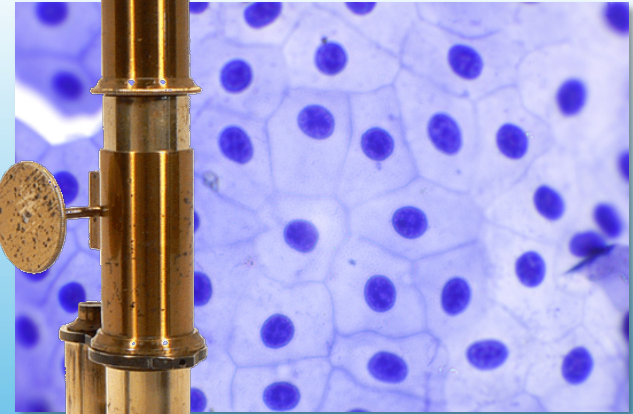
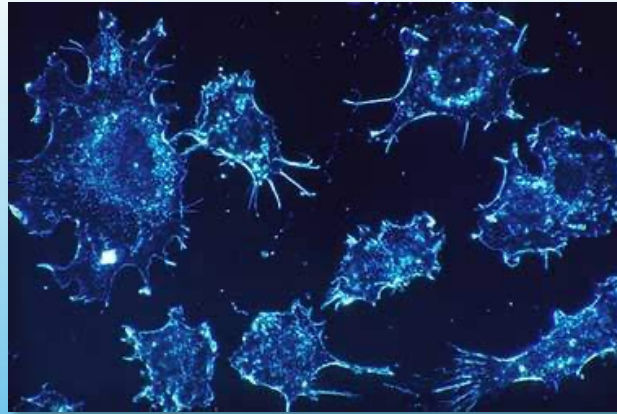
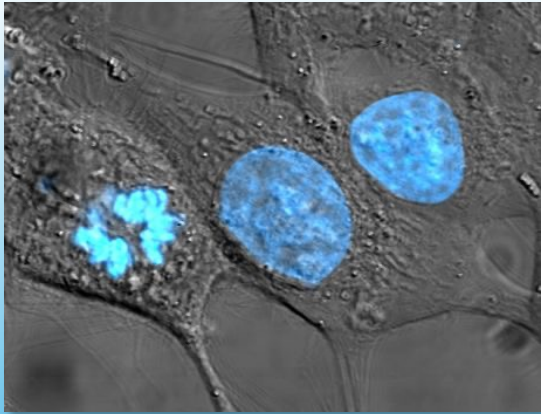


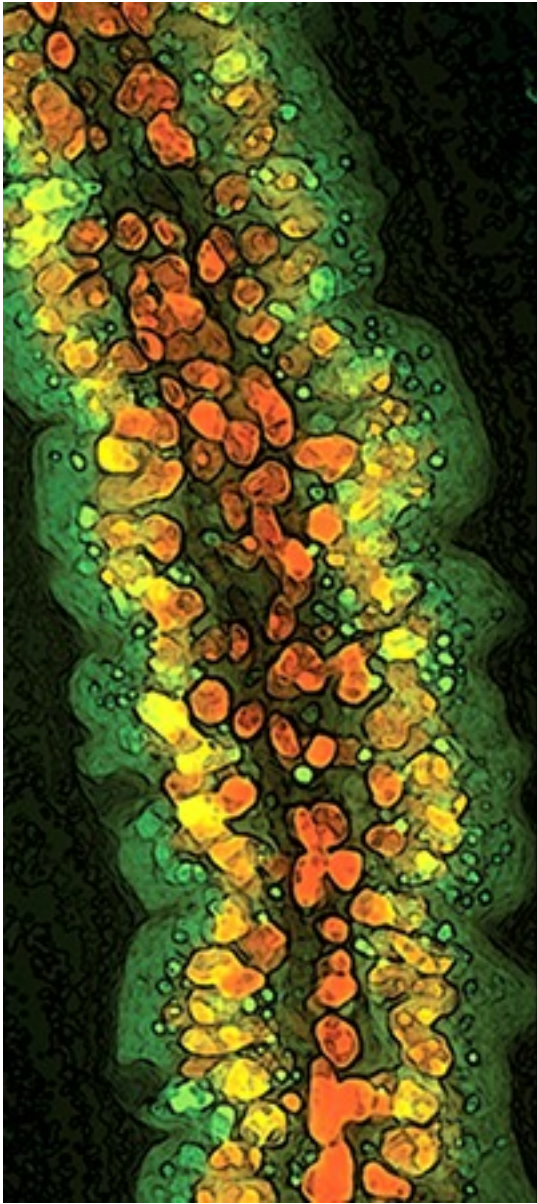
# Microscopie Photonique

## Principes et Applications

GUILLAUD Philippe – 2021

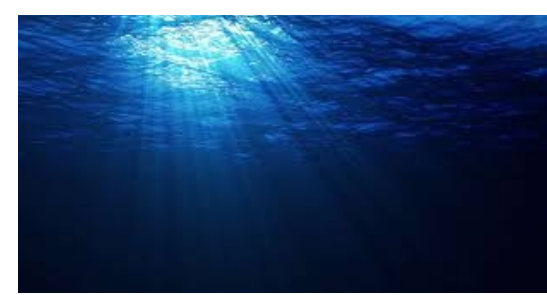


# Rappels



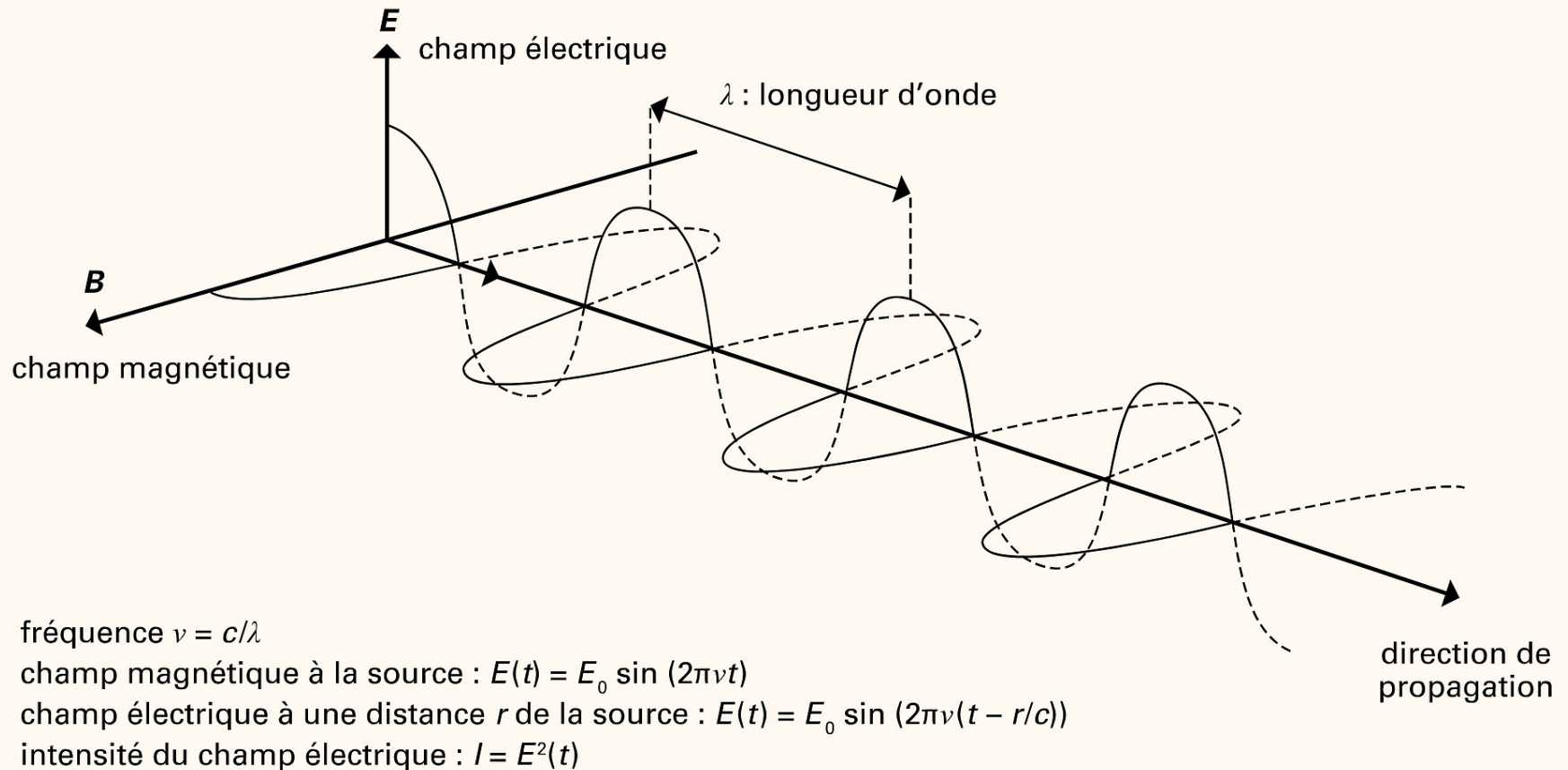


# La lumière



- La lumière est une **forme d'énergie** qui a les propriétés du **rayonnement électromagnétique**.
- La lumière est détectée par l'oeil et peut être également **détectée par ses effets thermiques, chimiques et électriques**.
- La lumière se propage par **ondes concentriques autour de la source émettrice**. L'énergie lumineuse **peut se propager dans le vide** sous forme de **vibrations dont le caractère dominant est d'être sinusoïdal**.
- Dans le vide, la **vitesse** de la lumière est de :  **$2,99792458 \cdot 10^8 \text{ m.s}^{-1}$  (#300 000 km/s)**.

# La lumière est une onde électromagnétique



Dans les constructions **d'optique géométrique**, seule l'onde électrique est prise en considération.

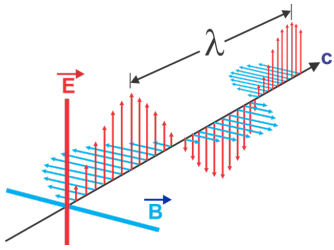
# Le photon, quanta de lumière

Le photon est une **particule de vitesse  $c$**  (*célérité*,  $c = 299792458\text{m.s}^{-1}$ ) et d'énergie :

$$E = h \nu$$

$h$  est la **constante de Planck** =  $6.626\ 0693 \cdot 10^{-34}$  J.s

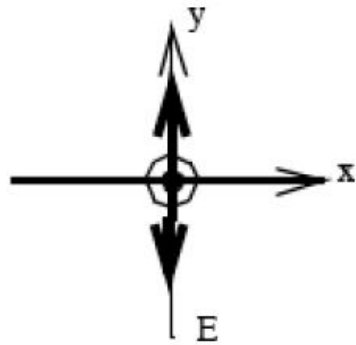
$\nu$  est la fréquence de l'onde associée



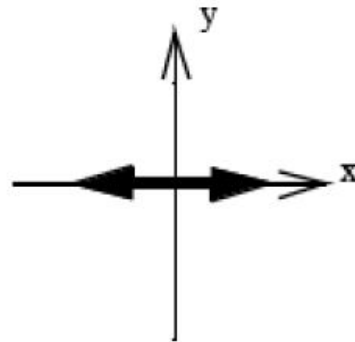
# Propriétés d'une onde électromagnétique

- **Longueur d'onde ( $\lambda$ )** : la longueur d'onde ( $\lambda$ ) est la distance parcourue par l'onde lumineuse durant un temps ( $T$ ) appelé **période**
- **Vitesse de propagation, notée  $c$  dans le vide**. Elle constitue la vitesse limite de tout objet matériel et elle est constante dans le vide quelque soit le référentiel (c'est une des constantes universelles). Sa valeur est de  $2,99792458 \cdot 10^8 \text{ m.s}^{-1}$
- **Polarisation** : c'est la façon dont évolue la **direction du champ électrique au cours de la propagation**. Elle peut être **linéaire, circulaire ou aléatoire** (dans ce cas, on parle d'onde non-polarisée).

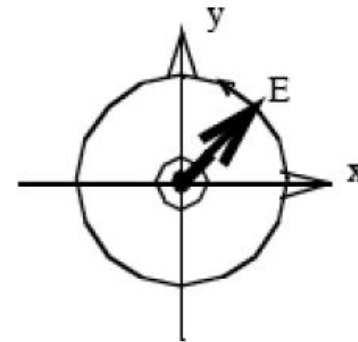
# Polarisation de la lumière



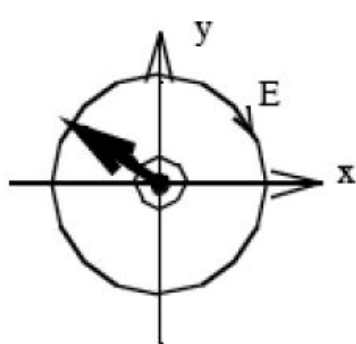
linear polarization  
y-direction



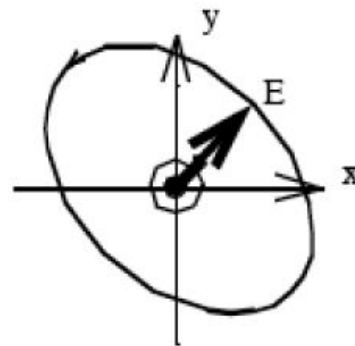
linear polarization  
x-direction



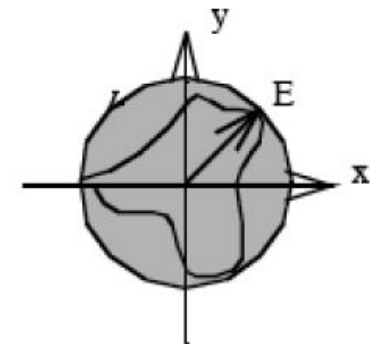
right circular  
polarization



left circular  
polarization



elliptical  
polarization



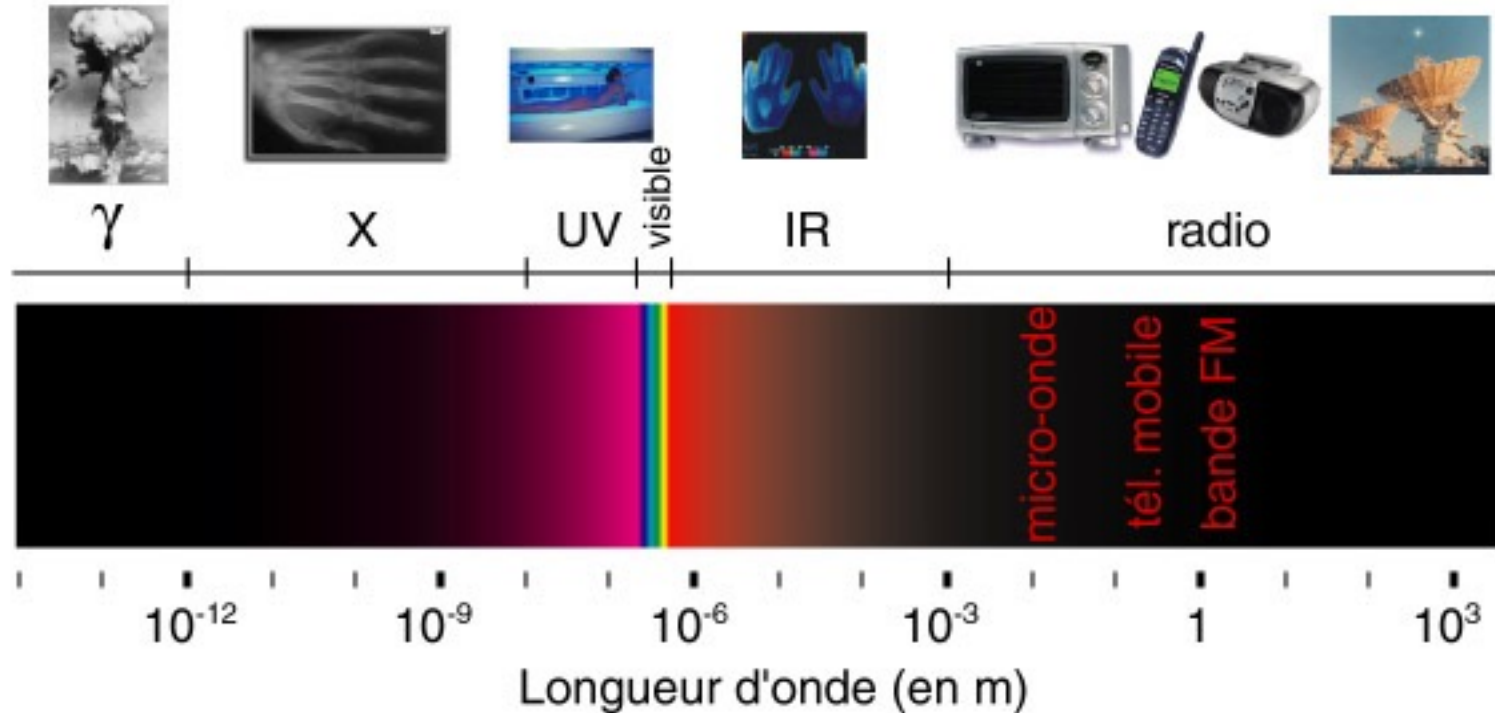
unpolarized  
(polarization-vector)  
fluctuates randomly

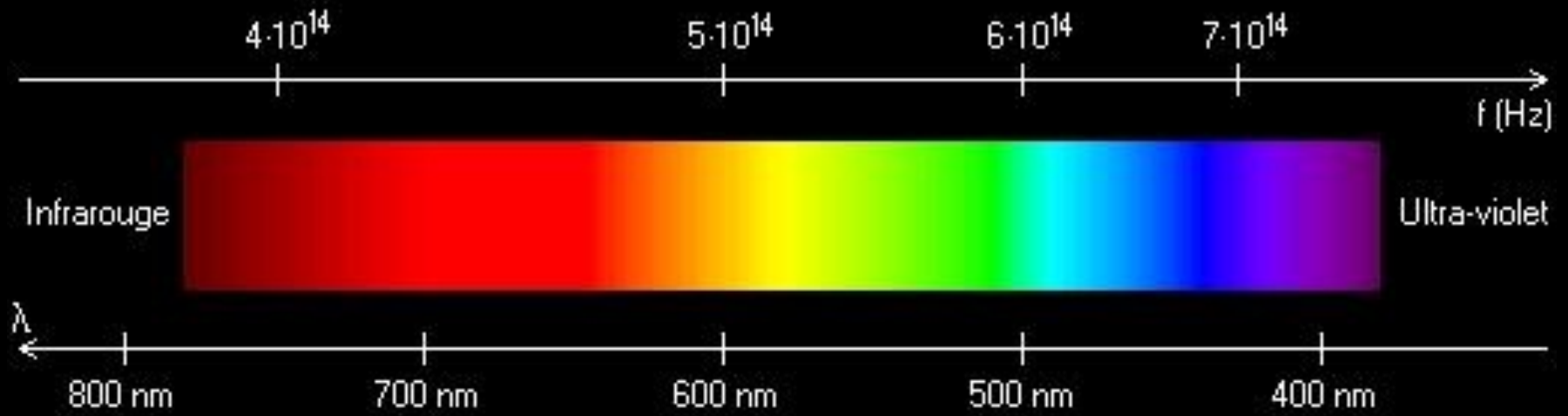
# Relations




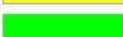




- La longueur d'onde ( $\lambda$ ) est la distance parcourue par l'onde lumineuse durant un temps (T) appelé période.
- On a les relations :
  - $\lambda = \text{Vitesse} \times \text{Période}$
  - $\text{Période} = 1 / \text{Fréquence}$
  - $\lambda = \text{Vitesse} / \text{Fréquence}$
- On utilise l'expression "lumière visible" pour désigner la partie du spectre électromagnétique comprise entre 400 et 760 nm.



# Spectre électromagnétique





Désignation	Couleur	Longueur d'onde (nm)	Fréquence (THz)
Rouge		~ 625 - 740	~ 480 - 405
Orange		~ 590 - 625	~ 510 - 480
Jaune		~ 565 - 590	~ 530 - 510
Vert		~ 520 - 565	~ 580 - 530
Cyan		~ 500 - 520	~ 600 - 580
Bleu		~ 450 - 500	~ 670 - 600
Indigo		~ 430 - 450	~ 700 - 670
Violet		~ 380 - 430	~ 790 - 700

# Interaction d'une onde lumineuse avec la matière - La réflexion

- Un faisceau lumineux qui rencontre une surface polie se réfléchit avec les propriétés suivantes (lois de la réflexion) :
  1. Le rayon incident, le rayon réfléchi et la normale sont dans un même plan.
  2. L'angle de réflexion est égal à l'angle d'incidence.

# Interaction d'une onde lumineuse avec la matière – La réfraction

- Lors de l'interaction de la lumière avec la matière, le milieu traversé peut être décrit par une propriété unique : **l'indice de réfraction**, noté  $n$ .
- La **vitesse de la lumière dépend de l'indice  $n$**  pour une longueur d'onde donnée suivant la formule suivante :

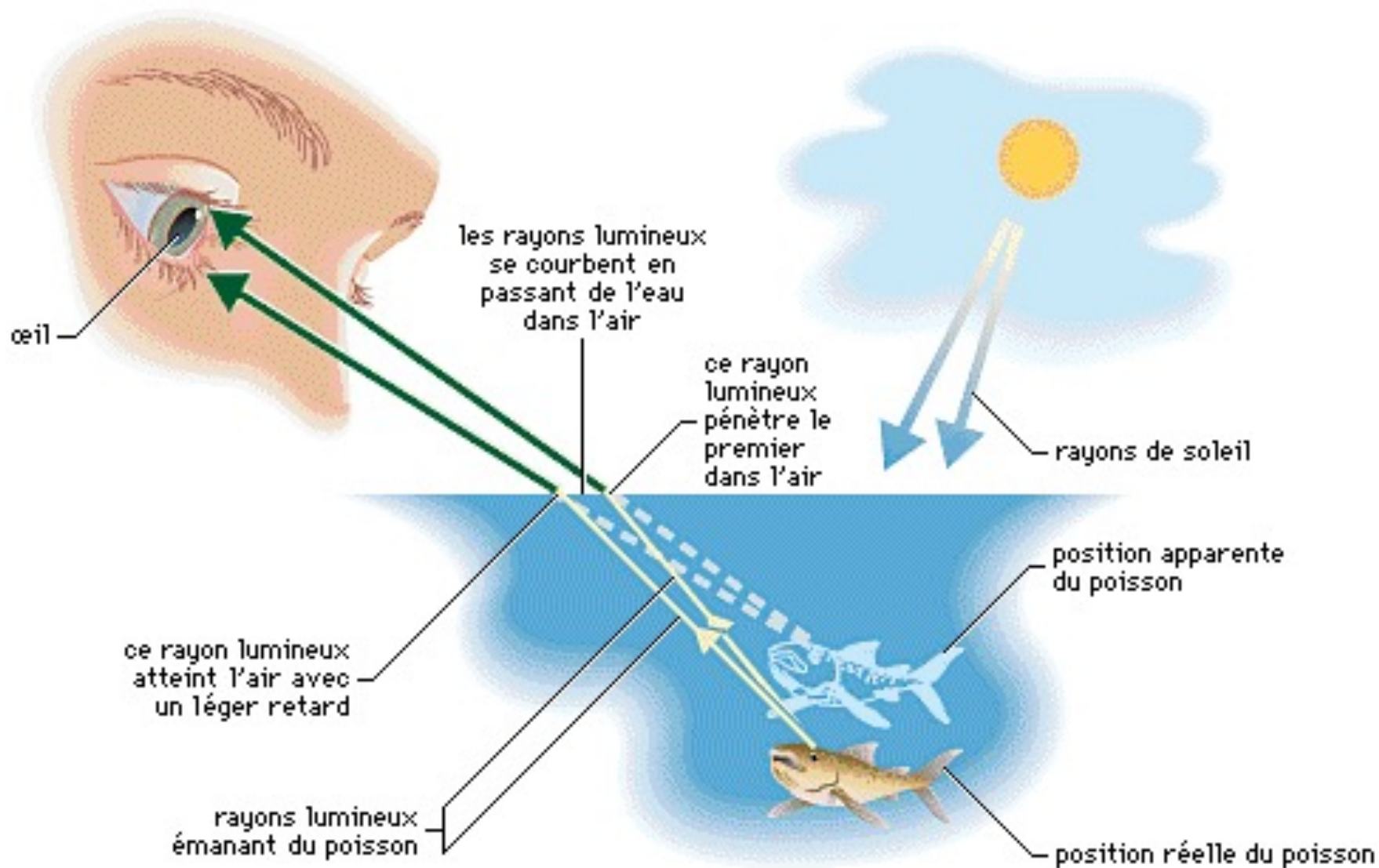
$$n = c / v$$

- L'indice  $n$  est toujours supérieur ou égal à 1 ( $n = 1,33$  pour l'eau,  $1,5$  pour le verre).

# La Réfraction - Définitions

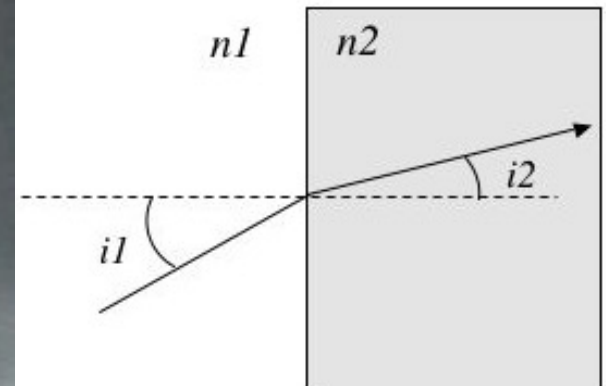
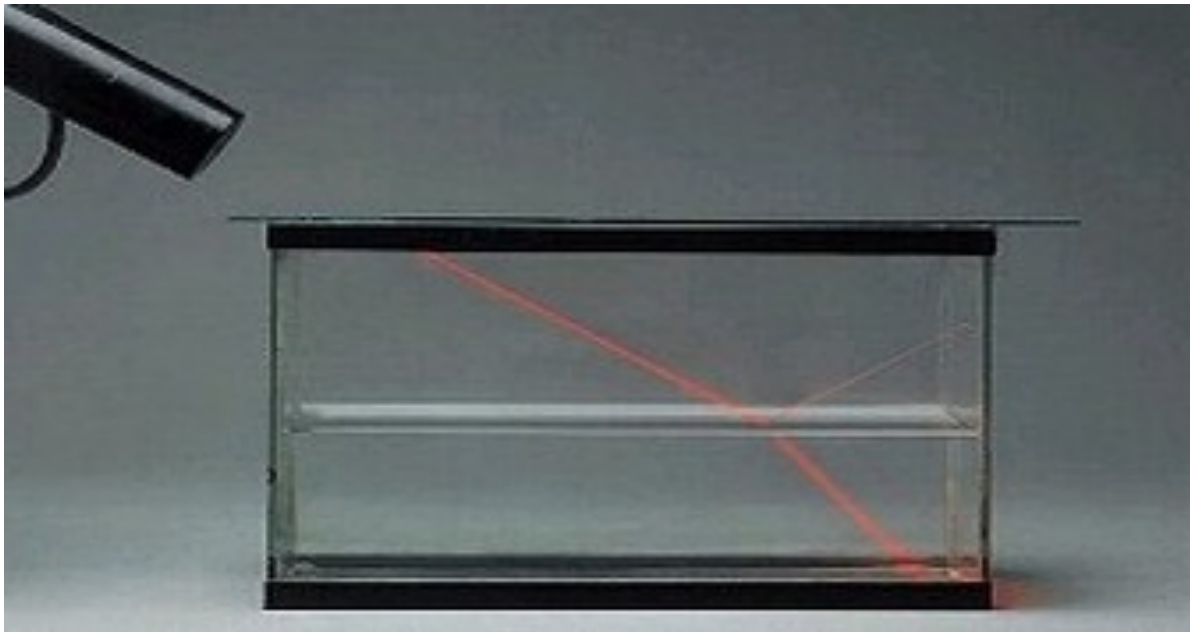
- La réfraction est un phénomène caractérisé par un **changement de direction de la lumière quand elle passe d'un milieu transparent à un autre**; ainsi, un faisceau lumineux qui rencontre la surface séparatrice de deux milieux donne naissance à un faisceau réfracté (une partie du faisceau subit une réflexion partielle).
- Dans le cas où la lumière va d'un milieu (1) vers un autre milieu (2) d'indice plus élevé ( $n_2 > n_1$ ), on peut observer le phénomène de **réfraction limite**.
- Dans le cas où la lumière va d'un milieu vers un autre milieu d'indice moins élevé ( $n_2 < n_1$ ) on peut observer les phénomènes **d'émergence rasante** et de **réflexion totale** suivant l'angle d'incidence.

# La réfraction - Exemple

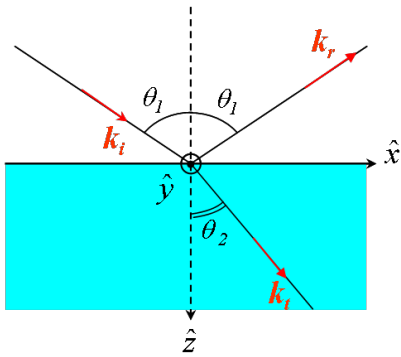


# La réfraction - Expérience

La réfraction apparaît lors du passage de la lumière d'un milieu d'indice  $n_1$  dans un milieu d'indice  $n_2$ . Le trajet de la lumière est alors dévié d'un angle qui dépend de l'angle d'incidence et du rapport des indices de réfraction des deux milieux, suivant la formule :  $n_1 \sin(i_1) = n_2 \sin(i_2)$



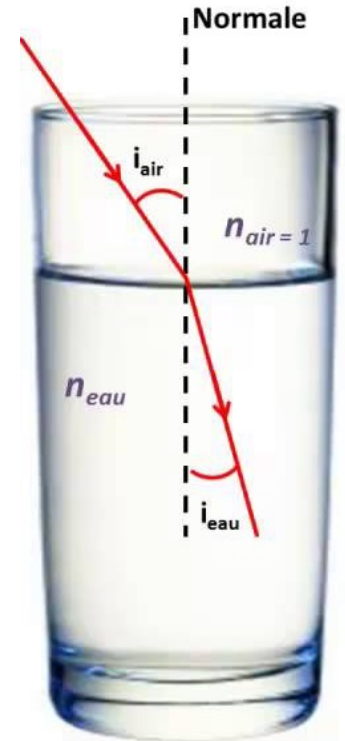
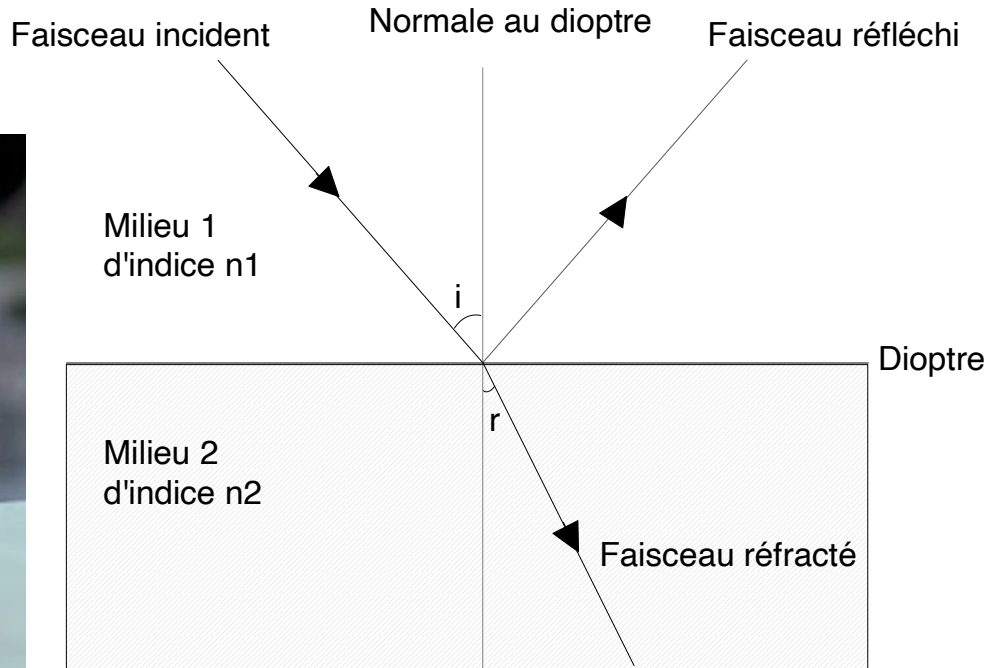
milieu d'incidence :  $n_1 = \sqrt{\epsilon_{r1}}$



milieu de transmission :  $n_2 = \sqrt{\epsilon_{r2}}$

# Loi de la réfraction

## (Loi de Snell-Descartes)



Lois de la réfraction:

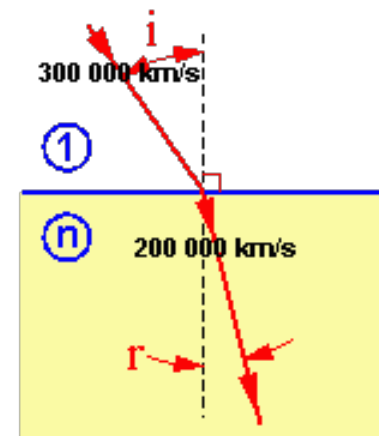
1. Le faisceau incident, le rayon réfracté et la normale au dioptré sont même plan.
2. Le sinus de l'angle d'incidence ( $i$ ) est dans un rapport constant avec celui de l'angle de réfraction ( $r$ ):

$$n_1 \cdot \sin(i) = n_2 \cdot \sin(r)$$



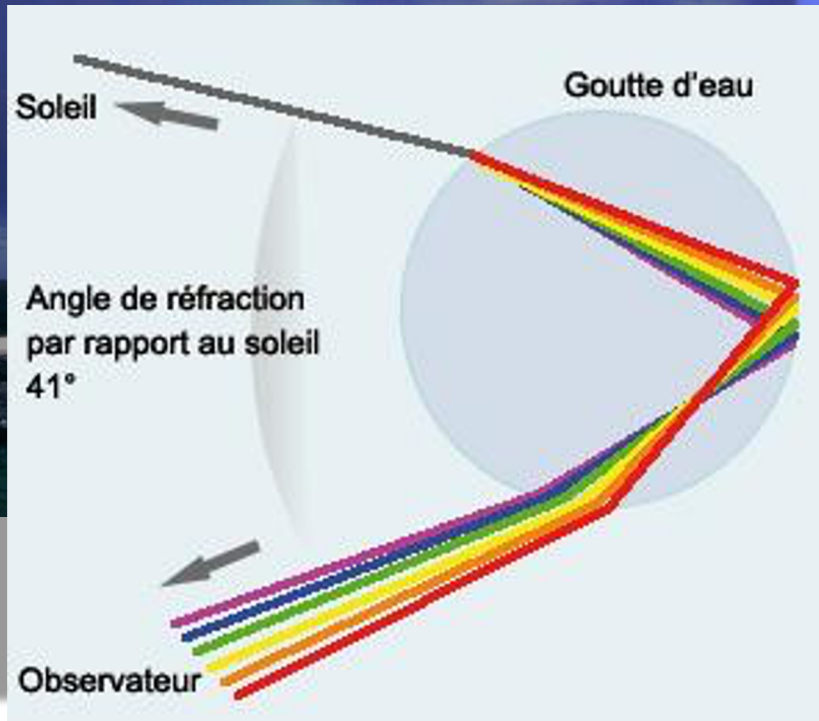
# Indice de réfraction

## Définition et exemples



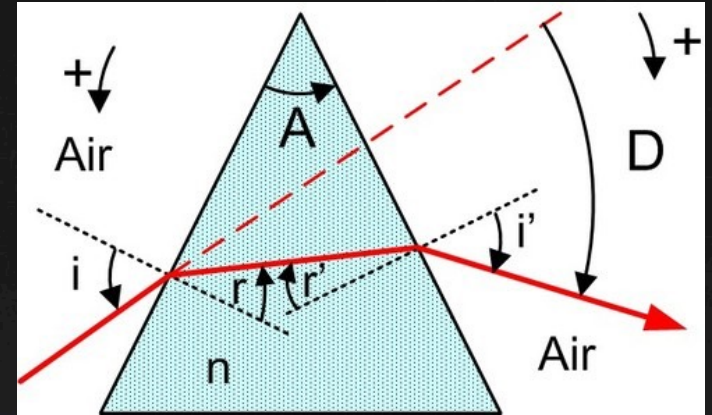
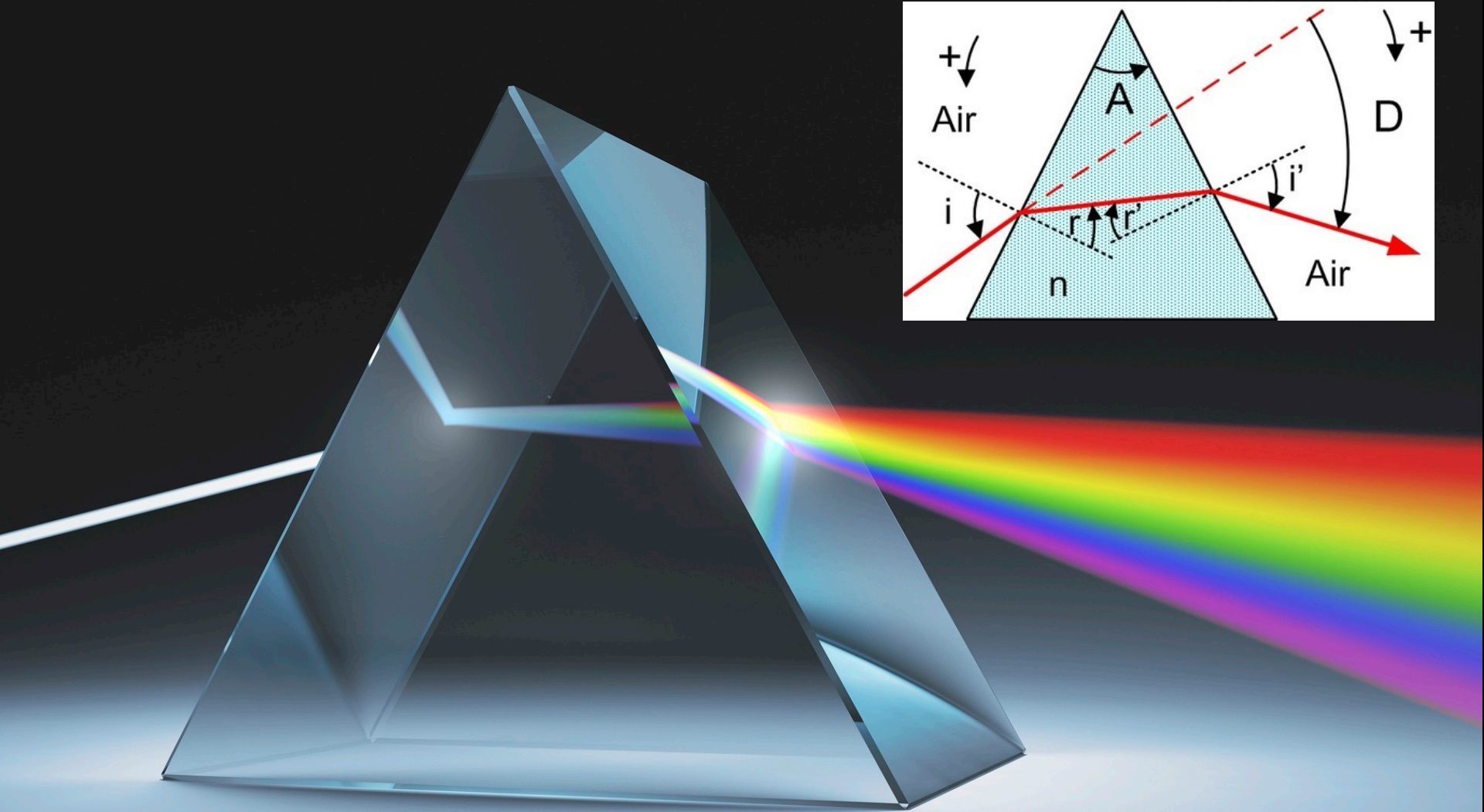
- Quand la lumière traverse des corps transparents, sa vitesse est plus ou moins freinée suivant la nature du milieu traversé, le rapport des vitesses dans le vide (300 000 km/s) et dans le corps traversé donne l'indice de réfraction du milieu (n).
  - Exemple : dans l'eau, la vitesse de la lumière est de 225 000 km/s, ce qui donne un indice de réfraction de l'eau de  $300\ 000 / 225\ 000 = 1,33$ .
  - Indices de réfraction de quelques milieux :
- |   |                      |                        |                 |
|---|----------------------|------------------------|-----------------|
| • | Indice de réfraction | de l'air               | = 1             |
| • | "                    | de l'eau               | = 1,33          |
| • | "                    | du glycérol            | = 1,47          |
| • | "                    | de l'huile à immersion | = 1,515         |
| • | "                    | du verre               | $1,4 < n < 1,9$ |
| • | "                    | du Baume du Canada     | = 1,528         |

# Réfraction et Dispersion



La réfraction varie en fonction de la longueur d'onde et il se produit ainsi une dispersion de la lumière blanche en ses composantes.

# Réfraction et dispersion de la lumière blanche par un prisme

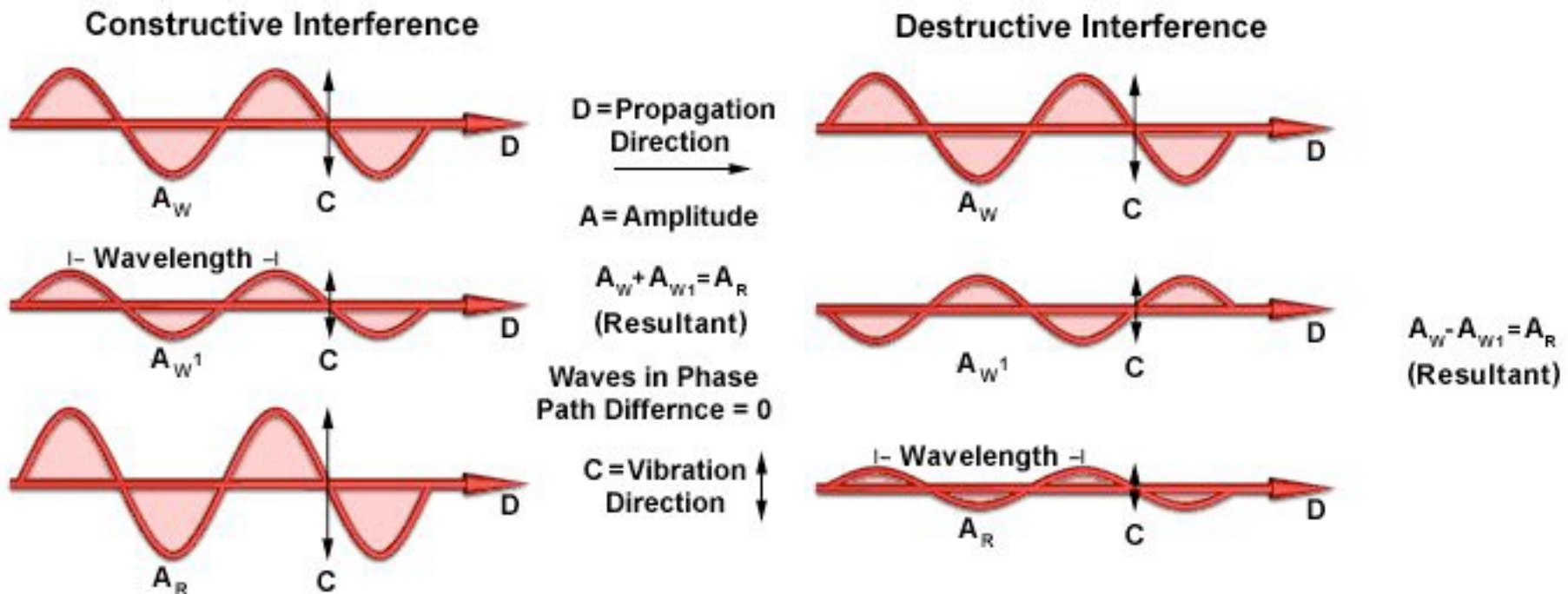


# Les interférences

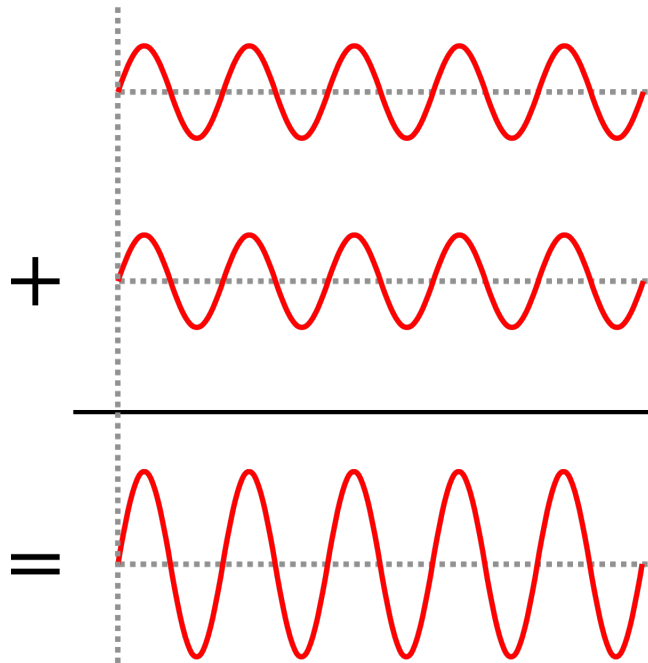
Chaque onde a une **phase**, c'est-à-dire que le champ électrique est à son maximum à un temps donné, a priori différent pour deux ondes différentes.

- Si deux ondes se superposent et qu'elles sont de phases identiques, leurs amplitudes vont s'additionner pour créer une onde unique avec une amplitude plus grande : c'est une **interférence constructive**.

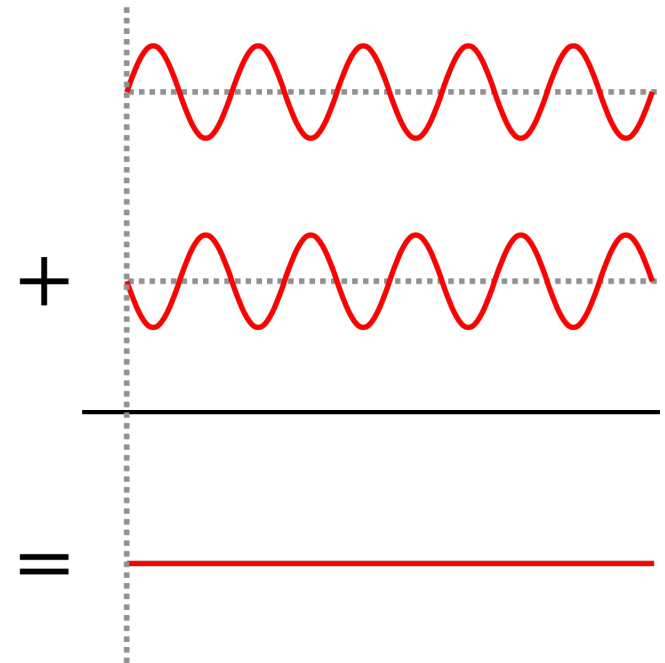
- A l'inverse, si les deux ondes sont en opposition de phase (l'une est à son maximum quand l'autre est à son minimum), l'onde résultante va avoir une amplitude plus faible, voire nulle : c'est une **interférence destructive**.

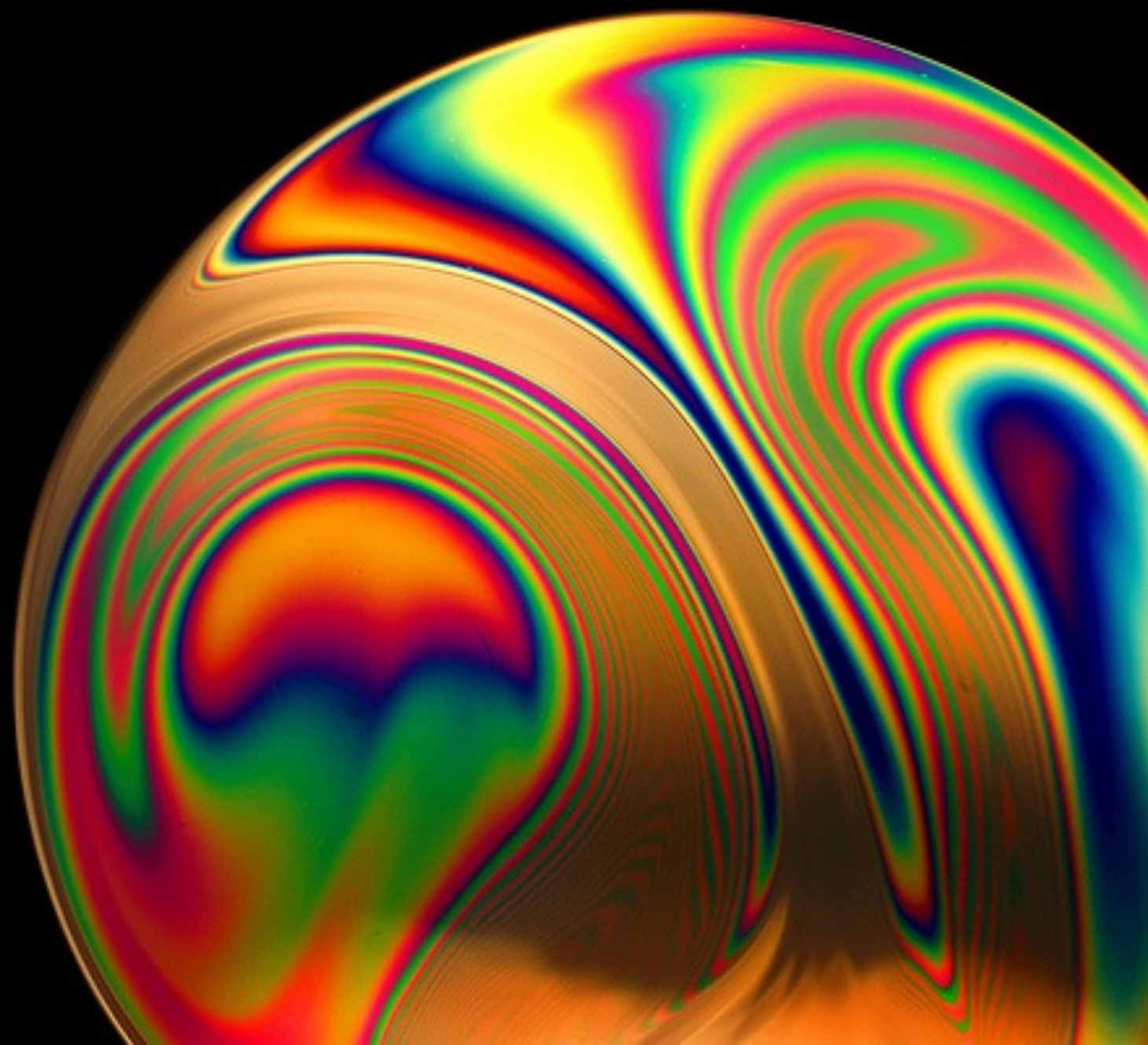


## Interférences constructives



## Interférences destructives







# La diffraction

- Phénomène se produisant quand des ondes, se propageant de manière rectiligne, franchissent une **ouverture suffisamment petite**: il semble qu'un **petit élément de l'onde incidente induise une onde circulaire**.
- L'ouverture angulaire ( $\Delta\alpha$ ) de l'onde diffractée est inversement proportionnelle à la dimension de l'ouverture ( $\Delta x$ );  $\lambda$  étant la longueur d'onde de l'onde incidente on a :

$$\Delta\alpha \cdot \Delta x \cong \lambda$$



# La diffraction

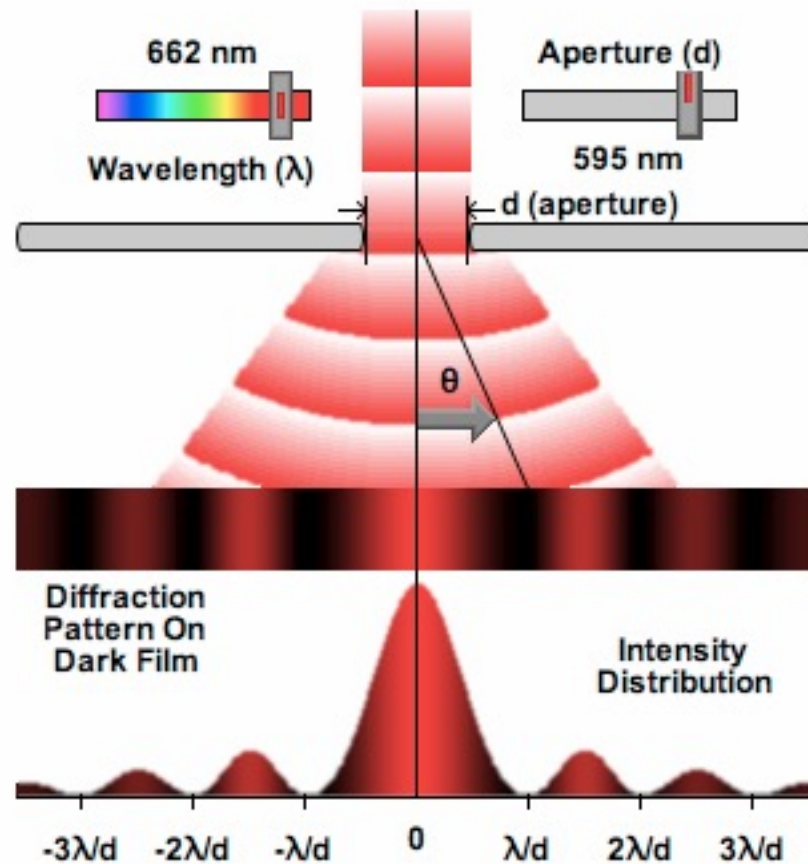
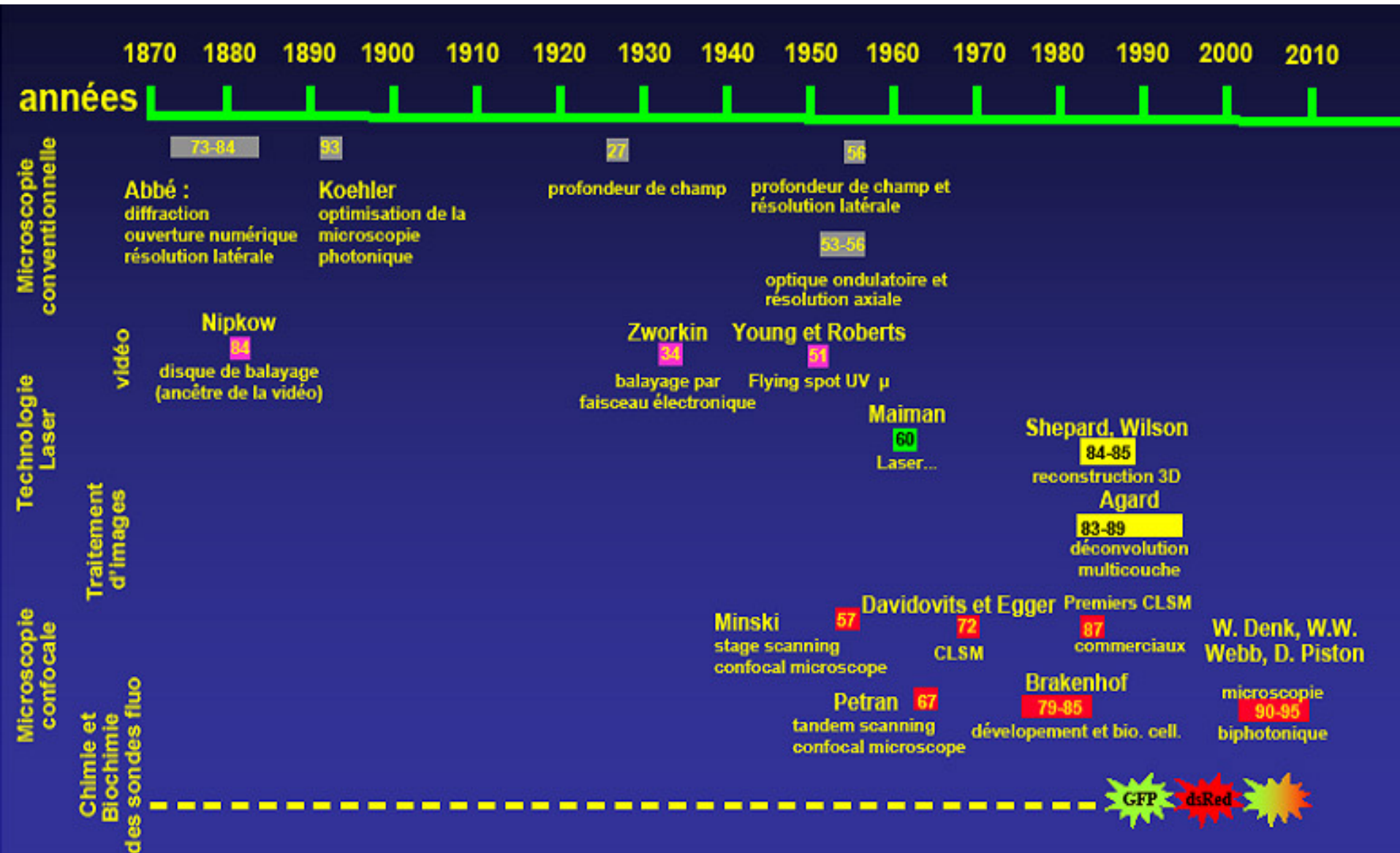


Figure de diffraction de la lumière passant par une fente fine. On obtient sur un écran une alternance de bandes claires et noires, centrées sur une bande claire correspondant à la projection de la fente elle-même.

# Microscopie photonique

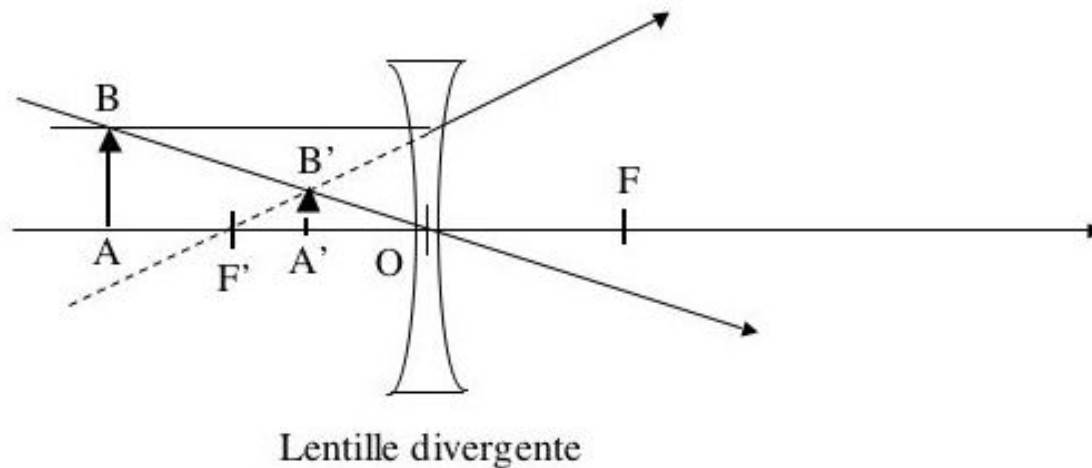
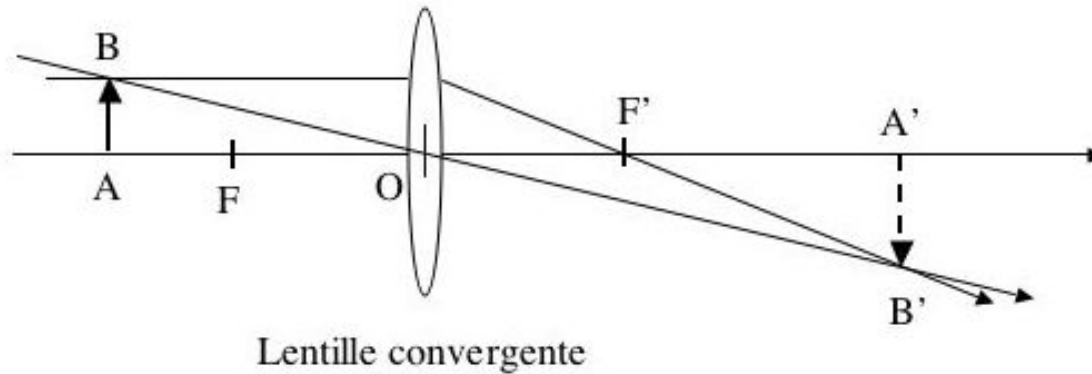


# Evolution des techniques de microscopie



# Les lentilles

Construction géométrique de l'image d'un objet par une lentille *convergente* ou *divergente*.

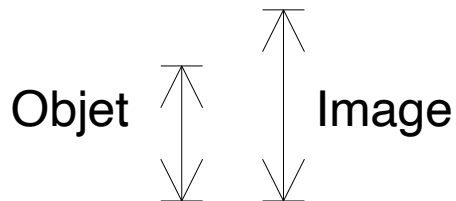
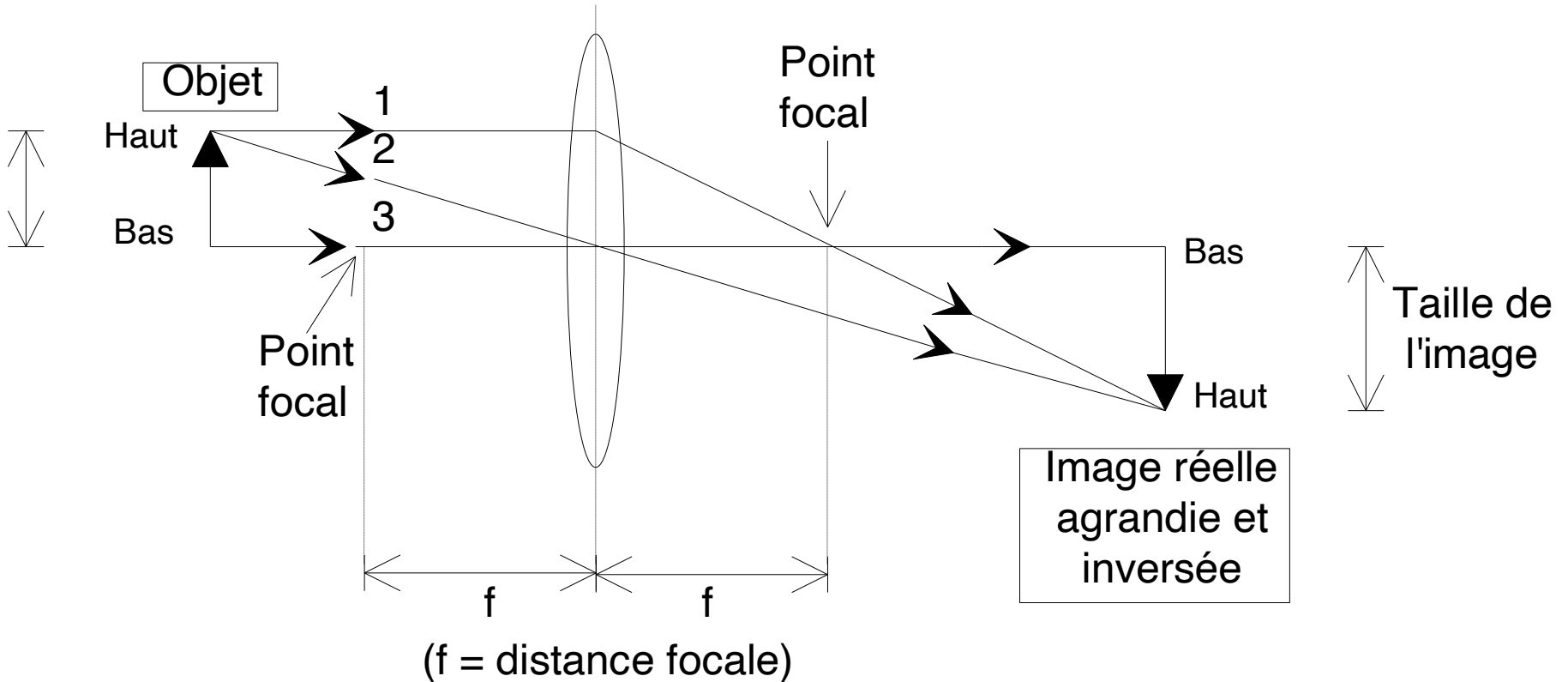


# Lentille convergente

- Une **lentille convergente focalise la lumière** suivant le schéma suivant : la lumière provenant du sommet de l'objet est focalisée de telle manière que le rayon 1 parallèle au rayon 3 provenant du bas de l'objet passe par un point appelé **point focal (ou foyer) à une distance  $f$  de l'autre côté de la lentille ( $f = \text{distance focale}$ )**; la lumière passant au centre de la lentille (rayon 2) n'est pas modifiée. **Une image est formée au point où les deux rayons 1 et 2 se rencontrent.** Dans la figure ci-dessous, le rayon 3 provenant du bas de l'objet passe par le centre de la lentille est n'est pas affecté. **La résultante est une image agrandie et inversée.**

# Lentille convergente

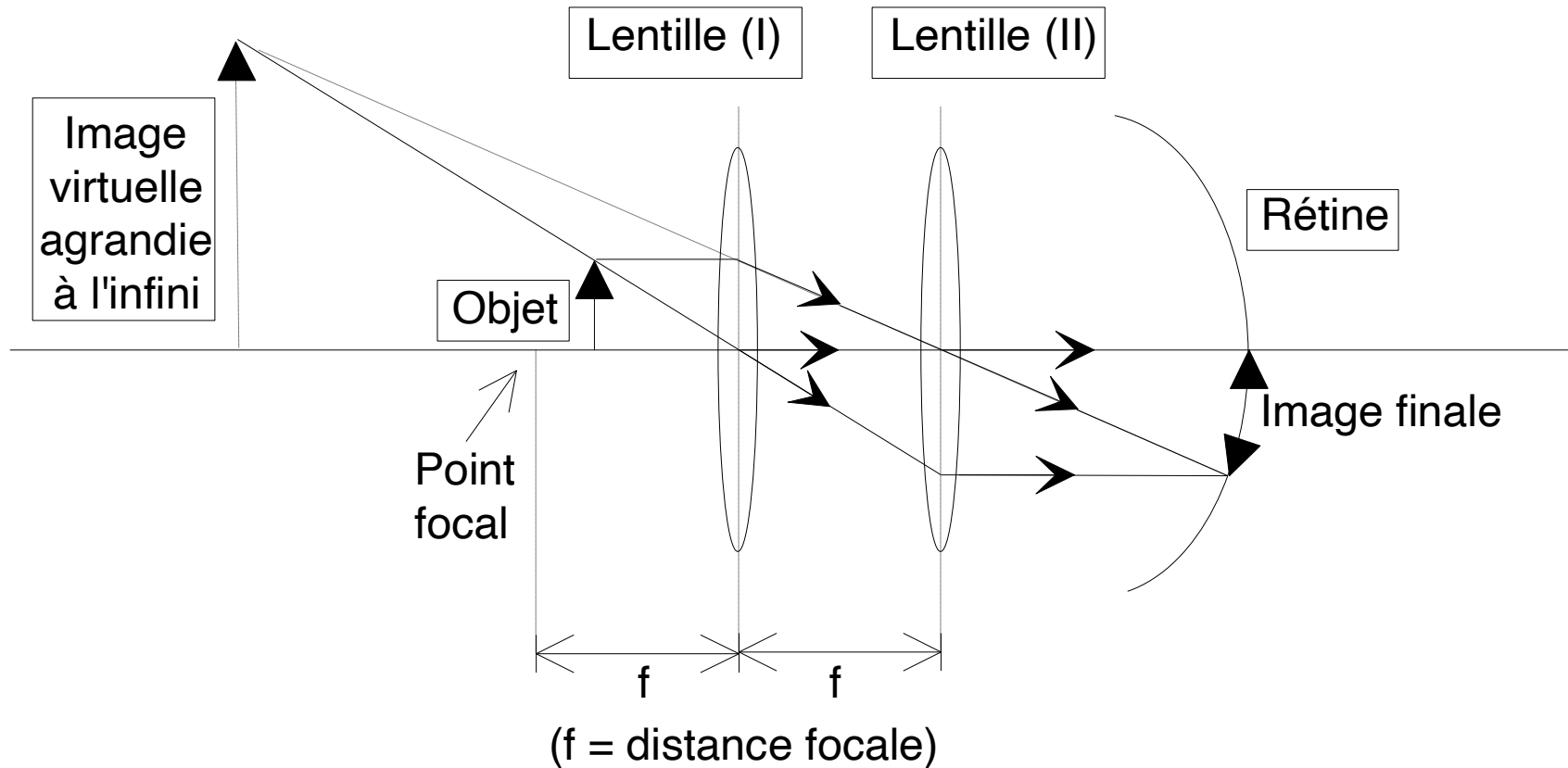
Lentille convergente



# Lentille convergente

- La manière dont une lentille convergente agrandit un objet dépend de la position de l'objet par rapport au point focal de la lentille:
  - si l'objet est placé au-delà du point focal de la lentille, le résultat est une image agrandie et inversée appelée image réelle (c'est une image qui peut être projetée sur un écran ou photographiée)
  - si l'objet est placé entre le point focal et la lentille, les rayons ne convergent plus mais divergent. Une image peut être formée en utilisant une seconde lentille convexe (II), dans ce cas, l'image formée apparaît du même côté de la lentille (I) que l'objet; elle est agrandie et dans le même sens que l'objet. Cette image est dite 'à l'infini' ce qui signifie qu'elle peut-être vue par un œil relaxé (rétine) comme quand on regarde un objet éloigné. Dans cette figure, la lentille II peut-être le cristallin de l'œil (Figure 3).

# Lentille convergente



L'utilisation de deux lentilles permet d'augmenter le grossissement

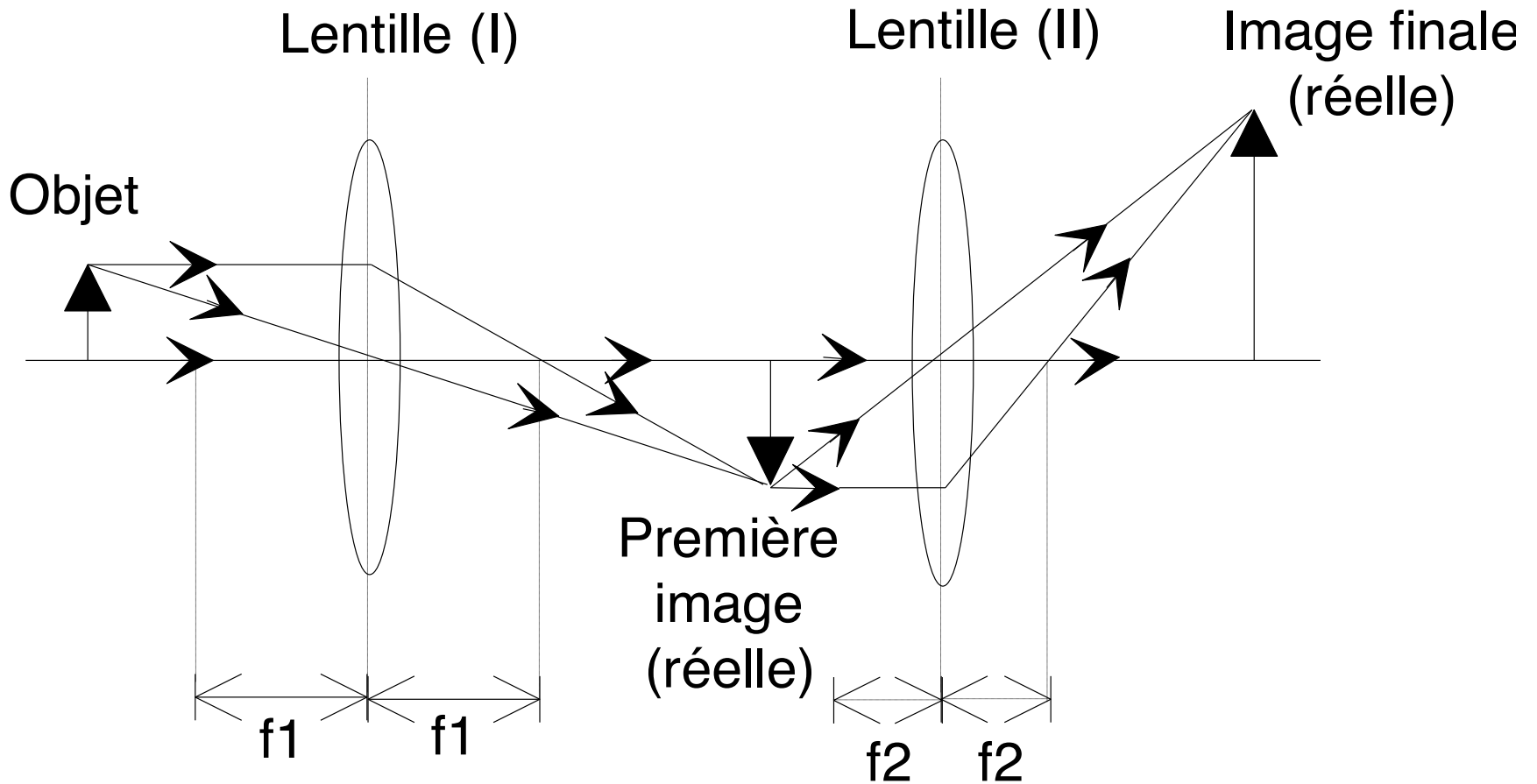


# Lentille convergente

- On peut utiliser deux lentilles combinées pour produire un grossissement plus important mais en plaçant cette fois l'objet au-delà du point focal. Le résultat est une image réelle, grossie et dans la même orientation que l'objet.

# Lentille convergente

Grossissement par deux lentilles convergentes combinées

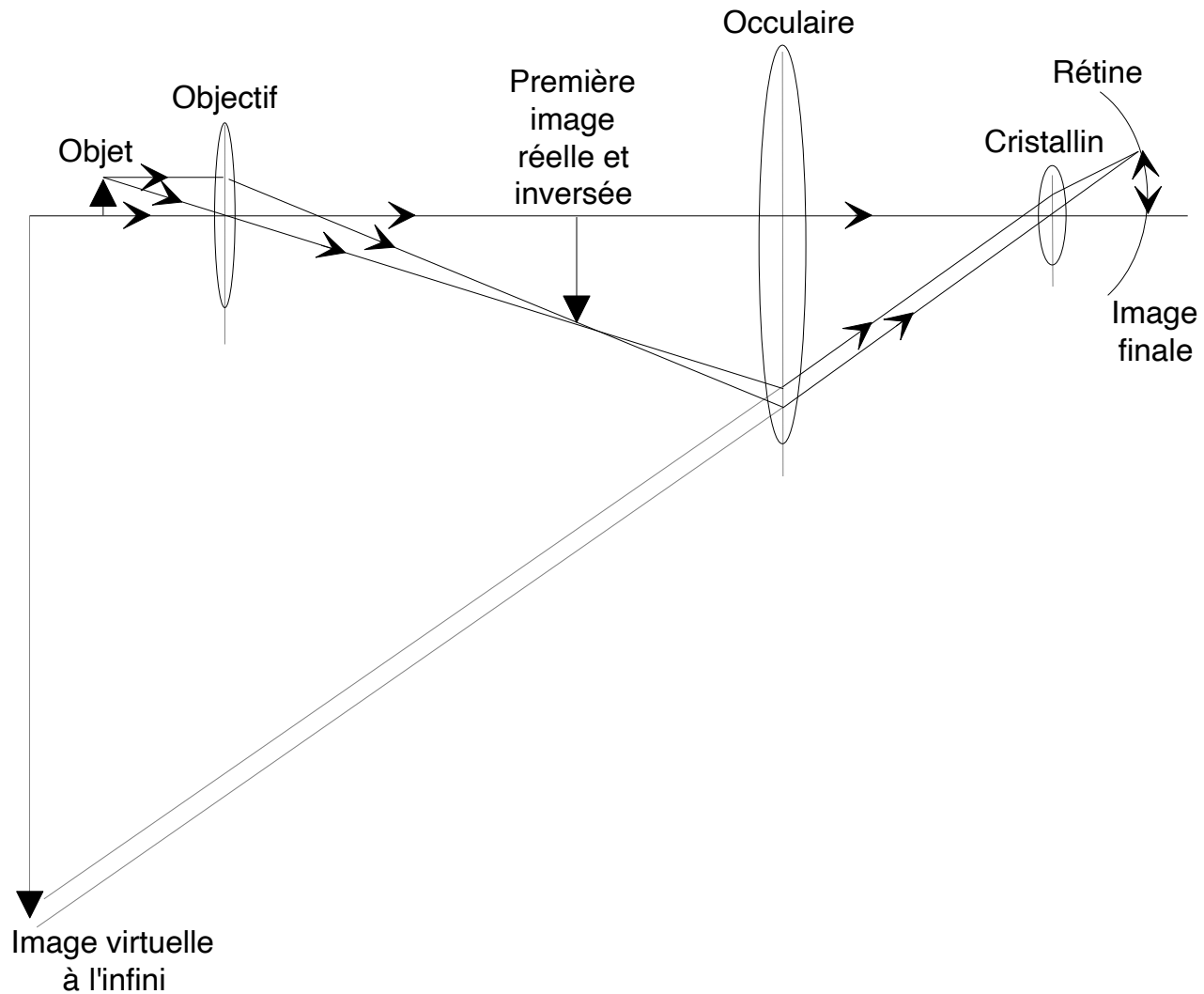


# Principe du microscope

Un microscope peut-être vu comme deux lentilles convergentes :

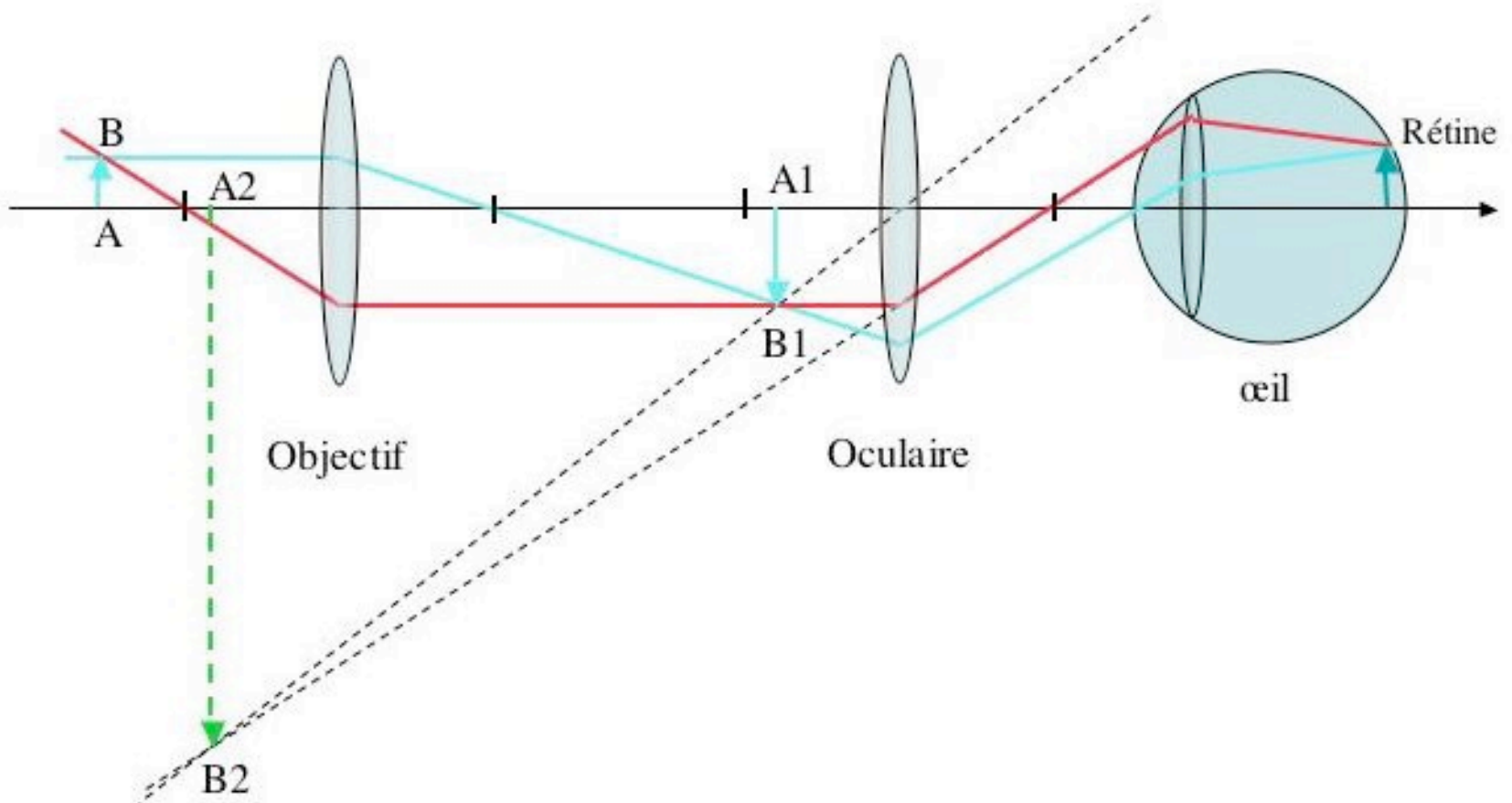
- la première produit une image réelle grossie et inversée
- la seconde produit une image virtuelle de la première image
- cette image virtuelle est focalisée par l'œil pour donner une image virtuelle très agrandie à l'infini

# Principe du microscope

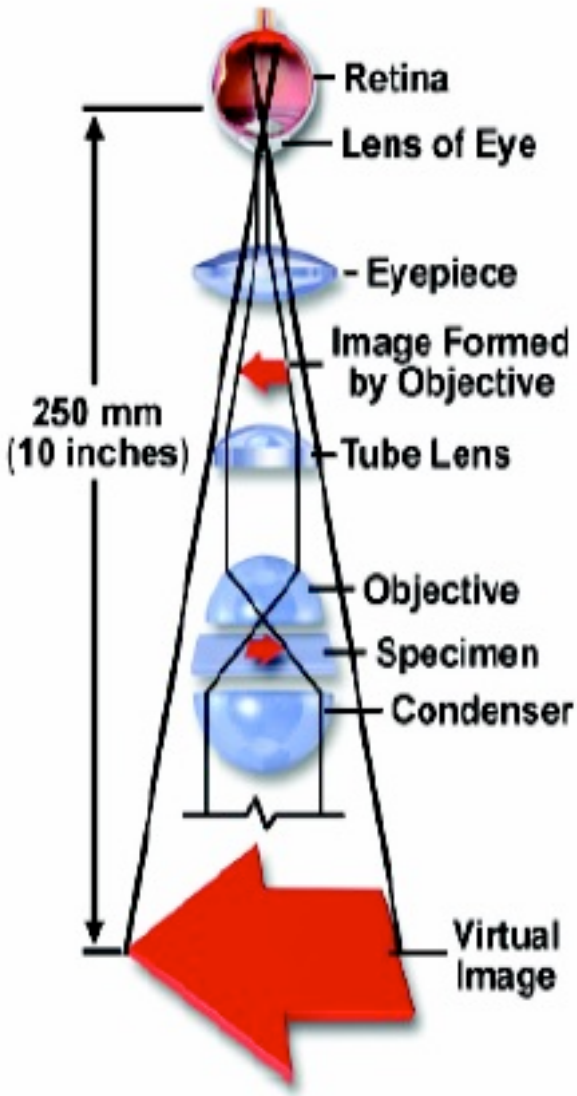


# Principe du microscope optique

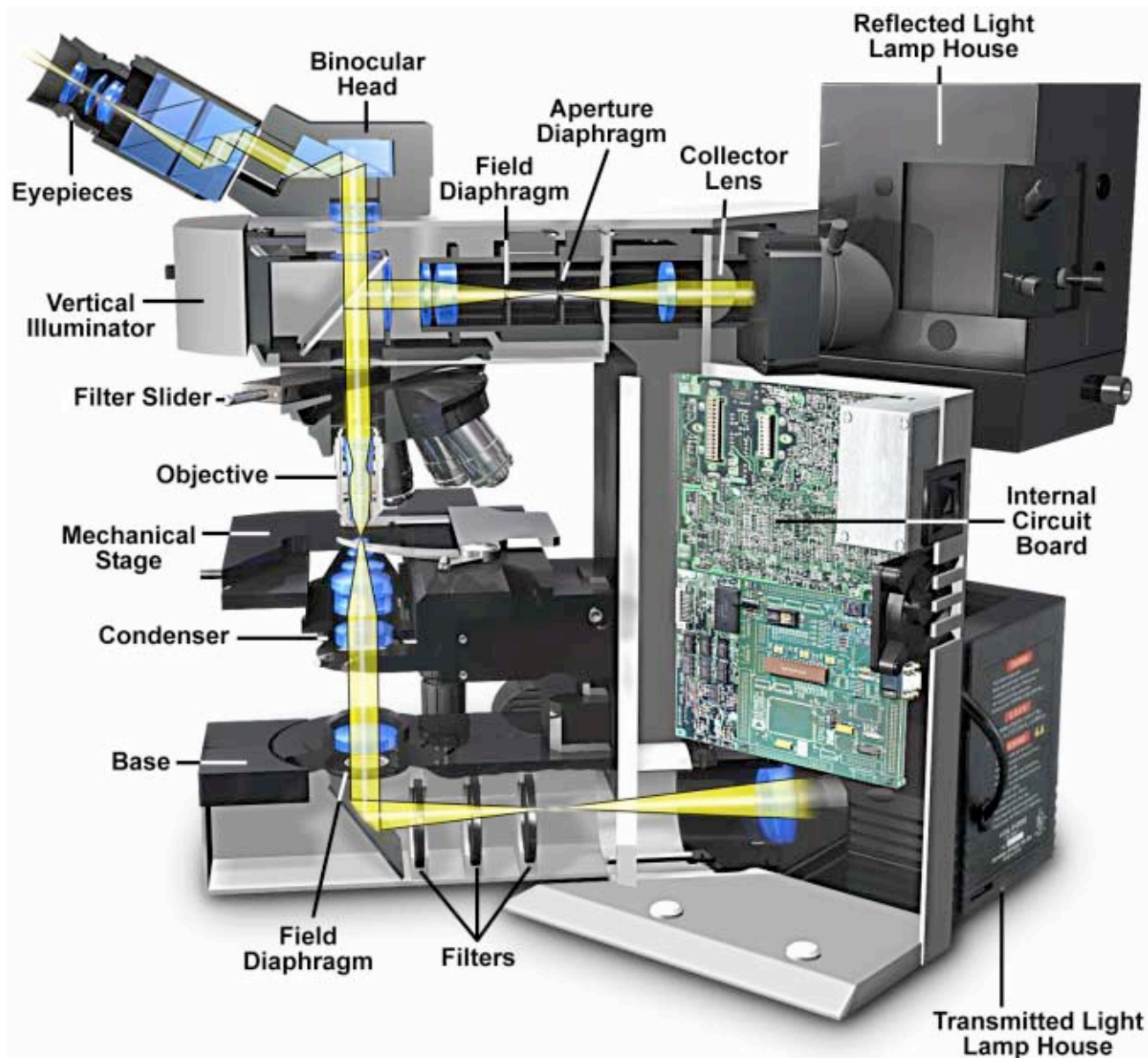
L'objectif donne de l'objet AB observé une image réelle A1B1 renversée et très agrandie qui joue pour l'oculaire le rôle d'objet réel. L'oculaire donne de cet objet une image virtuelle A2B2 agrandie, vue par l'observateur : l'oculaire est utilisé comme une loupe. Enfin, l'œil forme une image de l'objet A2B2 sur la rétine.

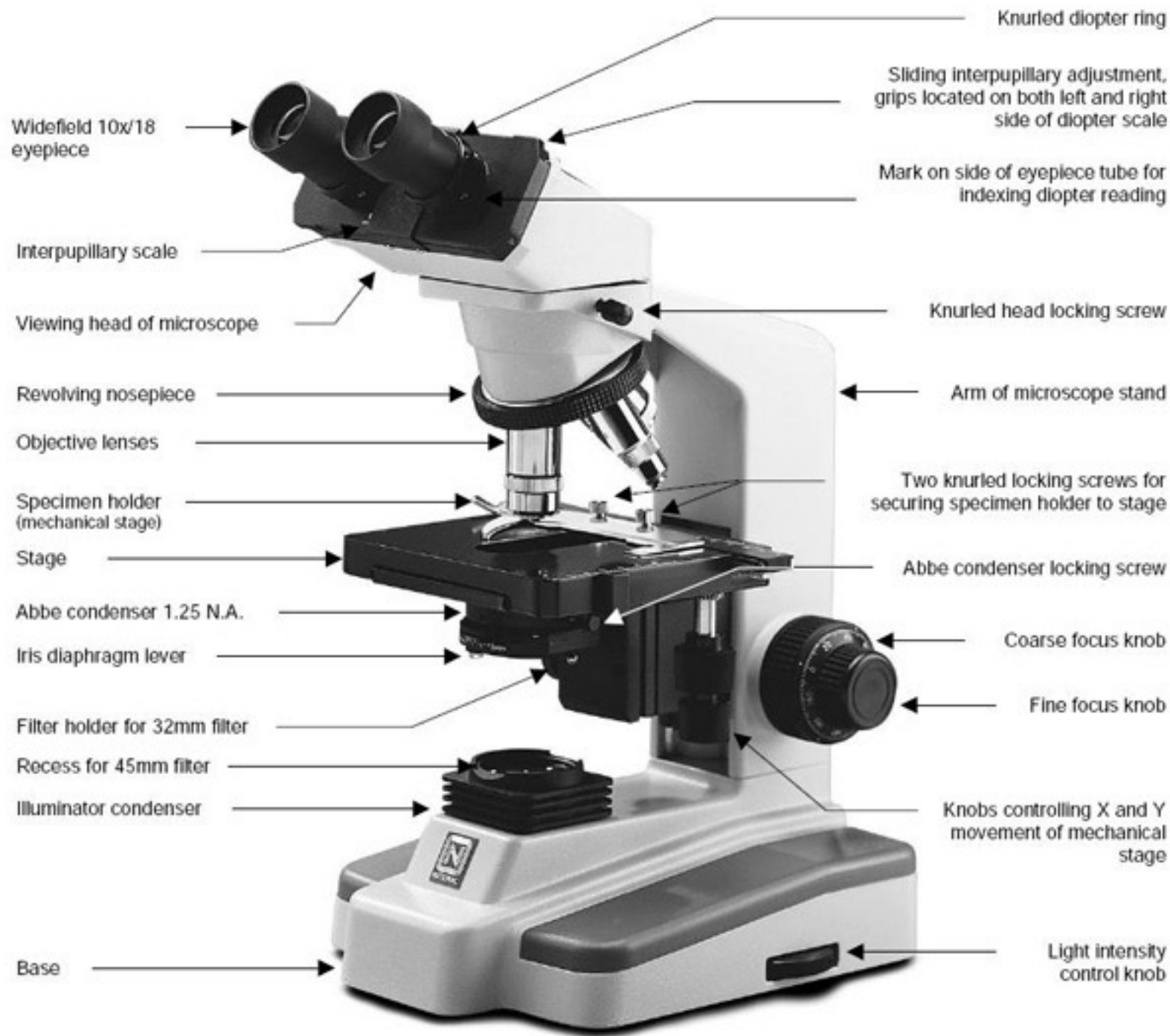


# Principe du microscope optique



# Schéma d'un microscope













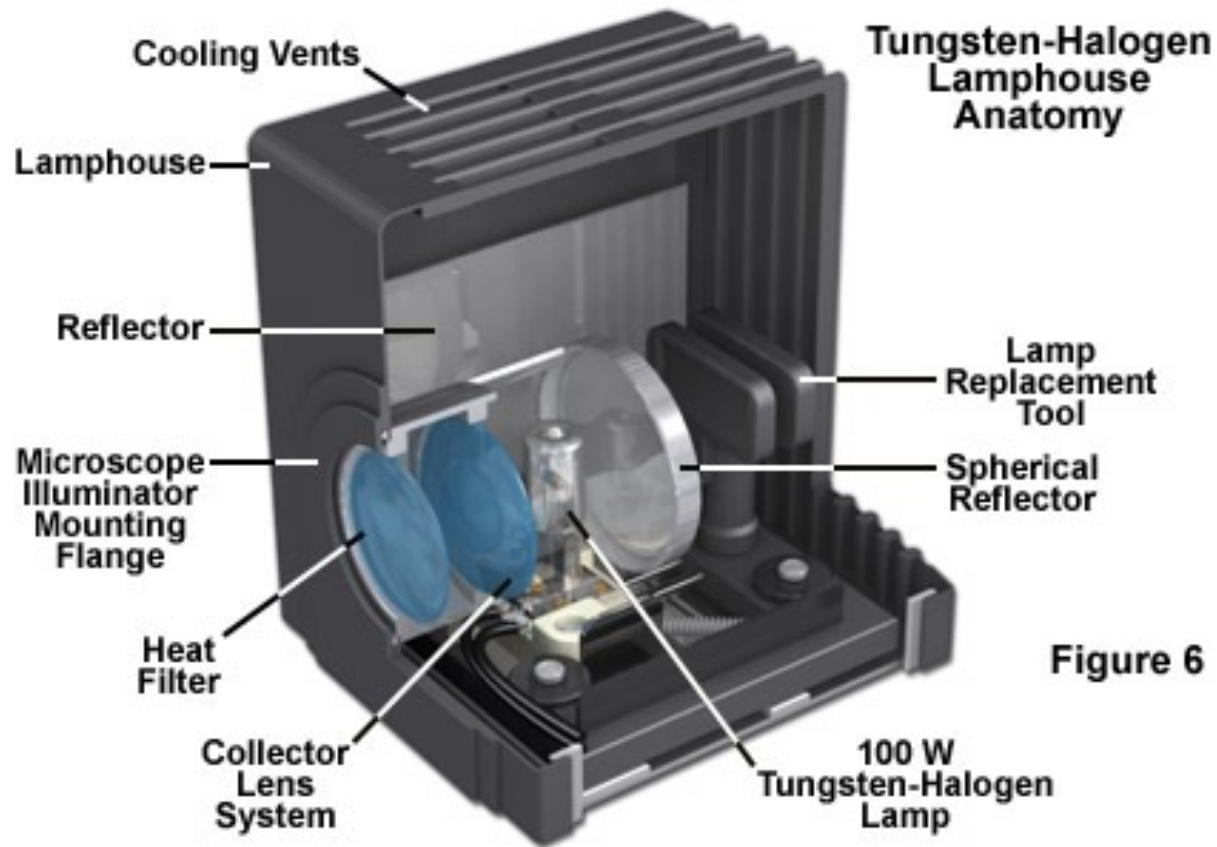
Leica DMI6000 B Light Path



Zeiss ApoTome 2

# Sources lumineuses

- Lampe halogène



# Condenseur

Achromat/Aplanat Condenser (Numerical Aperture = 1.38)

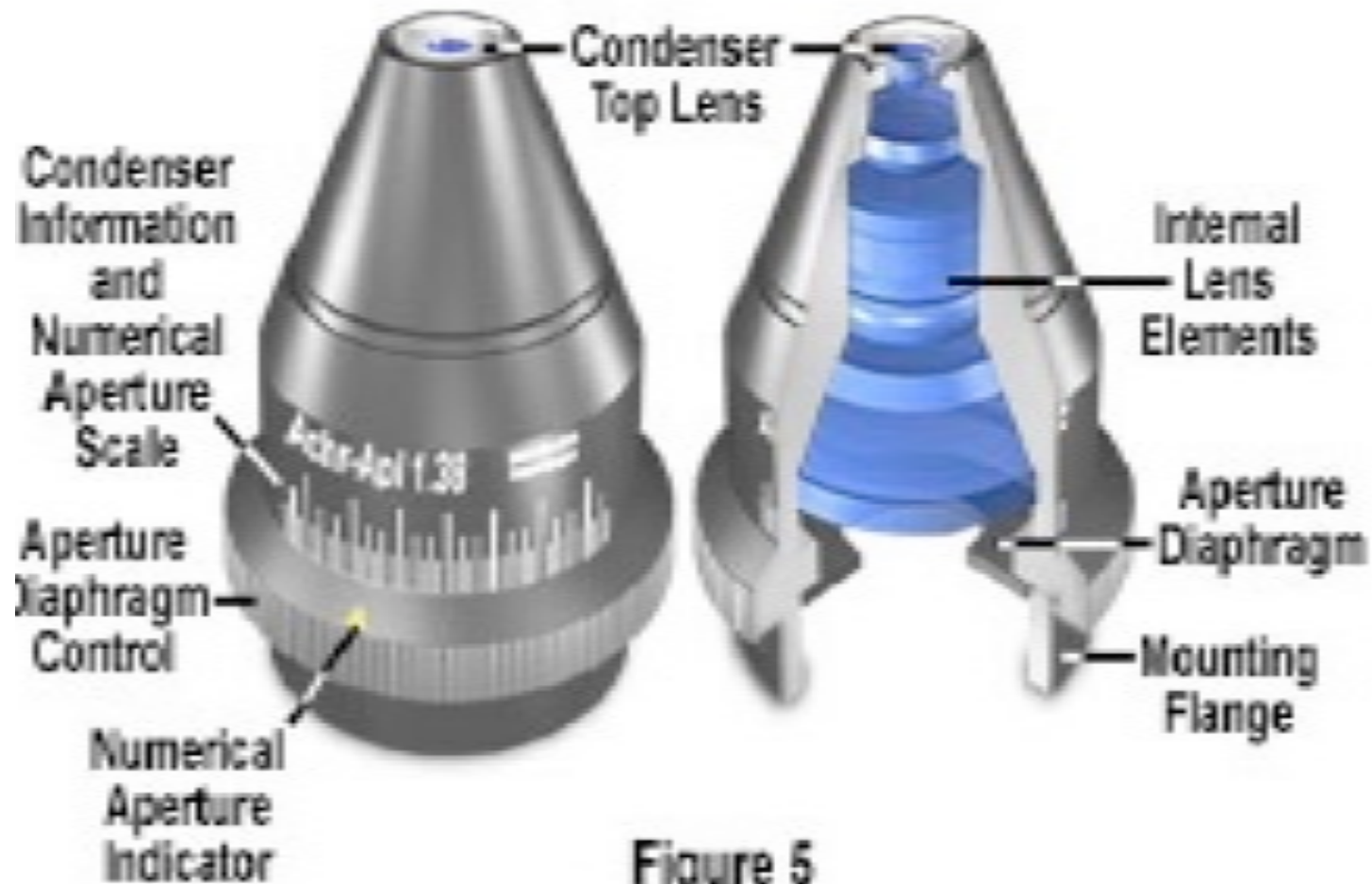


Figure 5

# Objectif



# Oculaire

## Aberration-Free 10x Eyepiece With Diopter Adjustment

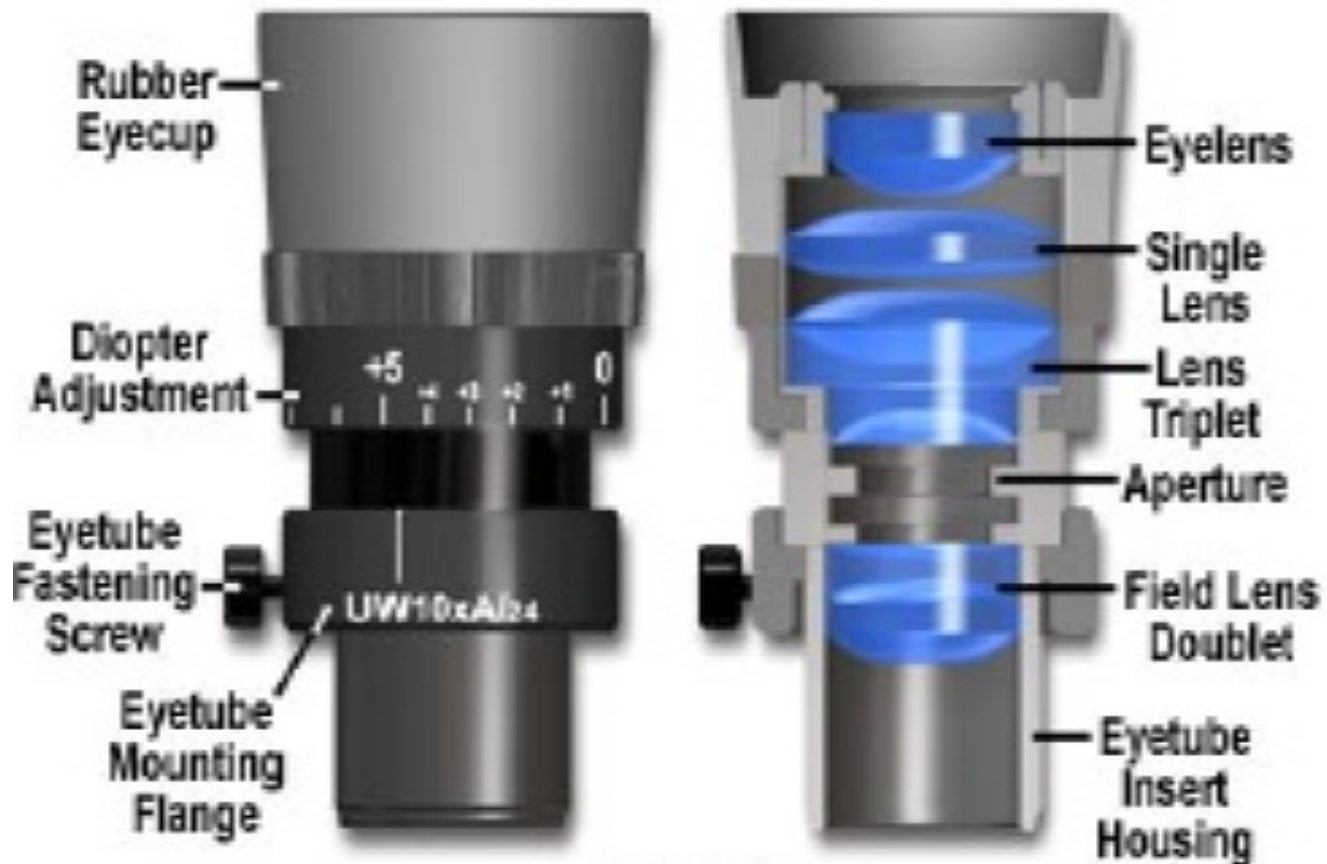
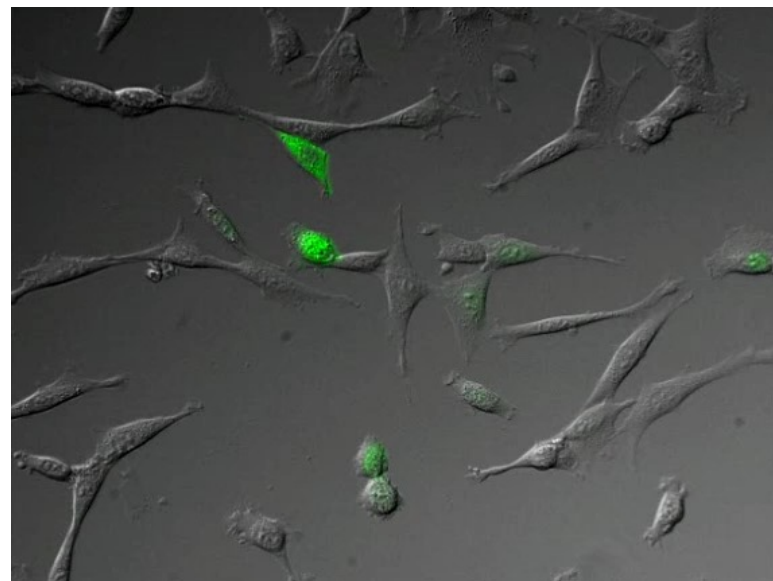
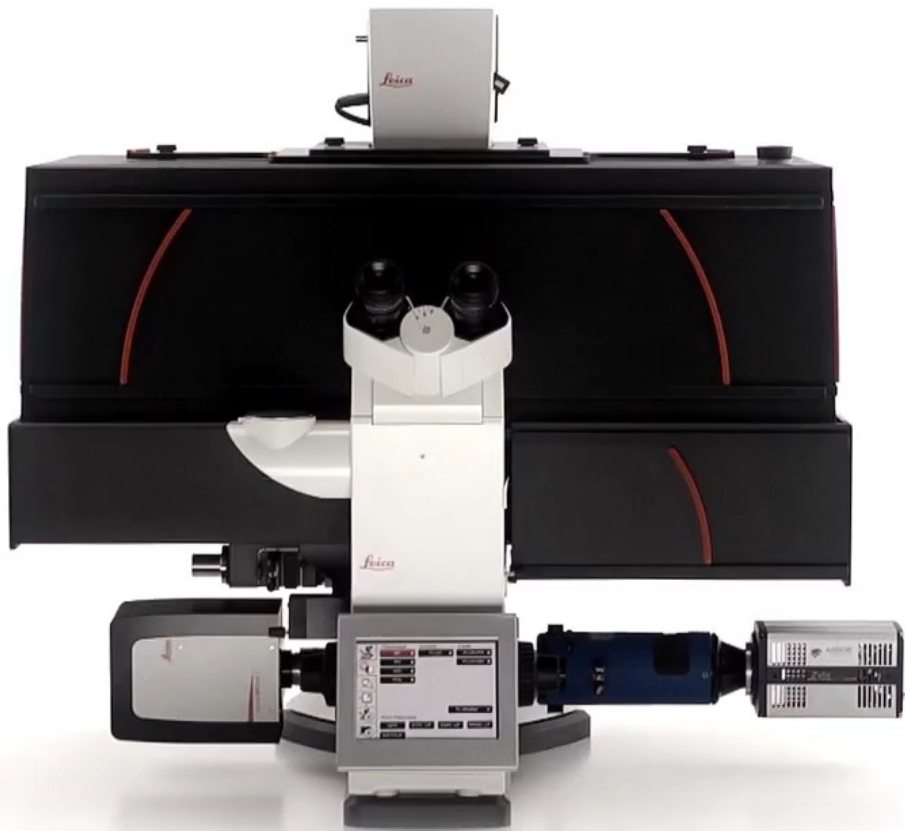


Figure 1





The Leica DM6 B Upright Microscope includes the Leica DFC7000 T Camera and LAS X Software.



# L'image

- Lorsqu'une personne affirme qu'elle voit un objet, cela signifie que la lumière provenant de cet objet provoque sur sa rétine un ensemble de sensations lui permettant de reconnaître et d'identifier cet objet.
- On peut considérer qu'un objet est constitué d'une multitude de points qui envoient de la lumière dans toutes les directions. Cette lumière transporte les informations nécessaires à l'identification de l'objet: positions respectives des points, couleurs, évolutions des formes dans le temps, etc. Au lieu d'être direct, ce transport d'informations peut être relayé par une image: photographie, image de télévision, image donnée par un miroir, un périscope, une loupe, un microscope ou une lunette astronomique.
- Une image peut être déformée, grossie ou réduite.
- Comme l'objet, l'image se regarde: ses différents points envoient de la lumière qui est perçue par l'œil.

# Microscopie Photonique

- Ernst Abbe (1840-1905) : théorie de la formation de l'image microscopique (1872)
- La diffraction de la lumière par l'échantillon et par la lentille de l'objectif détermine la résolution
- Défini les conditions pour avoir des lentilles dont la résolution est uniquement limitée par la diffraction



# Nombre d'Abbe

- Le nombre d'Abbe ou constringence d'un verre optique sert à en déterminer la dispersion, c'est-à-dire la variation de l'indice de réfraction avec la longueur d'onde.
- Il quantifie l'aberration chromatique transversale d'une optique.



# Nombre d'Abbe

- Le nombre d'Abbe ou constringence ( $V$ ) se définit en fonction des indices de réfraction à différentes longueurs d'onde, correspondant à des raies spectrales de Fraunhofer de certains éléments :

$$V = \frac{n_D - 1}{n_F - n_C}$$

- où les indices sont :
  - $n_D$ , dans la raie D de l'hélium à 589,2 nm
  - $n_F$ , dans la raie F de l'hydrogène à 486,1 nm
  - $n_C$ , dans la raie C de l'hydrogène à 656,3 nm



# Nombre d'Abbe

- Le nombre d'Abbe est utilisé pour minimiser la chromaticité d'un système de lentilles. Pour un système de deux lentilles accolées de focales  $f_1$  et  $f_2$  et de constringences  $V_1$  et  $V_2$ , la condition de minimisation empirique est

$$f_1 V_1 + f_2 V_2 = 0$$

- Elle assure que la distance focale du système est la même dans les raies F et C. En supposant que l'indice de réfraction est une fonction lisse de la longueur d'onde, cela implique que la focale est à peu près constante sur l'intervalle 480–560 nm, autrement dit que l'optique est achromatique.
- On notera que :
  - le nombre d'Abbe est défini pour de l'optique dans le visible et ne permet pas de quantifier la chromaticité dans l'ultraviolet ou l'infrarouge ;
  - la constringence compare deux longueurs d'onde données et ne permet pas de décrire en détail ce qui se passe sur l'intervalle de longueurs d'ondes.



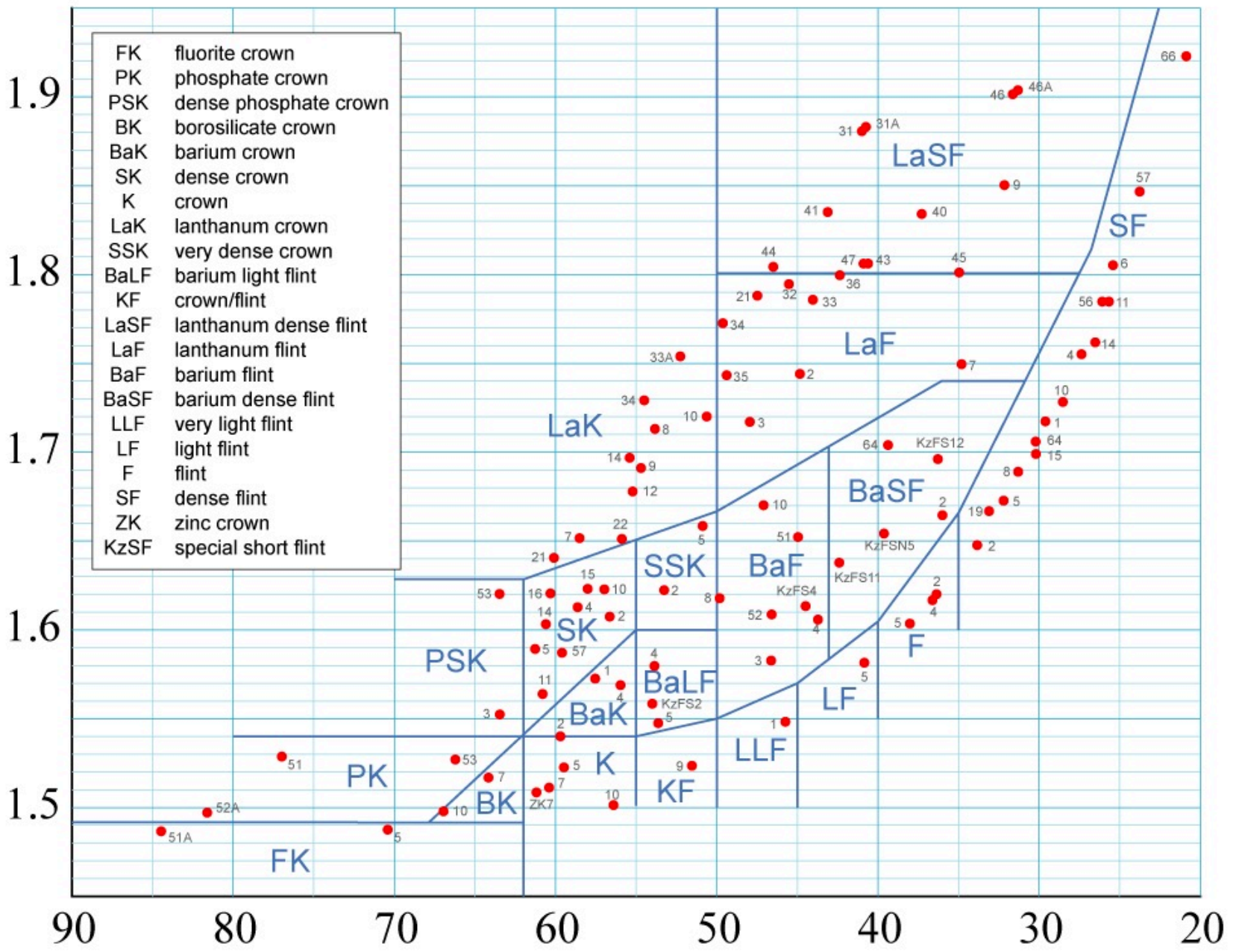
# Diagramme d'Abbe

- Nombre d'Abbe en fonction de l'indice de réfraction pour différents verres.
- La combinaison des différents verres et la forme des lentilles permettent de corriger les aberrations chromatiques et sphériques dans les optiques du microscope (condenseur, objectif, oculaire).



Refractive index  $n_d$  ( $\lambda = 587.6 \text{ nm}$ )

FK	fluorite crown
PK	phosphate crown
PSK	dense phosphate crown
BK	borosilicate crown
BaK	barium crown
SK	dense crown
K	crown
LaK	lanthanum crown
SSK	very dense crown
BaLF	barium light flint
KF	crown/flint
LaSF	lanthanum dense flint
LaF	lanthanum flint
BaF	barium flint
BaSF	barium dense flint
LLF	very light flint
LF	light flint
F	flint
SF	dense flint
ZK	zinc crown
KzSF	special short flint

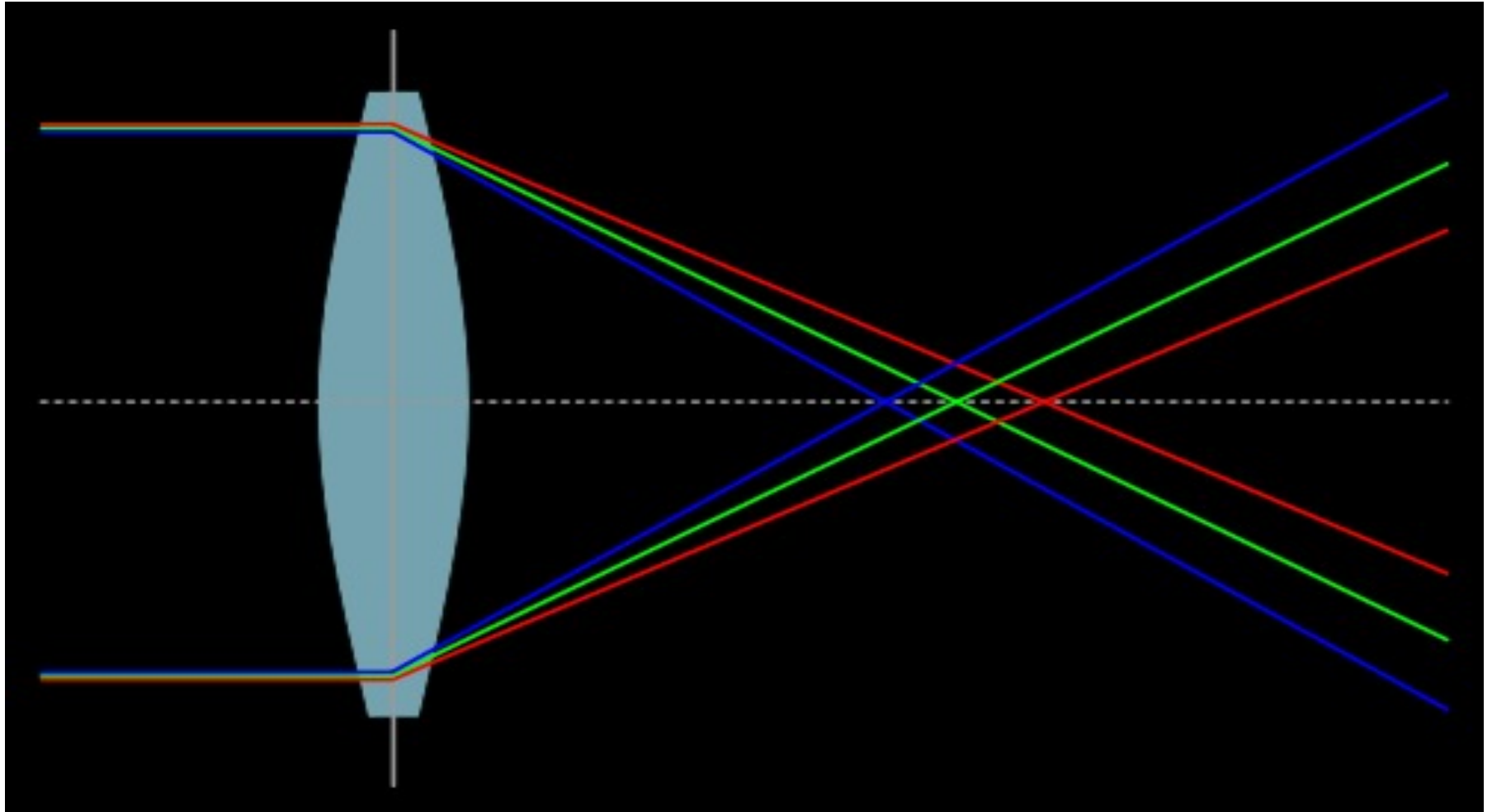


Abbe number  $V$

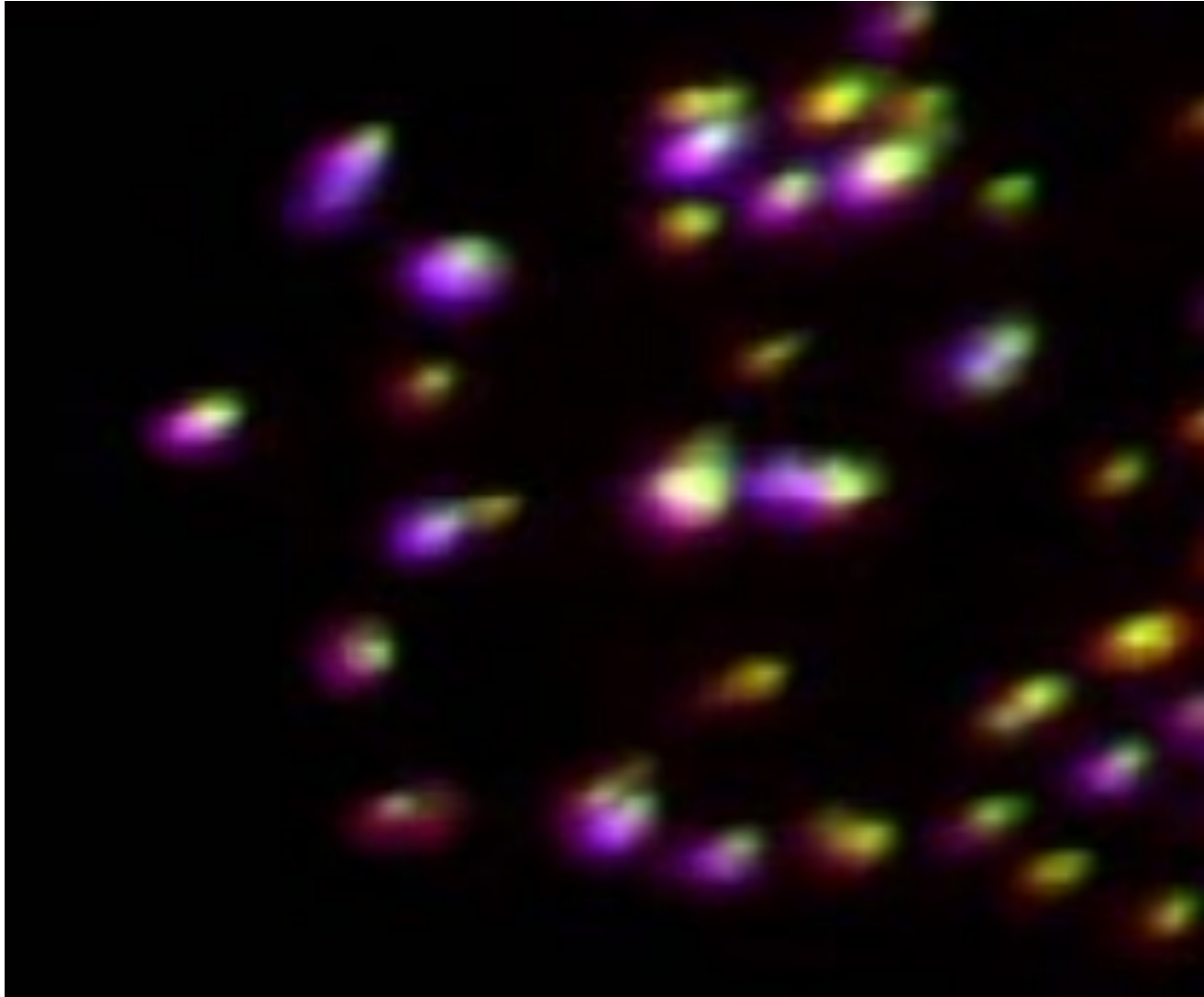
# Aberration chromatique

- Variation de l'indice de réfraction du matériau composant les lentilles en fonction de la longueur d'onde de la lumière qui les traverse.
- Il en résulte une **distance focale variable**, de sorte que la mise au point ne peut être effectuée simultanément pour toutes les couleurs du spectre.
  - Si, par exemple, la mise au point est effectuée pour le rouge, le bleu est alors flou : l'image d'un objet blanc présente alors sur ses bords une irisation bleutée.

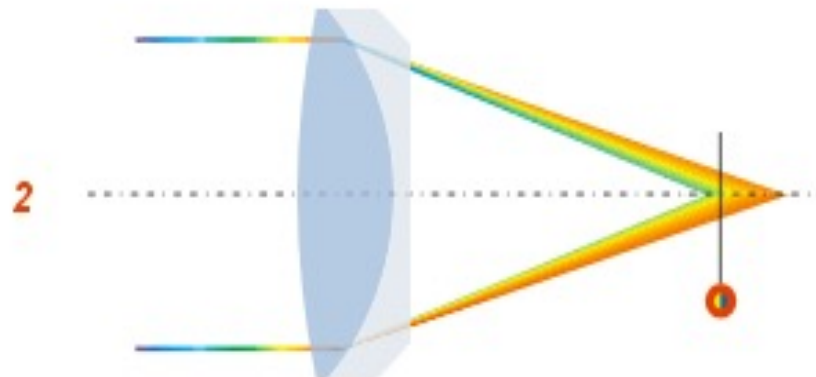
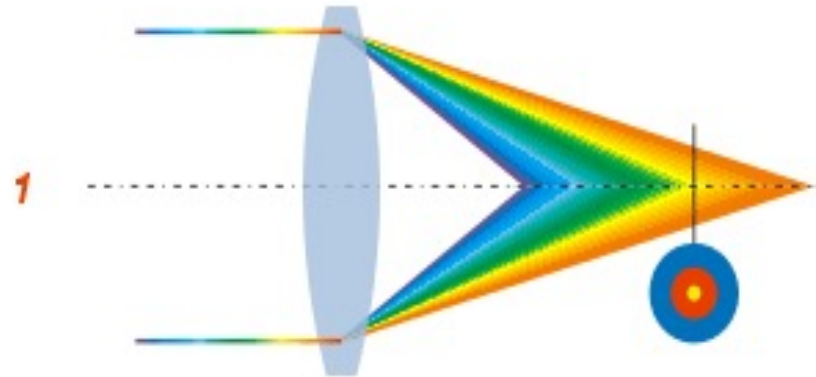
# Aberration chromatique



# Aberration chromatique



# Correction de l'aberration chromatique par 2 lentilles



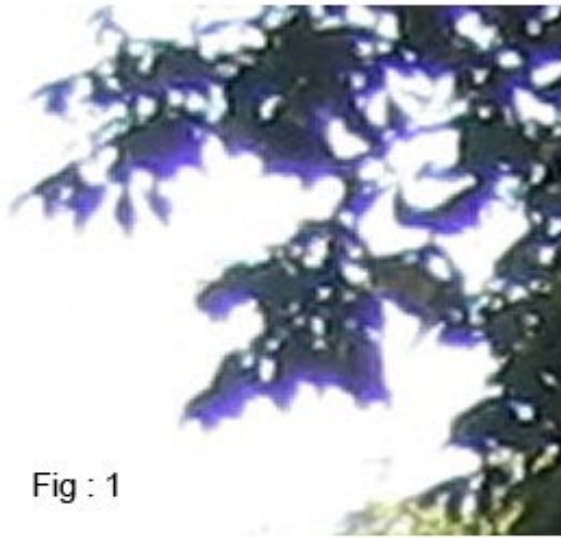


Fig : 1

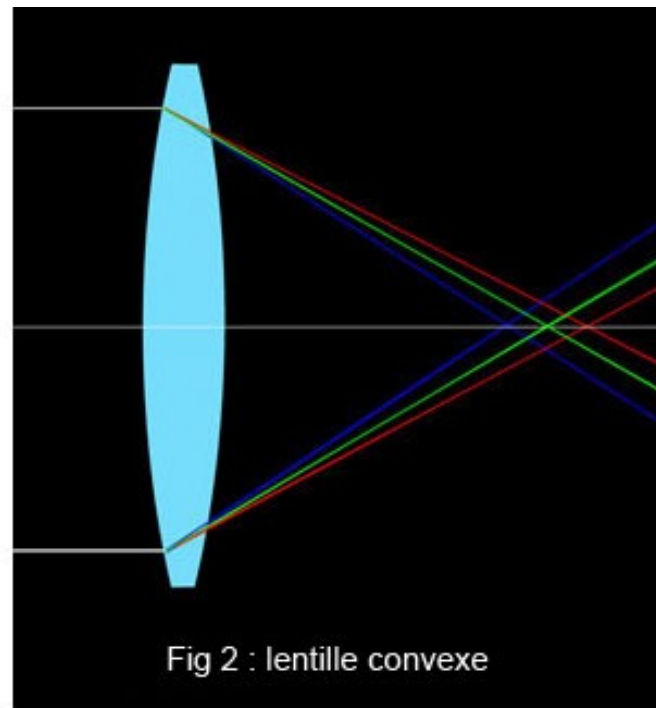


Fig 2 : lentille convexe

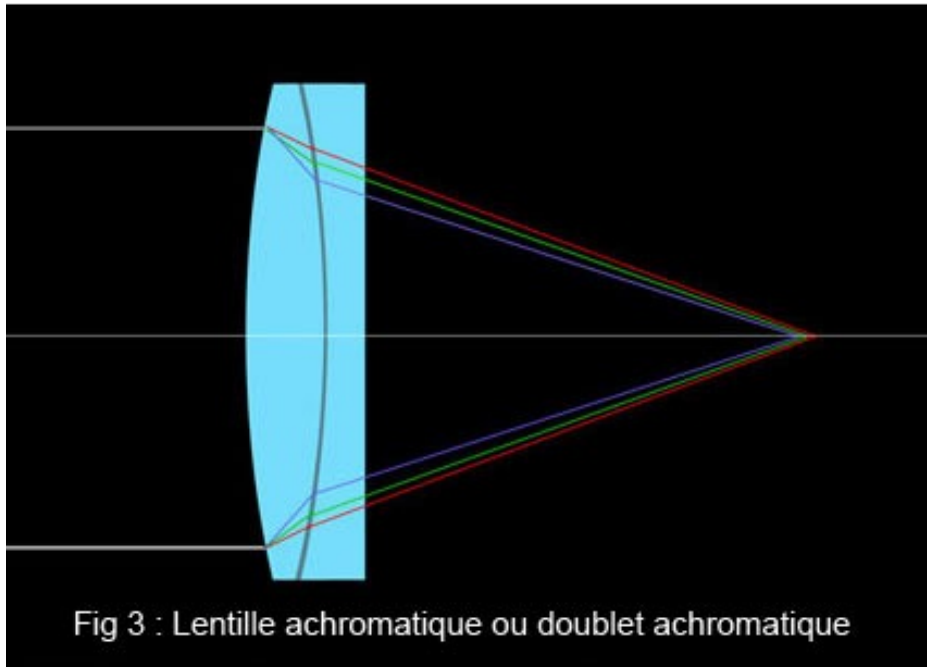


Fig 3 : Lentille achromatique ou doublet achromatique

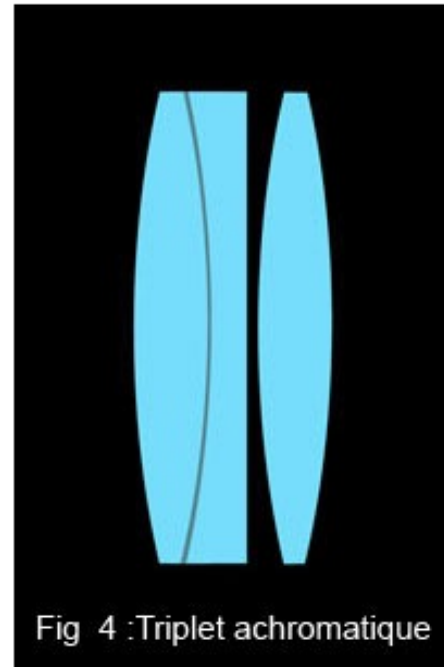
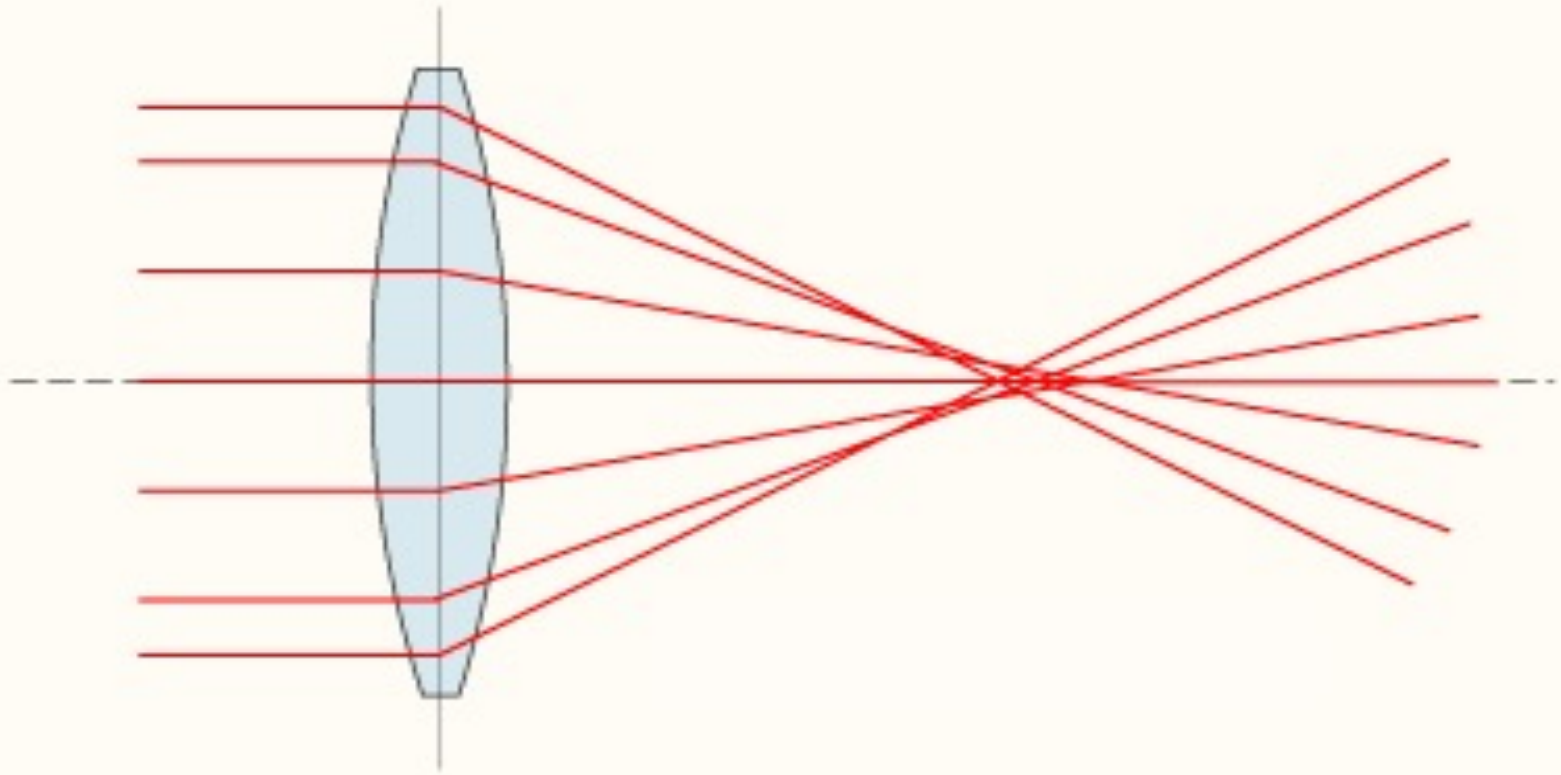


Fig 4 :Triplet achromatique

# Aberration sphérique

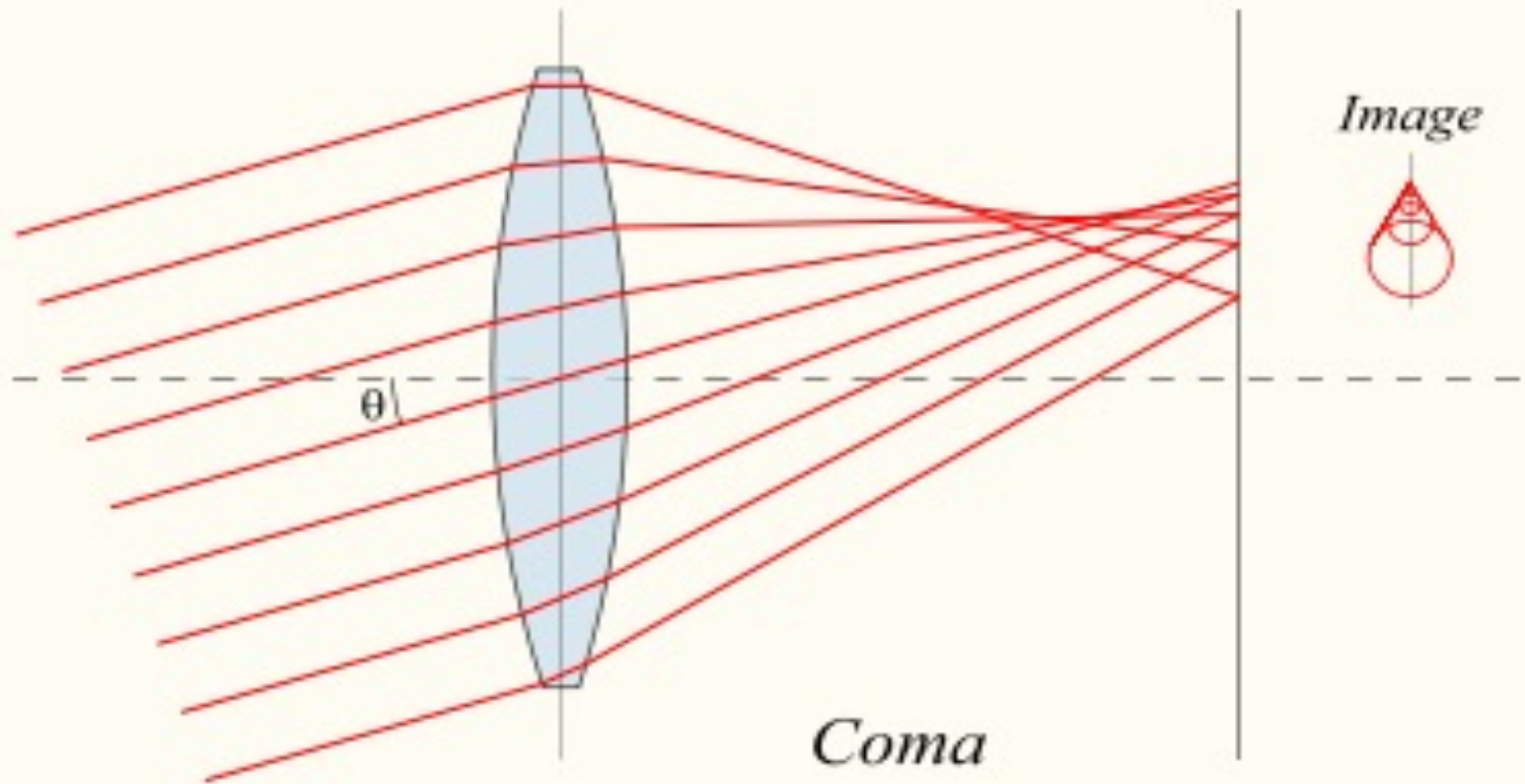
- Les rayons provenant du bord et du centre de l'optique ne se focalisent plus au même point.
- Le point image attendu sera remplacé par un halo plus ou moins flou.

# Aberration sphérique





# Autres aberrations : coma



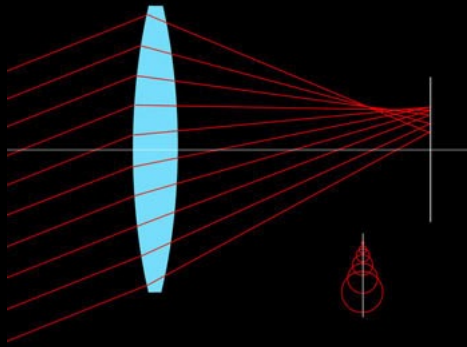


Fig 5 : abération de coma

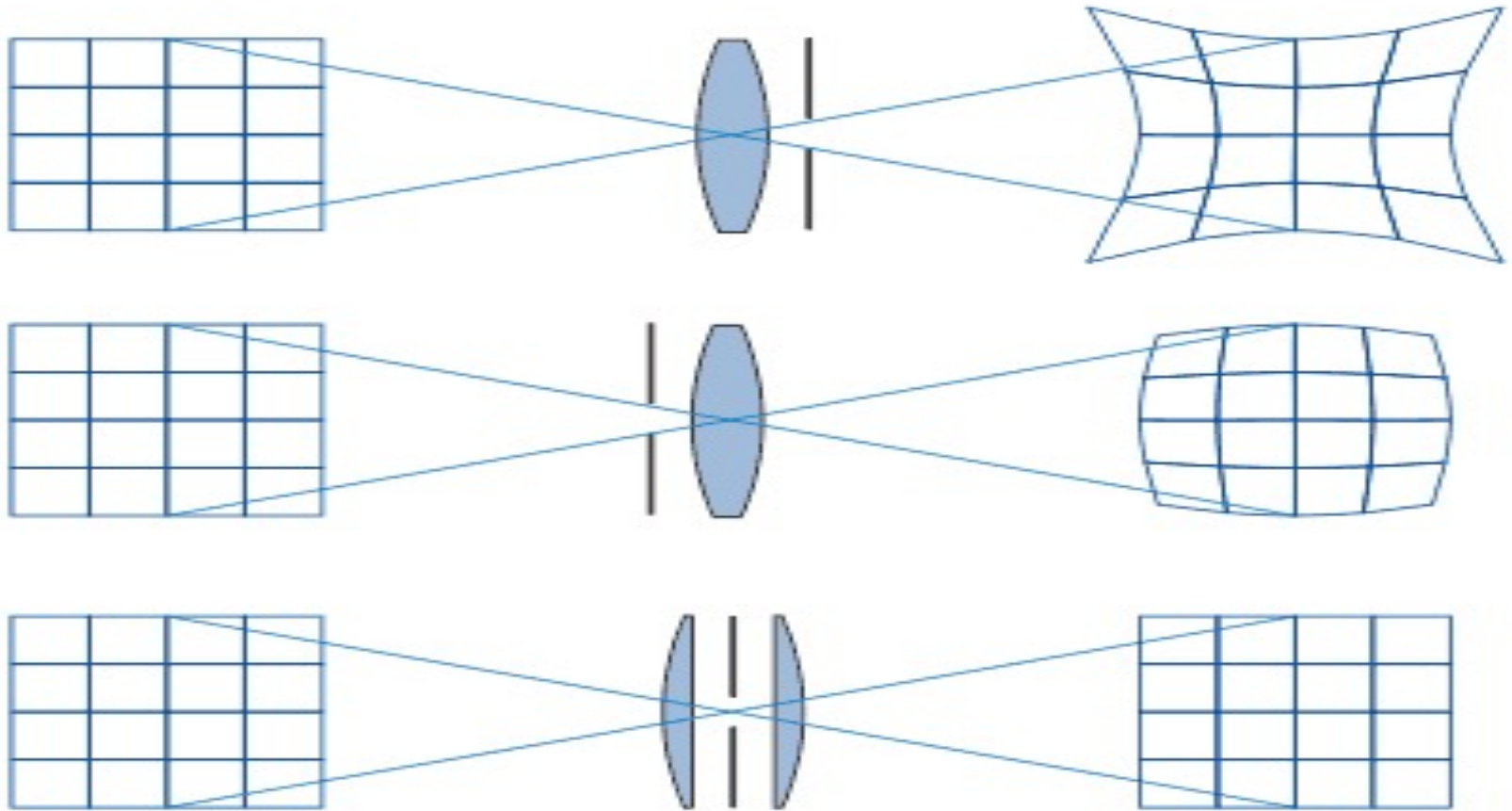


Fig 6

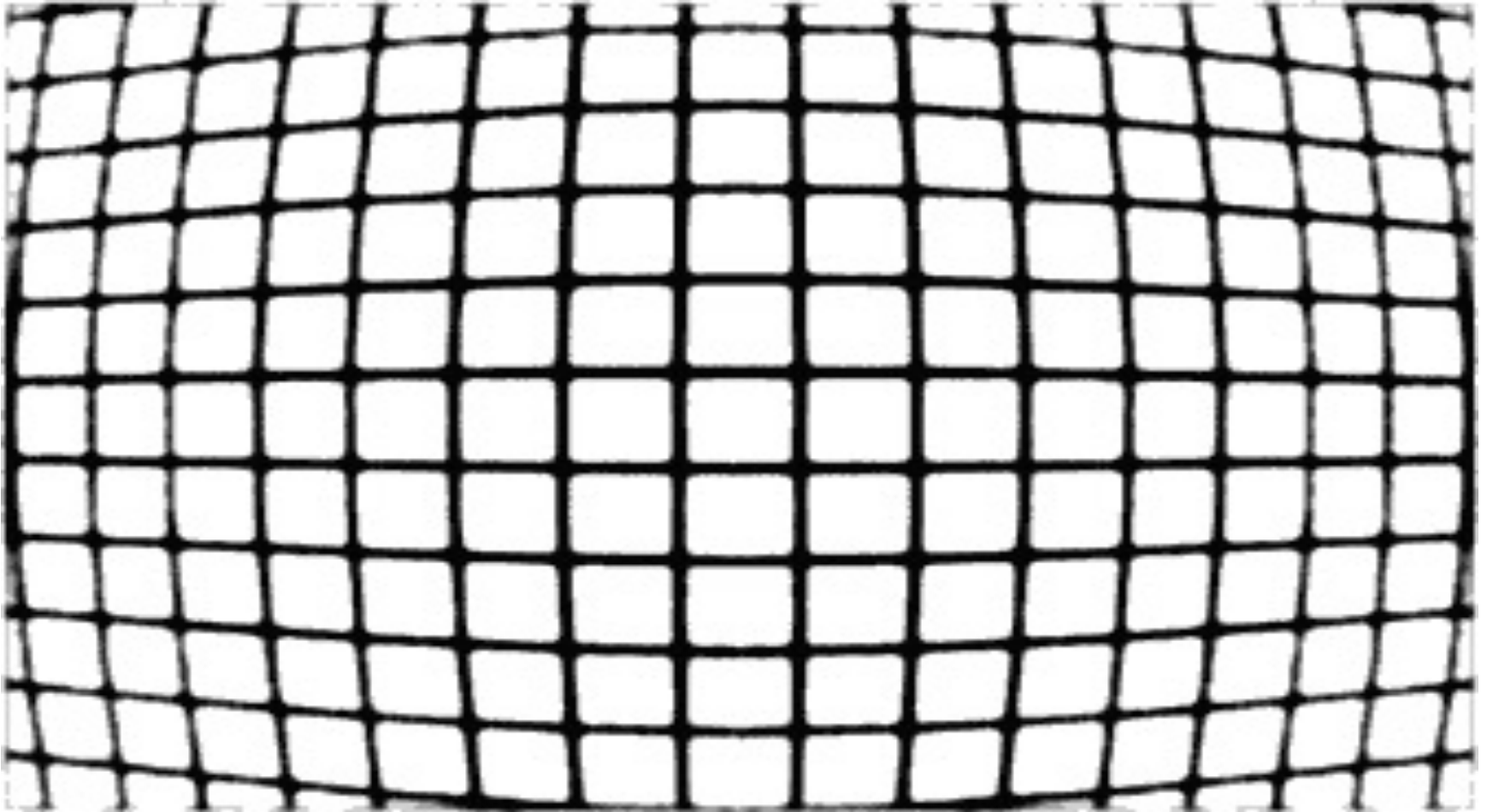


Fig 7

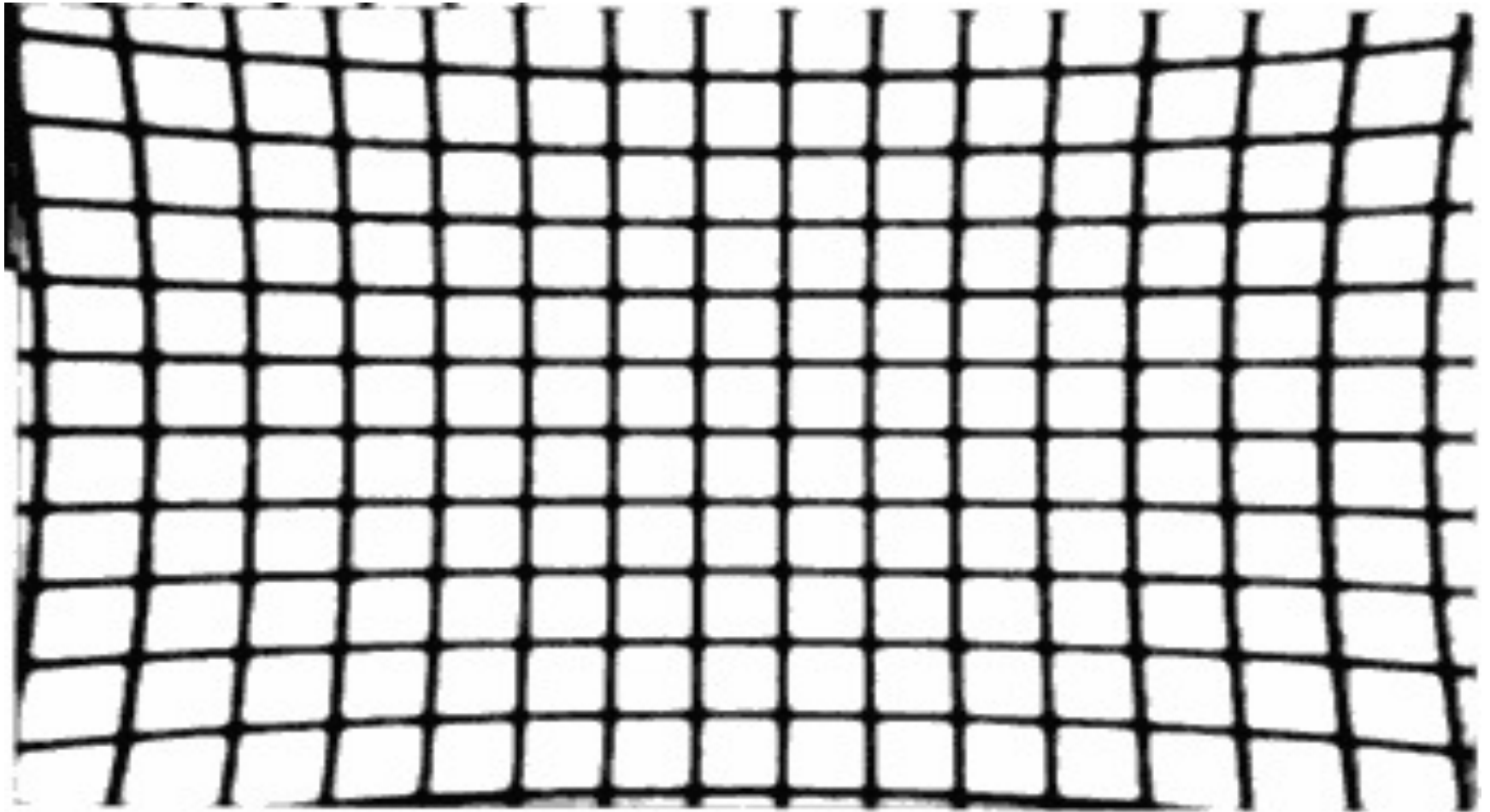
# Autres aberrations : astigmatisme, distorsion...



Exemple : distorsion en barillet



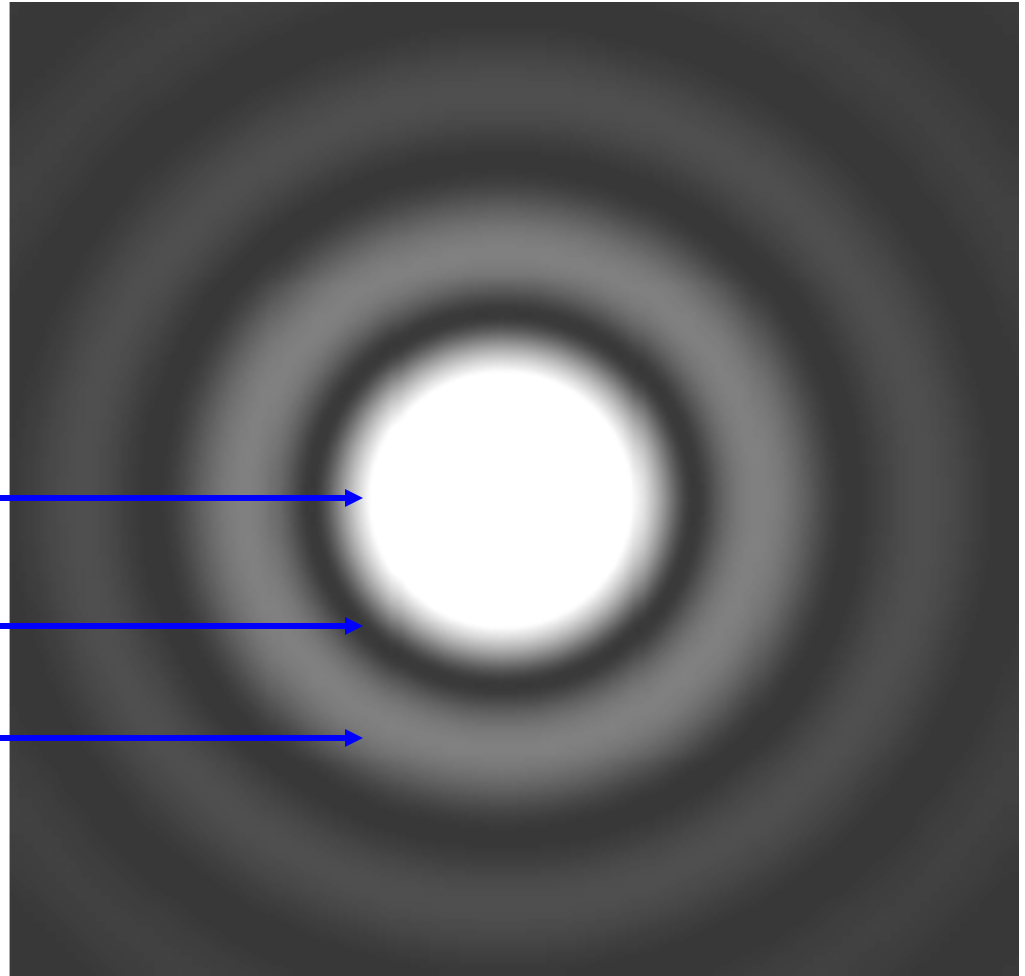
Exemple : distorsion en croissant



# Résolution latérale en microscopie

- L'image d'un point n'est pas un point mais une tache de diffraction appelée tache d'Airy (1801-1892)
- La tache d'Airy est composée d'un disque central brillant entouré d'anneaux concentriques alternativement noirs et brillants

# Tache d'Airy



Disque central brillant



Anneau sombre



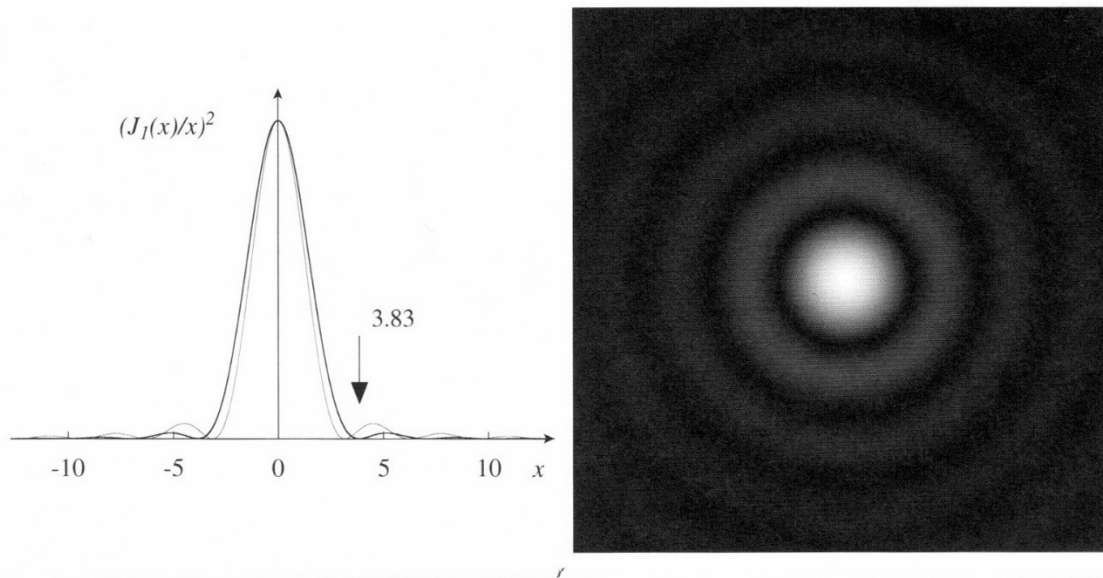
Anneau brillant



# Fonction d'Airy

La fonction  $J_1^2(x)/x^2$  est parfois appelée *fonction d'Airy*, et la distribution de lumière correspondante la *tache d'Airy*. Elle est représentée sur la **figure 5.14**, elle présente un maximum (à la valeur  $1/4$ ) pour  $x = 0$  puis une série d'annulations et de maxima secondaires, ce qui se traduit à l'écran par une succession d'anneaux sombres et brillants. La première annulation a lieu pour  $x \approx 3,83$ , soit  $2\pi Rr/f\lambda \approx 0,61f\lambda/R$ . C'est le rayon de la tache centrale à l'écran.

**FIG 5.14** Figure de diffraction par une ouverture circulaire. La figure de gauche représente le profil de l'intensité (courbe pleine) en fonction de  $x = 2\pi Rr/f\lambda$ . On a aussi indiqué, à titre indicatif, le profil de l'intensité obtenu pour une fente diffractante de largeur  $2R$ , en trait fin.



Cette situation est d'une grande importance dès que l'on forme une image avec un instrument d'optique ayant une ouverture circulaire. La tache d'Airy est en effet l'image que l'on obtient d'une source ponctuelle. La diffraction conduit donc à une dégradation des images

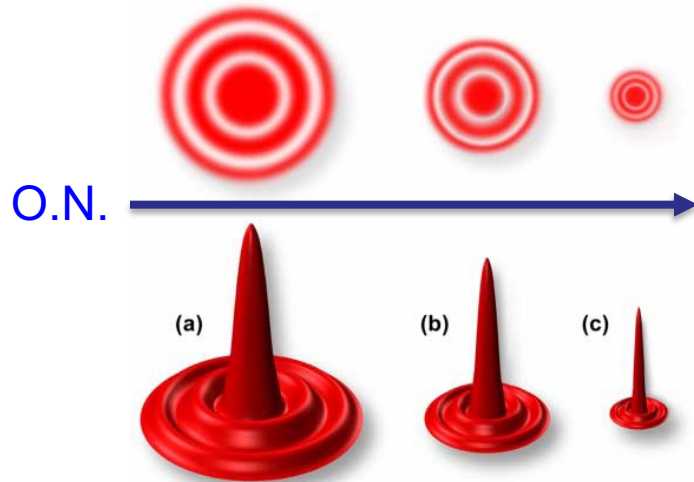


# Définition de la résolution

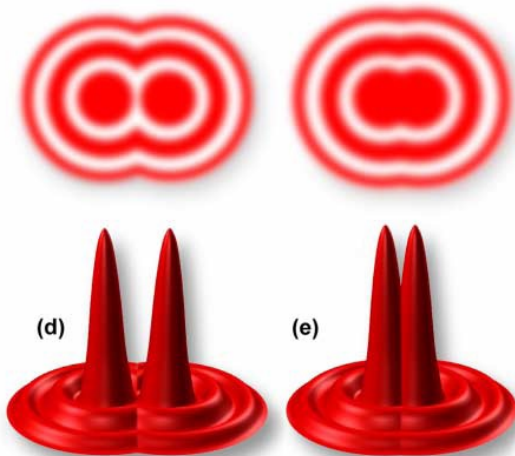
- Pour les systèmes basés sur l'observation d'images, la résolution est exprimée comme une dimension linéaire (distance).
- Deux points objet sont reproduits distinctement dans l'image si la distance qui les séparent est supérieure ou égale à la résolution du système.

# Disque d'Airy et résolution

Airy Disks and Resolution



(a-c) Airy disk size and related intensity profile (point spread function) as related to objective numerical aperture, which decreases from (a) to (c) as numerical aperture increases.



(d) Airy disks at the limit of resolution.

(e) Two Airy disks so close together that their central spots overlap.

# Critère de Rayleigh

- Lord Rayleigh, en 1896, décrit la **résolution** comme une **fonction du disque d'Airy**
- L'image d'un point objet est ainsi une tache de **diffraction**; deux points voisins donnent deux taches qui s'ajoutent en intensité
- Critère de Rayleigh : **la limite de résolution est considérée comme atteinte lorsque le maximum principal d'intensité de l'une des taches de diffraction correspond au premier minimum d'intensité de l'autre tache ; autrement dit, on considère que les images sont distinctes si la distance qui les séparent est au moins égale à la demi-largeur de la tache d'Airy.**

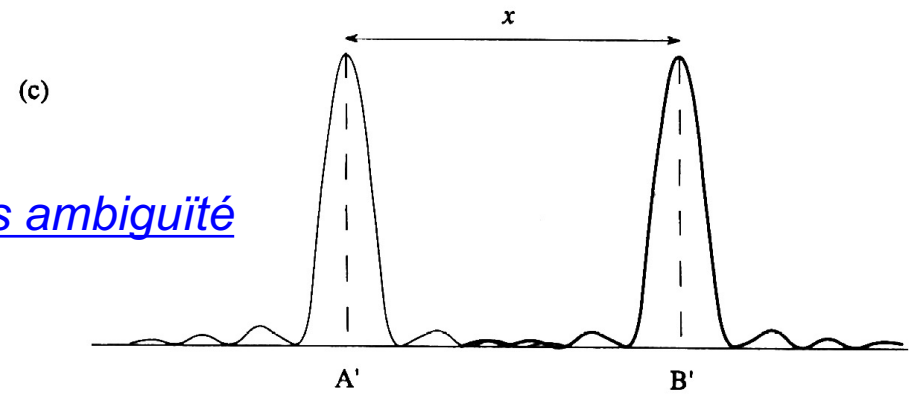
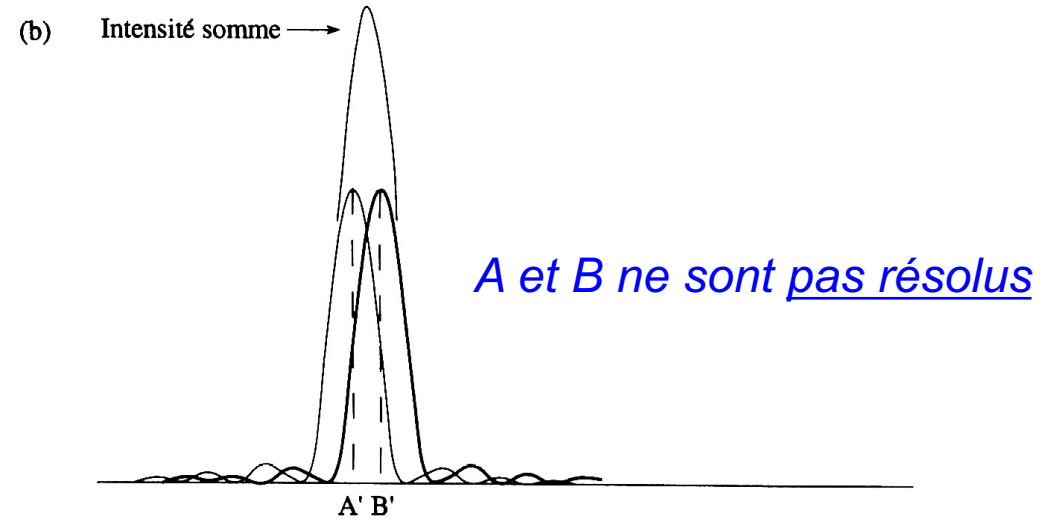
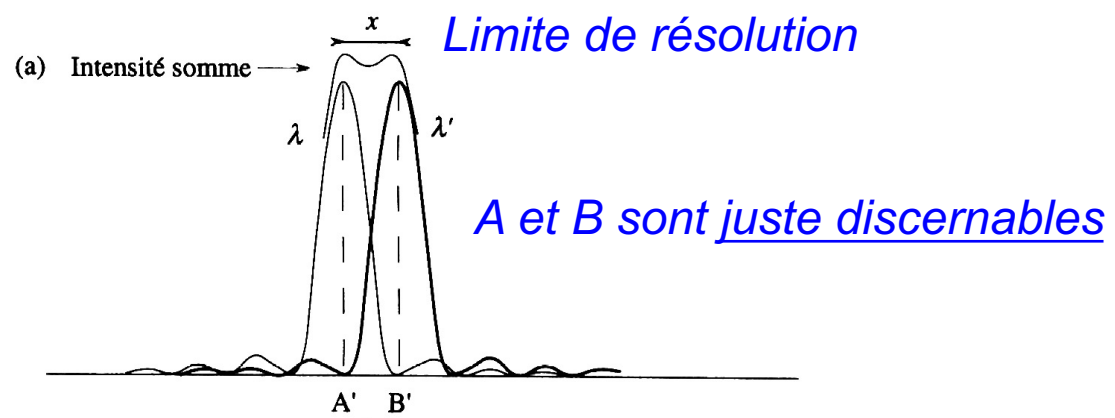
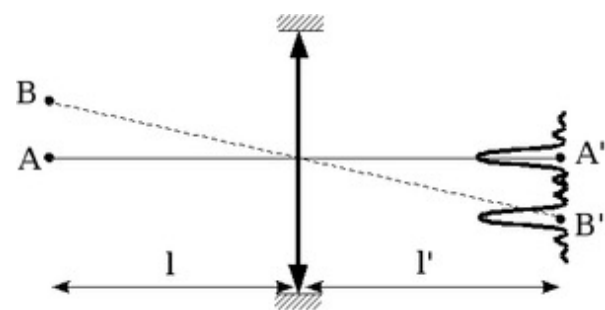
# Critère de Rayleigh

*Trois cas possibles de répartition de l'intensité lumineuse d'images (A' et B'), produites par un instrument d'optique à ouverture circulaire, de deux points objets (A et B) de même intensité et proches l'un de l'autre :*

(a) Les objets *A* et *B* sont juste discernables : la distance  $x$  définit la limite de résolution.

(b) Les images *A'* et *B'* sont confondues : les deux points objets *A* et *B* ne sont pas résolus.

(c) Les objets *A* et *B* sont distingués sans ambiguïté.



*A et B sont distingués sans ambiguïté*

*En X : distance à l'axe optique; en Y : intensité lumineuse*

# Critère de Rayleigh en microscopie

Pour deux points objets d'égale brillance, séparés par une distance  $d$ , leurs images de diffraction sont dites résolues si  $d$  est supérieur ou égal au rayon ( $r$ ) du disque d'Airy

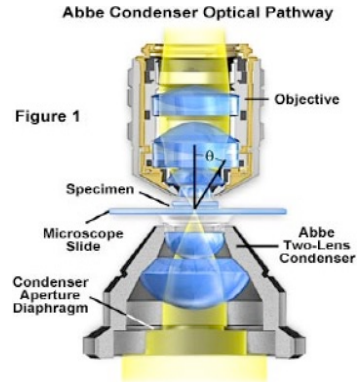
$$d \geq 0,61 \lambda / \text{ON}$$

$d$  = distance entre les deux points objets

$\lambda$  = longueur d'onde de la lumière utilisée

ON = Ouverture Numérique de l'objectif

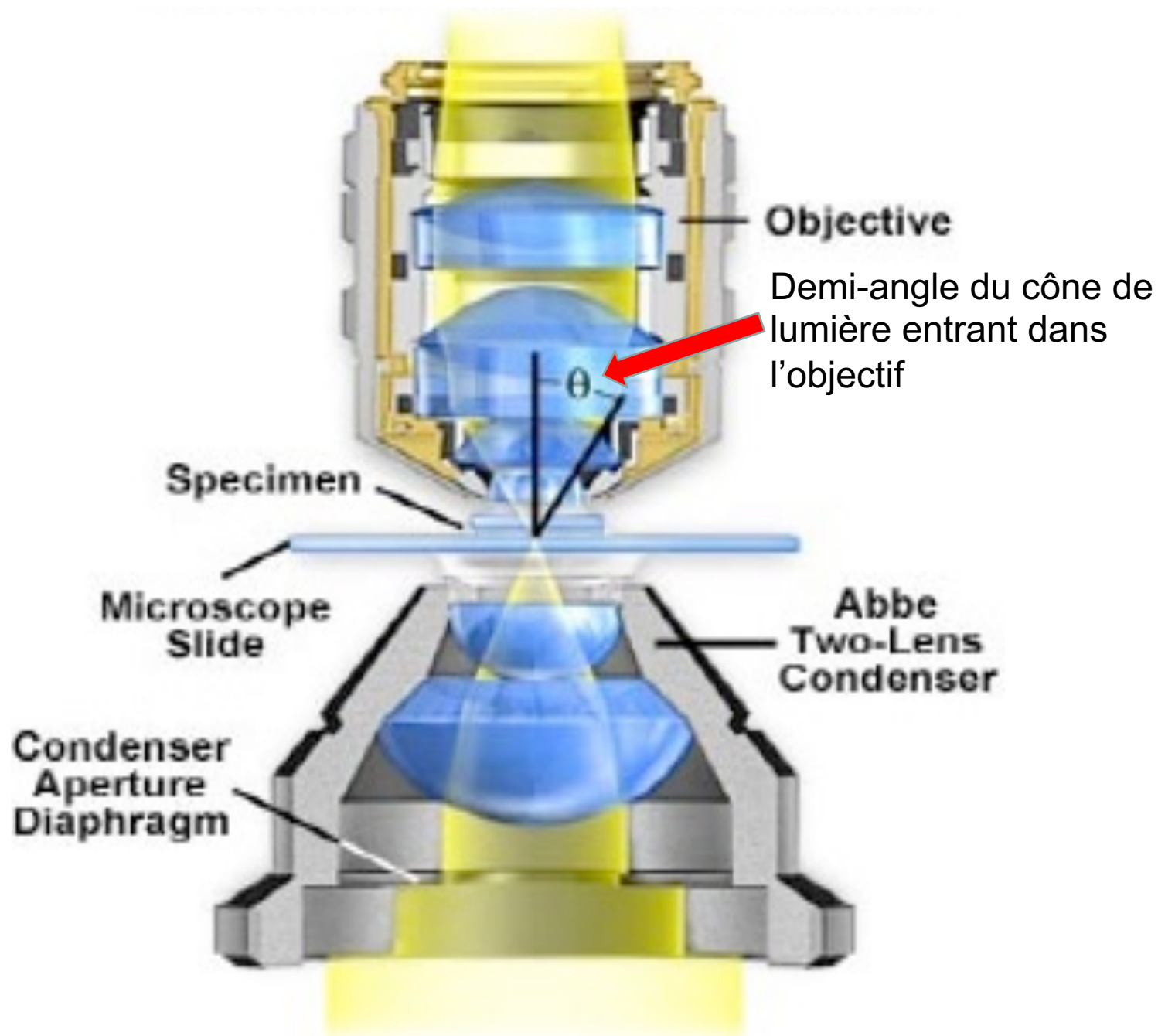
# Ouverture Numérique de l'objectif



$$ON = n \sin(\theta)$$

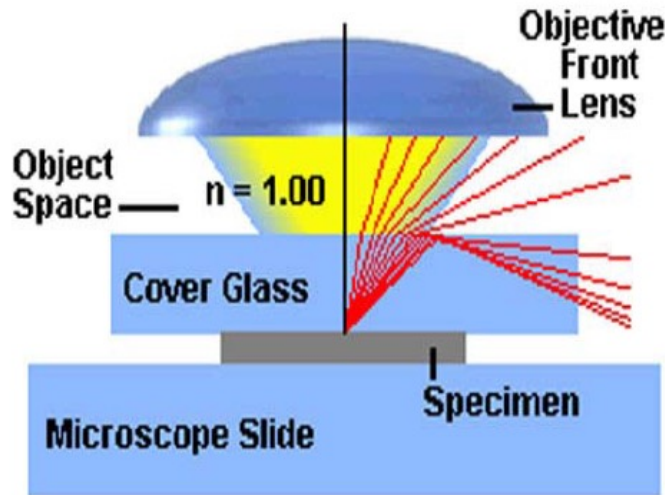
$\theta$  = demi-angle du cône de lumière entrant dans l'objectif

$n$  = indice de réfraction du milieu entre l'objet et la lentille frontale de l'objectif





# Ouverture numérique de l'objectif



$n$  = Refractive Index

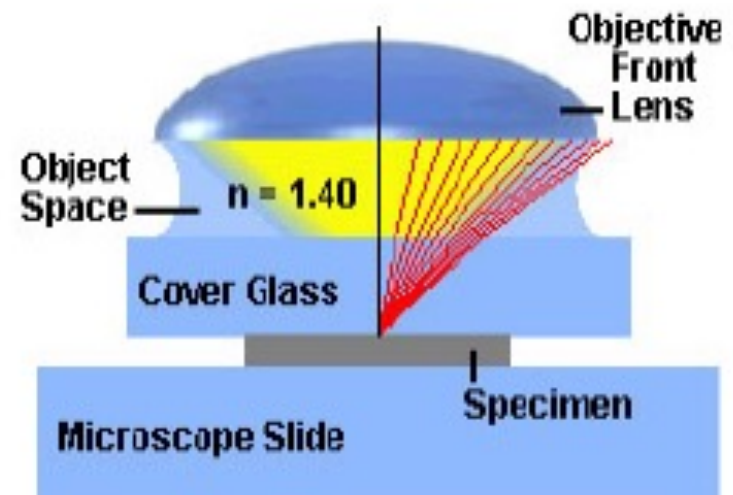


$$\text{Numerical Aperture (NA)} = n \sin(\theta)$$

$$\text{NA} = 1.00 \sin(65^\circ)$$

$$0.90 = 1.00 \sin(65^\circ)$$

$$\theta = \text{Angular Aperture} = 65^\circ$$



$n$  = Refractive Index



$$\text{Numerical Aperture (NA)} = n \sin(\theta)$$

$$\text{NA} = 1.40 \sin(65^\circ)$$

$$1.27 = 1.40 \sin(65^\circ)$$

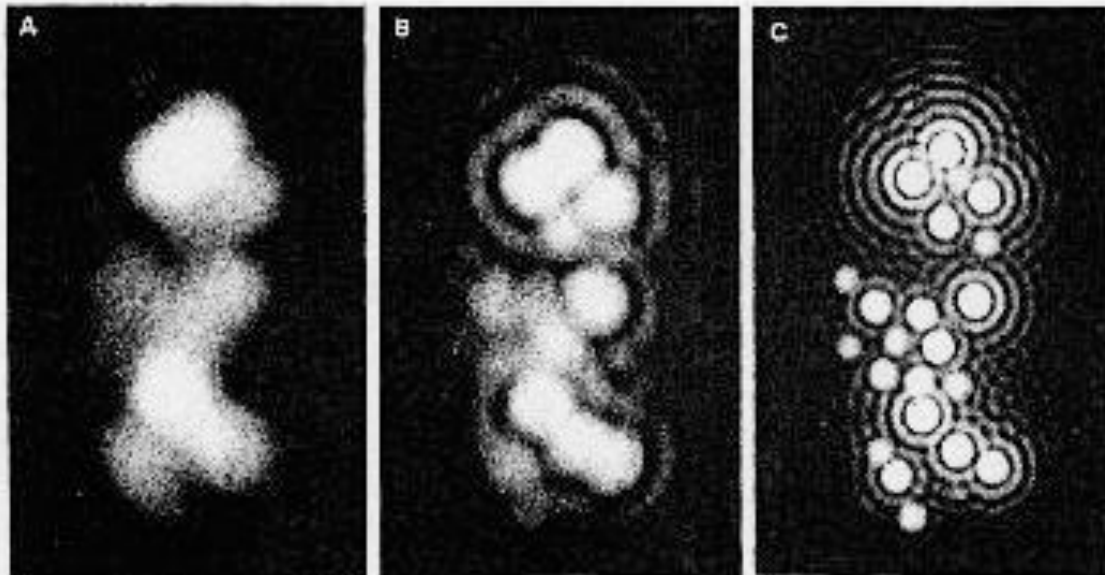
$$\theta = \text{Angular Aperture} = 65^\circ$$

# *Influence de l'ouverture numérique sur la séparation d'objets sphériques*

0,12

N.A.

0,87



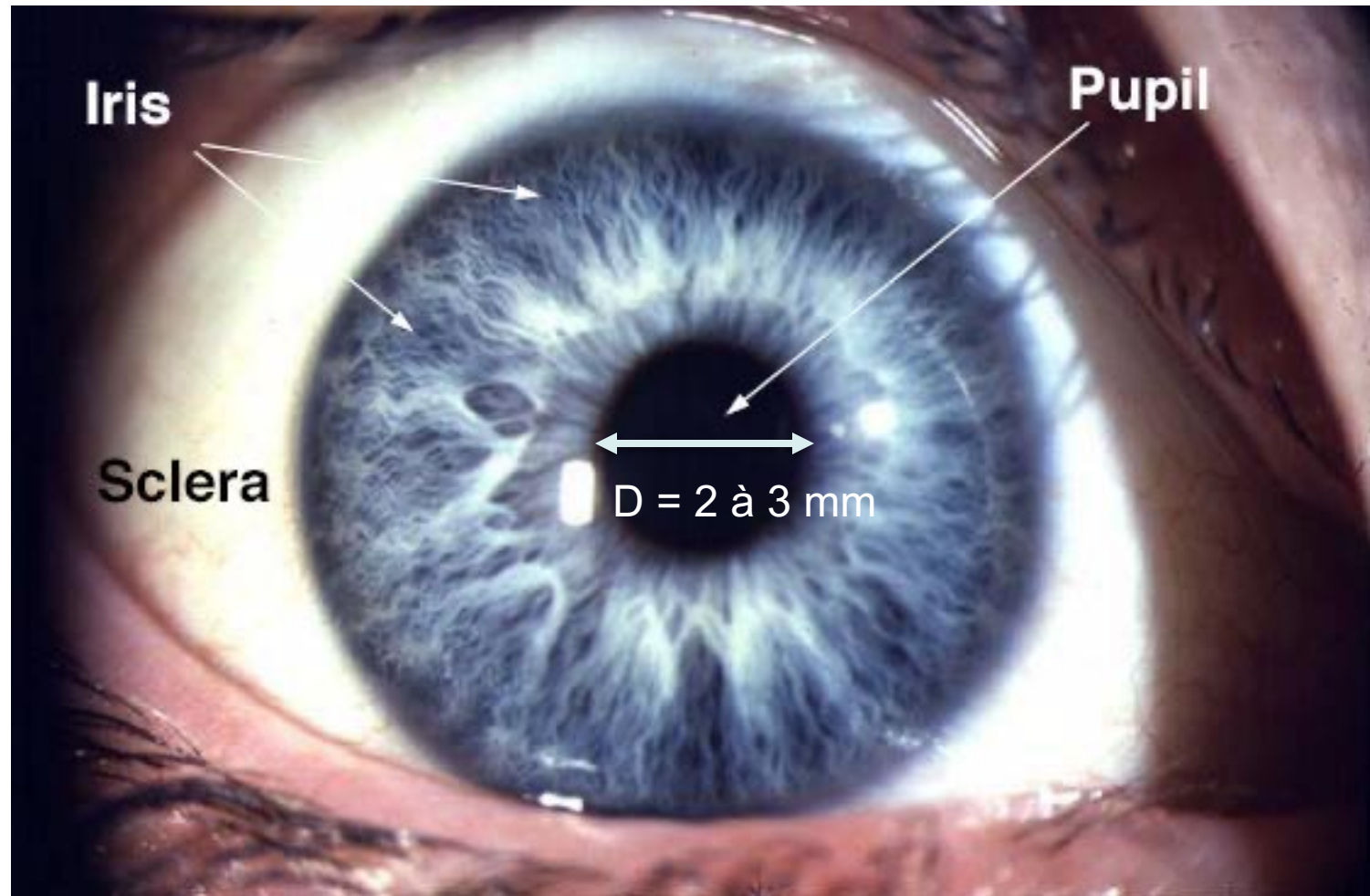
faible  
résolution

haute  
résolution

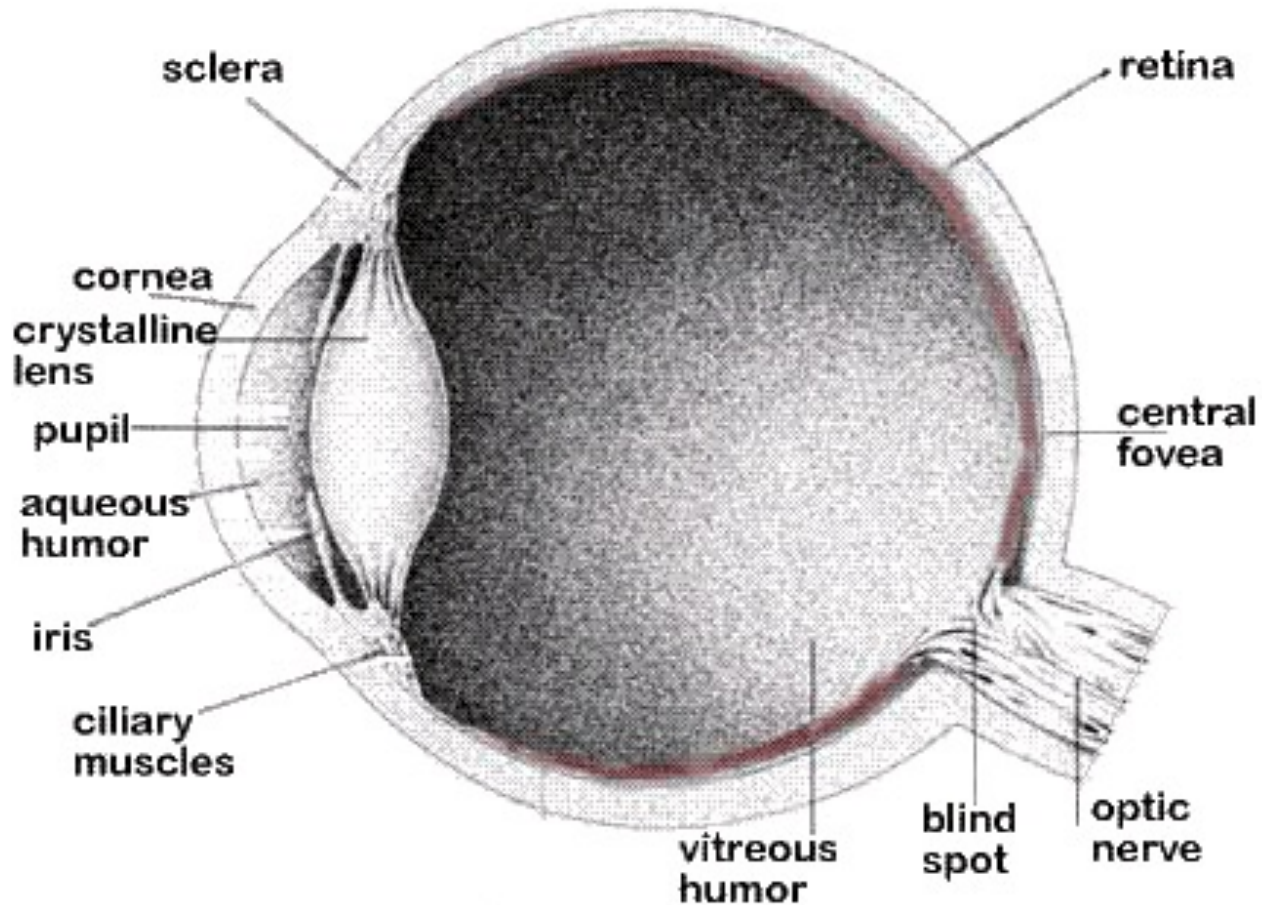
# Résolution de l'œil humain

- La limite de résolution angulaire de l'œil est la distance angulaire minimale qui doit exister entre deux points pour que ceux-ci soient vus distinctement.
- Elle dépend de la luminance et du contraste de la scène observée et également du diamètre de la pupille de l'œil (environ 2 à 3 mm).
- Cette limite varie d'une personne à l'autre, mais il a été établi une valeur moyenne qui s'applique à l'œil sans défaut. La limite de résolution angulaire moyenne de l'œil normal au repos (c'est à dire situé à environ 25 cm de l'image) est égale à environ 1' minute d'arc : la plus petite longueur perceptible est ainsi d'environ 0,075 mm (75  $\mu$ m), (environ 1/10 mm).

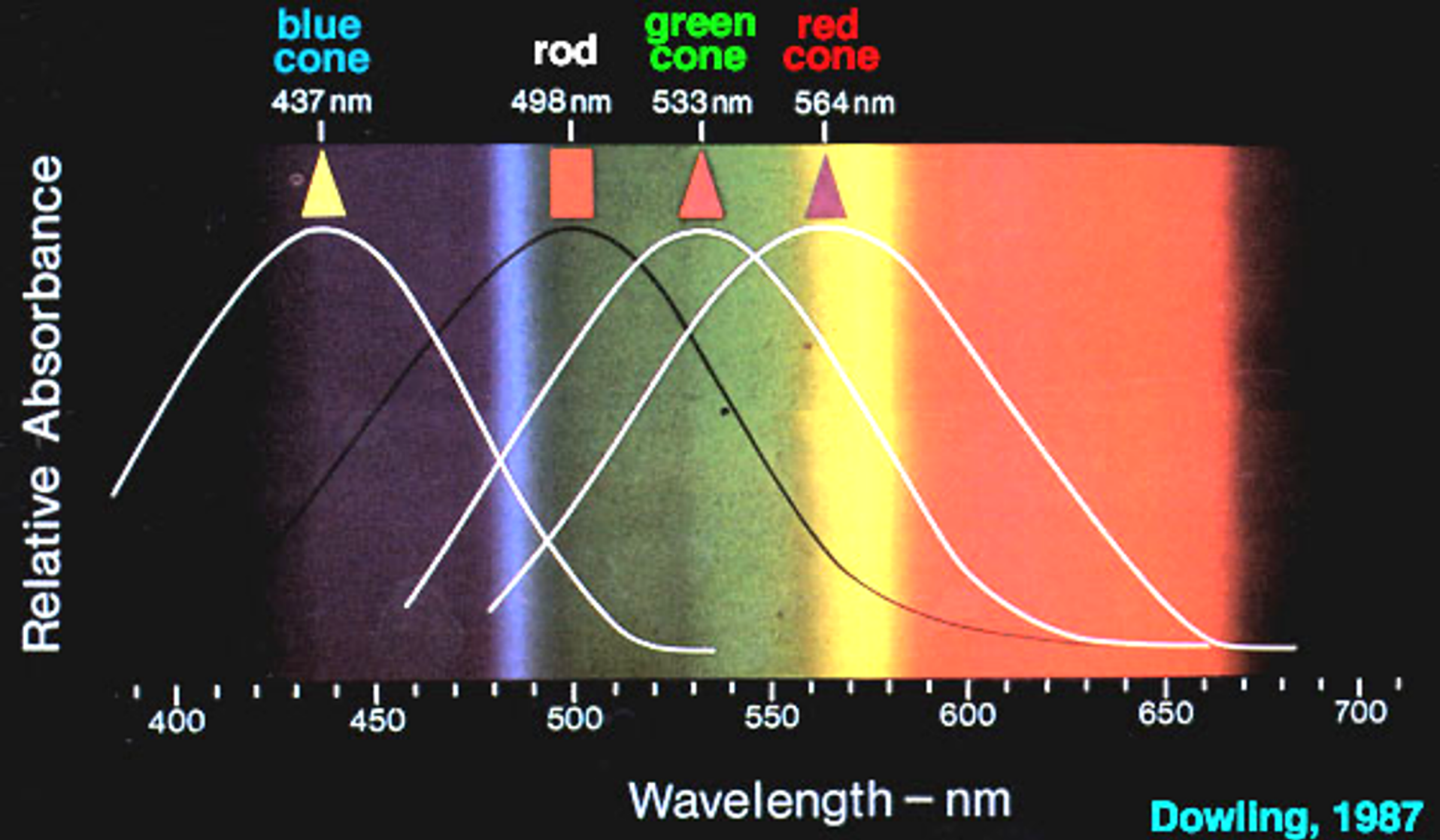
# Résolution de l'œil humain



# Coupe de l'oeil humain



# Spectres d'absorbance des cônes de la rétine



# Résolution en microscopie photonique

- En microscopie photonique la **résolution** dépend de l'ouverture numérique (O.N.) de l'objectif et de la longueur d'onde de la lumière utilisée (ainsi que de l'ouverture numérique du condenseur quand on utilise le mode lumière transmise). L'ouverture numérique est généralement indiquée sur l'objectif et le condenseur.
- La limite de résolution se calcule grâce à la **formule d'Abbe** :
  - **limite de résolution (distance) =  $0,61 \cdot \lambda / \text{O.N.}$** 
    - avec  $\lambda$ =longueur d'onde de la lumière utilisée
    - et O.N. (indiquée sur l'objectif)
    - O.N. peut être obtenu par la formule suivante :
    - **O.N. =  $n \cdot \sin \theta$**
    - avec  $n$  = indice de réfraction du milieu entre l'objet et l'objectif
    - et  $\theta$  = demi angle du cône de lumière entrant dans l'objectif.
- **La limite de résolution d'un microscope photonique est au mieux d'environ  $0,2 \mu\text{m}$  (200 nm).**

# Résolution en microscopie photonique

- **Remarque 1** : la résolution est exprimée dans la même unité que la longueur d'onde utilisée.
- **Remarque 2** : la résolution calculée par la formule d'Abbe est la meilleure résolution possible théoriquement; pratiquement, la résolution effective, est toujours inférieure à cause des aberrations optiques.
- **Remarque 3** : la puissance d'un microscope est égale au produit de la valeur absolue du grossissement linéaire de l'objectif par la puissance de l'oculaire. Le grossissement commercial du microscope est le produit de la puissance, exprimée en dioptries, par la distance minimale de vision distincte fixée à 0,25 m.
- **Remarque 4** : le grossissement nécessaire pour "amener" la résolution d'un microscope (0,2  $\mu\text{m}$ ) dans le domaine de résolution de l'œil (100  $\mu\text{m}$ ) est appelé le grossissement utile. Il est généralement compris entre 500 ( $100 / 0,2 = 500$ ) et 1000 fois l'ouverture numérique de l'objectif.
- **Remarque 5** : pour des raisons techniques, l'ouverture numérique d'un objectif est au plus de 1,4.



# Indices de réfraction de quelques milieux courants

<b>Milieu de montage</b>	<b>Indice de réfraction</b>
Eau	1,33
Glycérol	1,47
Euparal	1,481
Huile à immersion (Zeiss)	1,515
Baume du Canada	1,528

# Exemples de résolutions obtenues en microscopie optique

<b>Grandissement</b>	<b>Ouverture Numérique</b>	<b>Résolution théorique (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Grossissement utile</b>
2X	0,04	7,50	20 à 40
4X	0,10	3,05	50 à 100
10X	0,25	1,22	125 à 250
20X	0,50	0,60	250 à 500
40X	0,65	0,47	325 à 650
100X	1,30	0,23	650 à 1300
100X	1,40	0,21	700 à 1400

# Résolution axiale

- Distance entre le point le plus haut et le point le plus bas de la préparation qui donne une image nette. C'est donc l'épaisseur de la tranche d'espace dans laquelle tous les points de l'objet donnent une image nette.
- Elle dépend de l'ouverture numérique : la profondeur de champ diminue lorsque l'ouverture numérique augmente.

# Résolution axiale

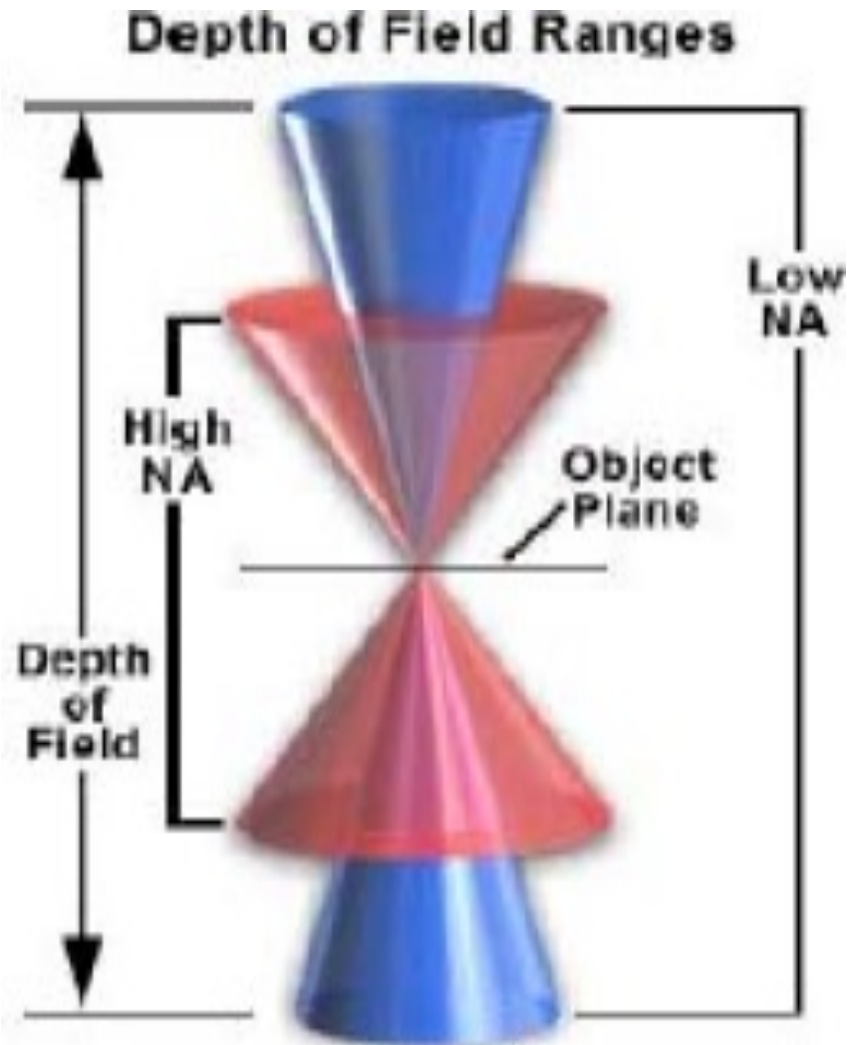


Figure 1

# Profondeur de champ

## PROFONDEUR DE CHAMP (côté objet)

$$D_{\text{champ}} = \lambda / O.N.^2$$

Tableau pour des objectifs achromates

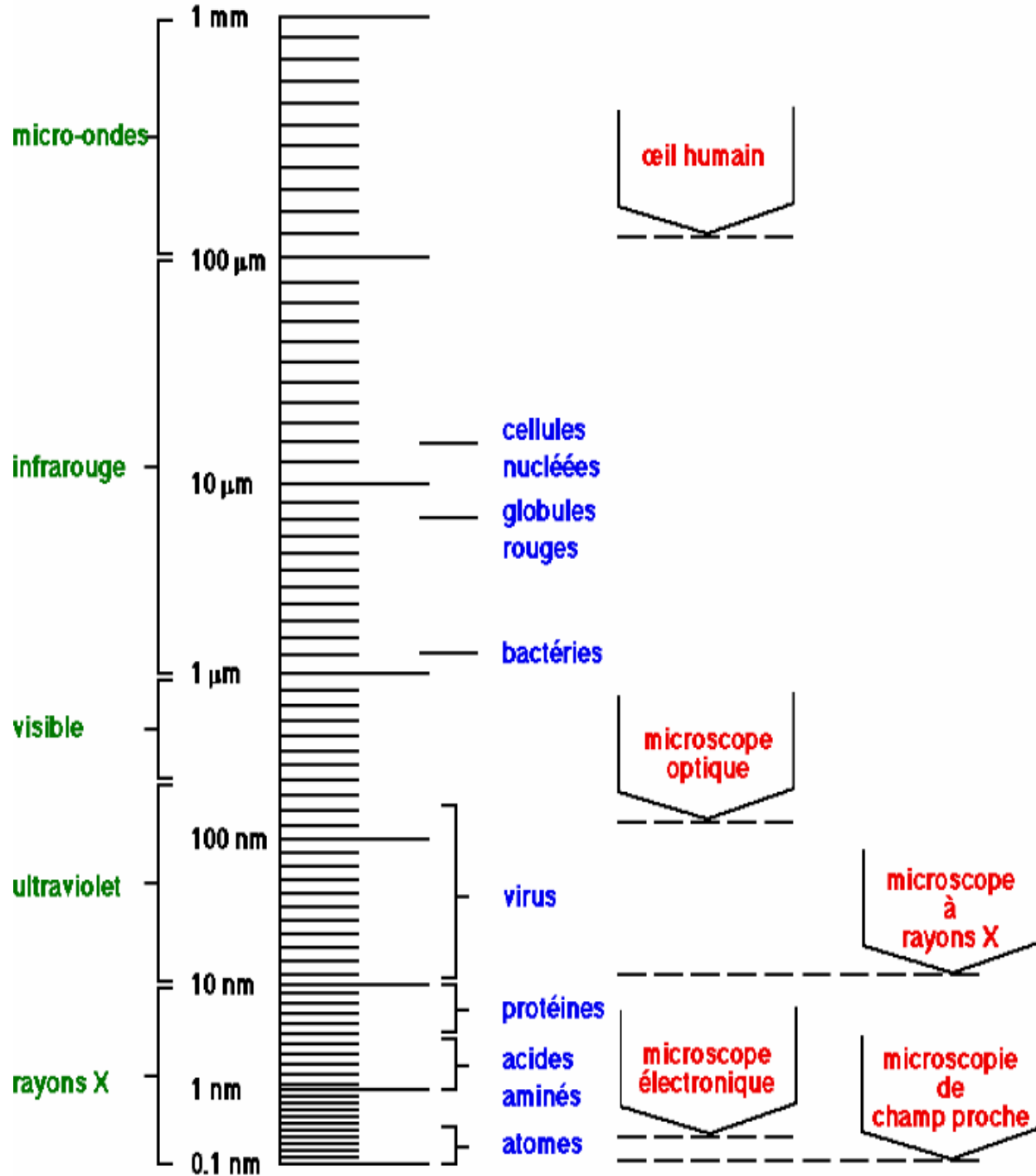
Grossissement de l'objectif	Ouverture Numérique	Profondeur de champ théorique (en microns)	Profondeur de champ pratique (en microns)
4x	0,1	50	172,5
10x	0,25	8	27,6
40x	0,65	1,2	3
100x	1,3	0,3	0,7

# Exemple : grossissement utile d'un microscope

- Résolution de l'œil humain de 0,15 mm (150  $\mu\text{m}$ )
- Résolution d'un microscope optique = 0,2  $\mu\text{m}$
- Grossissement utile d'un microscope optique =  $150/0,2 = 750$
- Au delà de ce grossissement on n'apporte plus d'information supplémentaire sauf en utilisant, comme récepteur, une pellicule photographique dont le pouvoir séparateur (donné par le grain de la pellicule) est inférieur à celui de l'oeil humain.

# Grandissement / Grossissement

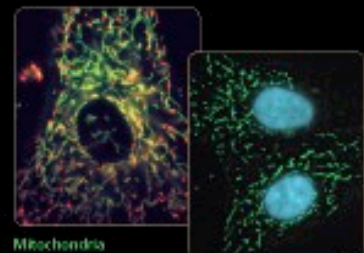
- On parle de **grossissement** pour une image virtuelle et de **grandissement** pour une image réelle.
- On parle de **grandissement** pour un objectif et de **grossissement** pour un oculaire et de **grossissement final d'un microscope** (grandissement objectif  $\times$  grossissement oculaire).
- On appelle grossissement d'un oculaire (ou d'une loupe) le rapport du diamètre apparent de l'image au diamètre apparent de l'objet observé à l'oeil nu, à la distance minimum de vision distincte (environ 25 cm).





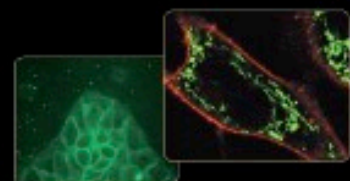
# The Illuminated Cell

Product Guide for Fluorescence Imaging



## Mitochondria

M1512 Mito Tracker™ Red CMXRos  
M1514 Mito Tracker™ Green FM  
M1516 Mito Tracker™ Orange CMXRos  
S11179 SelectiX™ Alexa Fluor™ 488 Cytochrome c Labeling Kit  
I1148 K-1  
R4483 anti-cytochrome oxidase subunit I



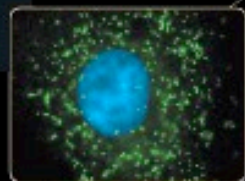
## Plasma Membrane

E11555 DMPE-1-45576 side analog of DMPE-1-41 membrane stain  
Y22875 Wytax™ TM cell labeling solution  
Y22856 Wytax™ TBO cell labeling solution  
Y22887 Wytax™ TBO cell labeling solution  
M11762 Alexa Fluor™ 555 anti-human gamma globulin



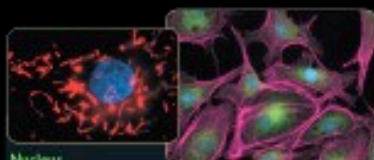
## Cytoskeleton/Tubulin

R22730 Oregon Green™ 488 Taxol  
A11135 anti- $\alpha$ -tubulin



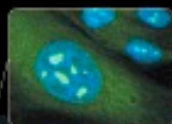
## Peroxisomes

S14291 SelectiX™ Alexa Fluor™ 488 Peroxisome Labeling Kit



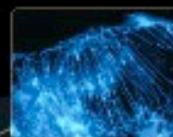
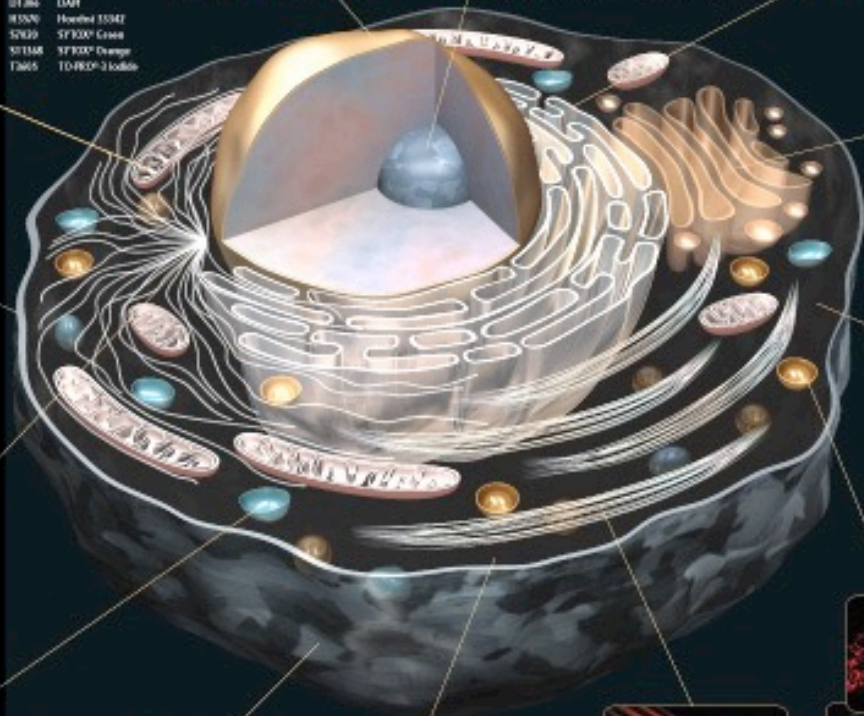
## Nucleus

D1384 DAPI  
R1550 Hoechst 33342  
S2029 SYTOX™ Green  
S11148 SYTOX™ Orange  
T4855 TO-PRO™ 3 iodide



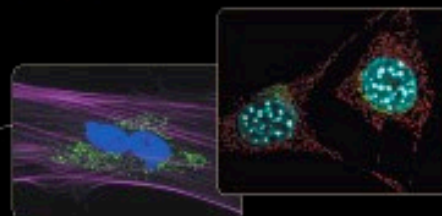
## Nucleoli

R12781 SYTO™ RNASelect™ green/fluorescent cell stain



## Endoplasmic Reticulum

E12153 ER Tracker™ Blue-ER TRX  
S14208 SelectiX™ Alexa Fluor™ 488 Endoplasmic Reticulum Labeling Kit  
R1445 InvivoScribe A, BODIPY™ FL568 conjugated Annexin V



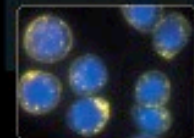
## Golgi

R12136 anti- $\beta$ -tubulin IV  
M1415 Mito C<sub>1</sub> carboxamide conjugated to BSA  
R12600 BODIPY™ FL C<sub>1</sub> carboxamide conjugated to BSA  
R14460 BODIPY™ FL C<sub>1</sub> carboxamide conjugated to BSA



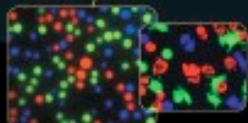
## Cytosolic Biosensors

**Cytosolic Ca<sup>2+</sup>**  
I1229 Indo-1, AM  
I1211 Fura-2, AM  
I14396 Fura-4, AM  
R12698F Fura-2, AM  
**Cytosolic pH**  
M14266 mag-fluor-4, AM  
M1293 mag-fluor-3, AM  
**Zn<sup>2+</sup>**  
I24115 FluoZn™-3, AM  
R16251 FluoZn™-3, AM  
**Cytosolic p11**  
R1158 p11-2, AM  
I1271 SNAP™ 1, acrylamide/ethanolamine acetate  
**Cytosolic dGTP**  
S4837 CMH(DCTM) (BOS general)  
D11162 dGTP-actin (Bioss/Invitrogen) (super stable)  
**Cytosolic dATP**  
R12385 anti-actin cytoskeleton rabbit IgG (anti-actin)  
D23842 DM-1A1 dantrolene



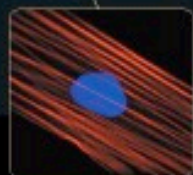
## Lipid Rafts

R12916 BODIPY™ FL C<sub>12</sub> ganglioside GM<sub>1</sub>  
Y14815 Wytax™ Alexa Fluor™ 488 Lipid Raft Labeling Kit  
Y14816 Wytax™ Alexa Fluor™ 555 Lipid Raft Labeling Kit  
Y14817 Wytax™ Alexa Fluor™ 794 Lipid Raft Labeling Kit



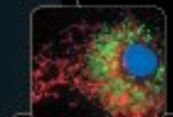
## Cytosol

C11088B Cytosol, AM  
C1155 Cytosol, Green CMFDA  
C1152 Cytosol™ Red CMFDA



## Cytoskeleton/Actin

A13239 Alexa Fluor™ 488 phalloidin  
R1075 InvivoScribe phalloidin  
A13281 Alexa Fluor™ 555 phalloidin

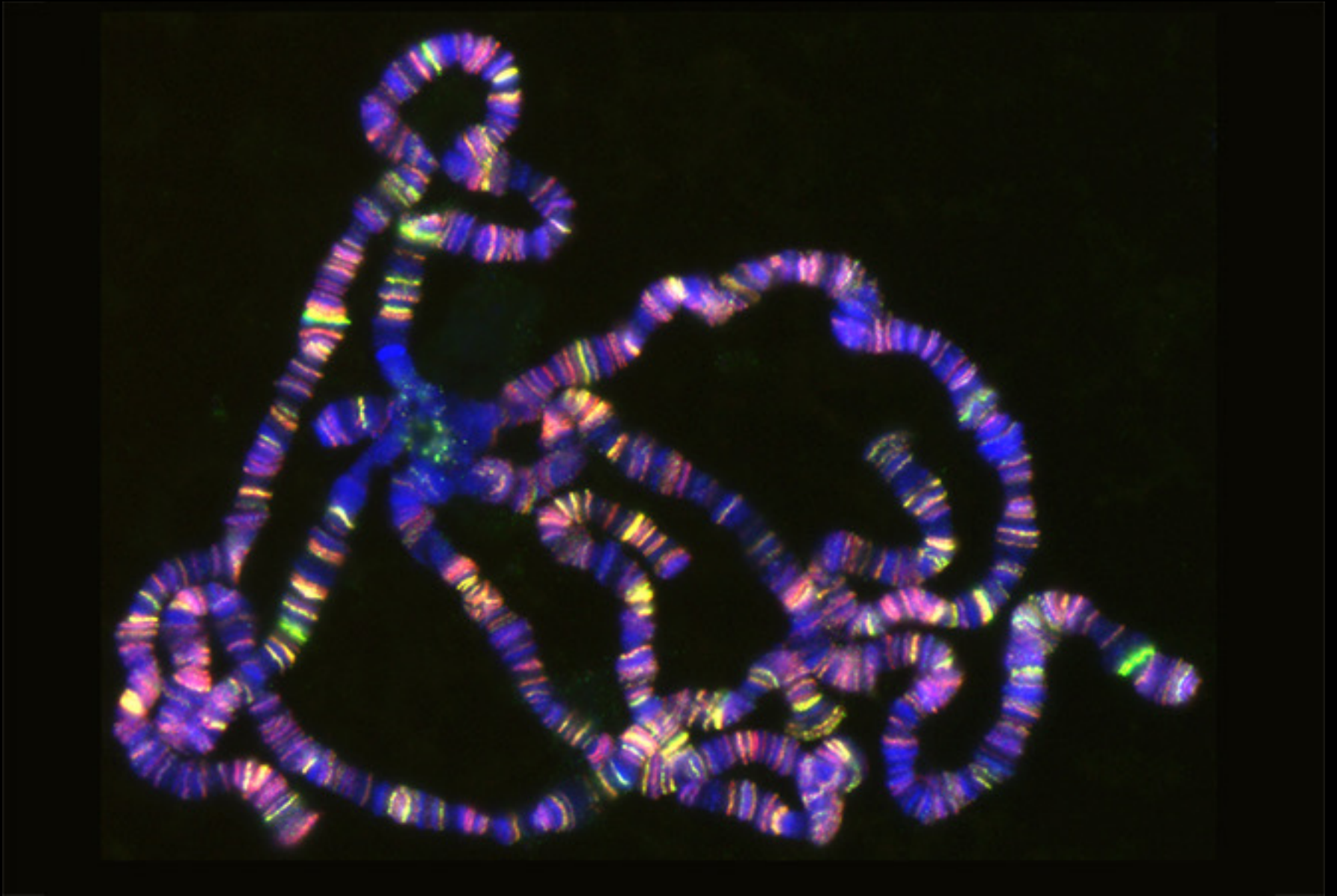


## Lymphocytes

L1428 InvivoScribe™ Red DAPI W  
L1430 InvivoScribe™ Green DAPI W  
L1432 InvivoScribe™ Yellow Blue DAPI W

**Molecular Probes**  
Invitrogen detection technologies

www.molecularprobes.com | www.invitrogen.com



Drosophila polytene chromosome

# Microscopie en lumière transmise

- **Eclairage critique**

- Méthode la plus simple qui consiste à focaliser la lumière de la source sur l'échantillon de sorte que l'image de la source soit projetée sur l'échantillon. L'inconvénient de cette technique est que la source n'est généralement pas homogène et par conséquent, **l'échantillon ne sera pas éclairé uniformément.**

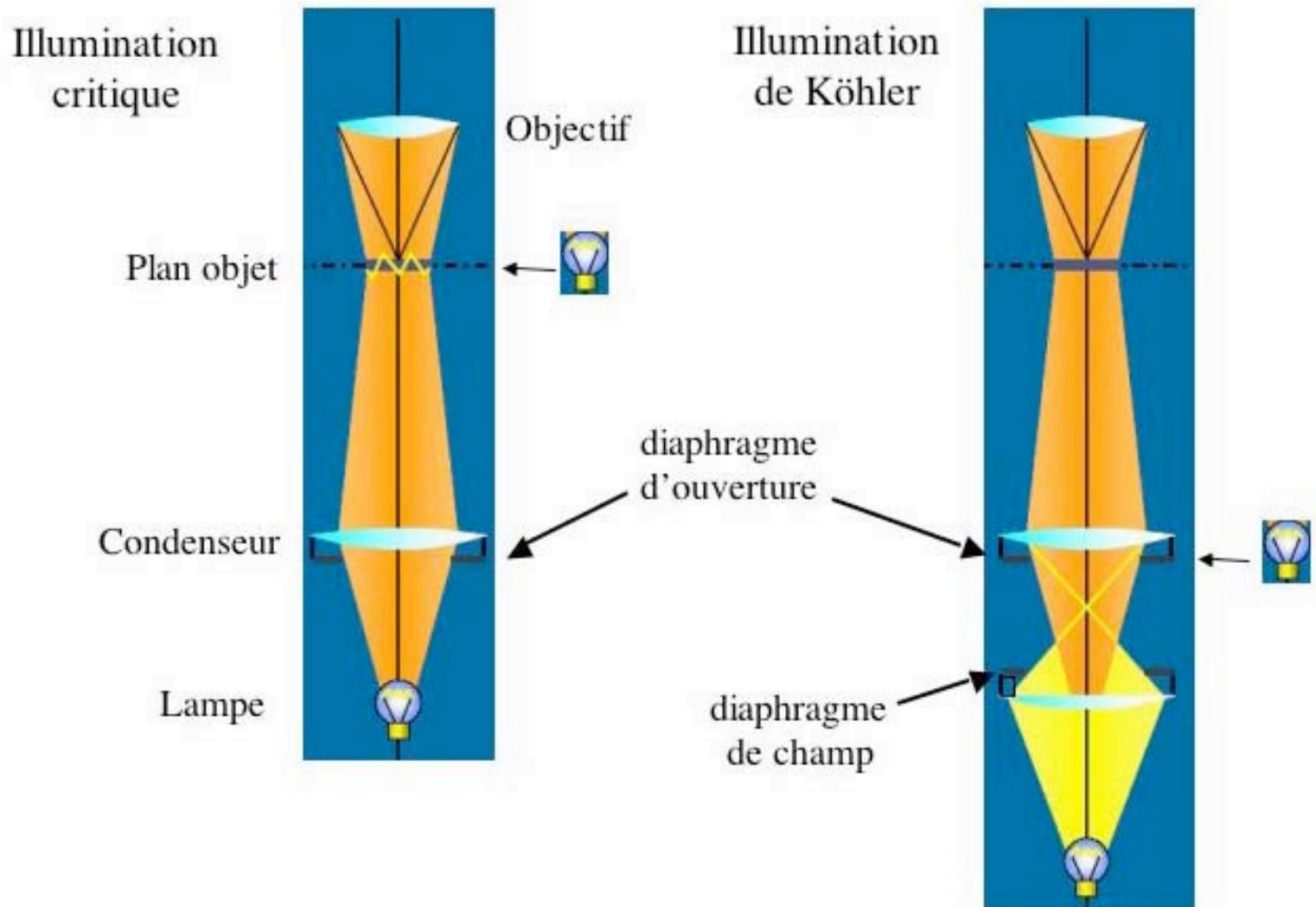
- **Eclairage de Köhler**

- Cette illumination permet d'avoir un **échantillon éclairé uniformément** et d'obtenir la meilleure résolution possible du microscope. **L'image de la source est formée sur le diaphragme d'ouverture et le condenseur va éclairer l'échantillon avec des rayons parallèles, de façon homogène.** Le réglage du diaphragme d'ouverture du condenseur va jouer sur le contraste et la résolution des images. De façon générale, il faut **ajuster l'ouverture du condenseur à l'ouverture numérique de l'objectif pour avoir une résolution optimale.**

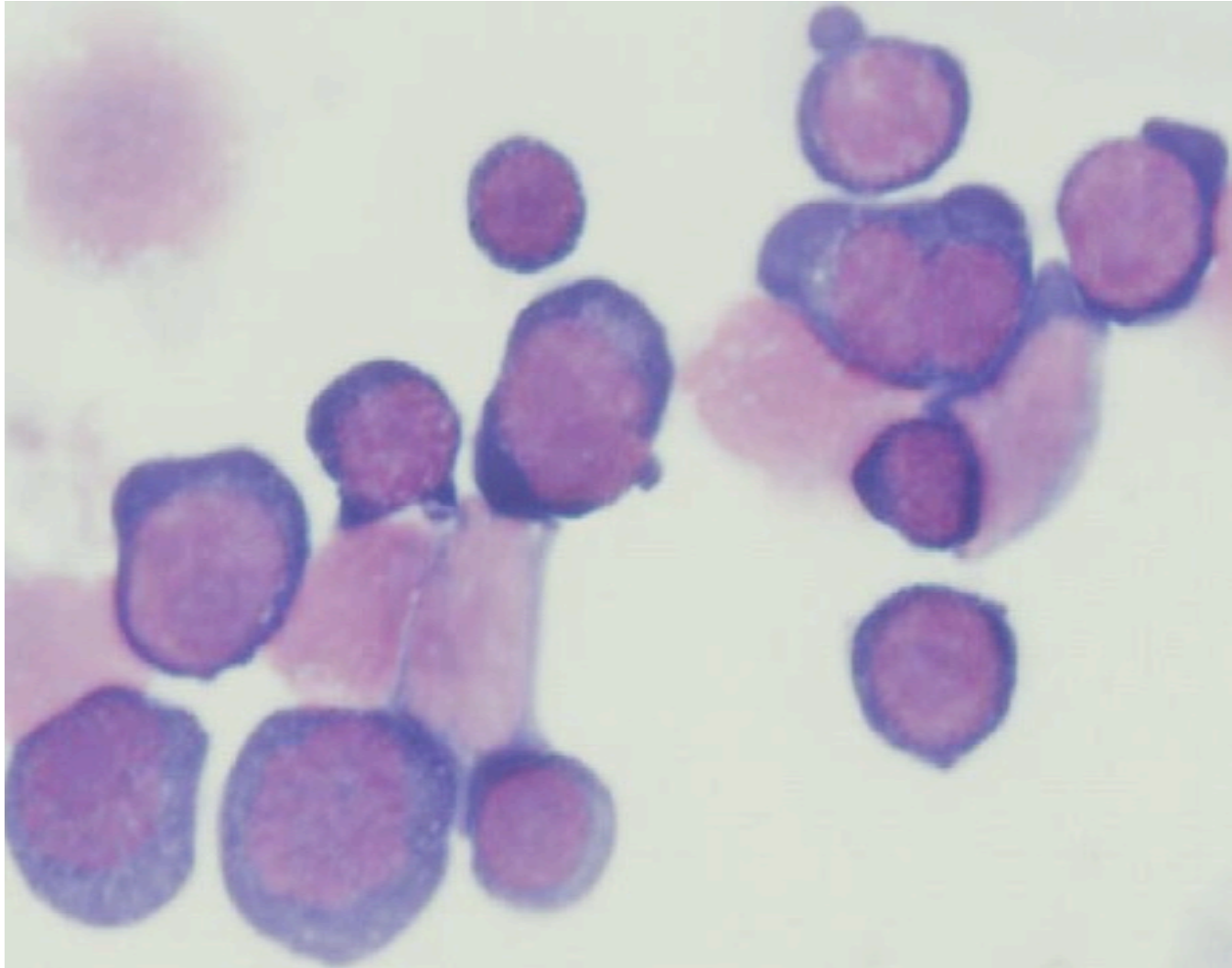
# Microscopie en lumière transmise

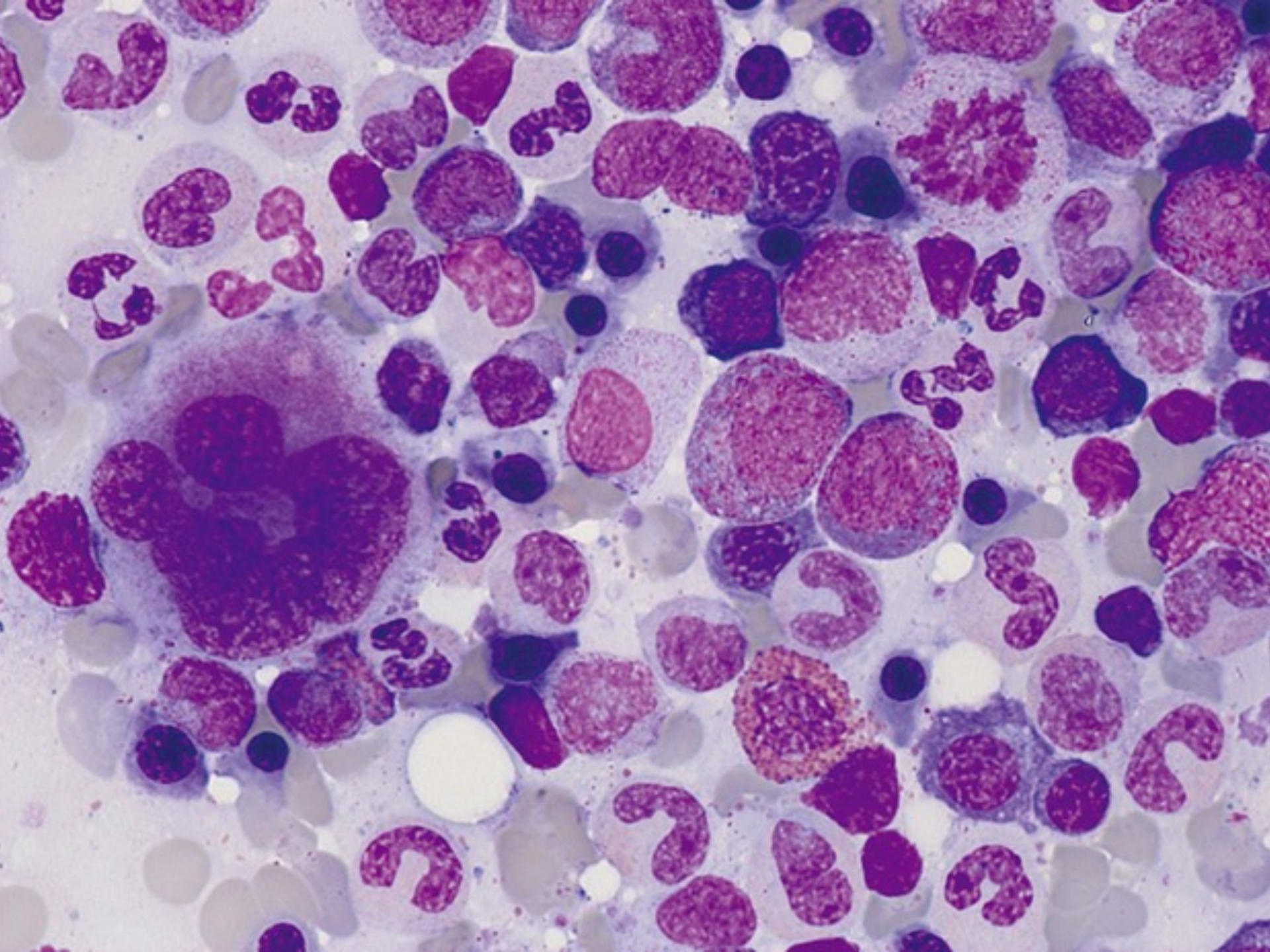
- **Alignement de Köhler (1893)**
  - Centrage des lentilles et diaphragmes du chemin optique
- **Illumination homogène de l'échantillon**
  - Réglage de l'ouverture du diaphragme de champ
- **Optimisation de la résolution et du contraste**
  - Réglage de l'ouverture du diaphragme d'ouverture

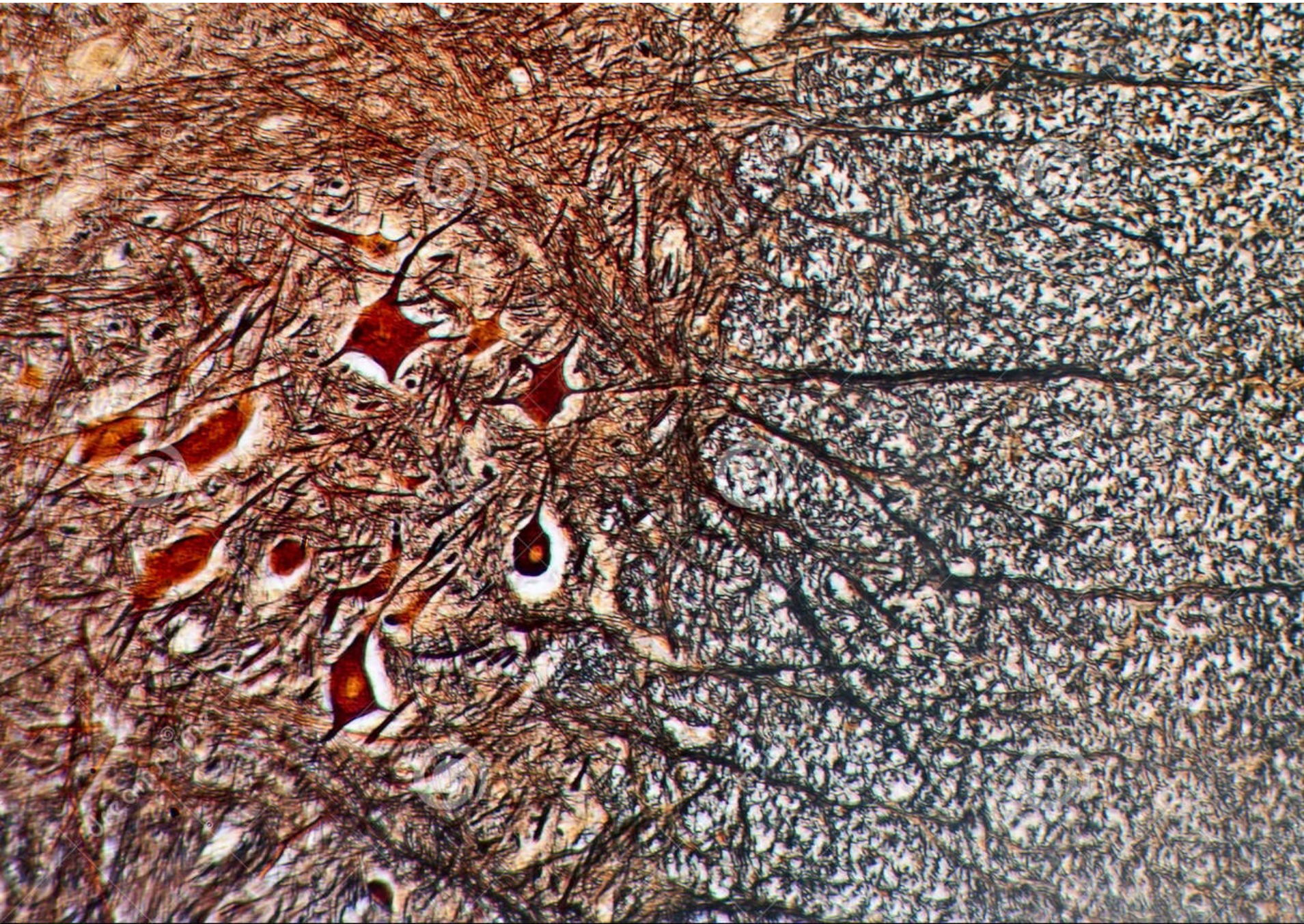
# Eclairage de l'échantillon



# Lumière transmise









# Contraste

- **Contrast is defined as the difference in light intensity between the image and the adjacent background relative to the overall background intensity.**
- **In general, a minimum contrast value of 0.02 (2 percent) is needed by the human eye to distinguish differences between the image and its background.**



# Autres techniques de contraste

- La microscopie en transmission n'offre pas beaucoup de contraste pour les objets transparents comme les cellules isolées. Pour obtenir des observations plus informatives, il faut utiliser d'autres techniques optiques permettant de révéler les structures de l'échantillon : **contraste de phase et contraste interférentiel**.



# Contraste de phase

- Cette technique permet de transformer une différence d'indice de réfraction dans l'échantillon en une différence d'intensité.
- Le principe consiste à éclairer l'échantillon avec un anneau lumineux (obtenu en plaçant une plaque percée d'un anneau dans le condenseur) et à récupérer la lumière avec un objectif spécial comportant une plaque de phase, c'est-à-dire une plaque avec un anneau (de la taille de l'image de l'anneau du condenseur par l'objectif) entraînant un déphasage de la lumière le traversant.
- Seule la lumière non-déviée par l'échantillon passera par cet anneau et sera ainsi en opposition de phase avec la lumière diffractée (qui passe dans le reste de la plaque de phase). Il s'ensuit des interférences destructrices au plan image ce qui permet d'observer des variations d'amplitude correspondantes à des variations de l'indice de réfraction de l'échantillon.
- L'alignement de la plaque de phase et de l'anneau du condenseur est particulièrement important pour obtenir cet effet.



# Lumière Transmise

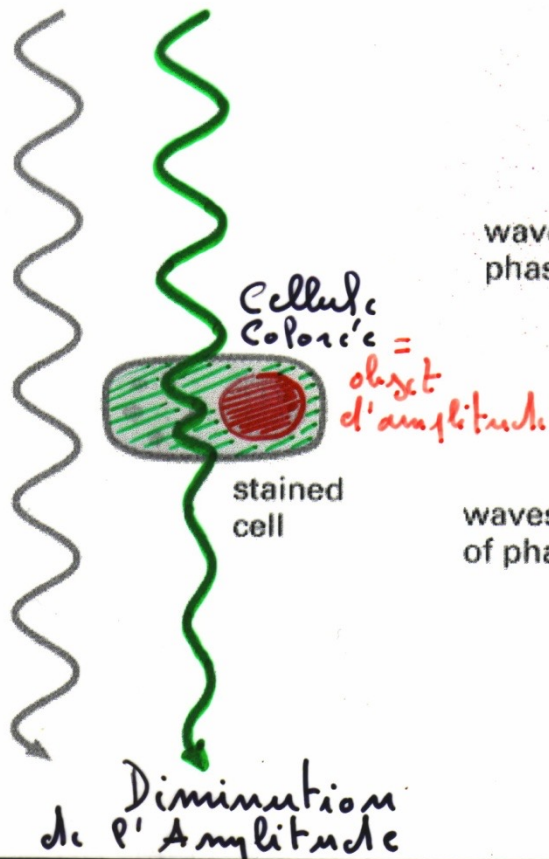
# Lumière Transmise

## Fond Claire

## Contraste de Phase

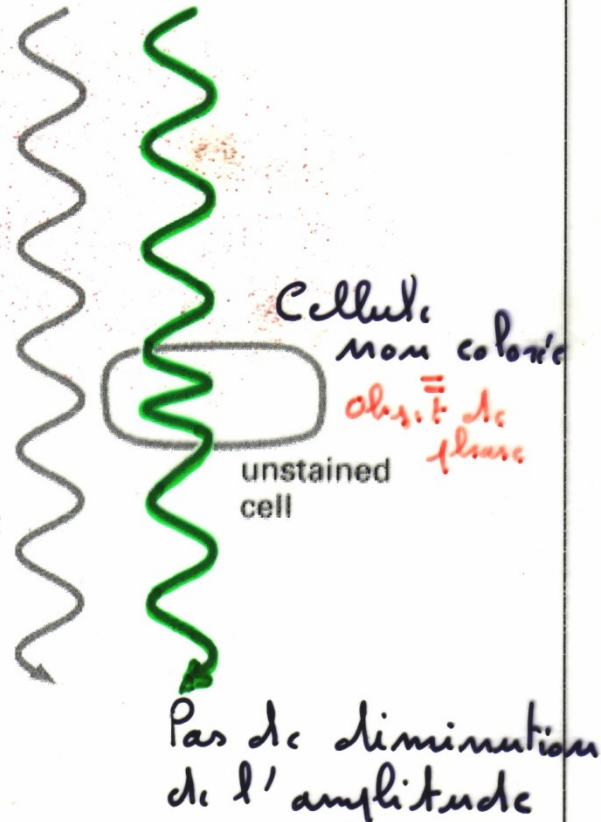
(A) incident light

(B) incident light



waves in phase

waves out of phase



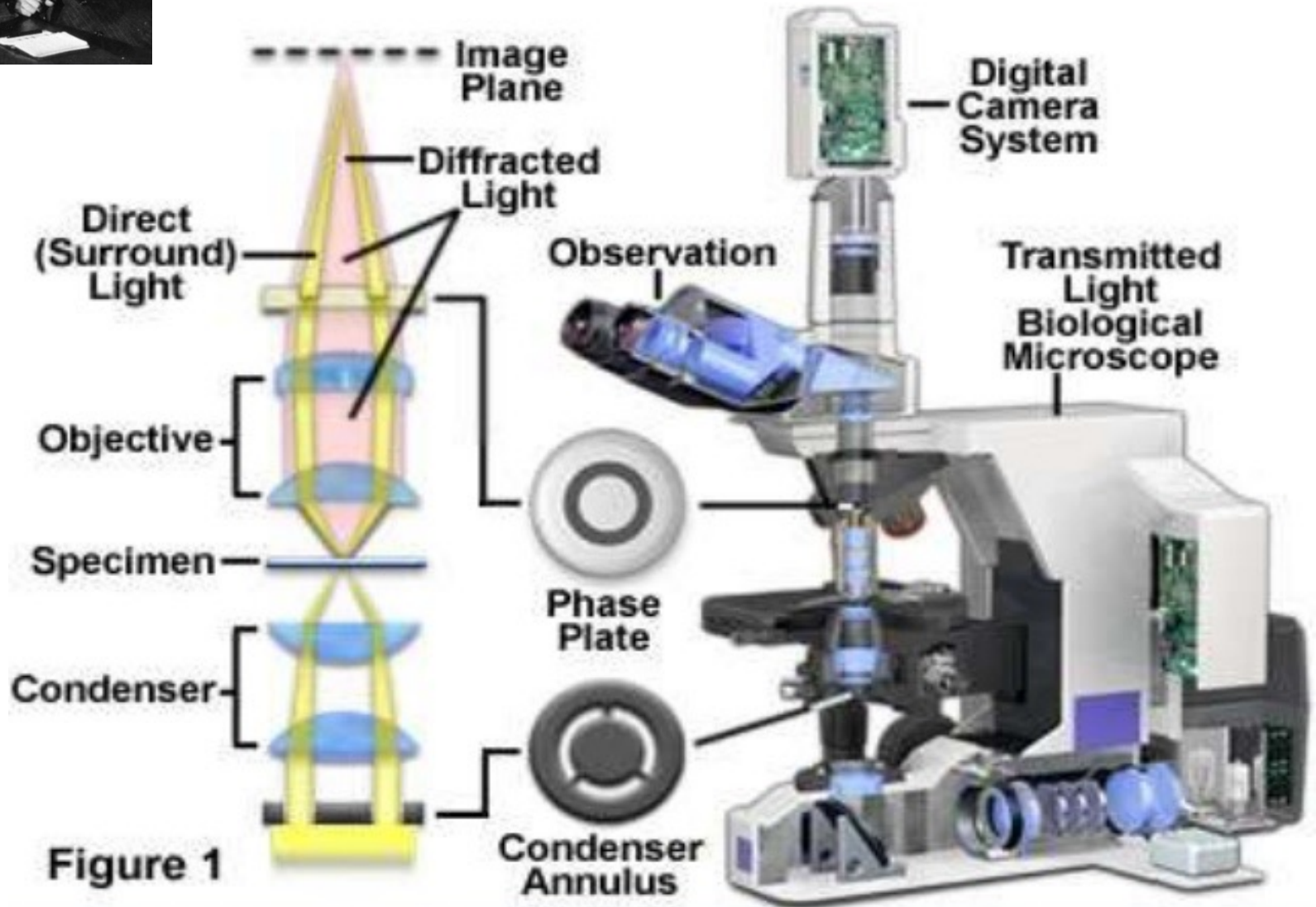
From The Art of MBoC<sup>3</sup> © 1995 Garland Publishing, Inc.

Pas de décalage de phases =>  
(décalage non perceptible)

Ondes en opposition de phase

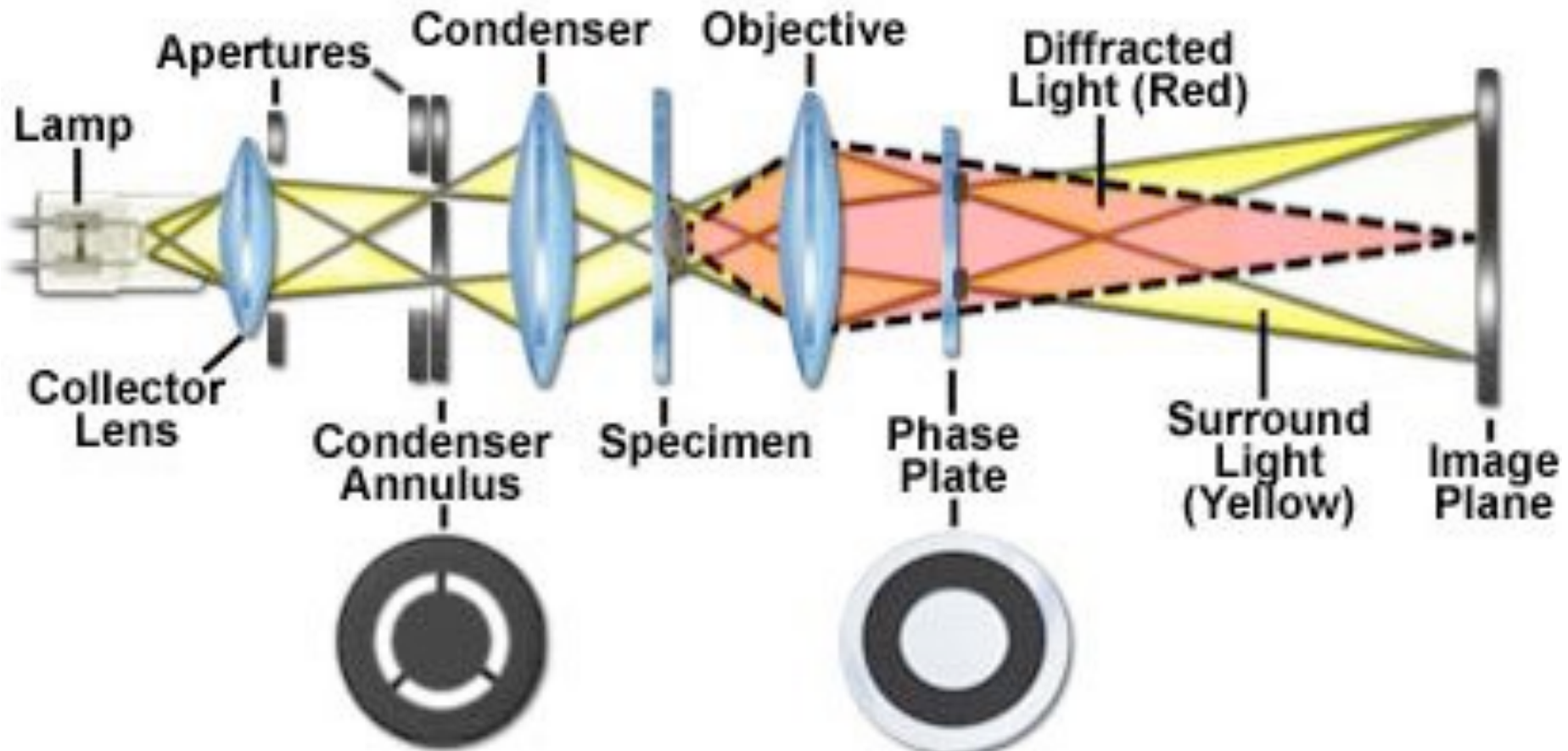


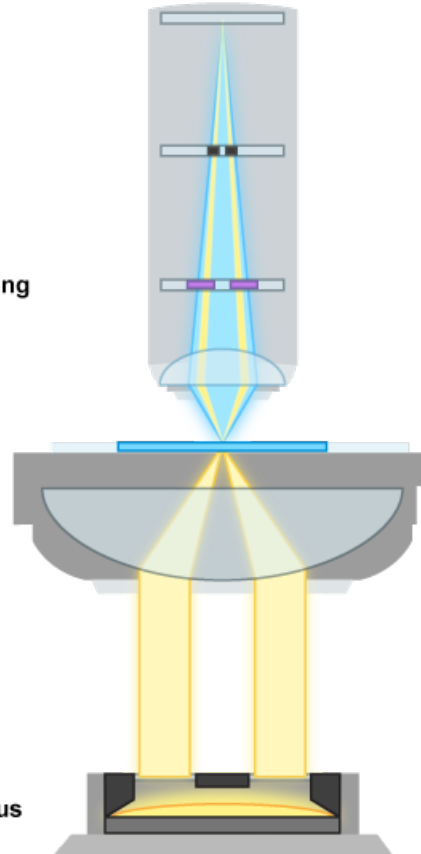
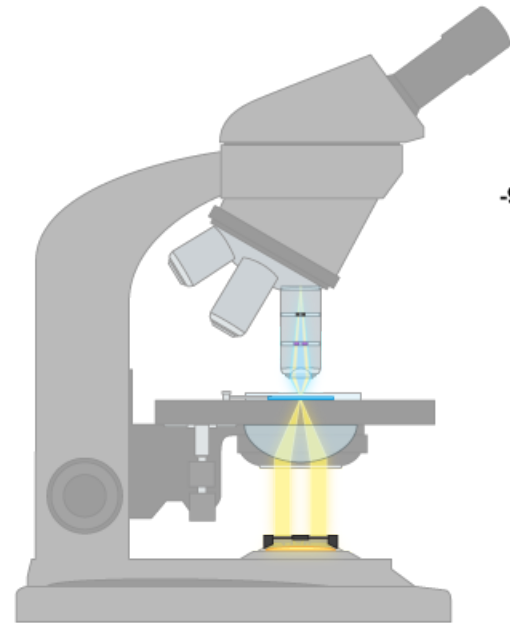
## Phase Contrast Microscope Configuration








# Contraste de phase





1. **Illuminating light** is passed through the **Condenser Annulus** to produce an annular phase ring of the appropriate size for the **Condenser**
2. The **Condenser** focuses the **light** upon the **Specimen**
3. Some of the **illuminating light** is scattered and phase shifted approximately  $-90^\circ$  by the **Specimen** (**blue**)
4. A **Phase Shift Ring** eliminates the phase difference between the **background light** and **scattered rays**, producing constructive interference that enhances the brightness of the foreground image of the **Specimen**.
5. The background light is dimmed by a **Gray Filter Ring**, minimizing the amount of the **illuminating light** that reaches the **Image Plane**.
6. **Image** of the specimen reaches the **Image Plane**.



-  = Background Light
-  = Scattered Light
-  = Foreground Image (Background + Scattered)



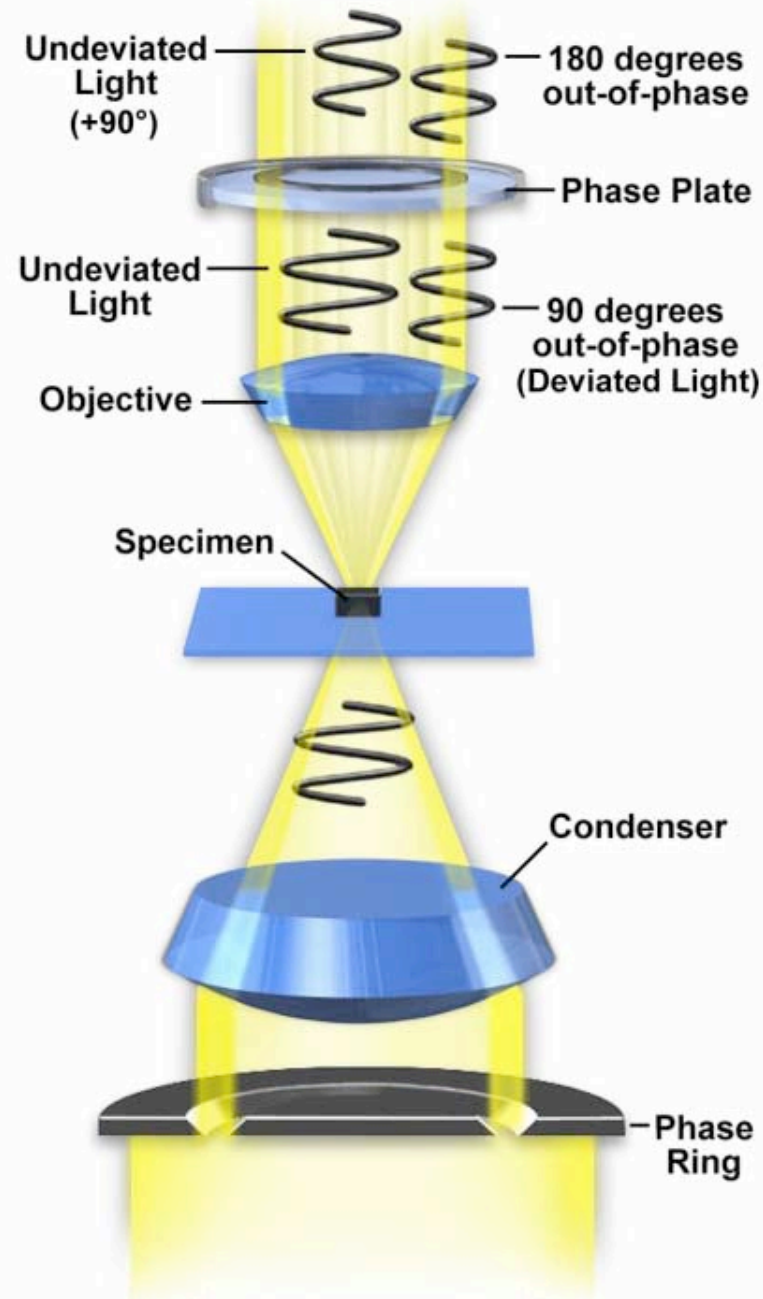


# Contraste de phase

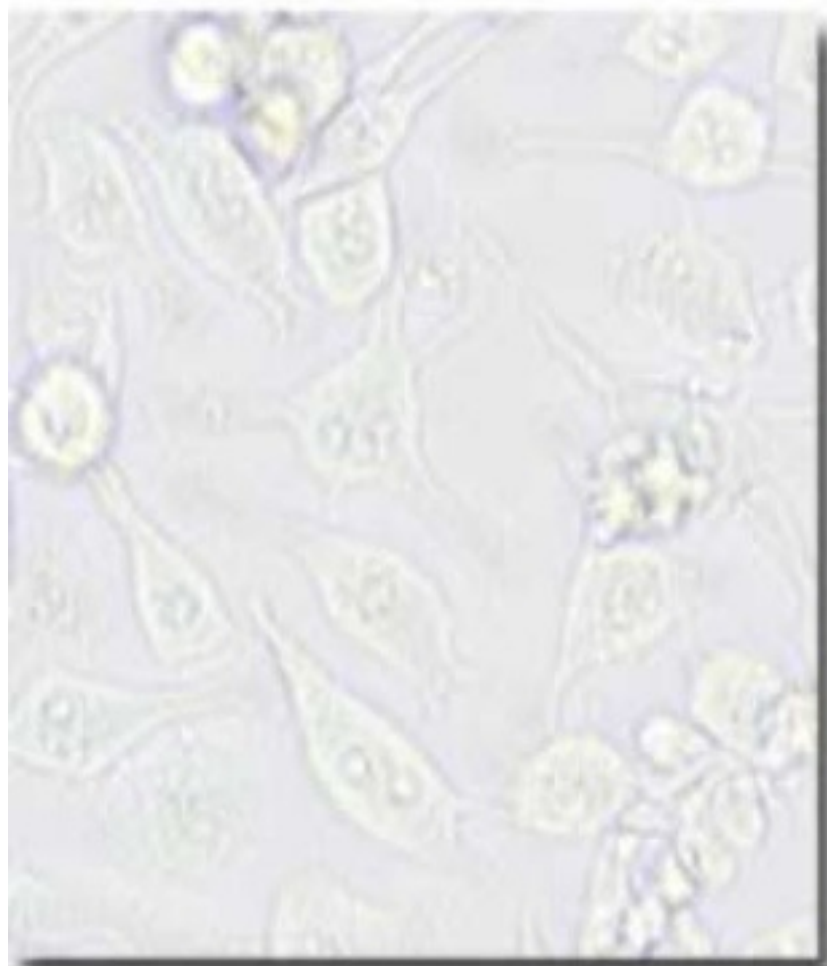




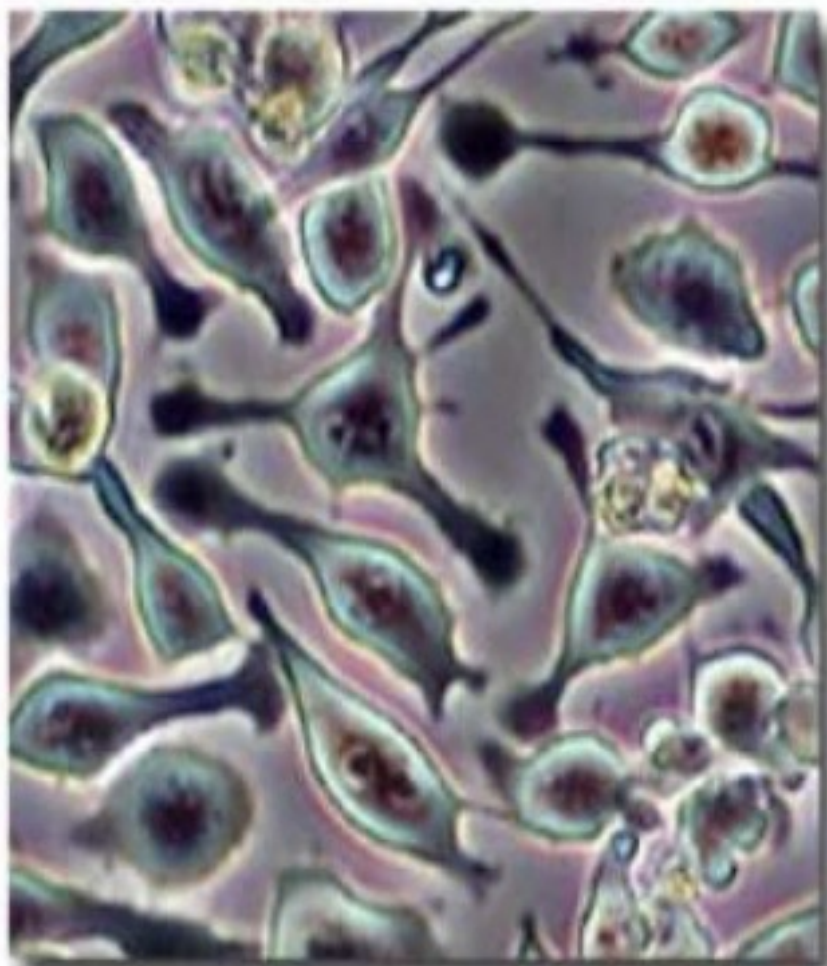
# Phase Contrast Microscopy



## Living Cells in Brightfield and Phase Contrast

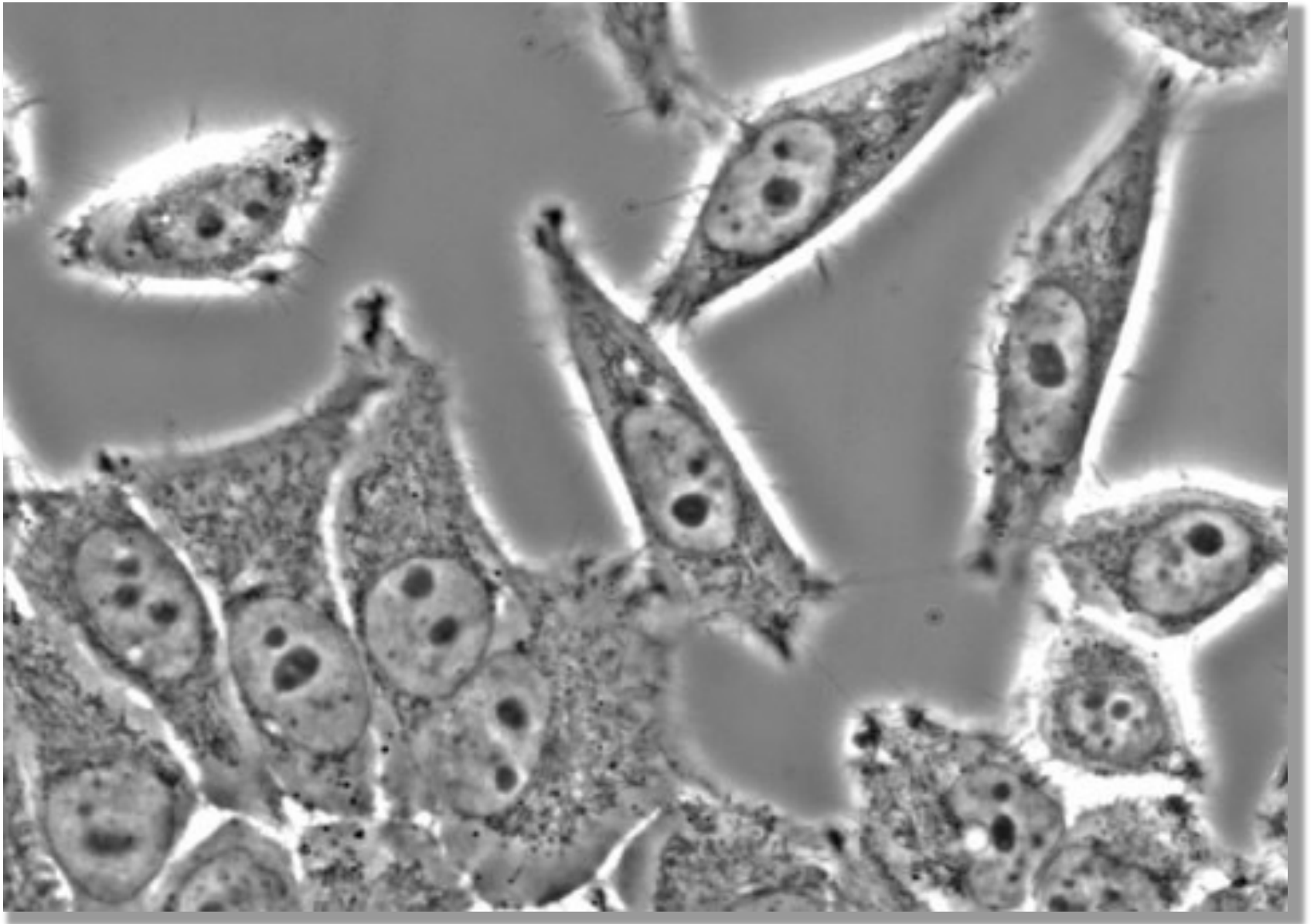


Brightfield



Phase contrast

# Contraste de phase



# Contraste de phase



# Contraste interférentiel (DIC / Nomarski)

- La technique **DIC (Differential Interferential Contrast)** ou Nomarski (du nom de son inventeur) est basée sur une **transformation des changements d'indice de réfraction dans l'échantillon en un changement d'amplitude lumineuse**, observable à l'œil

- Les différences de chemin optique sont transformées en différences d'intensité :

$$\text{Optical Path Difference} = (n_2 - n_1) \times T$$

avec  $n_2$  : indice réfraction échantillon,  $n_1$  : indice réfraction milieu,  $T$  : épaisseur de l'échantillon

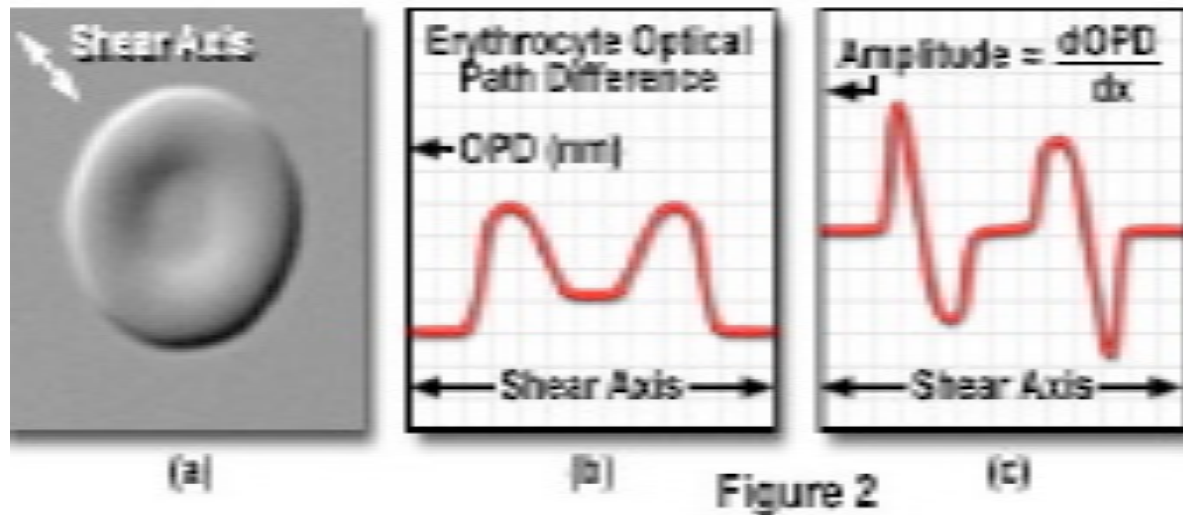
- L'intensité des images de contraste interférentiel est équivalente à la dérivée première de la différence de chemin optique :

$$\text{Intensité} \sim d \text{ Optical Path Difference} / dX$$

- **On éclaire l'échantillon avec une lumière séparée en deux polarisations à l'aide d'un prisme de Wollaston**. Ces deux rayons vont traverser l'échantillon en passant par des chemins qui peuvent être un peu différents, **puis ils seront combinés à nouveau par un deuxième prisme pour former des interférences**. Ces interférences destructrices et constructrices révèlent les structures intracellulaires, en particulier les membranes (qui présentent souvent une forte variation d'indice de réfraction).

# DIC

Specimen Optical Path Difference and DIC Amplitude Profile



L'image d'un objet transparent apparaît en « pseudo volume »

Utilisé pour l'observation de cellules vivantes, micro-organismes, coupes de tissus, organites cellulaires

# Differential Interference Contrast Microscope Configuration

Olympus Digital BX61 Motorized Fluorescence and DIC Microscope

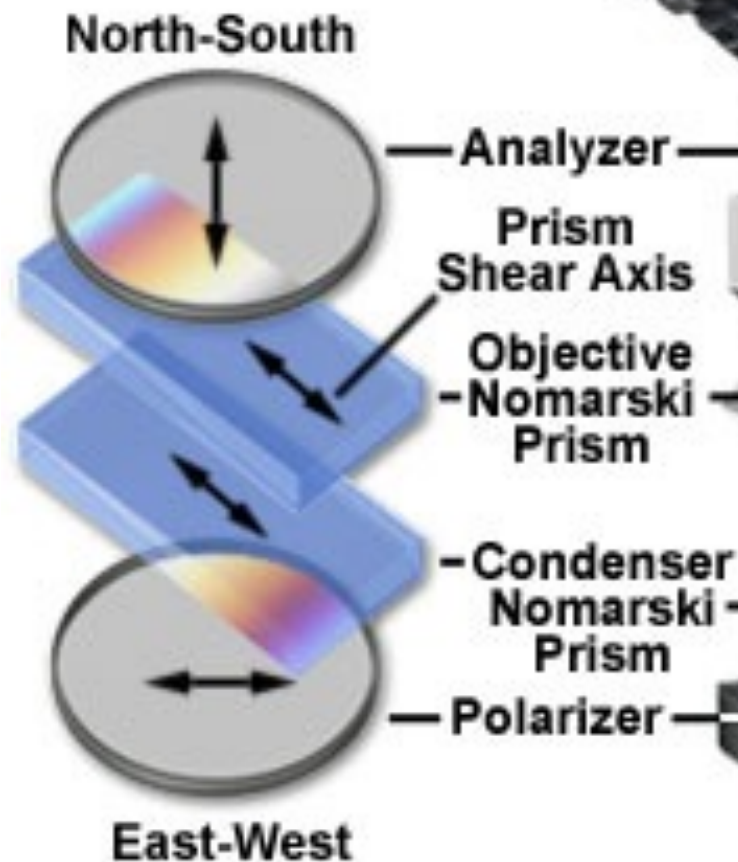


Figure 1





# Contraste interférentiel

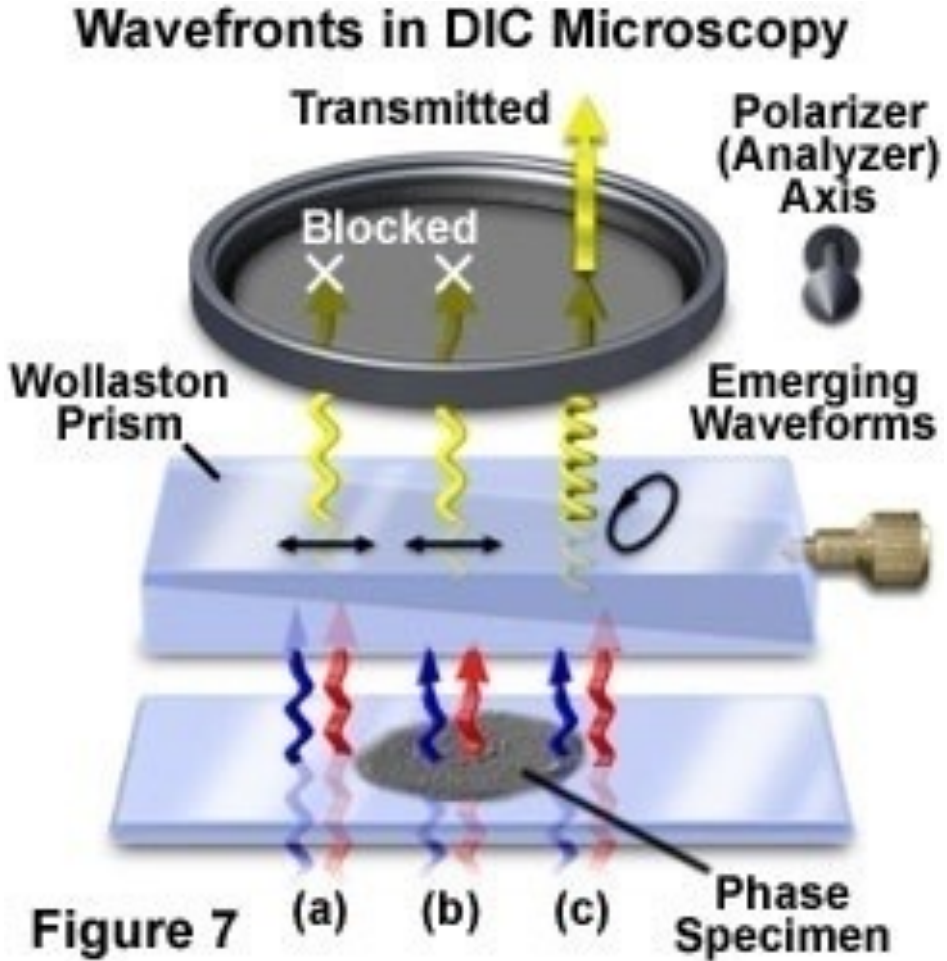
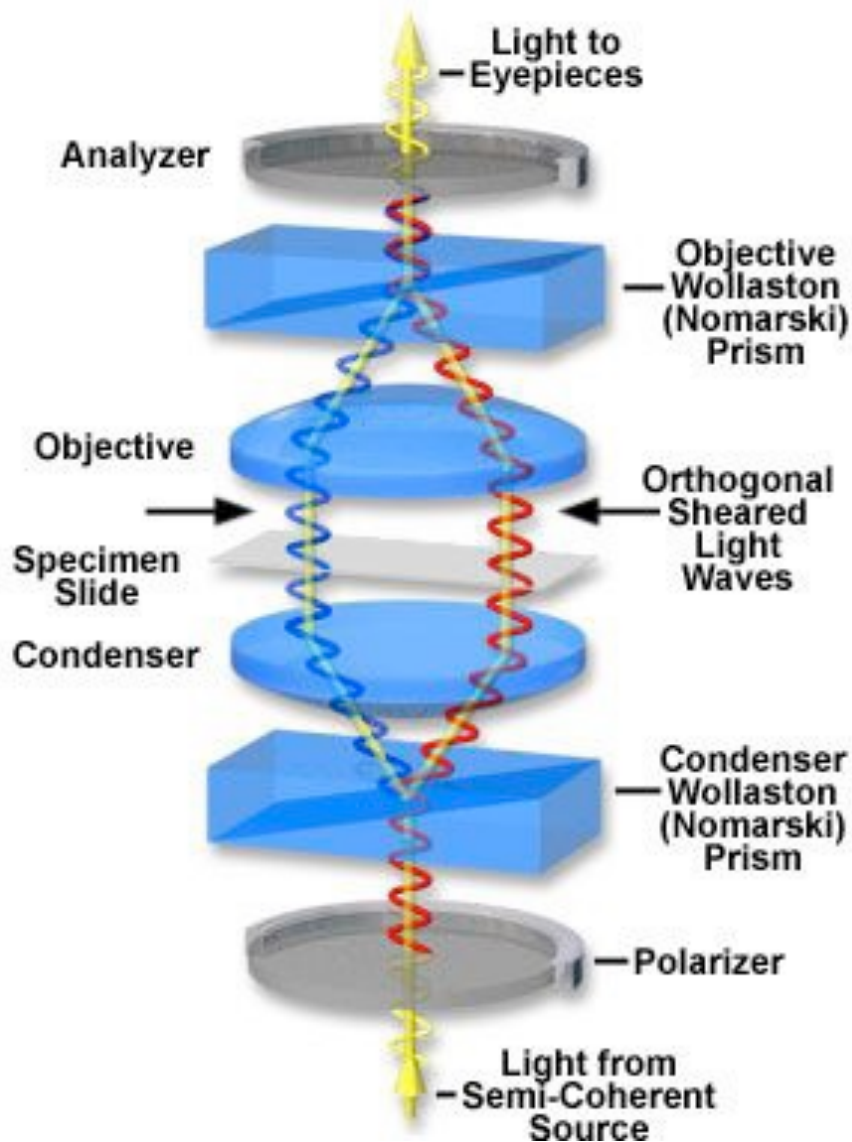
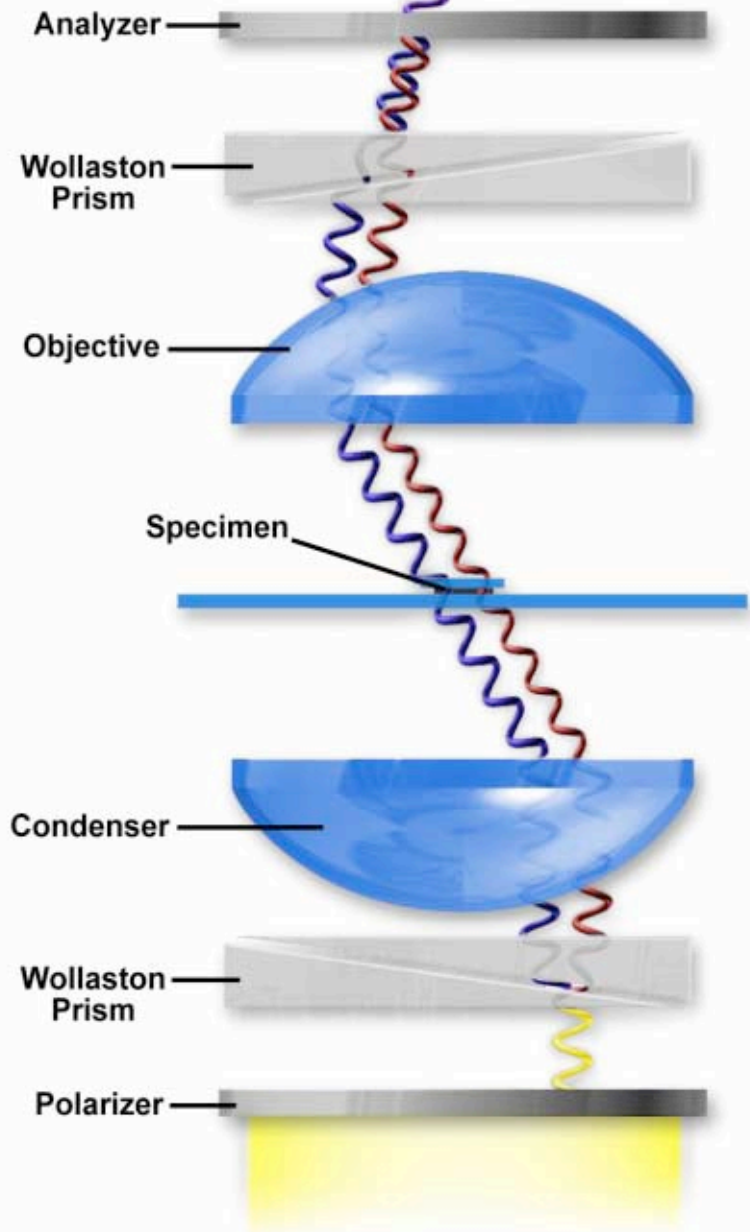


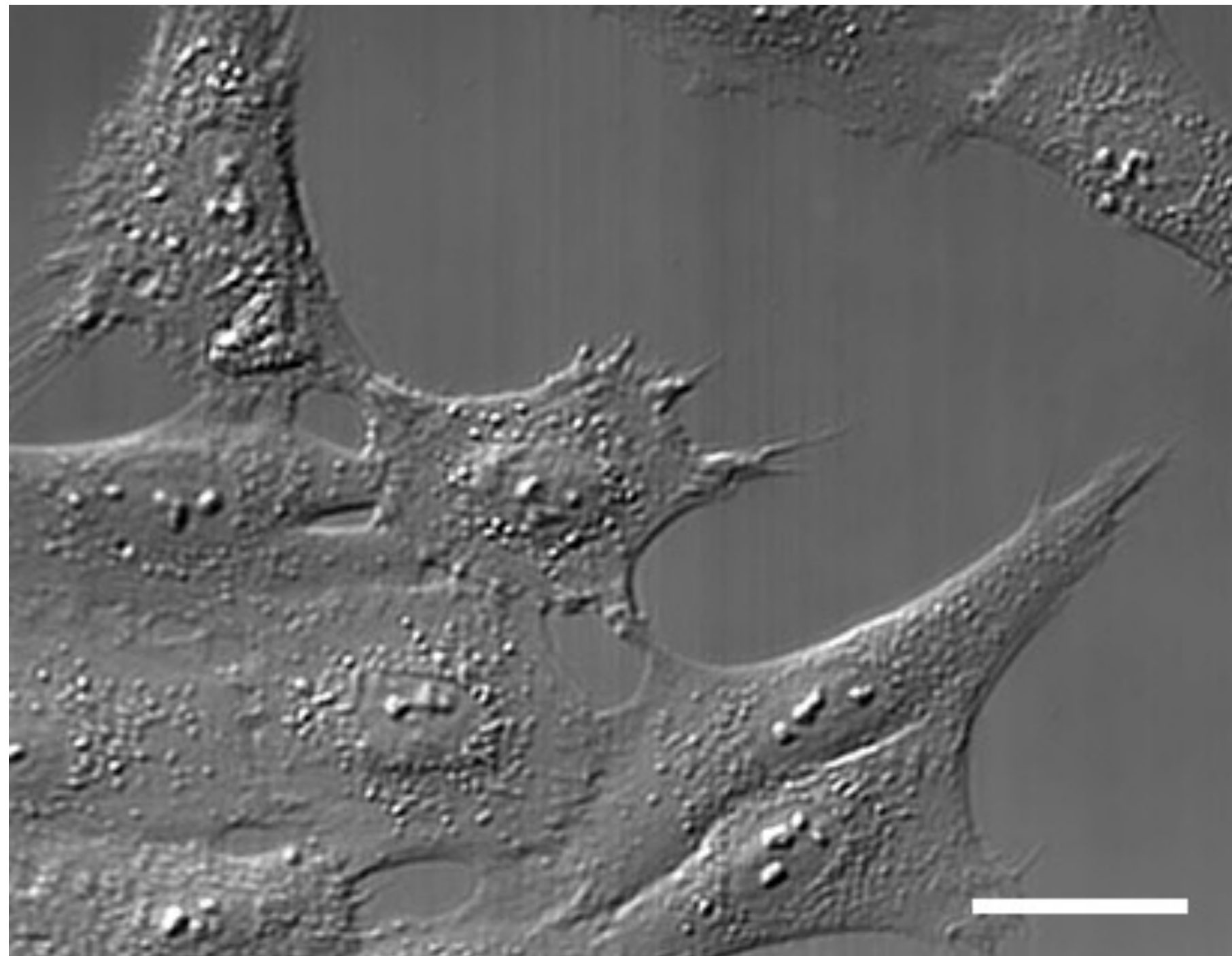
Figure 7

# Differential Interference Contrast Microscopy

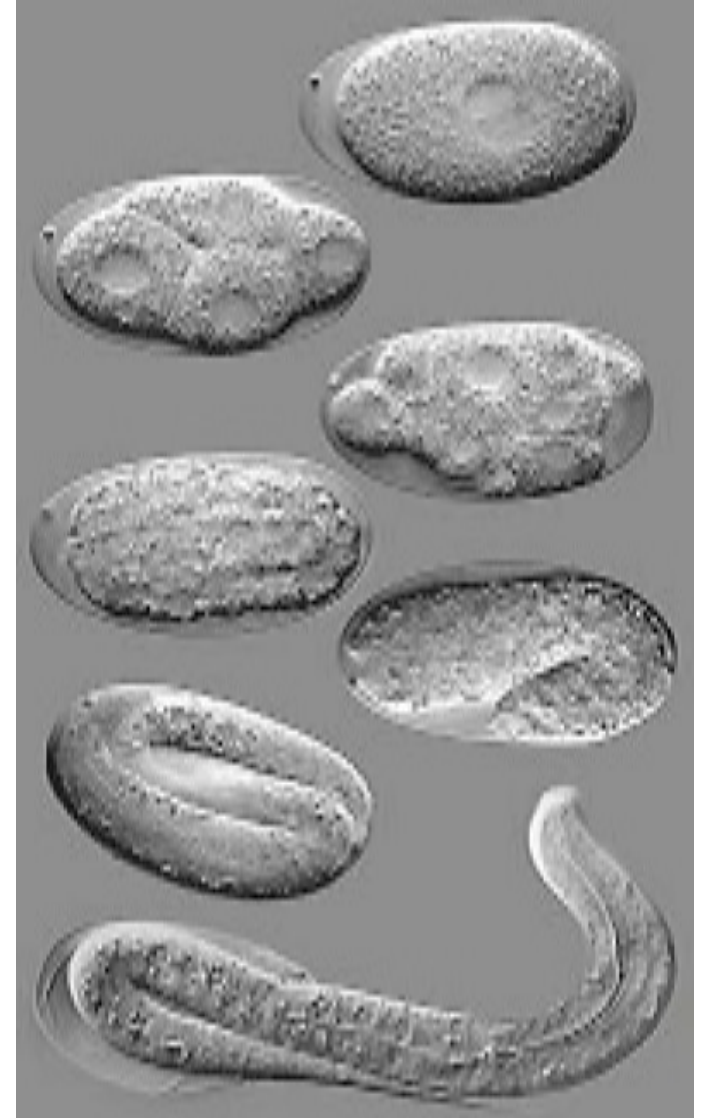
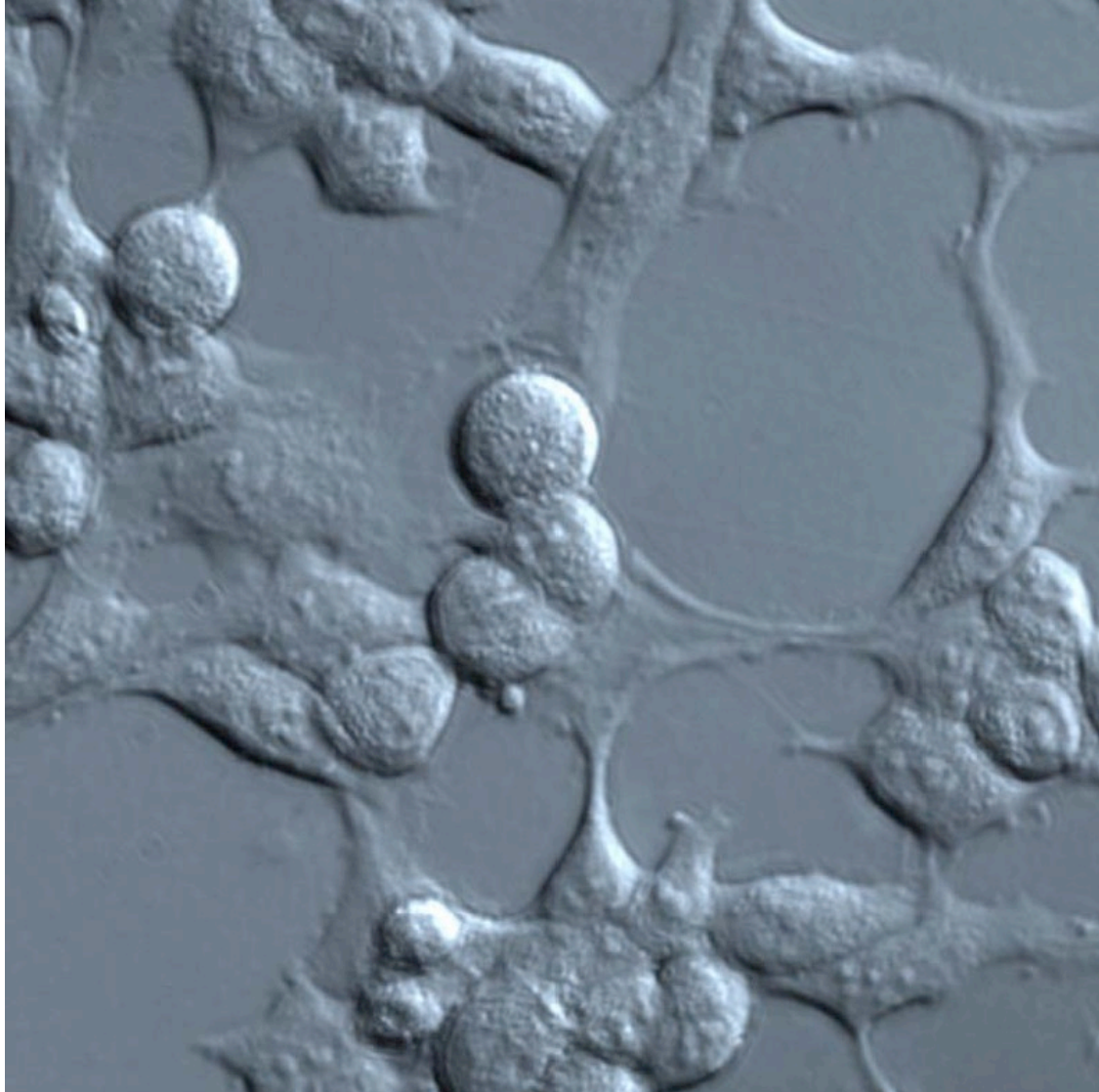


DIC

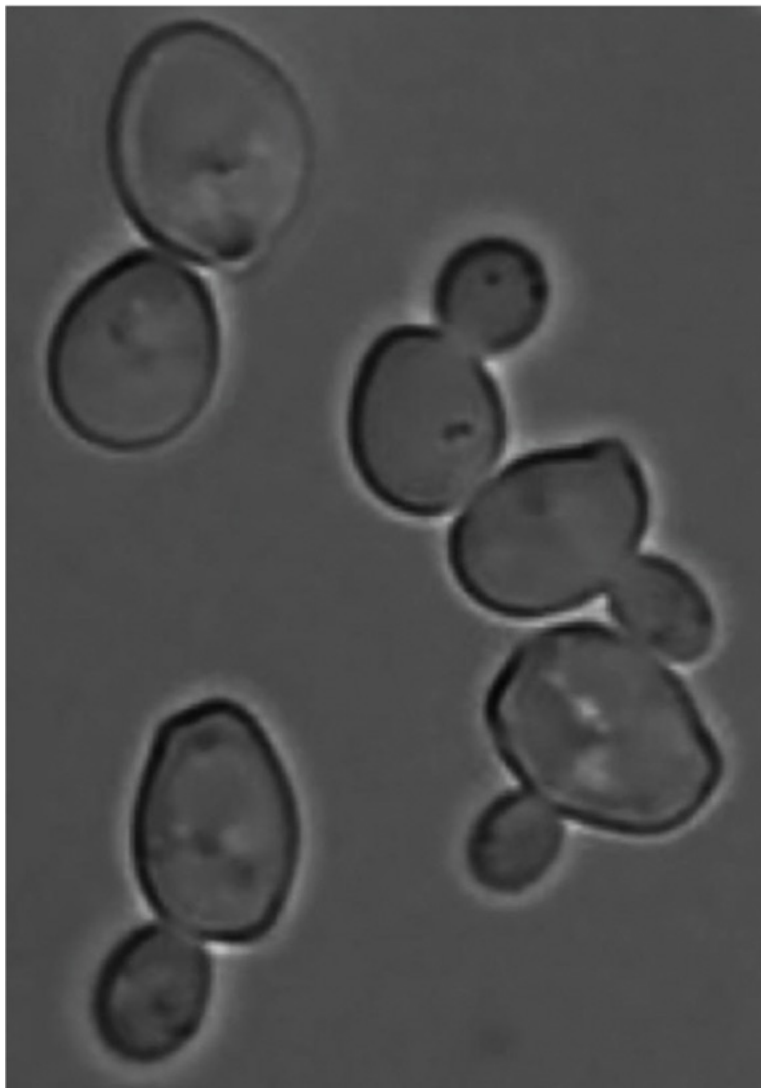




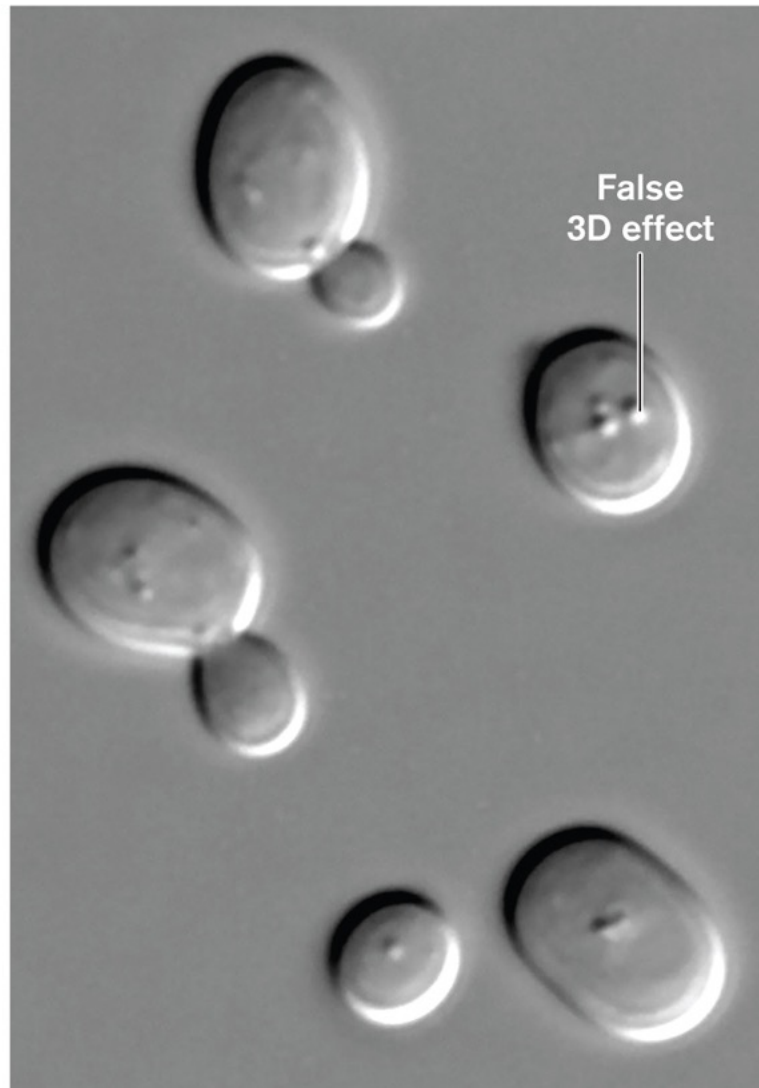
# Contraste interférentiel

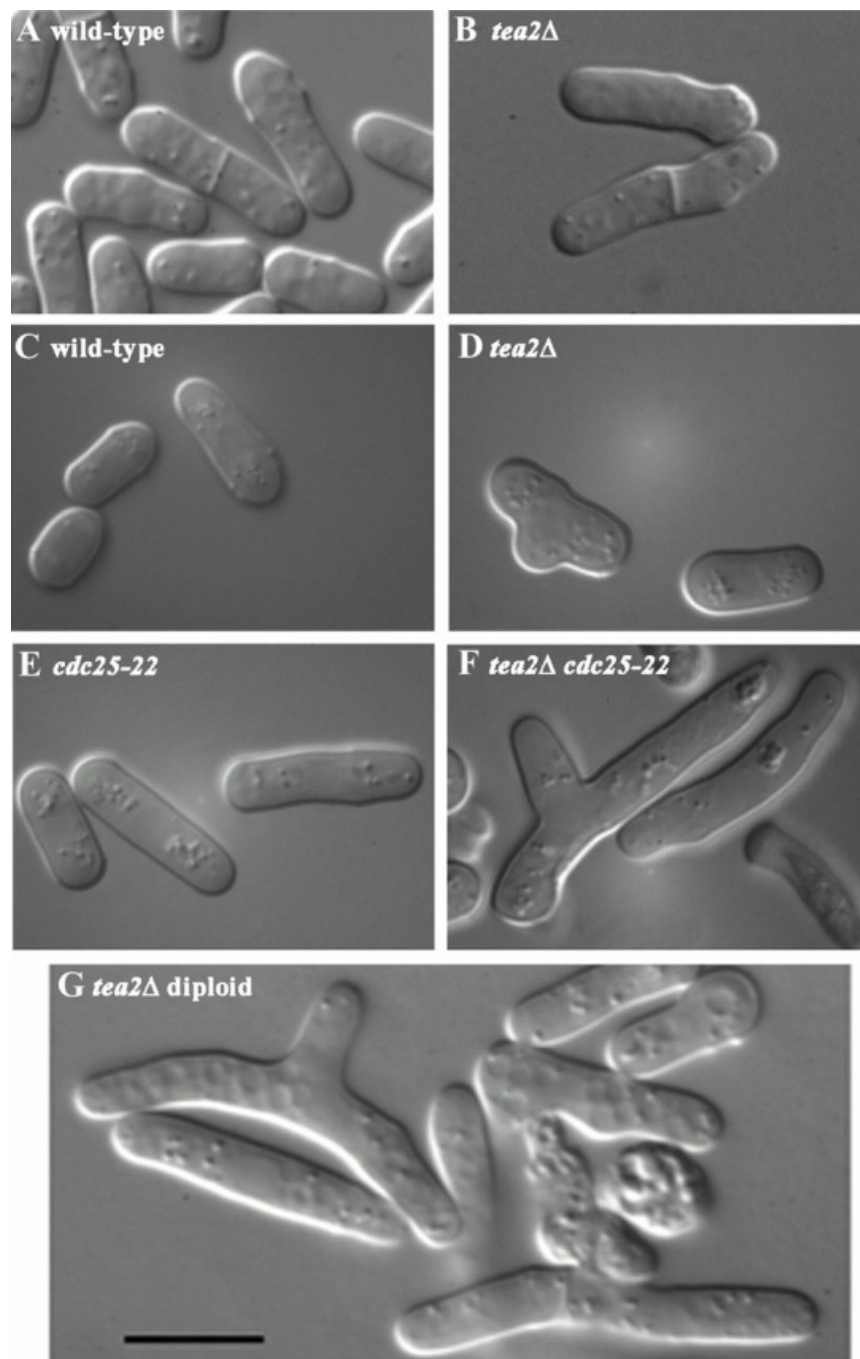


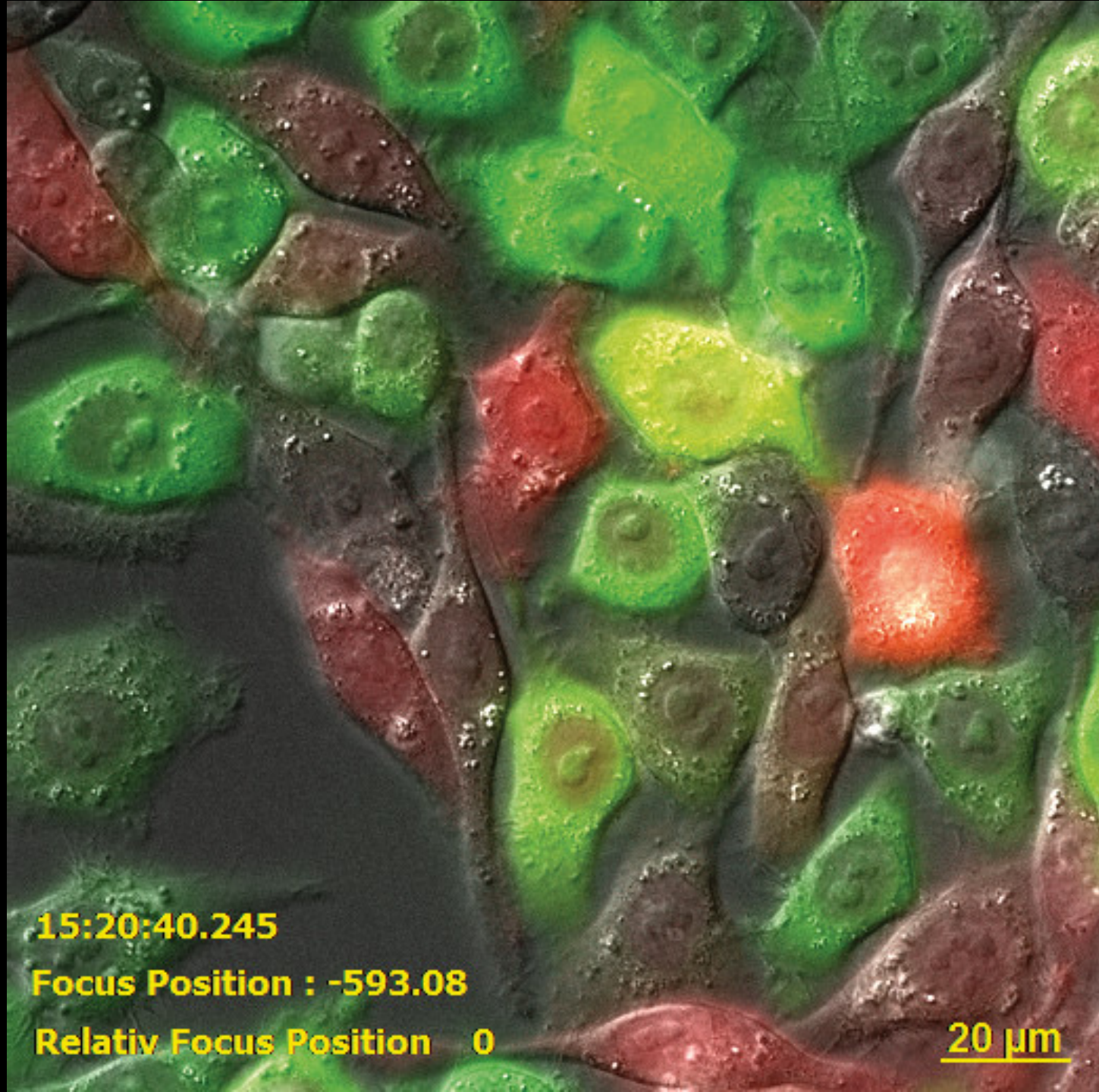
A. Phase contrast (Zernike optics)



B. DIC (Nomarski optics)







15:20:40.245

Focus Position : -593.08

Relativ Focus Position 0

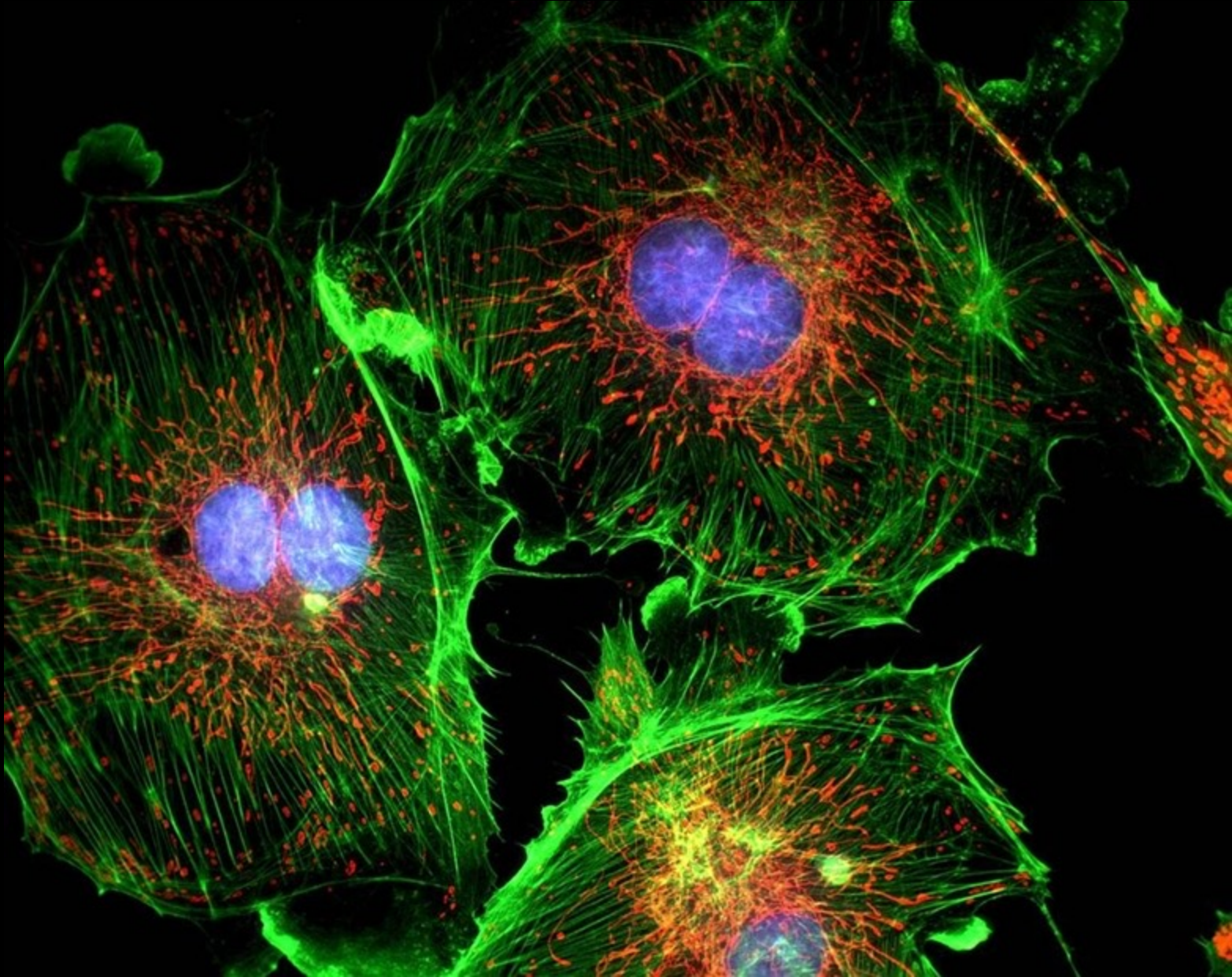
20 µm



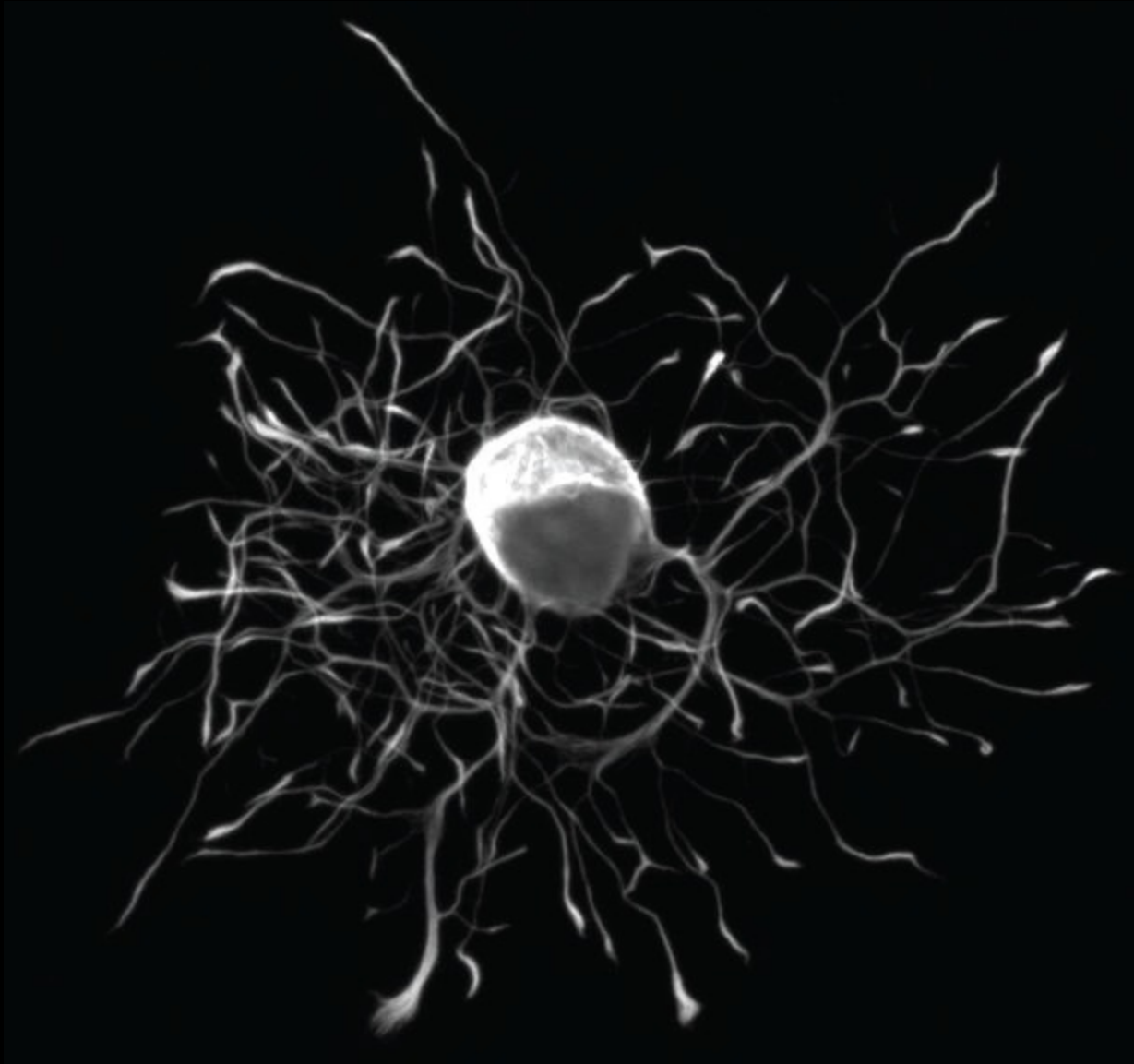
# Microscopie à fluorescence

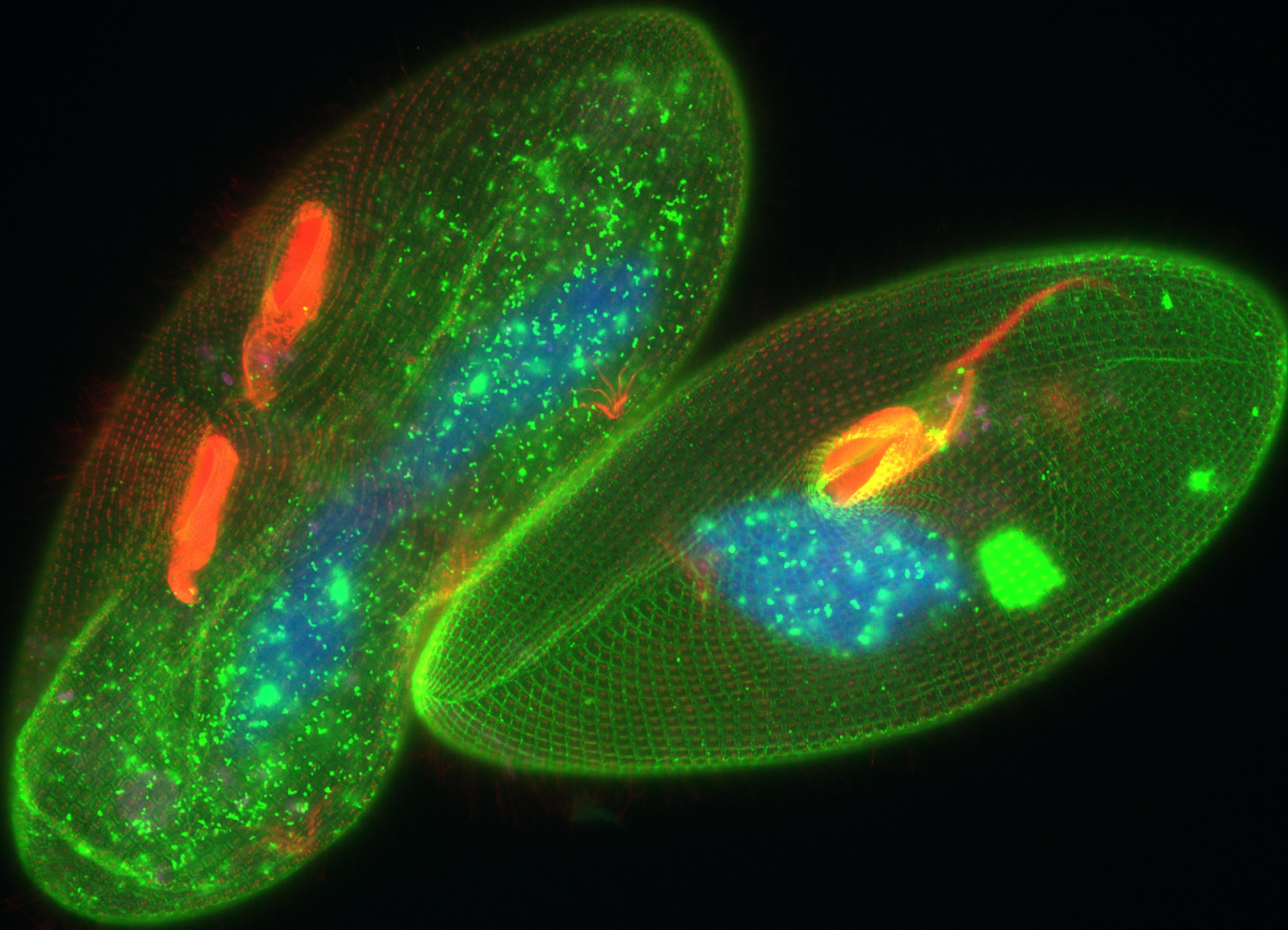
- Marquer les molécules ou les structures d'intérêt avec une sonde fluorescente capable d'émettre elle-même de la lumière, de sorte que l'on observe seulement ce qu'on a choisi de marquer.
- Le reste de l'échantillon est noir et on a un contraste très fort.
- Permet de détecter des molécules uniques et d'en suivre la dynamique.

Merged Triple Emission fluorescence microscopy image. The sample slide consists of multi-labeled bovine pulmonary artery endothelial cells (BPAEC), showing at least one example of a double nucleus. Fluorophores: MitoTracker Red CMXRos(target: mitochondria; excitation = 579 nm, emission = 599 nm ); BODIPY FL (target: actin filaments; excitation = 503 nm, emission = 512 nm) & DAPI counterstain (target: cell nucleus DNA; excitation = 345 nm, emission = 455 nm). Individual images acquired with our monochrome 1.4 megapixel camera and a filter wheel were merged via software to produce a composite image.



Fluorescence image of a rat neuron, taken with our 1.4 megapixel camera using 40x magnification.





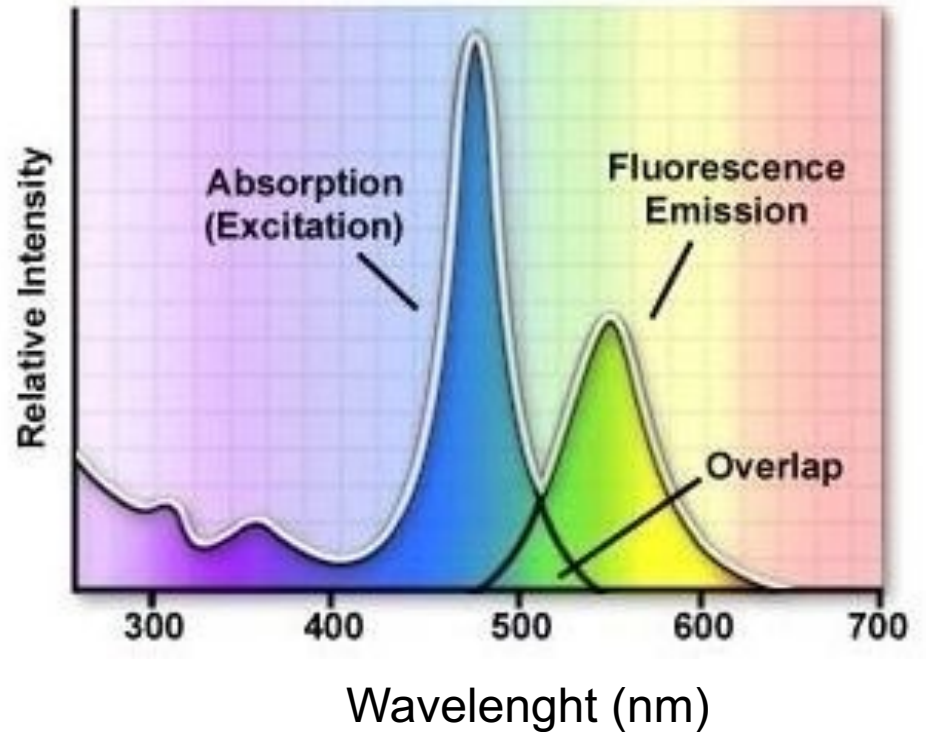
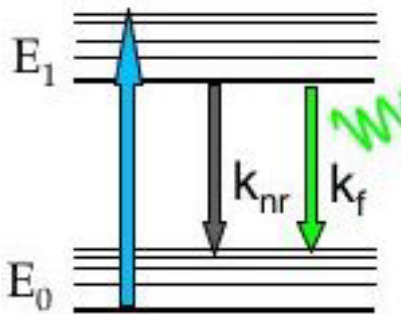
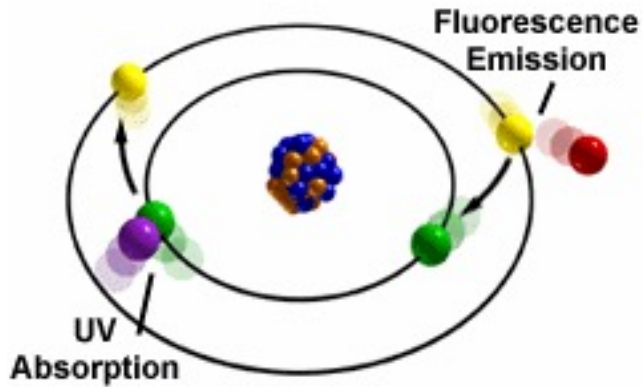
The Leica DFC9000 sCMOS microscope camera is highly sensitive with its high quantum efficiency of up to 82% and extremely low noise. The image shows a paramecium expressing GFP-Epiplasmin and Cy5-polyglycylated Tubulin. Nucleus stained with Hoechst 33258 (blue). Acquisition with LAS X. Specimen courtesy of Dr. A. Aubusson-Fleury, CGM-CNRS, France

# La fluorescence

- Lorsqu'une molécule fluorescente (**fluorochrome**, **fluorophore**) est excitée par un photon d'une énergie suffisante (i.e. avec la bonne longueur d'onde), elle **se désexcite en émettant un photon** d'énergie plus basse (à cause des **relaxations d'énergie vibrationnelle**).
- Ainsi, un fluorochrome excité par de la lumière bleue émettra dans le vert (**décalage de Stokes**). En réalité, il existe une gamme de longueurs d'ondes où l'on peut exciter la molécule (**spectre d'excitation**) et la lumière émise comporte également un ensemble de longueur d'ondes différentes (**spectre d'émission**).

# La fluorescence

Stokes' Observation



# Caractéristiques de la fluorescence

- Rendement quantique
  - Nombre de photons émis / Nb photons absorbés (compris entre 0,1 et 1)
- Coefficient d'extinction ( $\varepsilon$ )
  - Probabilité d'absorption d'un photon
  - Plus  $\varepsilon$  est élevé, plus la fluorescence est élevée (à intensité incidente et rendement quantique égaux)
- Durée de vie
  - Temps moyen qu'une molécule passe à l'état excité
  - La durée de vie de la population est la moyenne des durées de vie de toutes les molécules qui constituent la population

# Influence de l'environnement

- **pH**
  - Modification du rendement quantique
  - Modification des spectres
  - Développement de sondes sensibles au pH
- **Ions** ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $K^+$ , ion bromure ...)
  - Modifications de l'intensité de fluorescence
  - Modification des spectres (Décalage vers les grandes / courtes longueurs d'onde)
  - Développement de sondes ratiométriques (Mesure des concentrations cellulaires en  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $K^+$ , ...)
- **Polarité**
  - État excité + stable avec augmentation de la polarité du milieu
  - Décalage du spectre d'émission vers le rouge
- **Quenchers**
  - Favorisent les transitions non radiatives ( $O_2$ )
- **Température**
  - Augmentation du rendement quantique avec une baisse de température



# Microscope à fluorescence

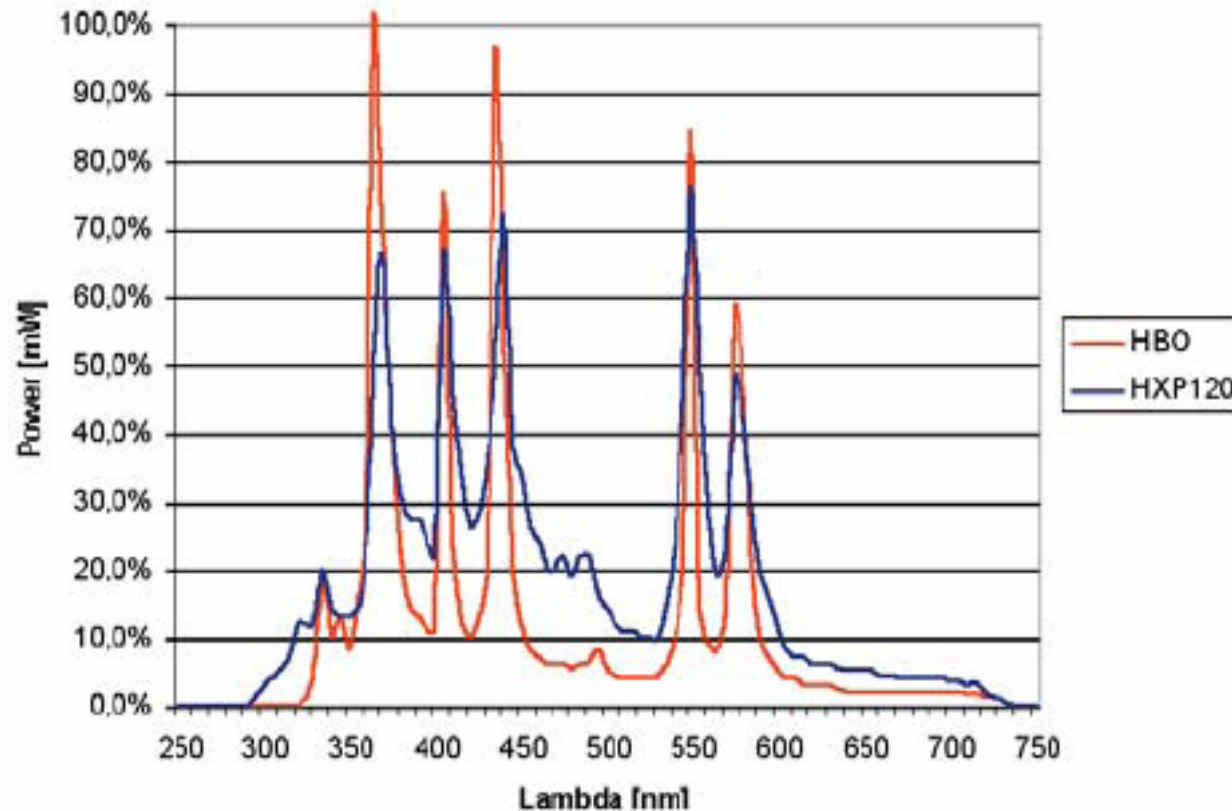
- Source de lumière : lampe à vapeur de mercure



La lumière est émise après excitation du gaz par un arc électrique entre les deux électrodes.

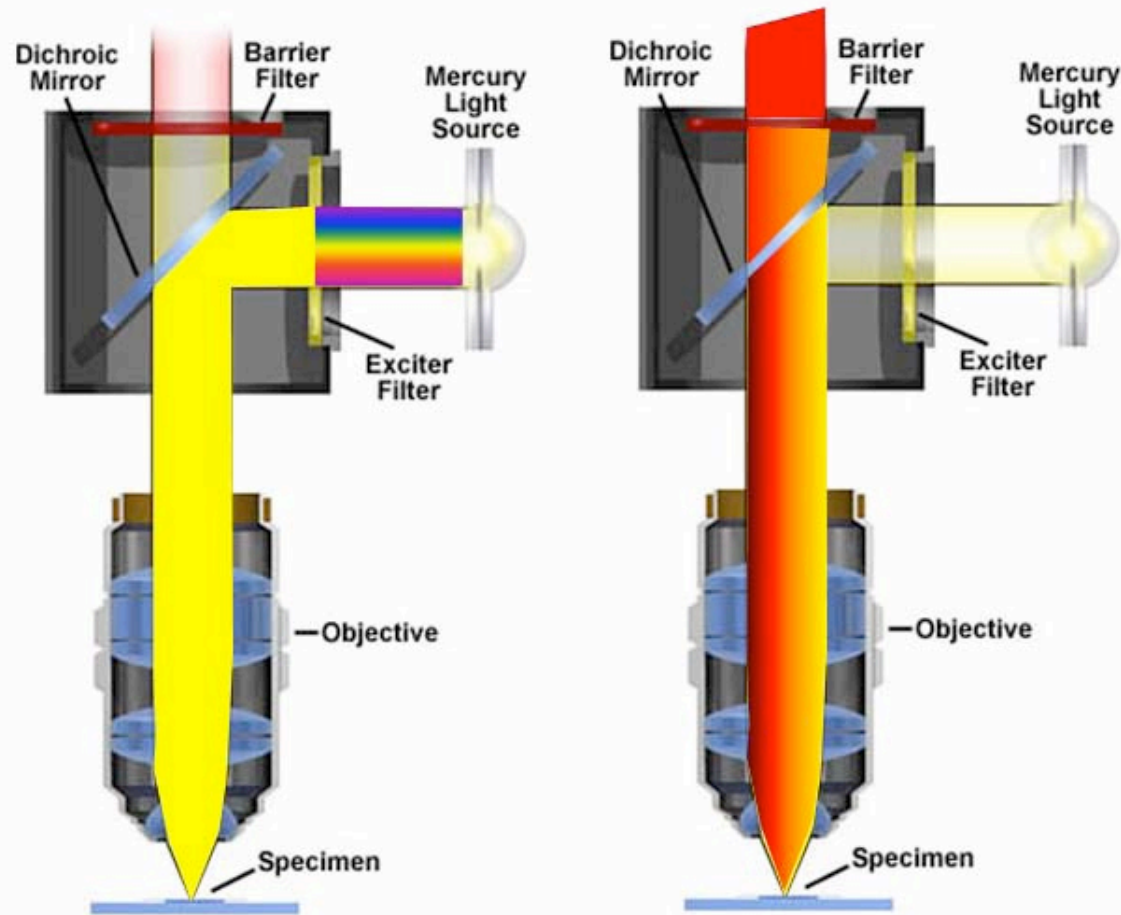
Permet un éclairage puissant et stable, et **le spectre de la lumière émise possède plusieurs pics utilisables pour exciter les fluorophores usuels** (en utilisant des filtres pour sélectionner le pic choisi).

# Lampe à vapeur de mercure



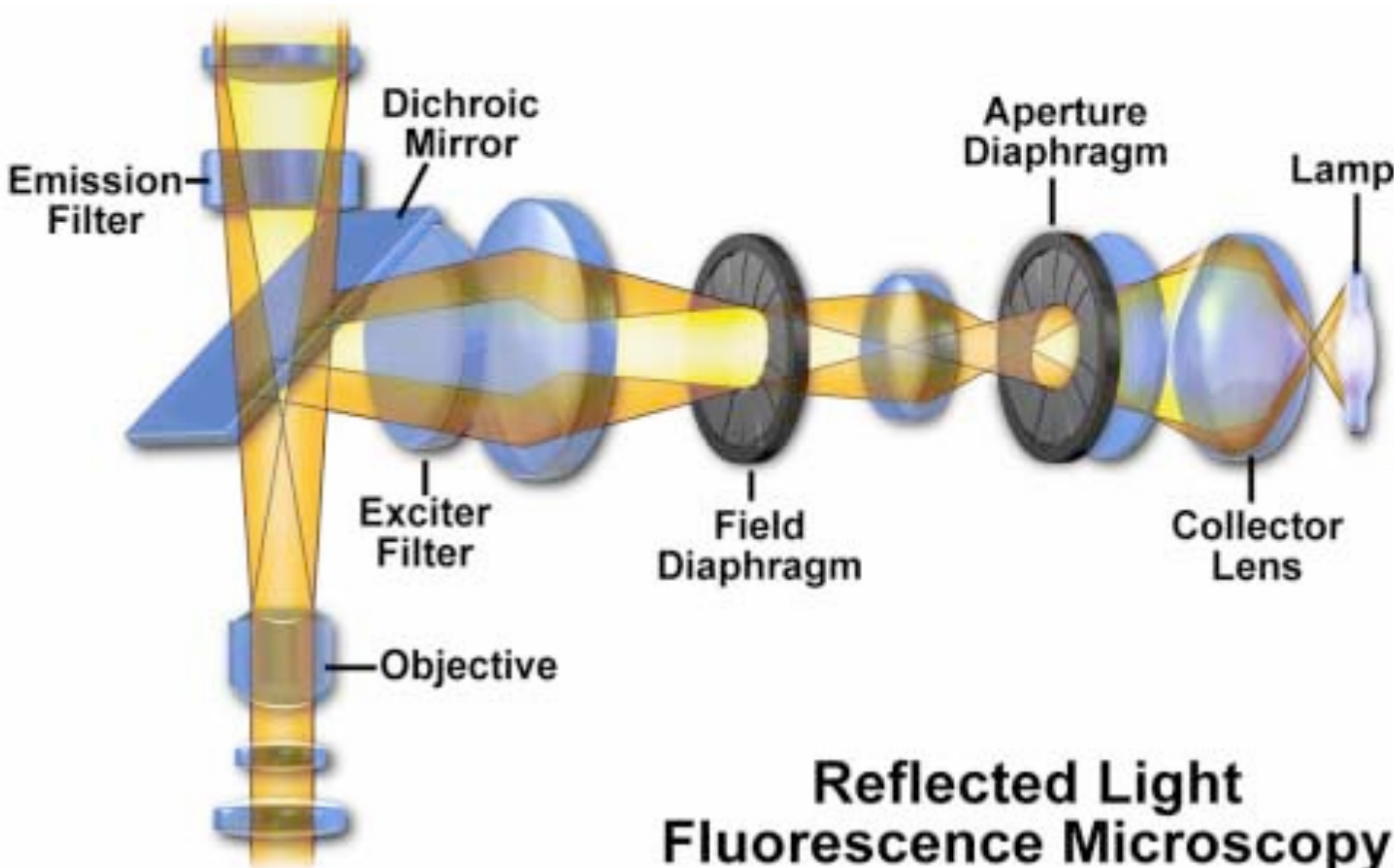
Spectre de la lumière émise par une lampe à vapeur de mercure (HBO) et une lampe métal halide (HXP120).

# Trajet optique dans un microscope en épifluorescence



Excitation

Emission

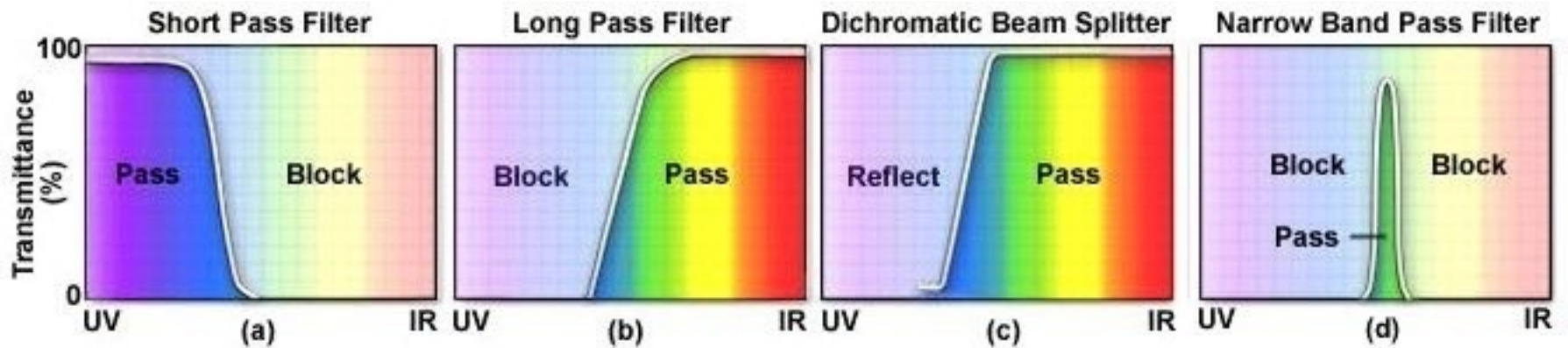


**Reflected Light  
Fluorescence Microscopy**

# Filtres

- Les filtres servent à sélectionner la gamme de longueur d'onde que l'on veut utiliser pour exciter les fluorophores ou que l'on veut récupérer pour faire une image.
- Il existe principalement 4 types de filtres :
  - **passé-haut** ou **passé-bas** (long-pass, short pass) : laisse passer la lumière ayant une longueur d'onde supérieure (passé-haut) ou inférieure (passé-bas) à une longueur d'onde de coupure
  - **dichroïque** (« beam-splitter ») : permet de séparer la lumière en deux plages de longueurs d'onde
  - **passé-bande** (band-pass) : ne laisse passer qu'une bande spectrale  $\pm$  large

# Filtres

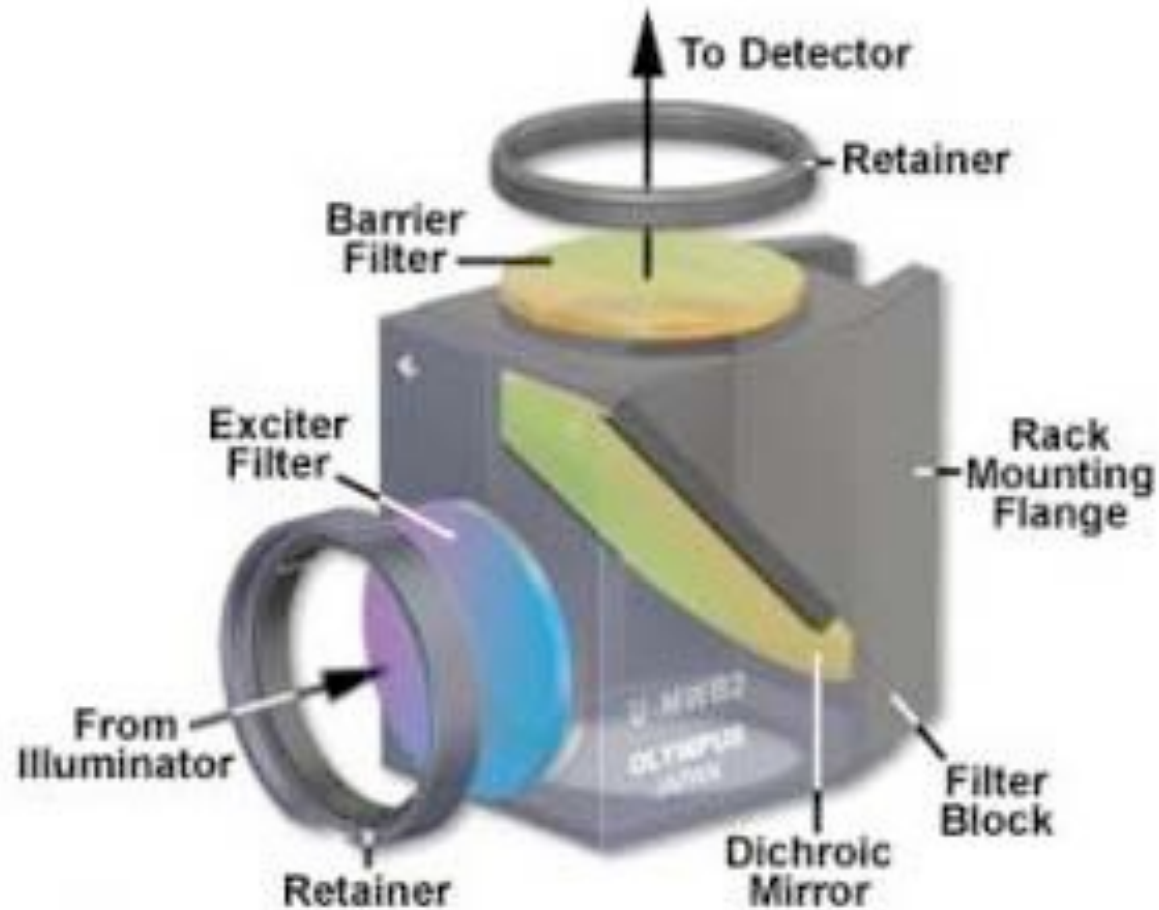


Les 4 différents types de filtres

# Filtres

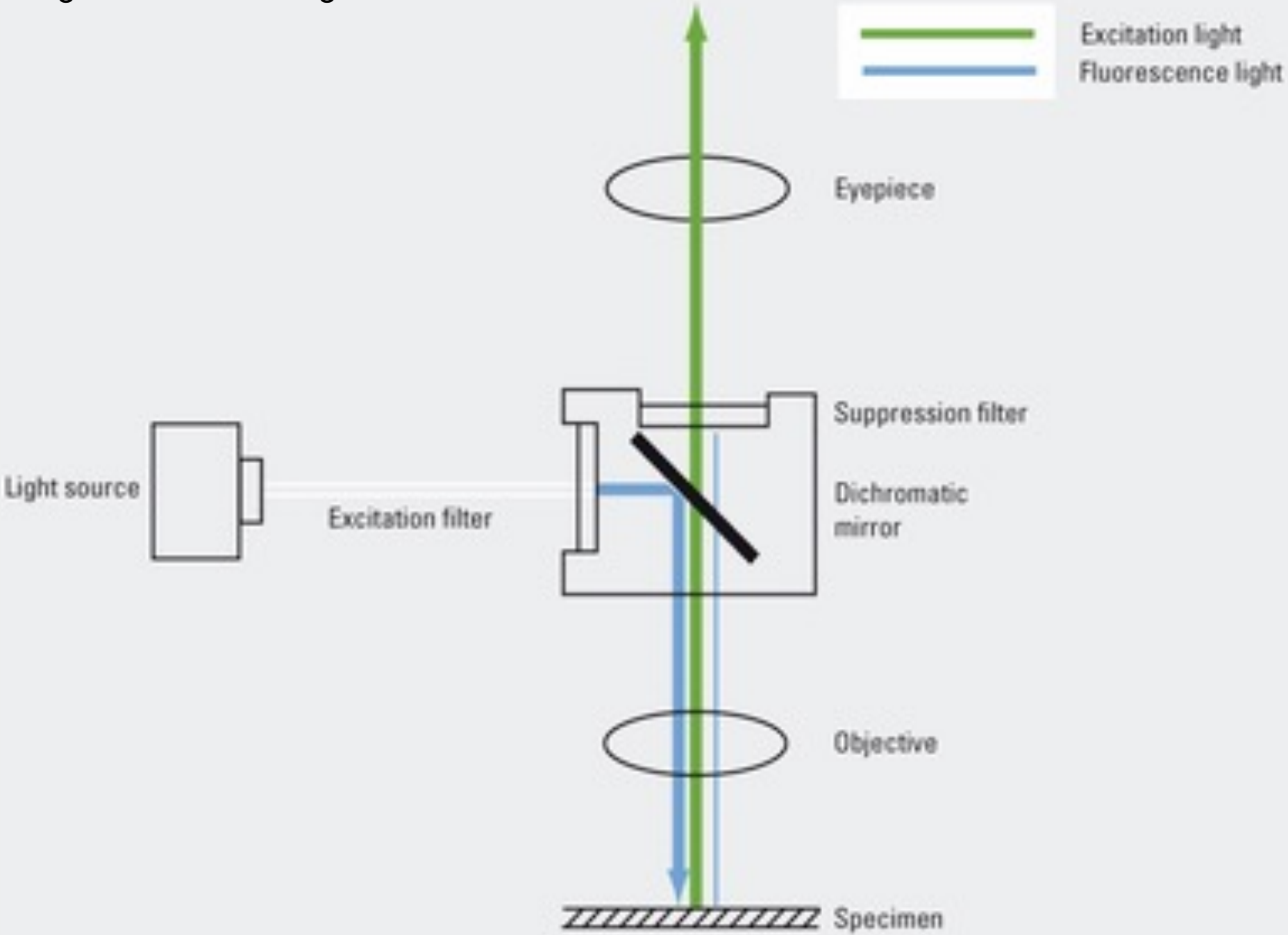
- Dans le microscope, les filtres sont le plus souvent regroupés sur un cube qui comporte un filtre d'excitation, un filtre dichroïque et un filtre d'émission.
- On peut ainsi avoir plusieurs cubes avec pour chaque un jeu de filtres adaptés à un fluorophore particulier.
- Il suffit de changer le cube dans le chemin optique du microscope (souvent en tournant une roue) suivant le type de marquage effectué dans l'échantillon.

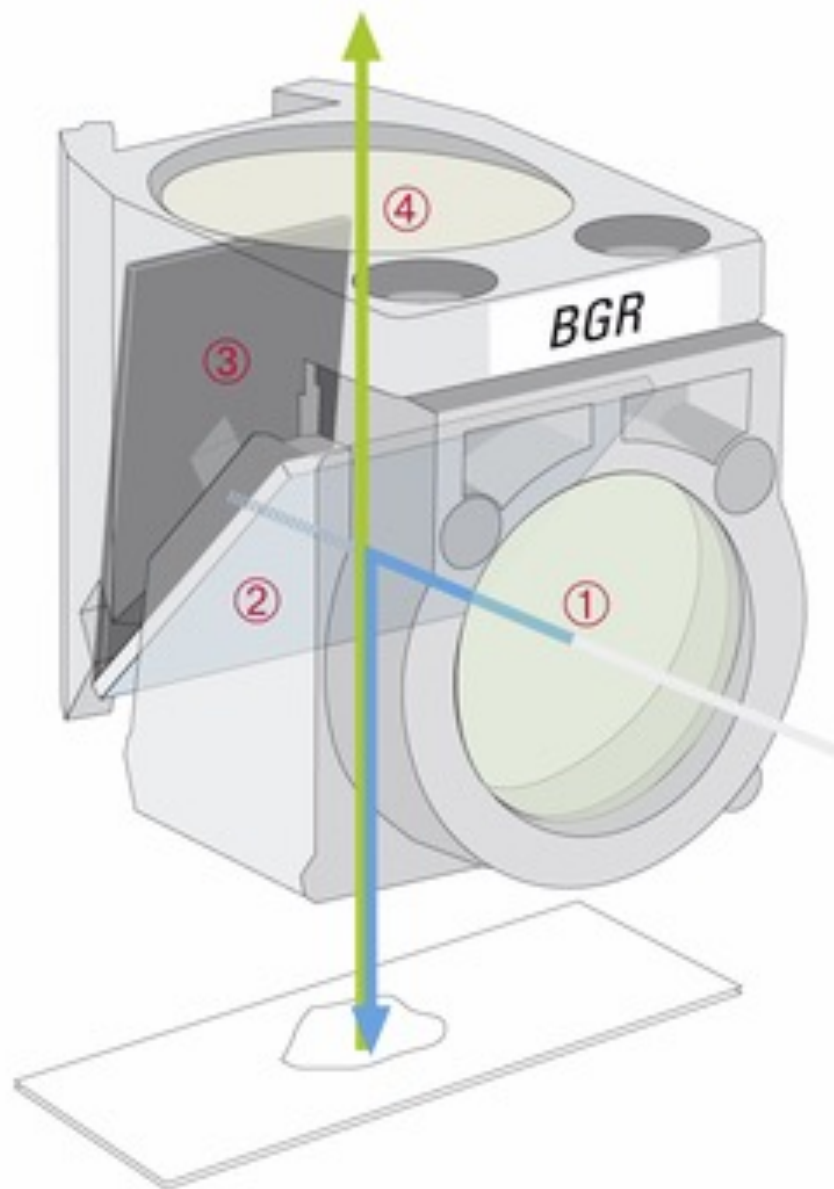
# Cube à filtres pour la fluorescence





# Diagram of incident light excitation of fluorescence





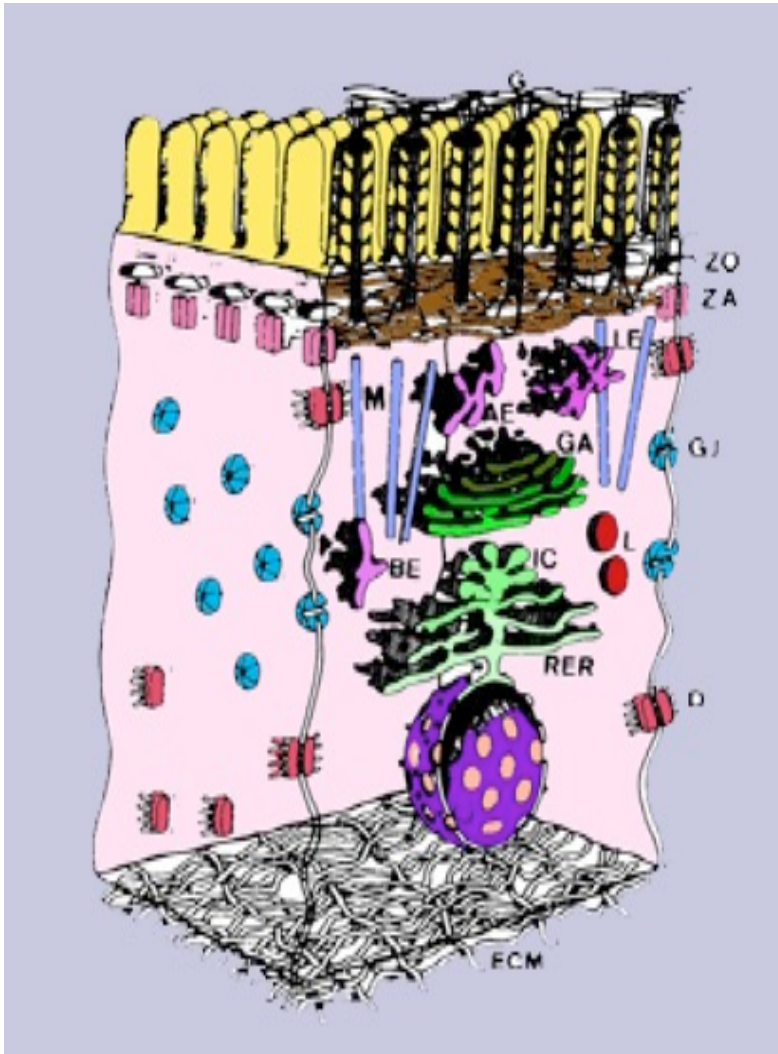
Light trap for the efficient suppression of noise.

- ① Excitation filters
- ② Dichroic mirrors
- ③ Leica light trap
- ④ Emission filters

# Fluorescence en biologie cellulaire

- L'une des utilisations les plus courantes est le **marquage d'une protéine par immunofluorescence**, c'est-à-dire en utilisant un premier anticorps contre la protéine d'intérêt, puis un second anticorps dirigé contre le premier, couplé à un fluorophore.
- On peut ainsi **étudier la localisation des protéines dans la cellule** et des translocations éventuelles suite à un traitement des cellules, par exemple.

# Fluorescence en biologie



Où est localisé la molécule A ?

La molécule A est-elle co-localisé avec B ?

A et B sont-ils co-localisés avec C ? Et D et ... ?

Quelle est la quantité de molécules A qui passe de a à b ?  
En combien de temps ?  
etc .....

Combien y a-t-il de molécules A sur la localisation a et combien en b

# Fluorochromes : DAPI, FITC, TRITC

- **DAPI** :

- Nom : 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
- Formule : C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>
- PM : 350.25
- Spectres : Spectres d'absorption et d'émission du DAPI lié à l'ADN (voir schéma).

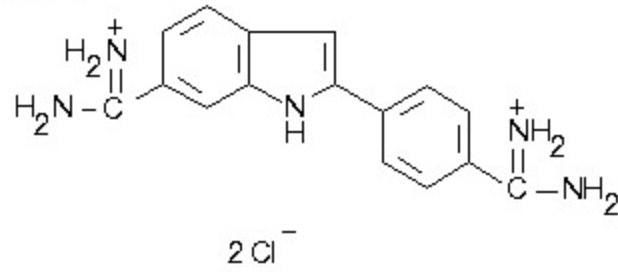
- **FITC** :

- Nom : Fluorescein Isothiocyanate
- Synonymes: FITC; Spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one, 3',6'-dihydroxy-5(or 6)-isothiocyanato-; Fluorescein-5(or 6)-isothiocyanate
- Formule : C<sub>21</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>S
- PM : 389.38
- Spectres : Spectres d'absorption et d'émission du FITC à pH 9.

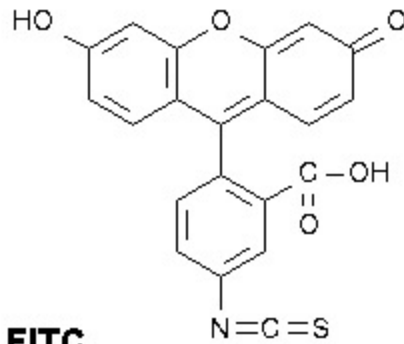
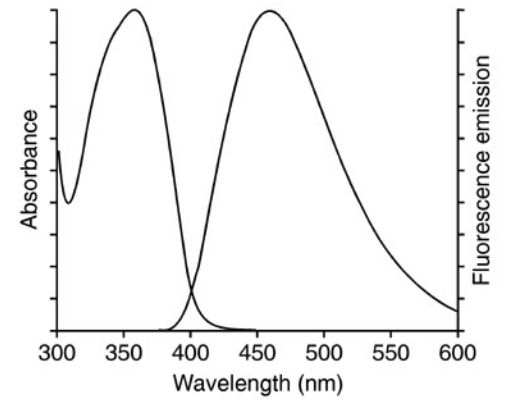
- **RHODAMINE** :

- Nom : Rhodamine 123
- Formule : C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>
- PM : 380.83
- Spectres : Spectres d'absorption et d'émission de la rhodamine 123 dans le méthanol.

### DAPI

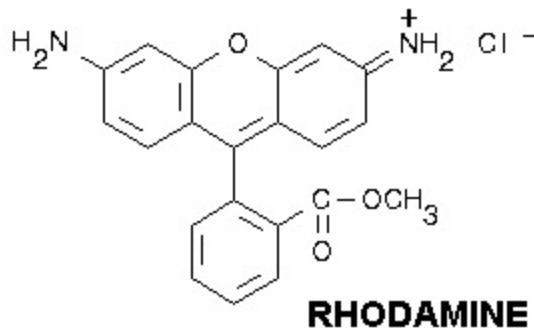
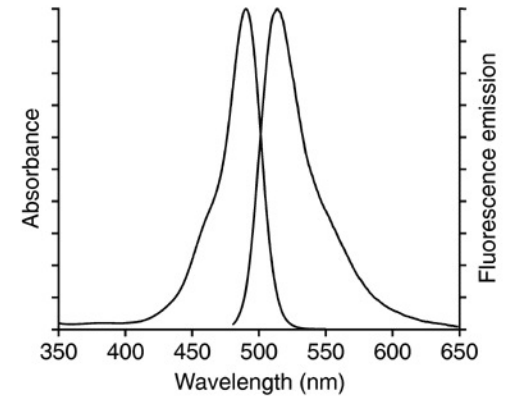


### DAPI



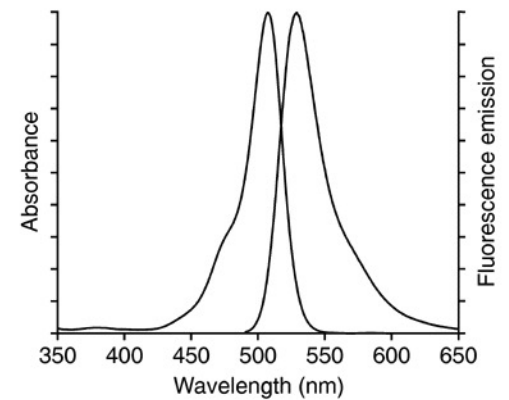
### FITC

### FITC

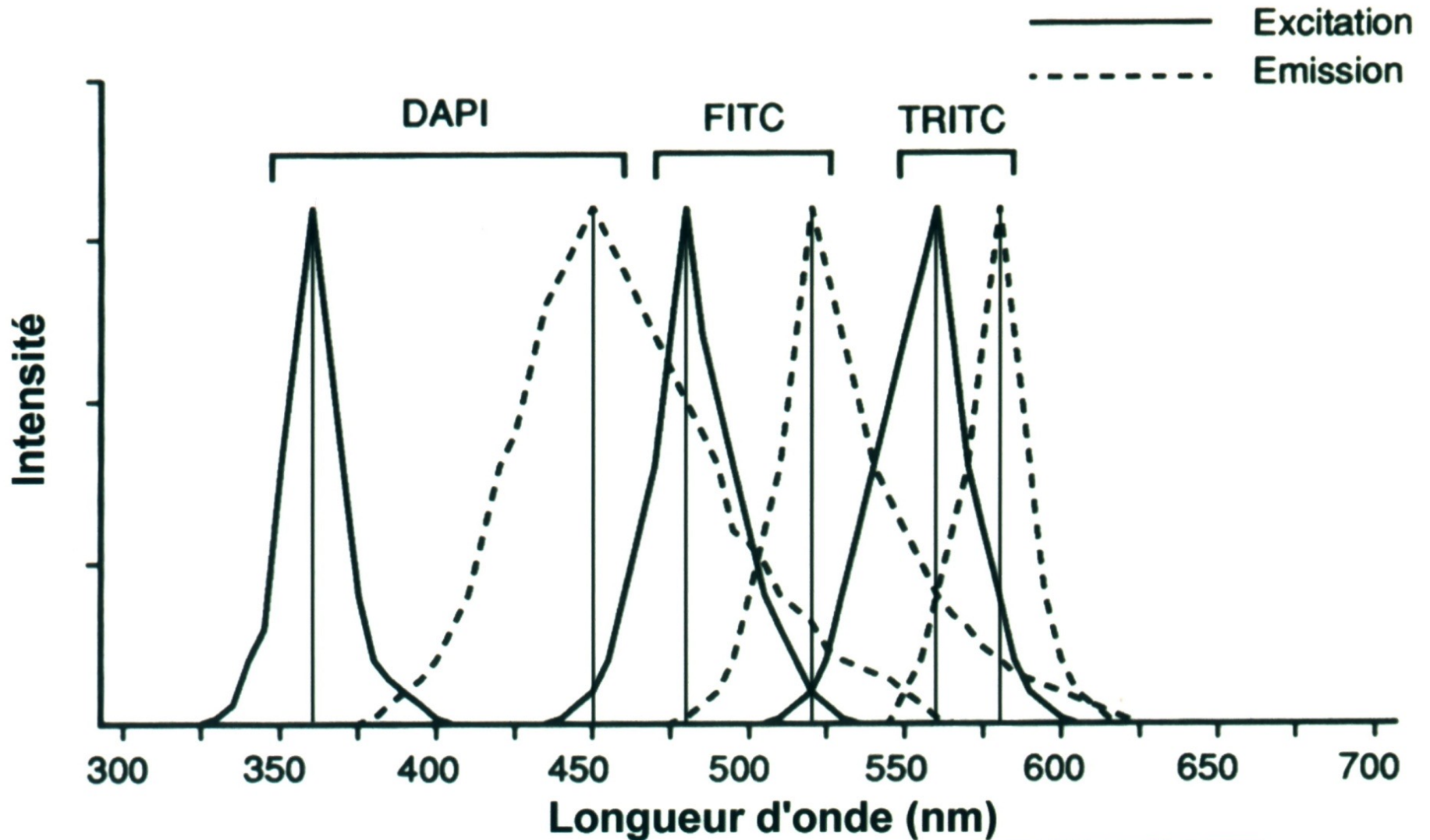


### RHODAMINE

### RHODAMINE



# Fluorochromes : DAPI, FITC, TRITC



**U.V.**



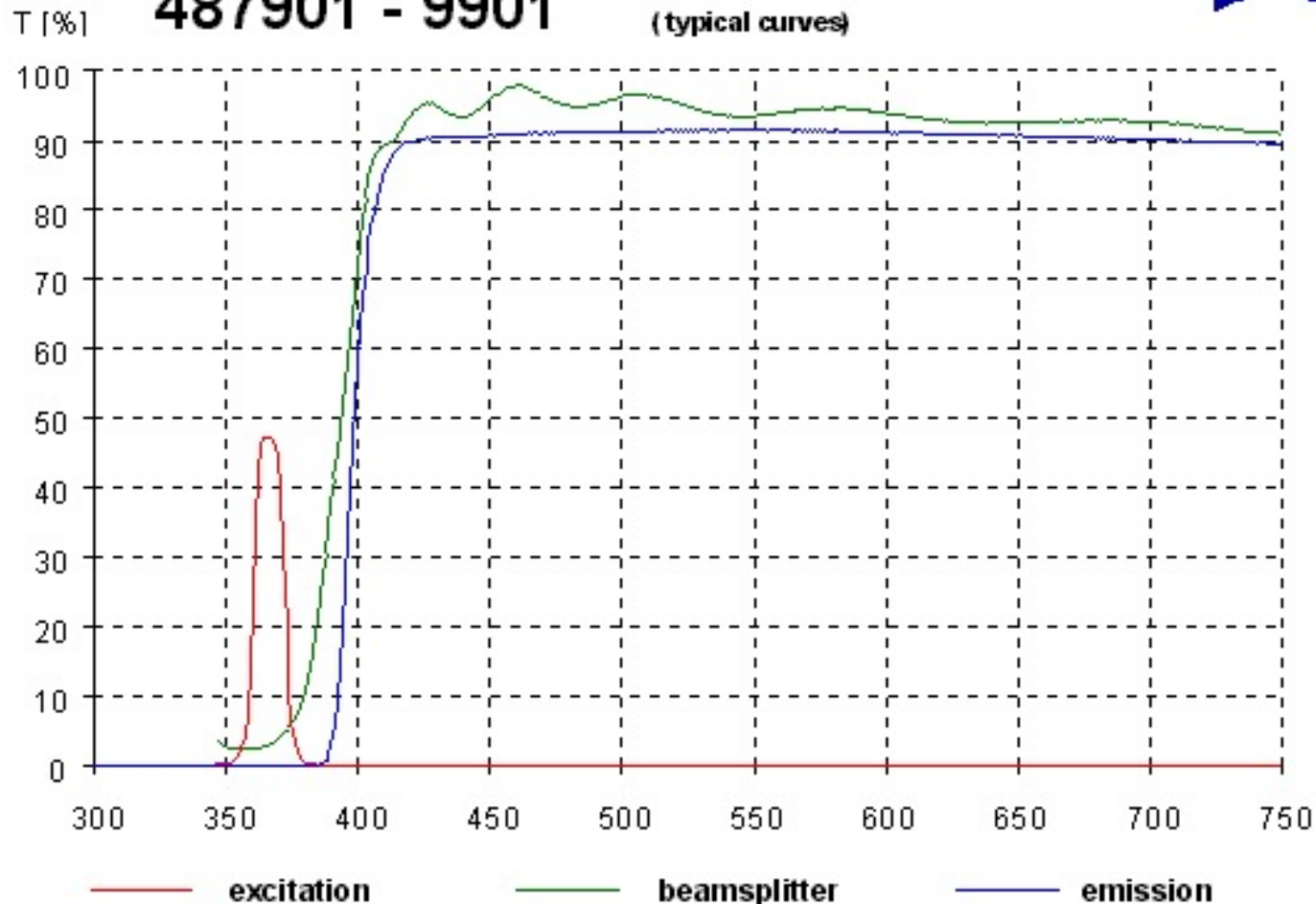
**VISIBLE**

**I.R.**

# Bloc filtres DAPI

**Filter set 01**  
**487901 - 9901**

excitation: BP 365 / 12  
beamsplitter: FT 395  
emission: LP 397  
(typical curves)

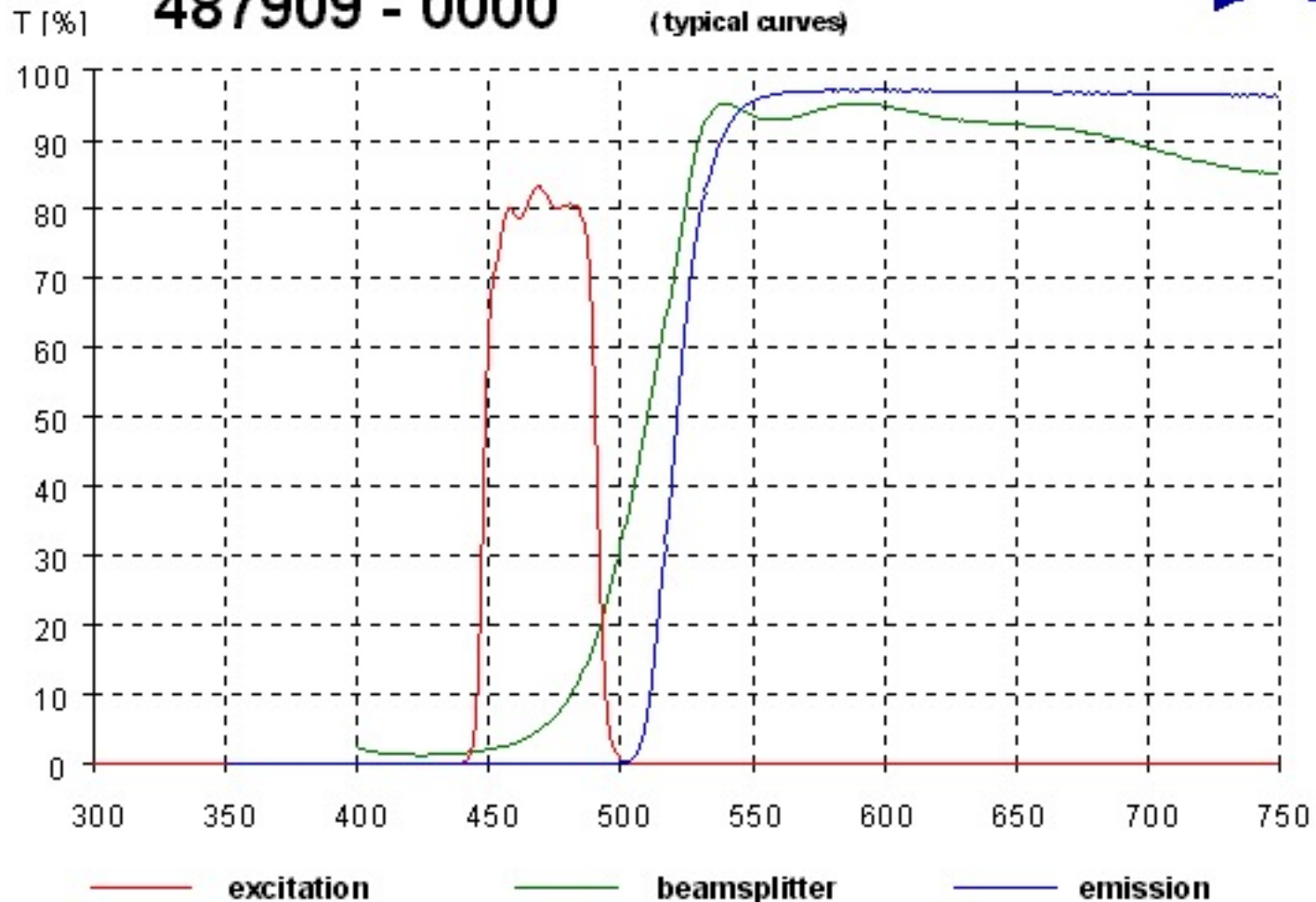




# Bloc filtres FITC

**Filter set 09**  
**487909 - 0000**

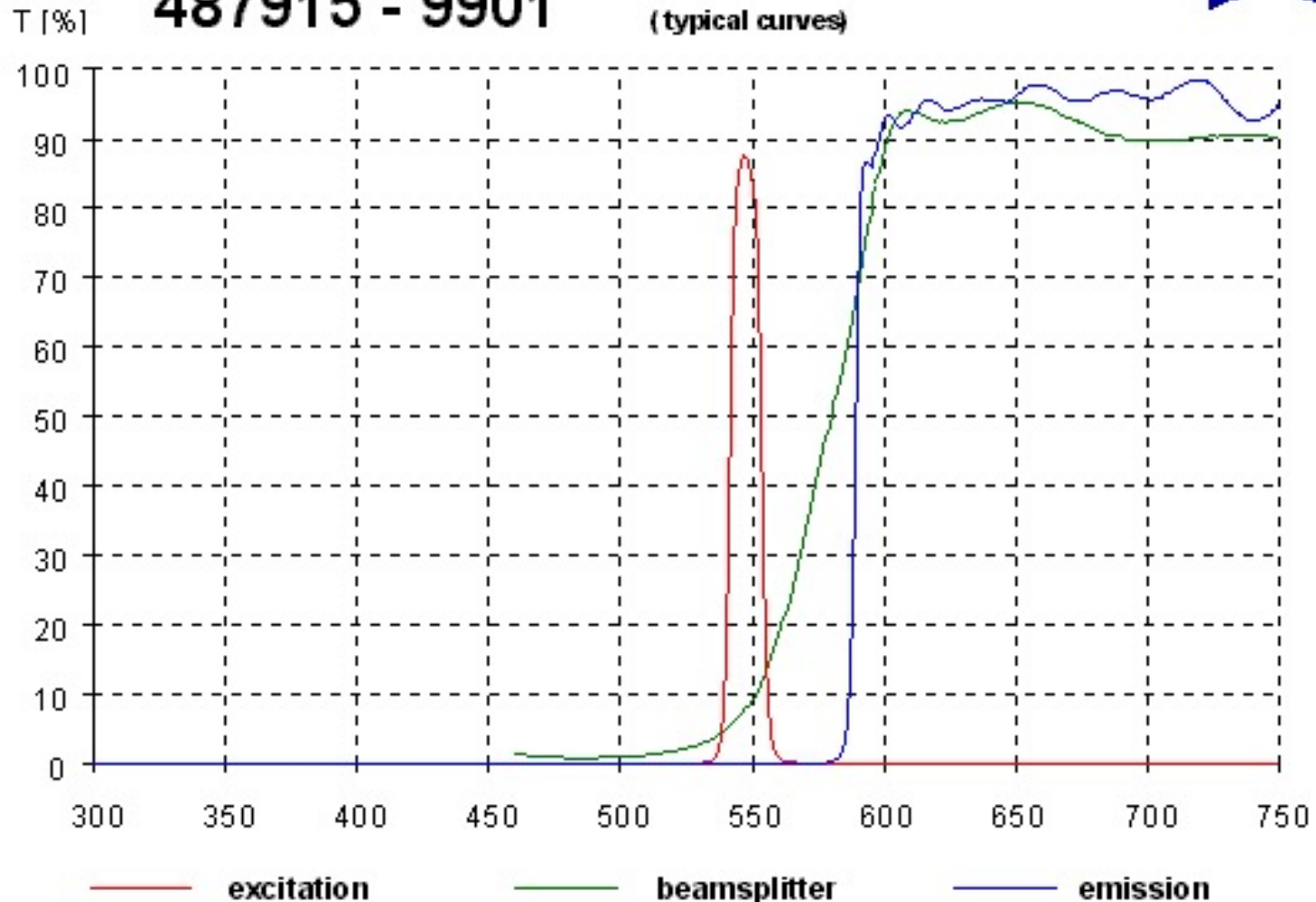
excitation: BP 450 - 490  
beamsplitter: FT 510  
emission: LP 520  
(typical curves)



# Bloc filtres Rhodamine 123

**Filter set 15**  
**487915 - 9901**

excitation: BP 546 / 12  
beamsplitter: FT 580  
emission: LP 590  
(typical curves)



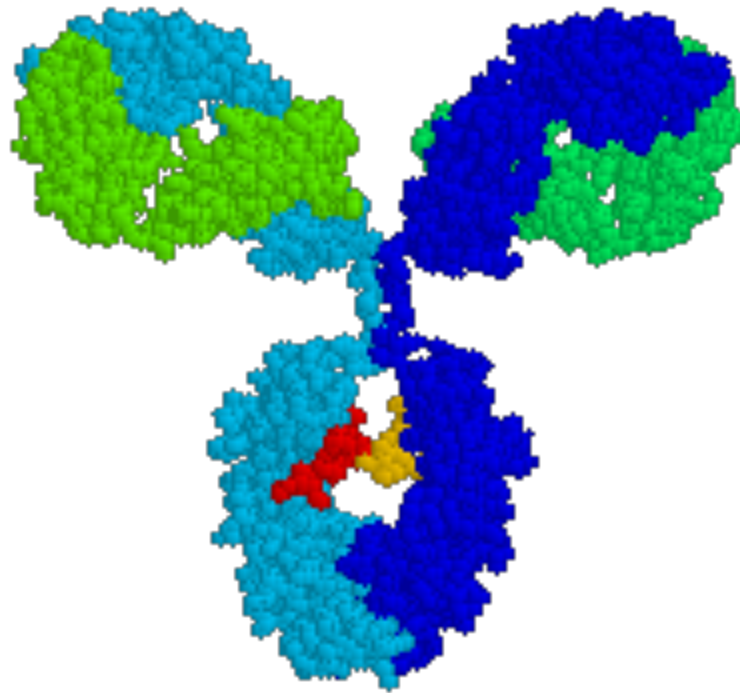
# Fluorochromes

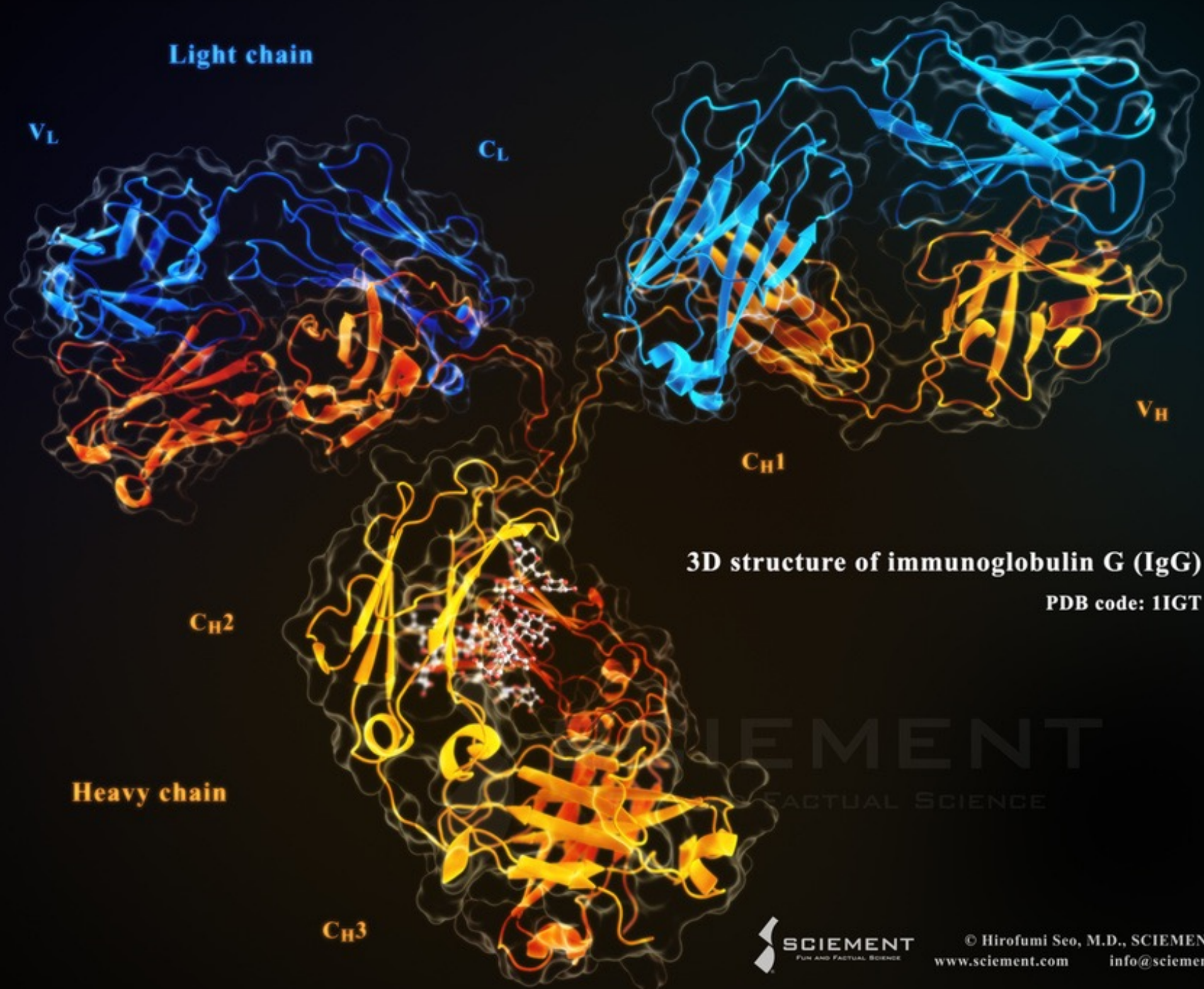
- ***Recouvrement des spectres d'émission***
  - Prendre d'autres fluorochromes
  - Faire des **acquisitions séquentielles** avec changement de configuration pour chaque fluorochrome
  - Dispositif de lecture et puis de modélisation des spectres pour opérer une **déconvolution spectrale**, par extrapolation depuis des domaines «purs» vers les domaines de recouvrement...
  - PMTs à cascade spectrale ; Multi-Anode Detectors
  - Correction mathématique sur les deux canaux : cross-talk compensation
  - Imager l'autofluorescence de temps à autre

# Immunofluorescence

Un **anticorps** est une protéine de la classe des **immunoglobulines** qui a la faculté de reconnaître un **motif antigénique** sur une autre **protéine** étrangère à l'organisme. La reconnaissance se fait par une affinité élevée de l'anticorps pour le motif antigénique et une **liaison non covalente**.

Immunoglobuline  
de type G (IgG)  
= anticorps





**Light chain**

**V<sub>L</sub>**

**C<sub>L</sub>**

**V<sub>H</sub>**

**C<sub>H1</sub>**

**C<sub>H2</sub>**

**Heavy chain**

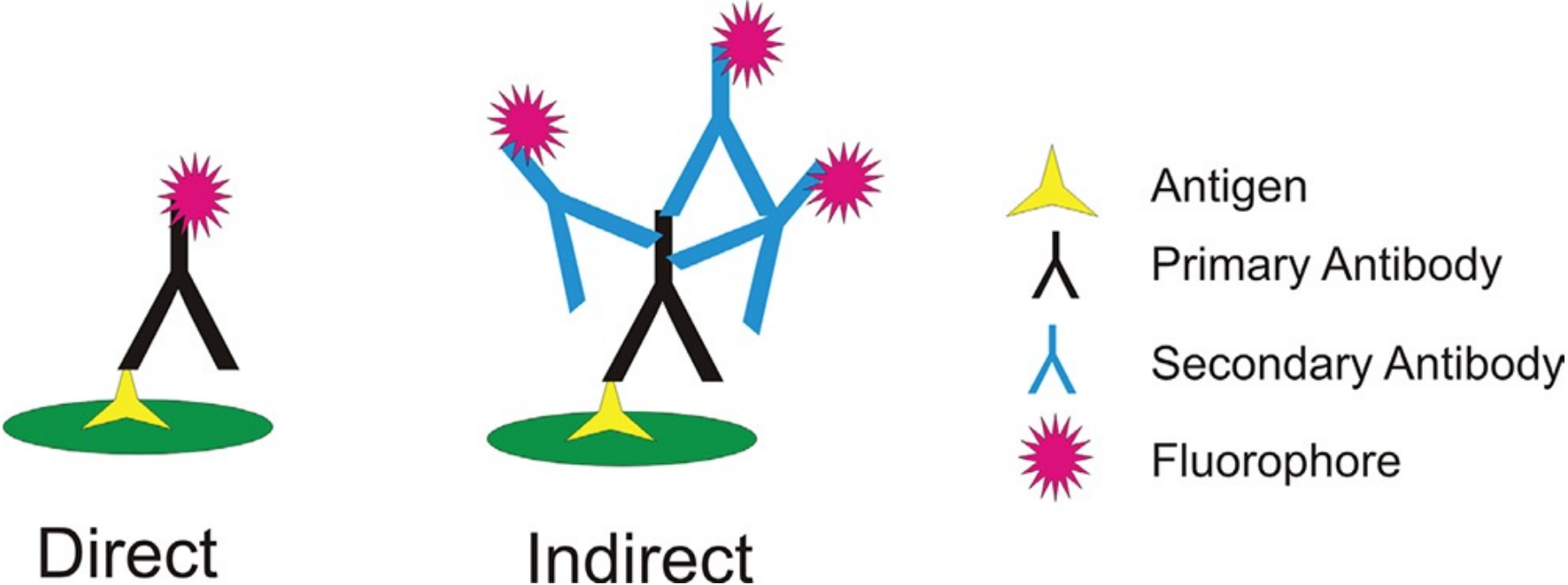
**C<sub>H3</sub>**

**3D structure of immunoglobulin G (IgG)**

**PDB code: 1IGT**

**SCIENT**  
FACTUAL SCIENCE

# Immunofluorescence : marquage direct ou indirect



Aequorea



Aequorea





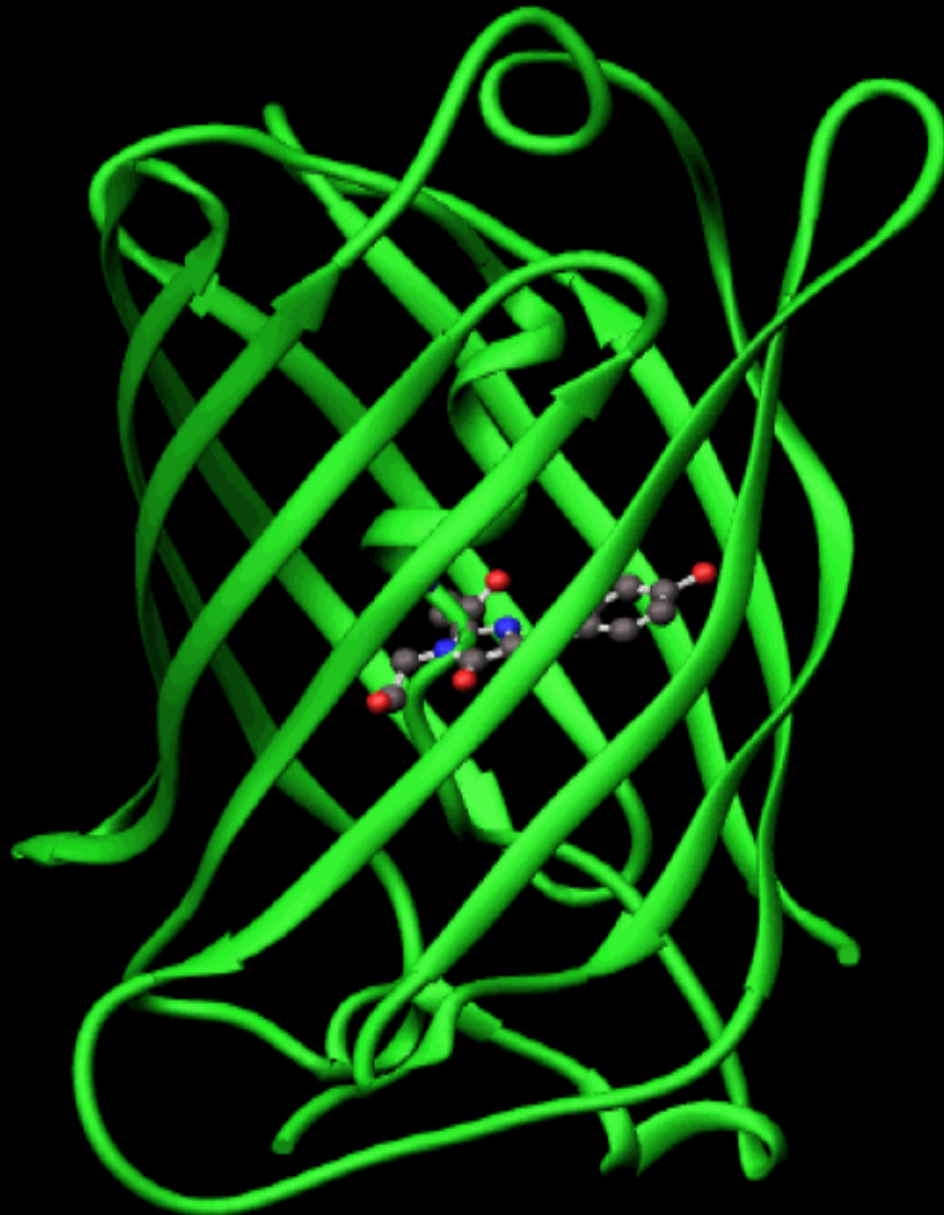
# Green Fluorescent Protein

- **1962** Découverte de la GFP (Shimomura et al.)
- **1992** Clonage du gène de la GFP (Prasher et al.)
- **1994** Expression de la GFP dans autres organismes (*C. elegans* et *E.coli*), (Chalfie et al., Inoué et Tsuji)
- **1996** Optimisation de l'usage des codons, augmentation de la thermo-stabilité (Yang et al.), amélioration de la maturation à 37°C
- **1997** Elimination d'un intron cryptique (Haseloff et al.) pour utilisation dans les plantes
- **1998-2016** Création de variants spectraux, protéines fluorescentes avec des propriétés uniques...

# GFP

- La **bioluminescence de la GFP** dépend de la photo-protéine **AEQUORIN**. Isolée, cette **photo-protéine** émet de la lumière verte.
- Ce processus est dépendant du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et de l'oxygène ( $\text{O}_2$ ). En complexe, elle excite ainsi par transfert d'énergie non radiatif la GFP, laquelle émet ensuite de la lumière verte.

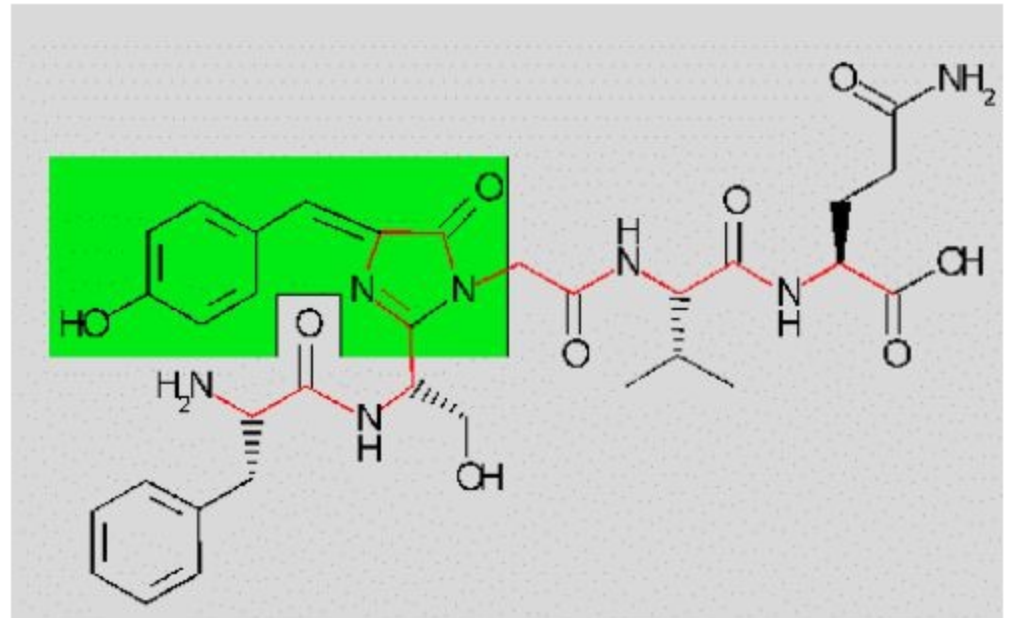
# GFP



La GFP (Green Fluorescent Protein) est constituée de 238 acides aminés en 11 feuillets- $\beta$  et une hélice- $\alpha$  centrale. L'ensemble forme une protéine de 28 kDa avec une structure appelée  $\beta$ -tonneau. Les extrémités N-terminale et C-terminale sont accessibles à la liaison avec d'autres protéines.

# Structure of the GFP-fluorophore

- The fluorophore is derived from the tripeptide -Ser<sup>65</sup>-Tyr<sup>66</sup>-Gly<sup>67</sup>-
- Formation of the fluorophore occurs in an autocatalytic manner



Le fluorophore de la GFP est constitué par une courte séquence de 3 résidus ac.aminés Ser 65, Tyr 66 et Gly 67 qui subit une réorganisation autocatalytique post-traductionnelle avec mise en place d'un système conjugué (électrons délocalisés) étendu (intégrant l'hydroxyle de Tyr 66).

Ce système se retrouve au centre de la molécule (de forme cylindrique), intégré à une hélice  $\alpha$ . Il est directement responsable de l'absorption en UV suivie de l'émission (fluorescence) dans le vert spectral.

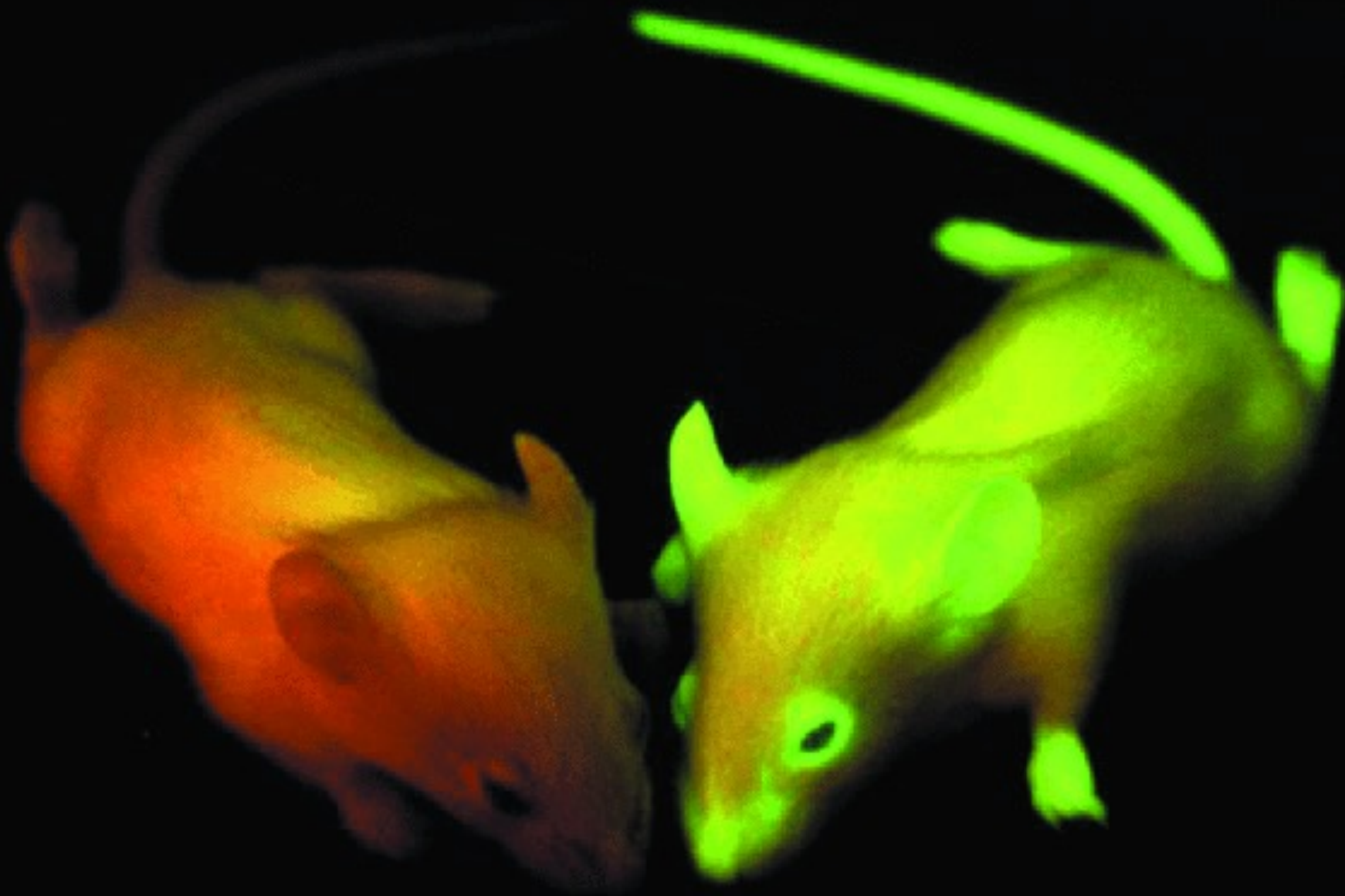
Il a cependant été établi que plusieurs résidus ac. aminés situés à proximité du fluorophore ont également un rôle déterminant et on peut même considérer que c'est la configuration spatiale (déterminée par la structure primaire) de la molécule dans son ensemble qui confère à la protéine son aptitude à "fluorescer" par l'intermédiaire du fluorophore.

# Green Fluorescent Protein (GFP)

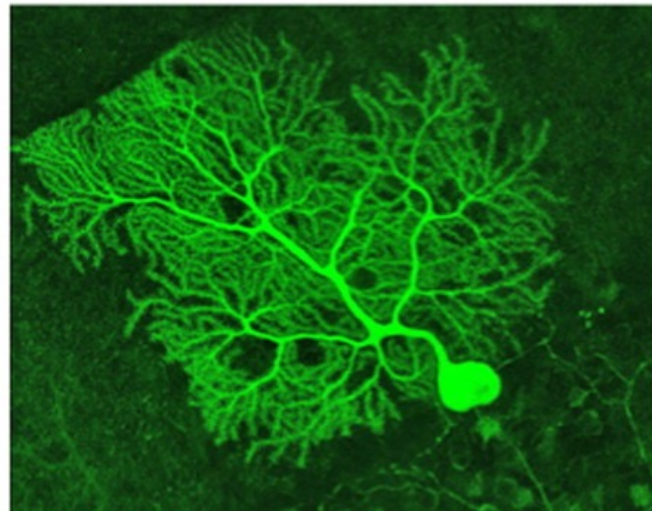
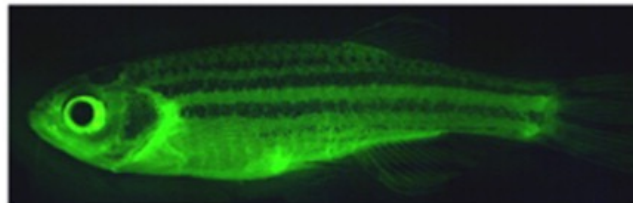
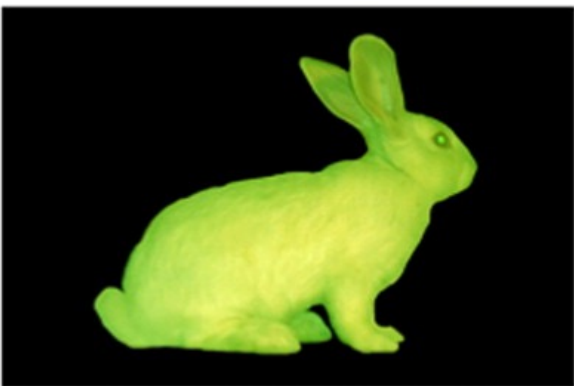
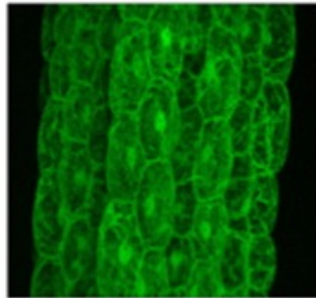
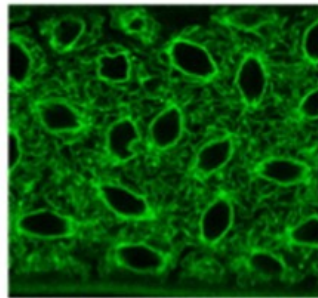
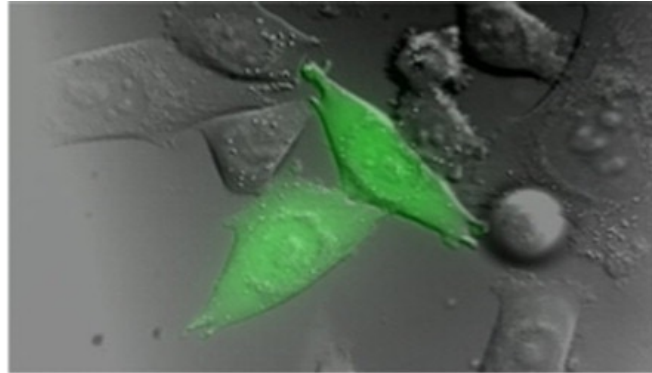
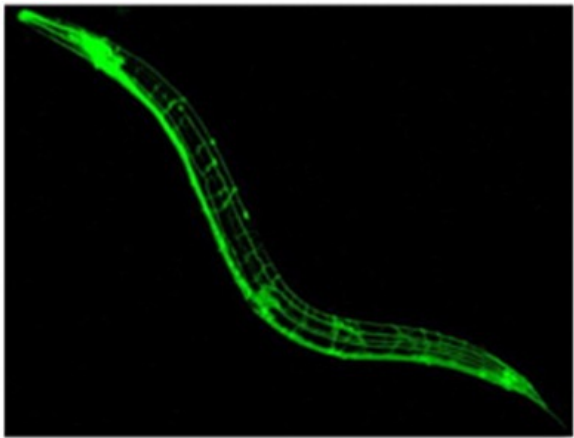




Souris GFP





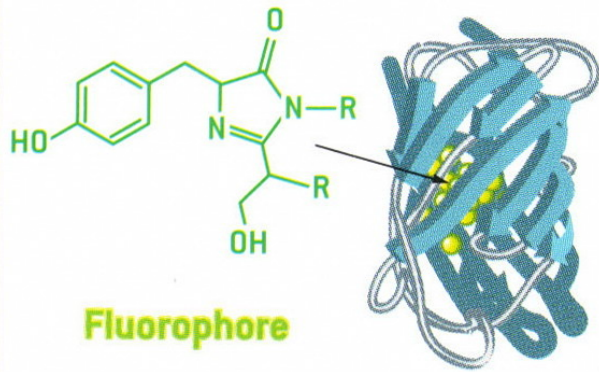


## H : Comment rendre fluorescente une protéine à l'aide de la GFP (Green Fluorescent Protein)

La fluorescence de la GFP est due à un tripeptide (sérine, tyrosine, glycine) partiellement cyclisé, localisé au sein d'une hélice  $\alpha$  qui se trouve à l'intérieur d'une structure peptidique en forme de tonneau (fig. H1).

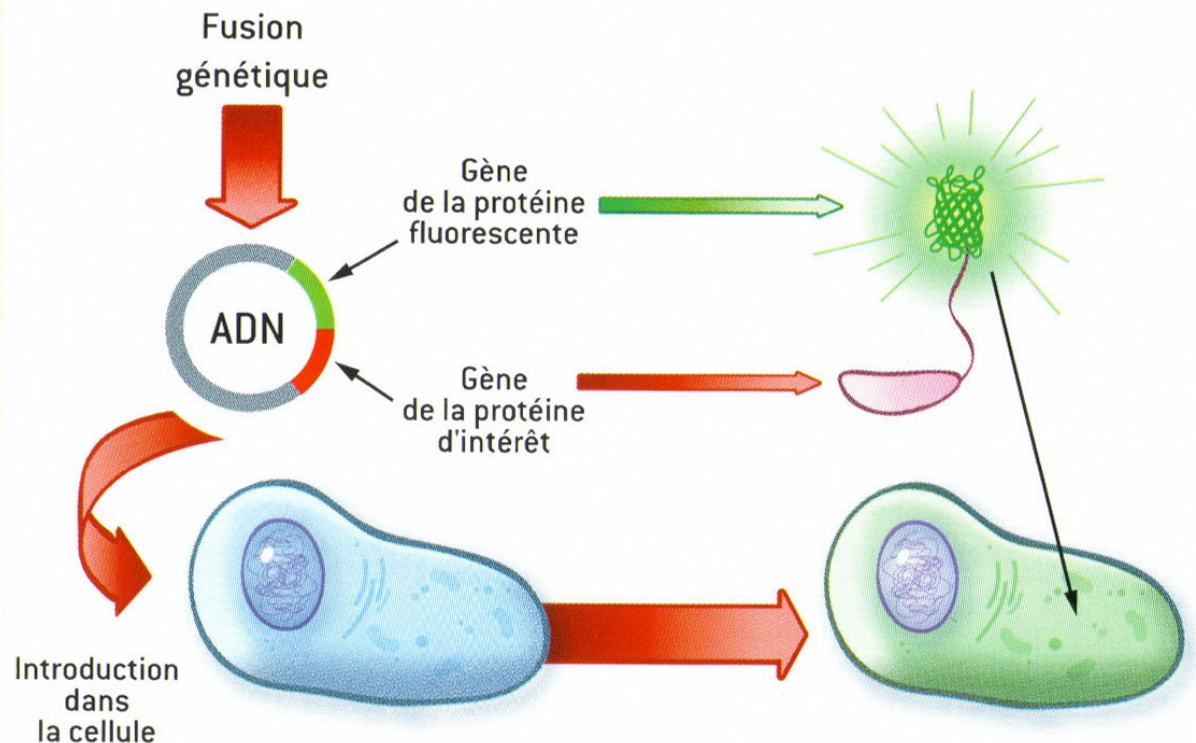
Pour se servir de la GFP comme traceur, il faut au préalable fusionner le gène qui encode la GFP avec le gène qui code la

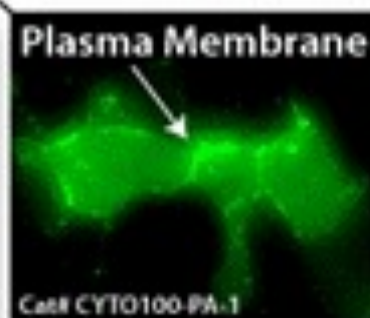
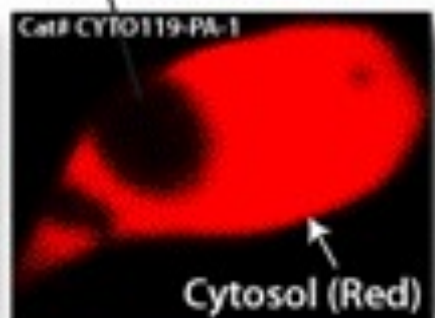
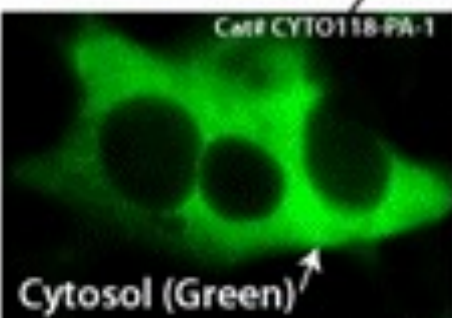
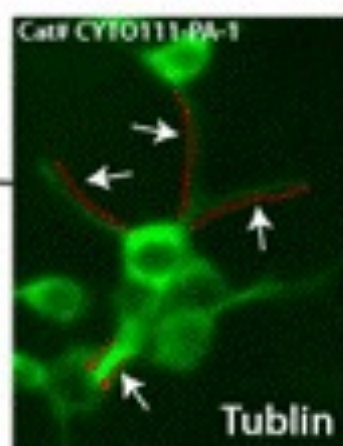
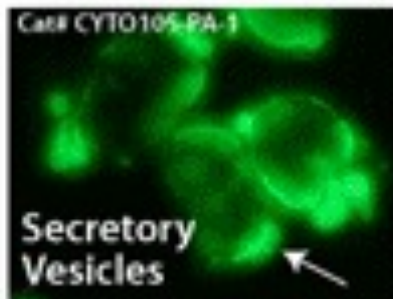
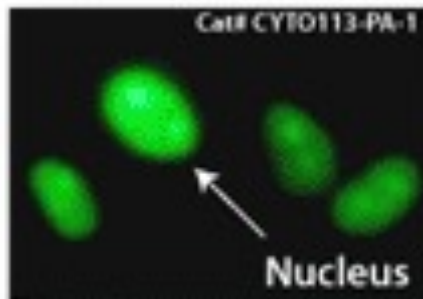
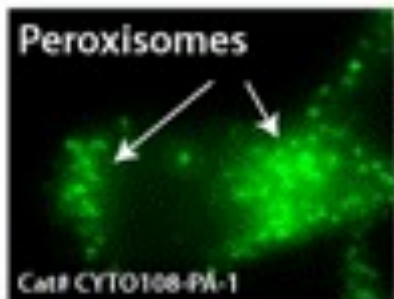
protéine endogène à laquelle on s'intéresse. Dans ces conditions, lorsque les gènes sont exprimés par la « machine » cellulaire, il y a production d'une protéine chimérique constituée de la protéine d'intérêt à laquelle est accrochée la GFP, détectable par fluorescence (fig. H2). Dans la majorité des cas, la fonction de la protéine d'intérêt est conservée.



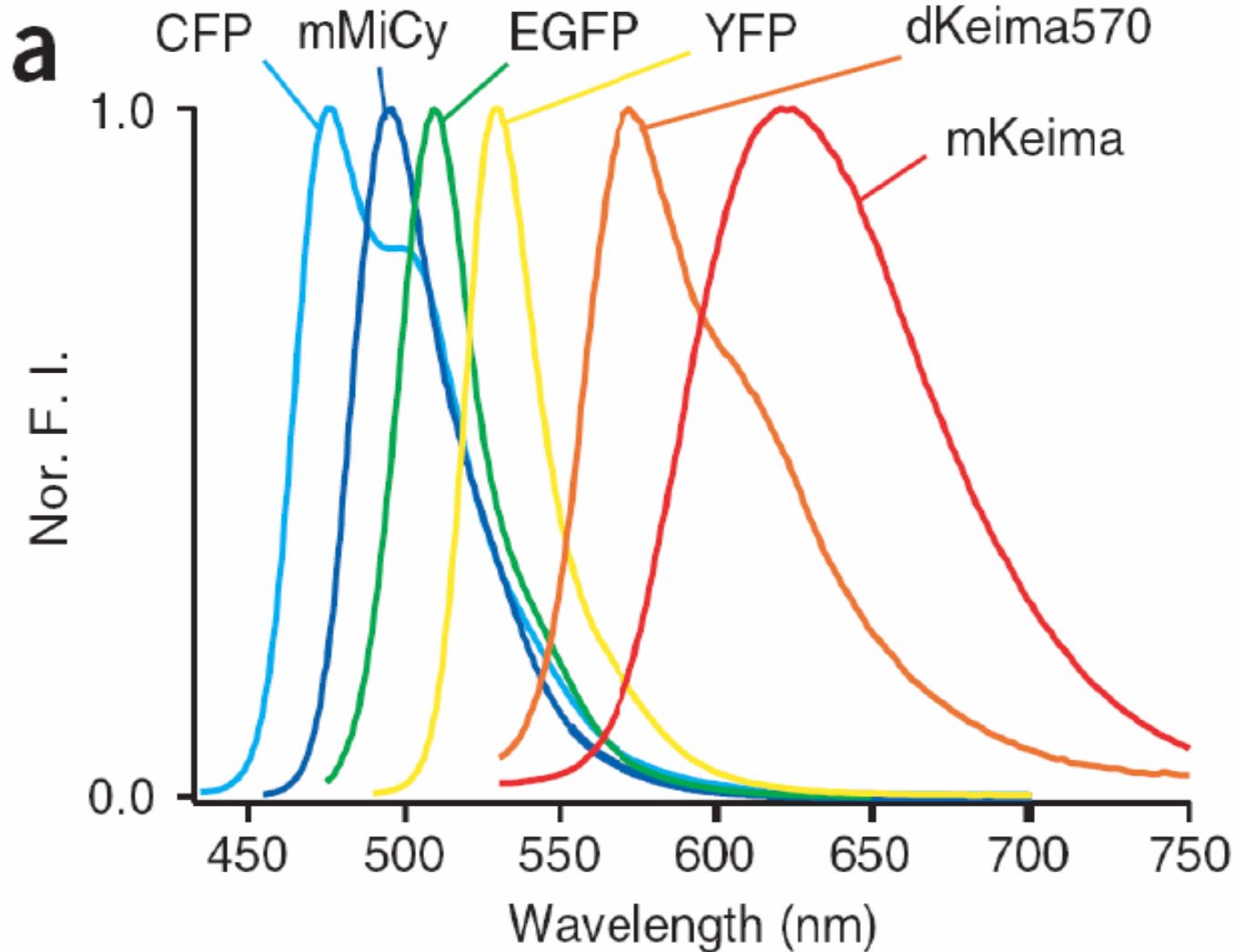
**Fig. H1** Structure et localisation du fluorophore responsable de la fluorescence de la GFP.

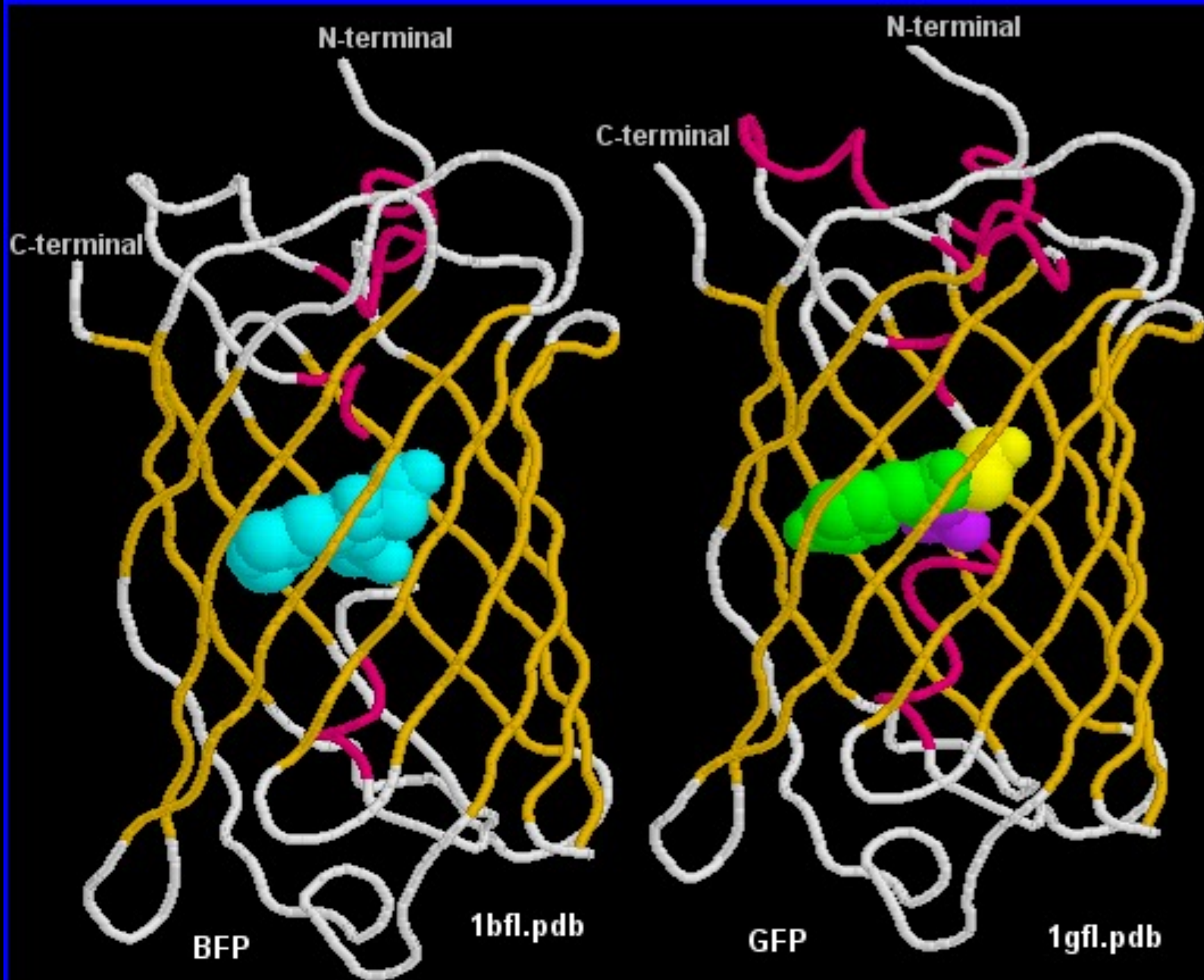
**Fig. H2** Principe de la technique permettant d'accrocher à une protéine d'intérêt une protéine fluorescente pour la suivre à la trace dans la cellule.

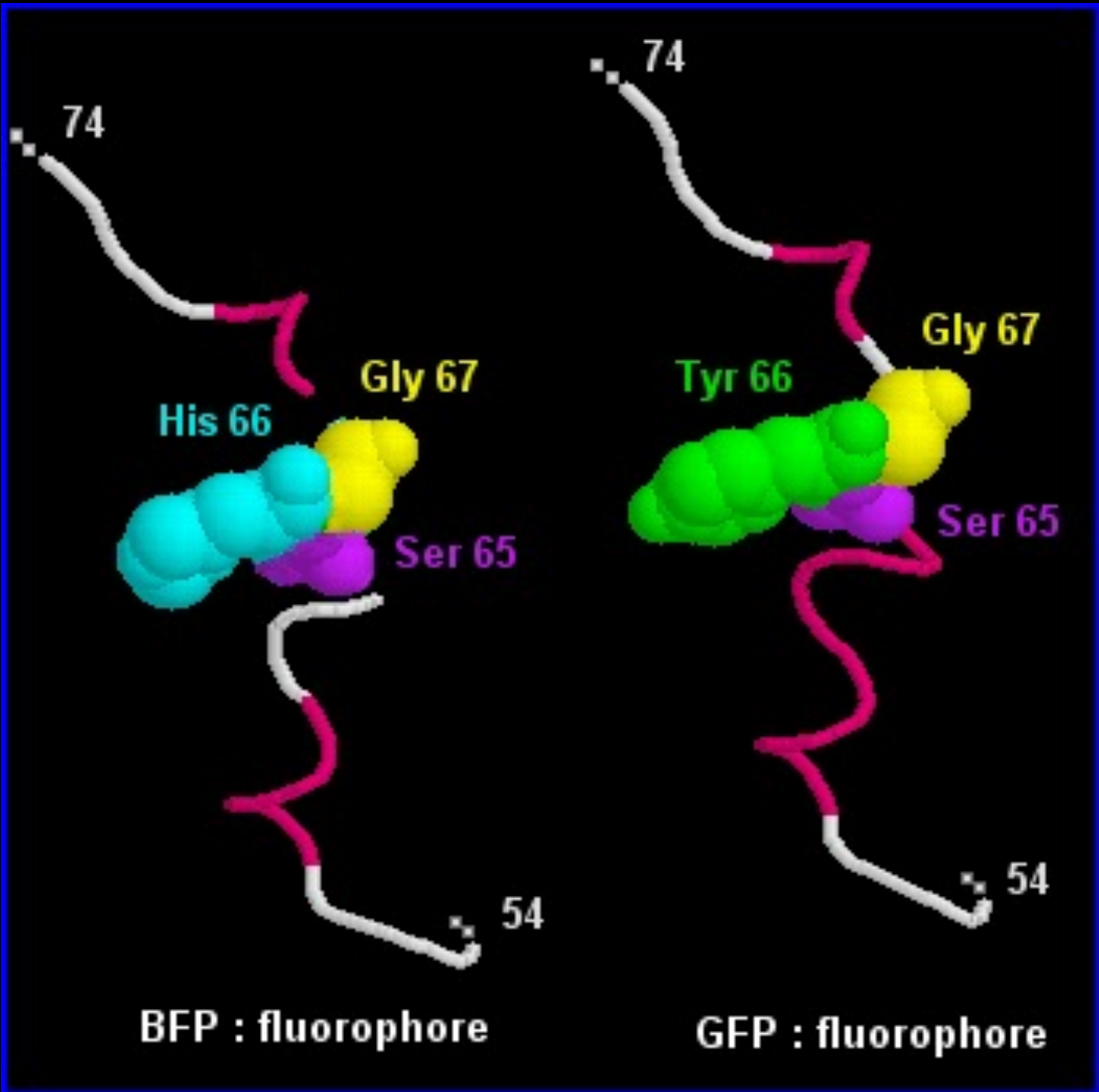


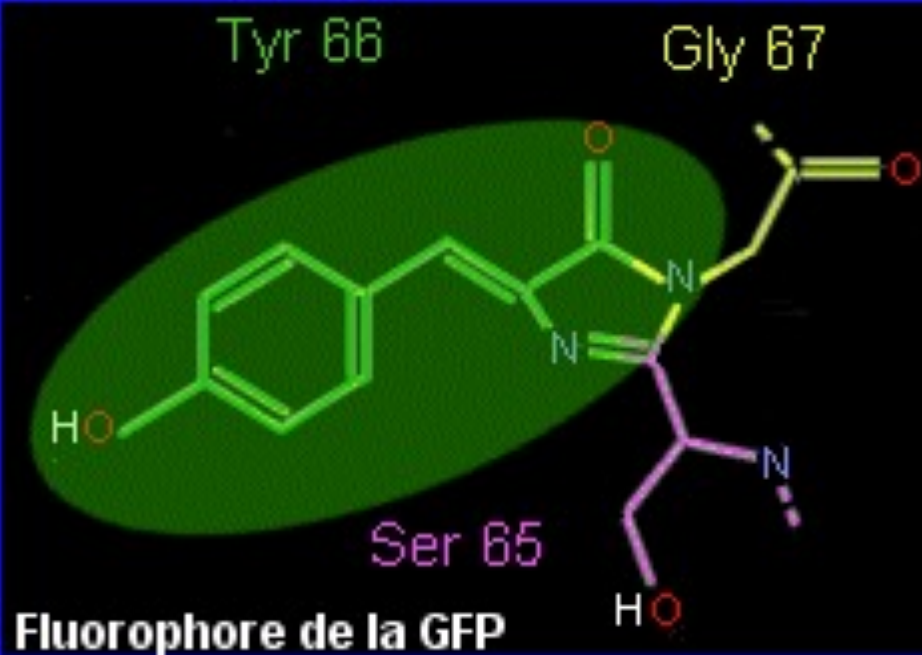
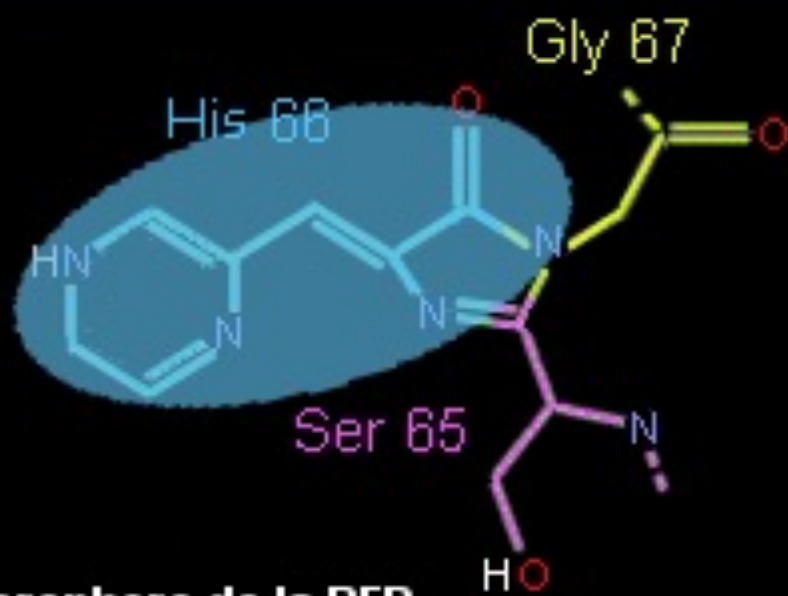
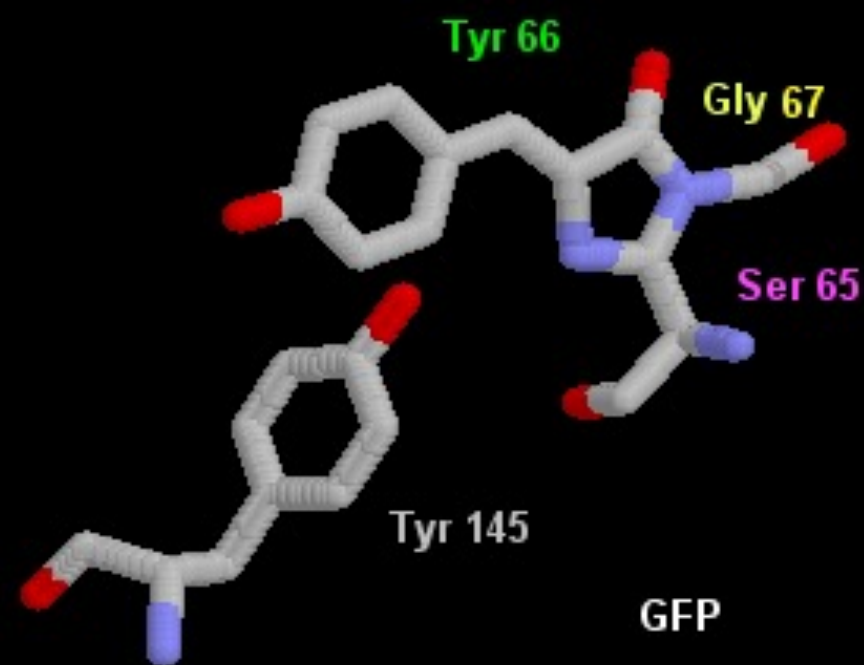
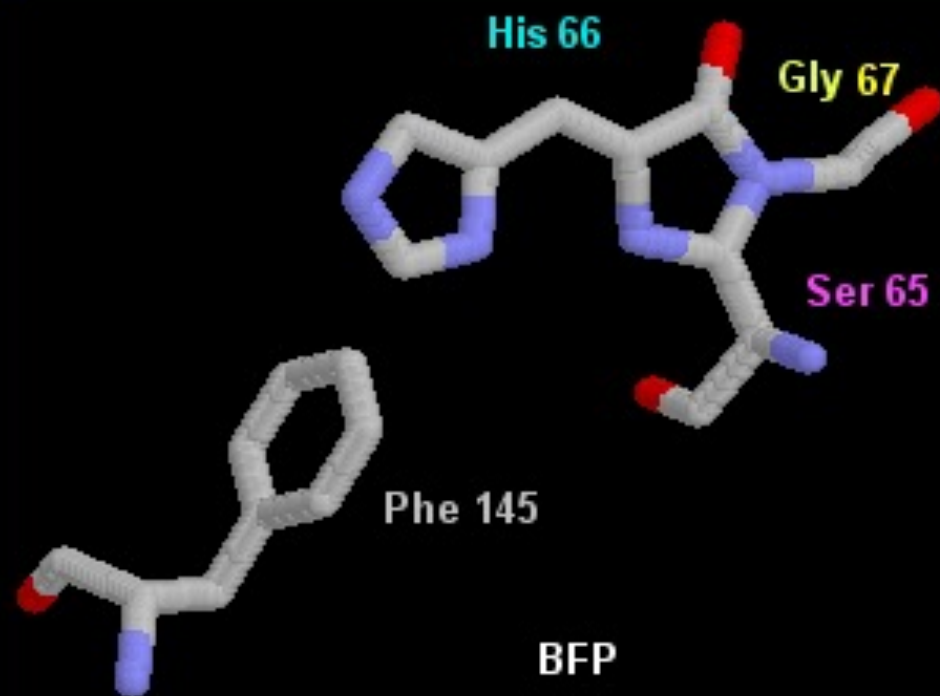


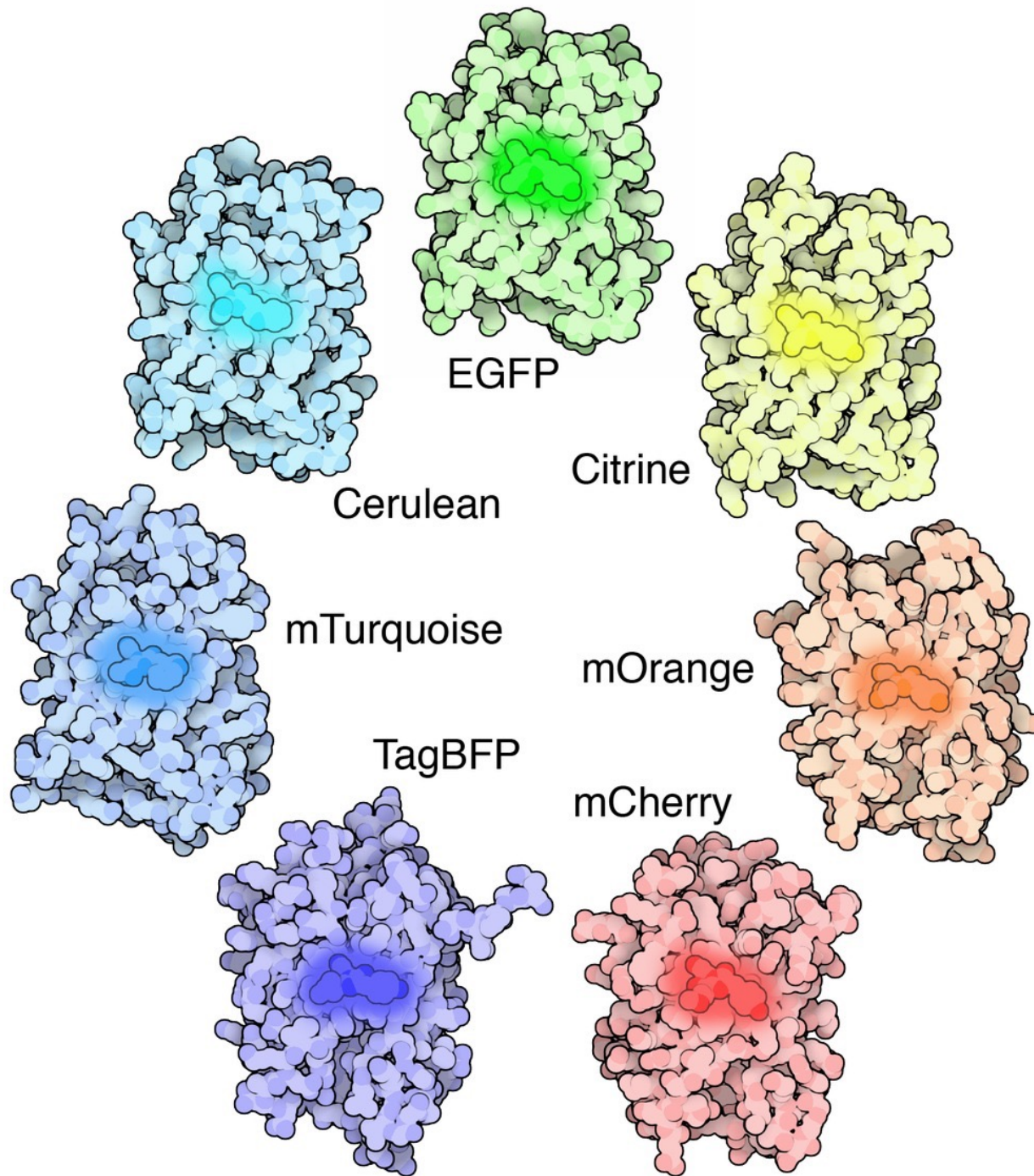
# GFP et dérivées











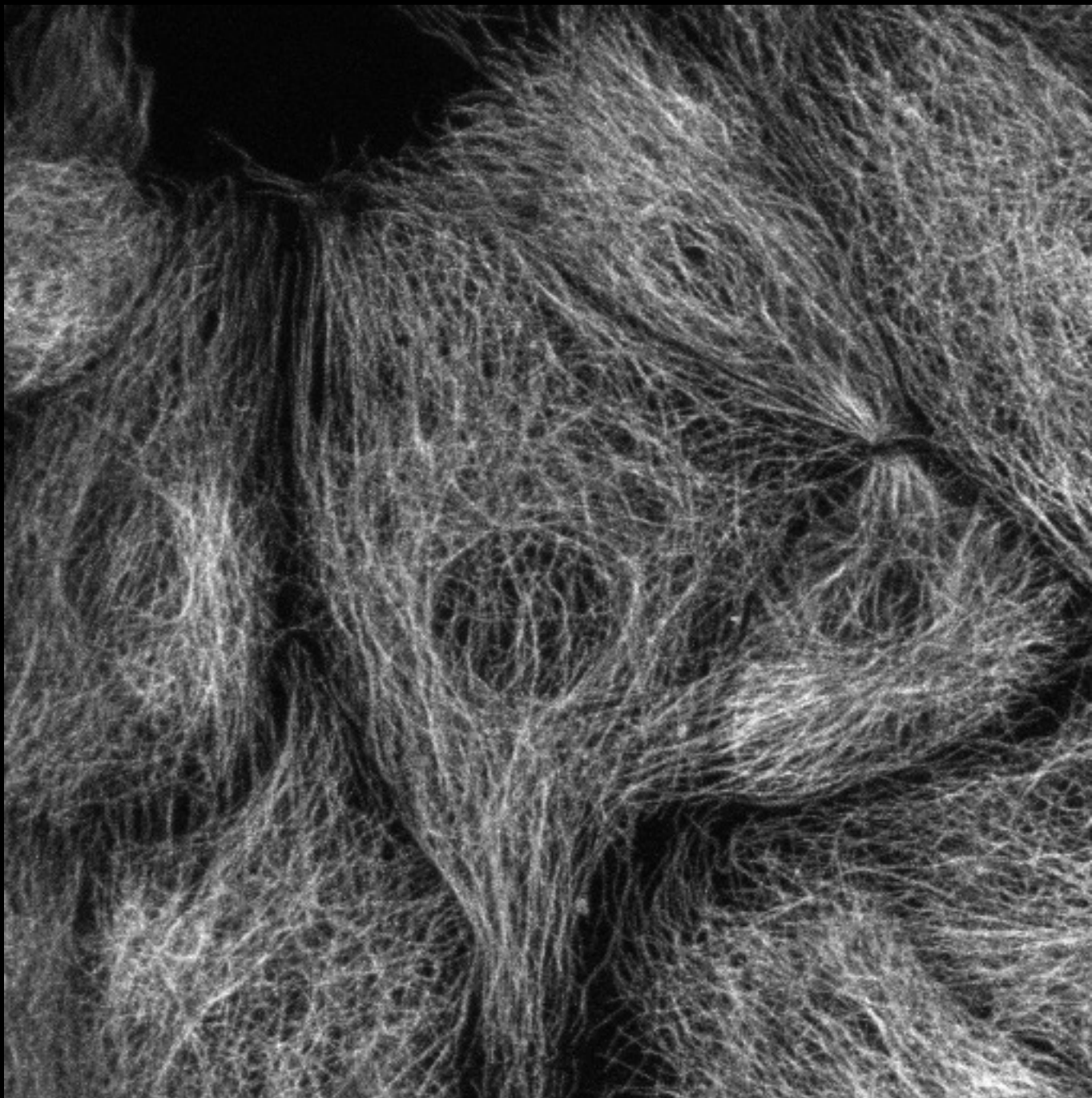


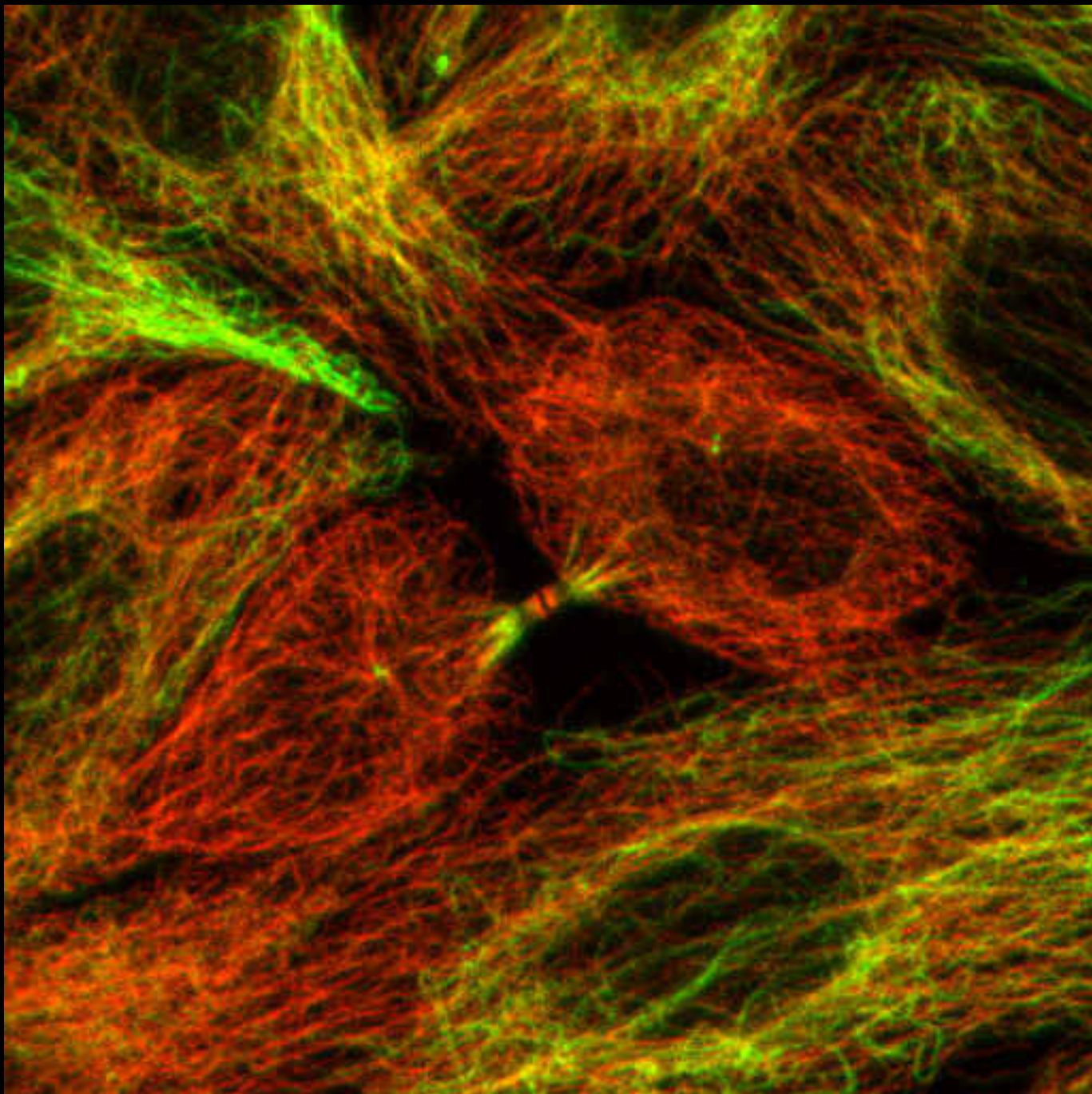
# Applications en biologie cellulaire

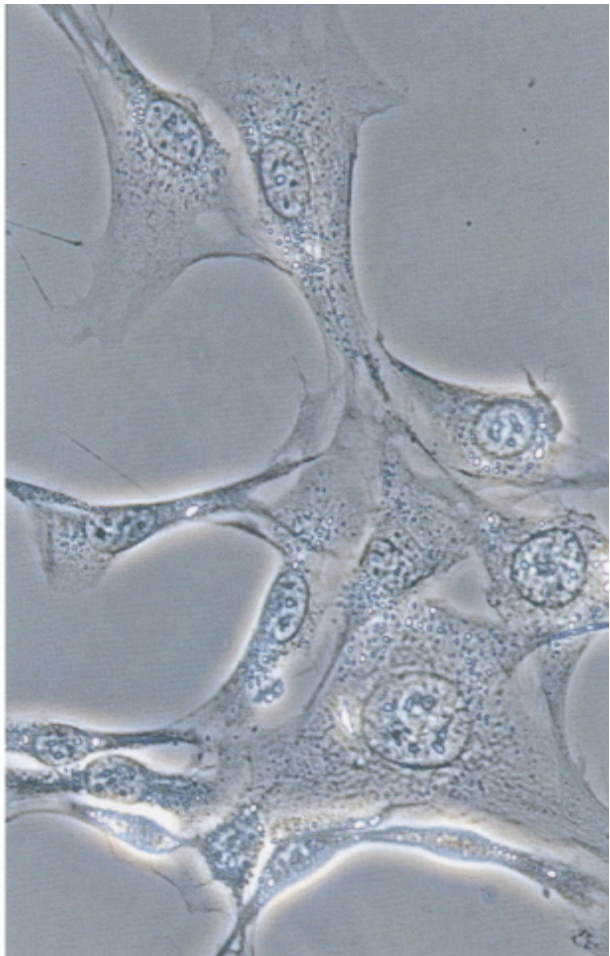
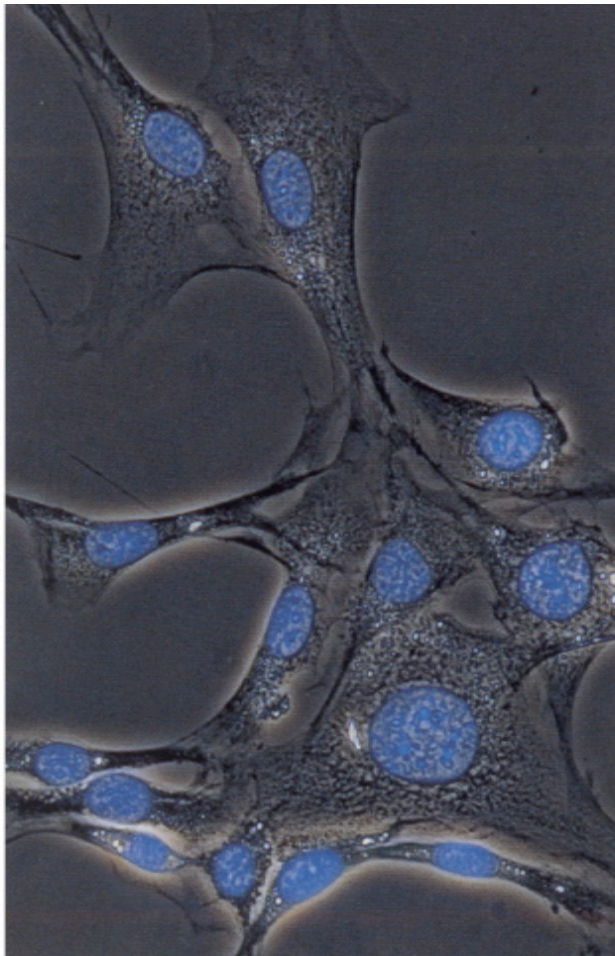
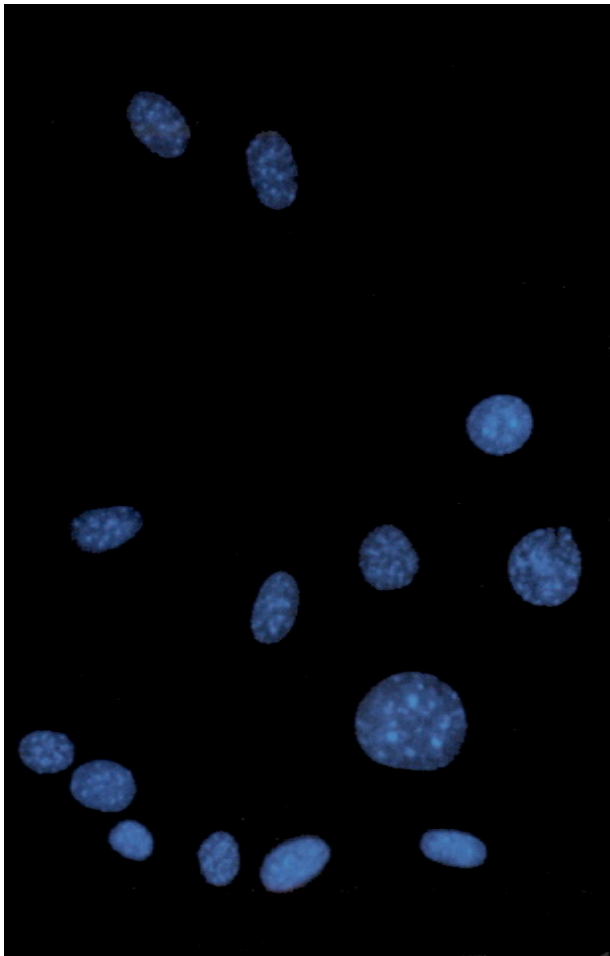
- **Localisation sub-cellulaire de composés (protéines ou molécules)**
- **Co-localisation de protéines/molécules**
- **Interactions entre protéines/molécules**
- **Dynamique du transport des protéines/molécules**

# Exemples

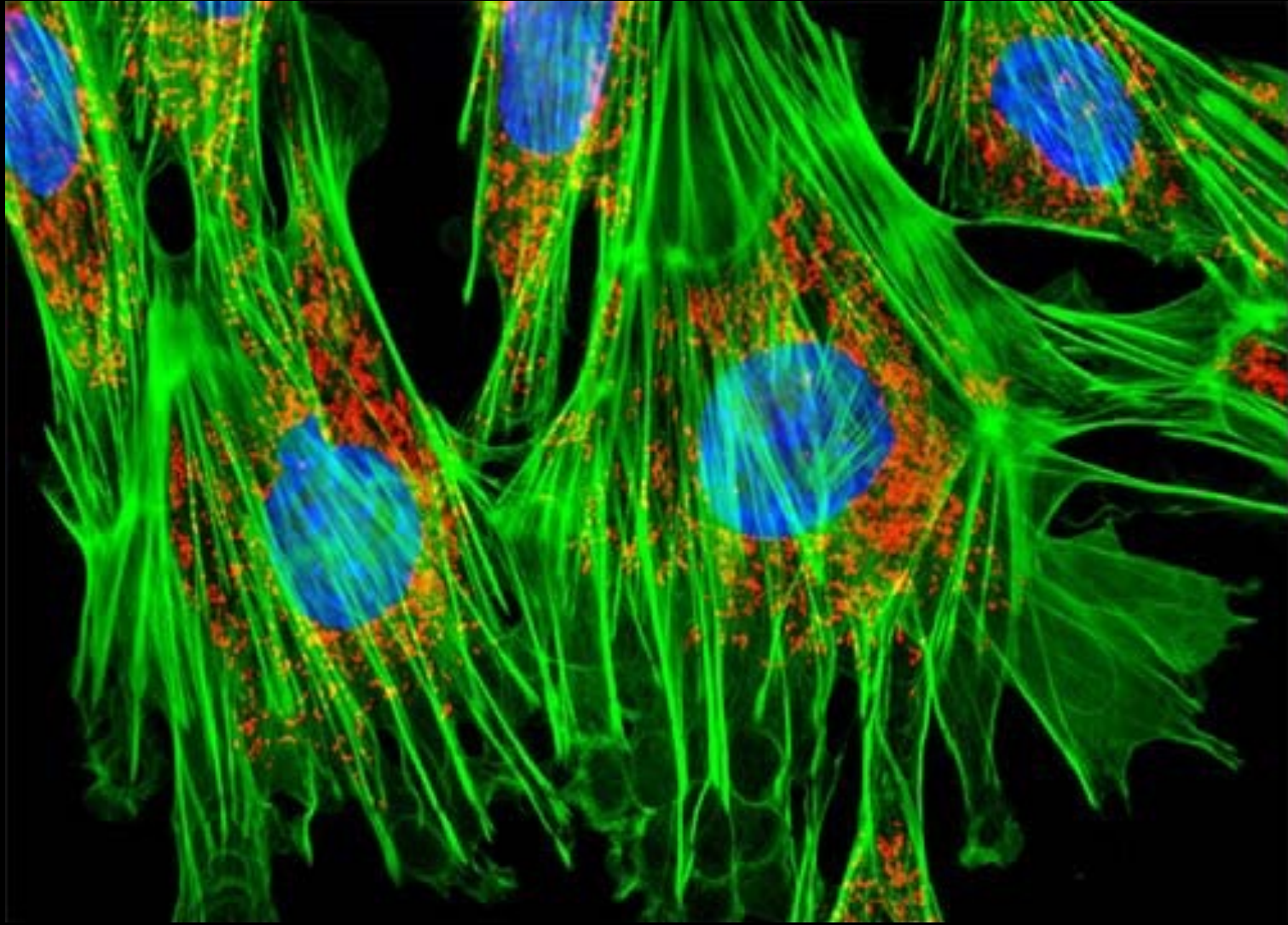
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Microscopie/fluo/fluo.htm>



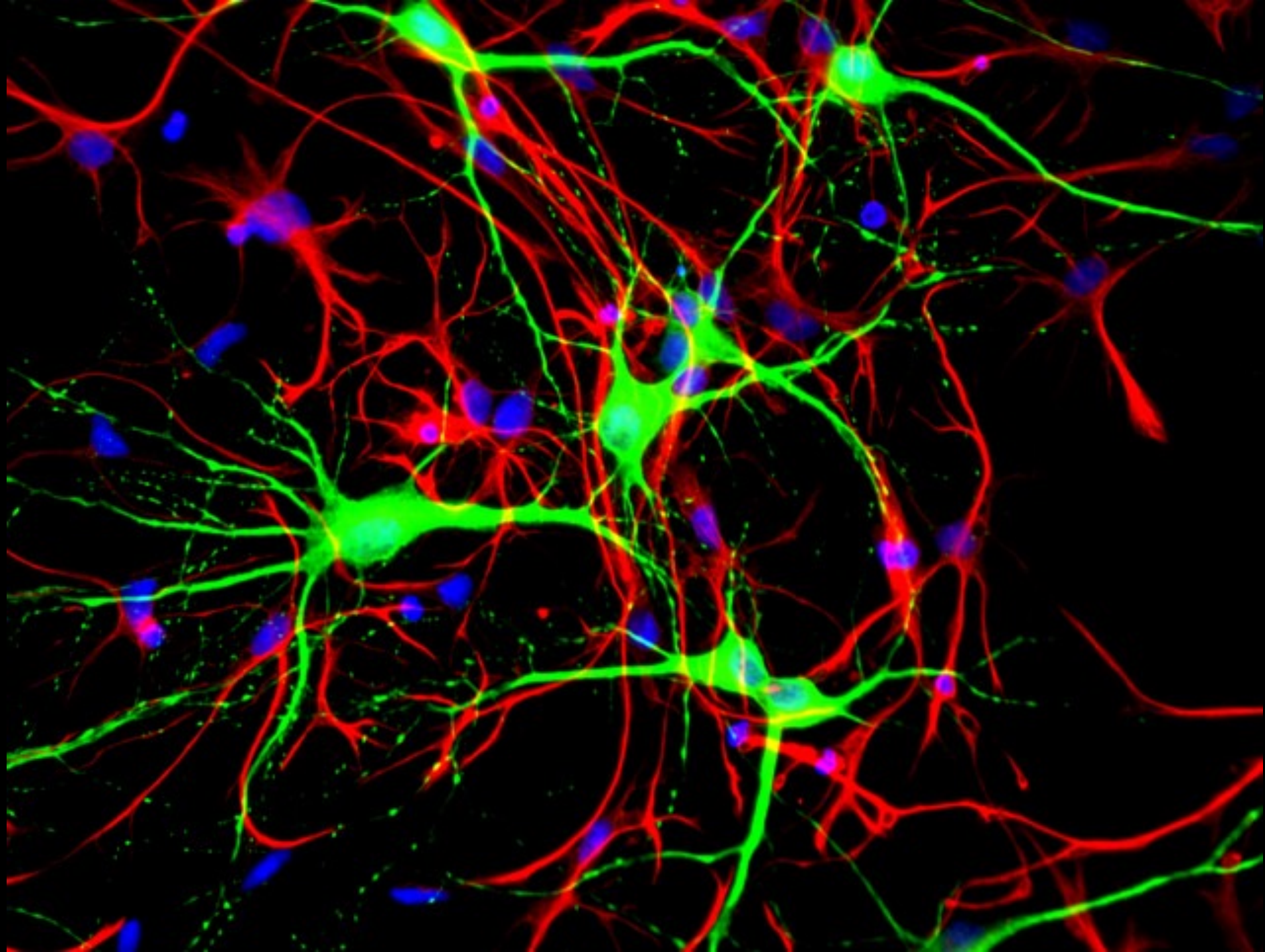


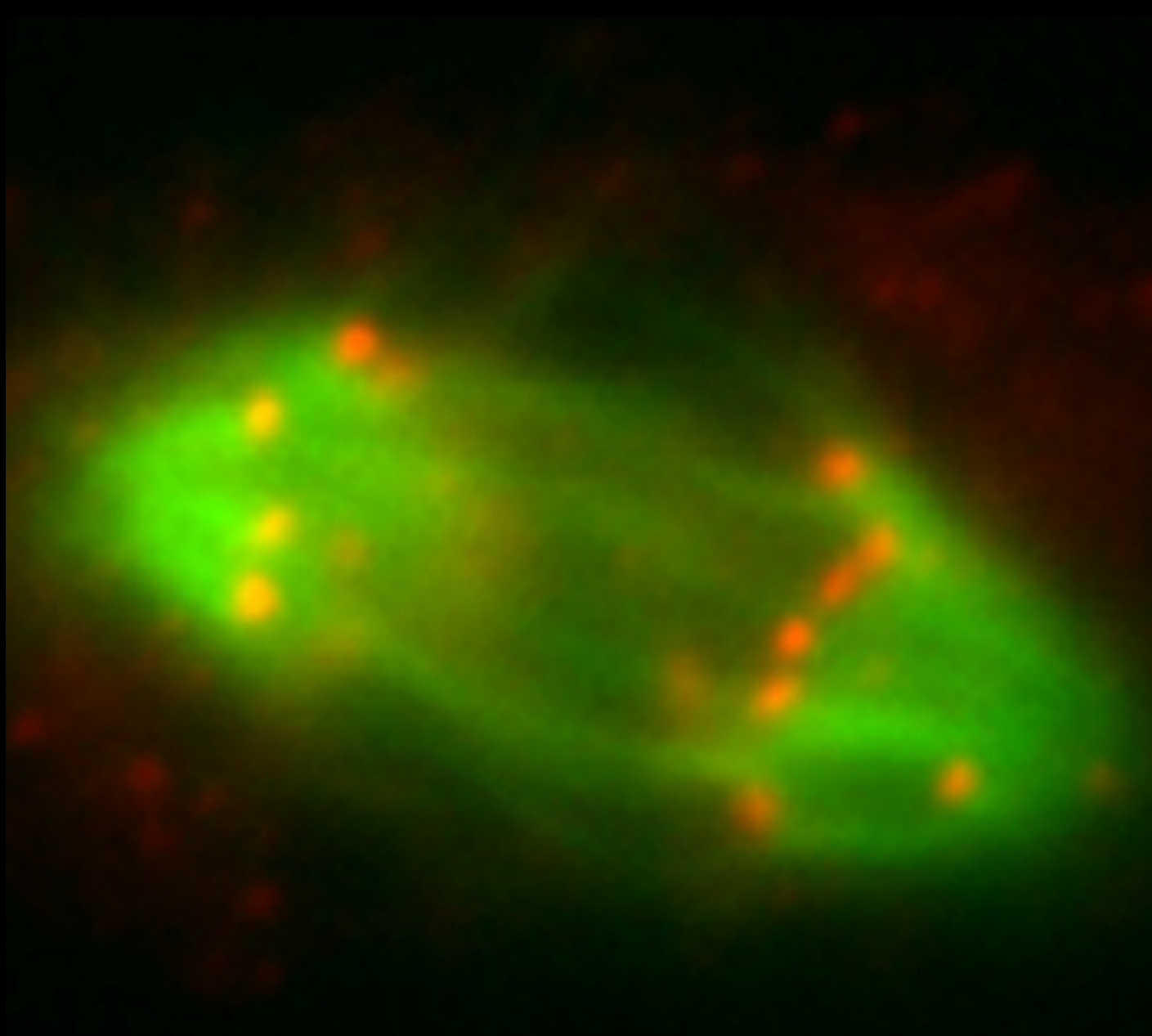


# Images en fluorescence



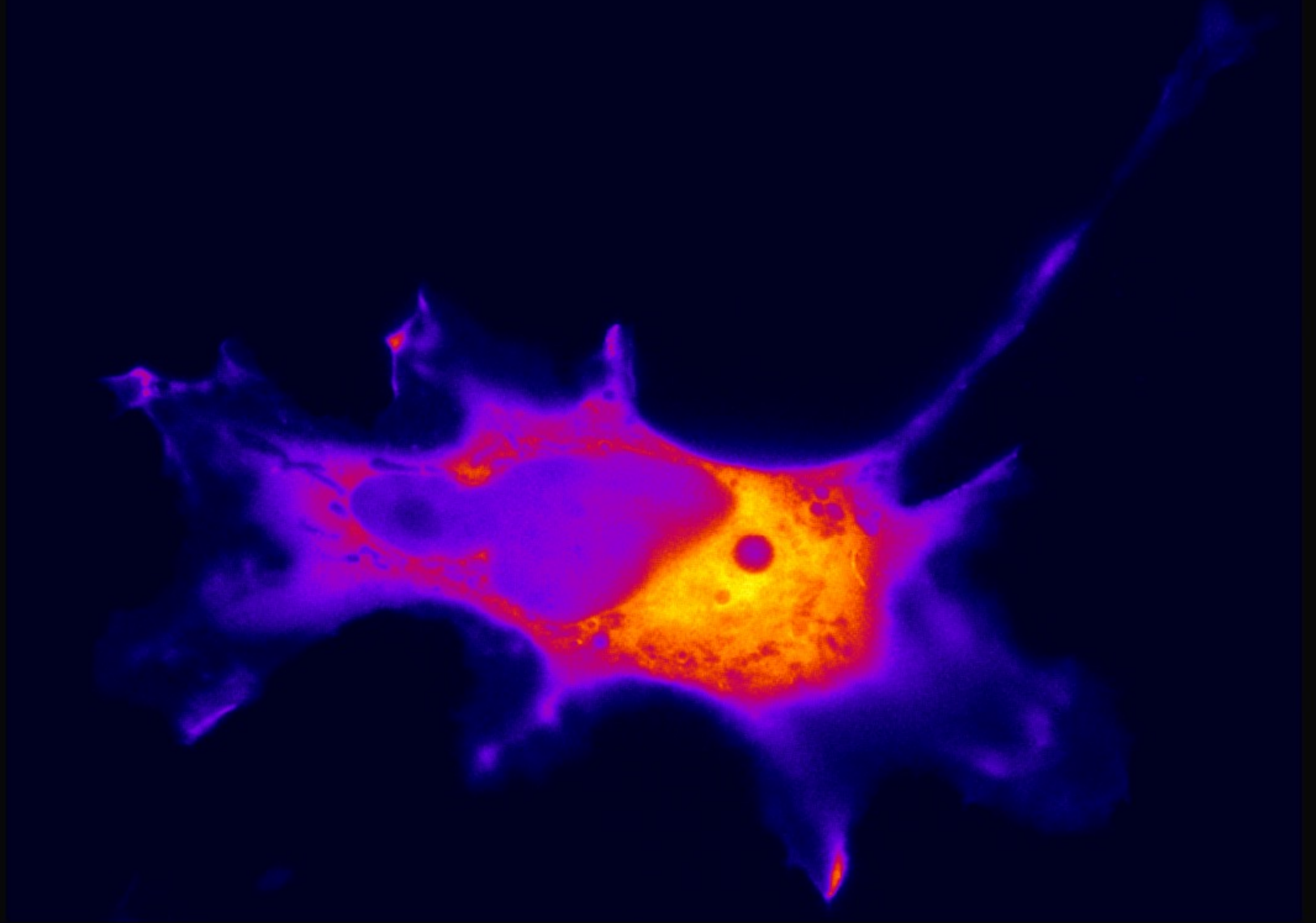
Cellules 3T3 marquées avec du MitoTracker (mitochondries, rouge), phalloïdine-Alexa488 (actine, vert) et du DAPI (ADN, bleu)

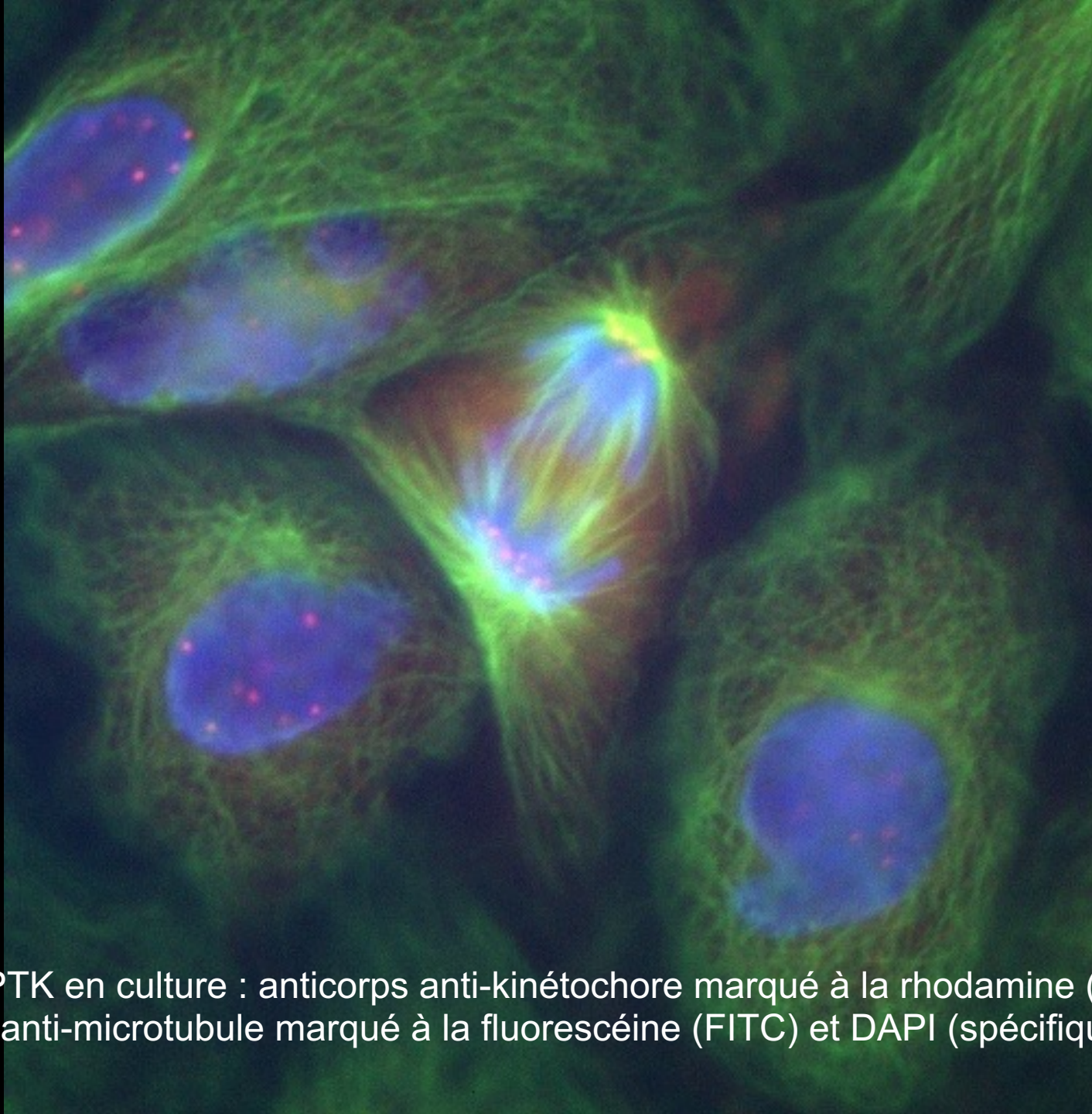




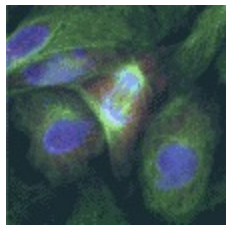
Cellules PTK en culture, anaphase : anticorps anti-kinétochore marqué à la rhodamine (TRTC) et anticorps anti-microtubule marqué à la fluorescéine (FITC)



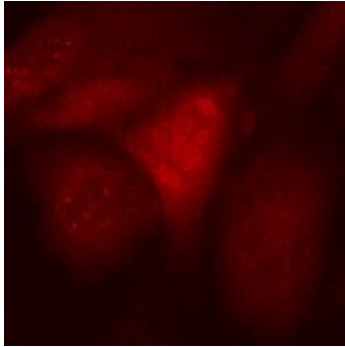
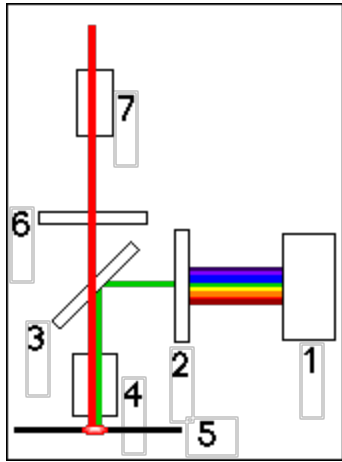




Cellules PTK en culture : anticorps anti-kinétochore marqué à la rhodamine (TRTC), anticorps anti-microtubule marqué à la fluorescéine (FITC) et DAPI (spécifique de l'ADN)

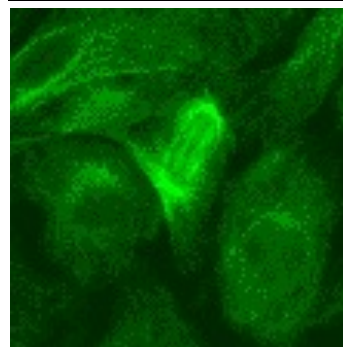
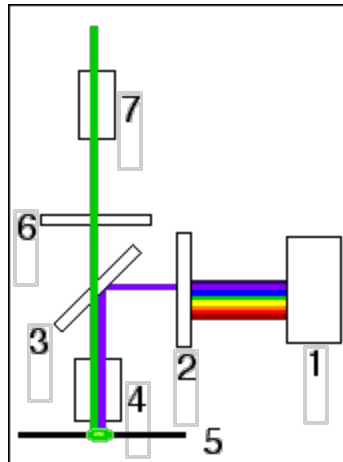


Jeu de filtres pour fluorescence rouge



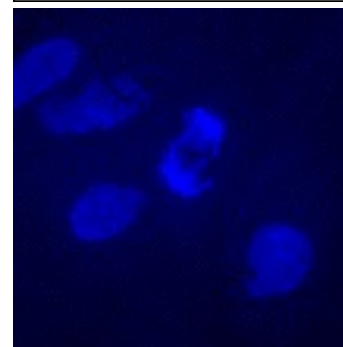
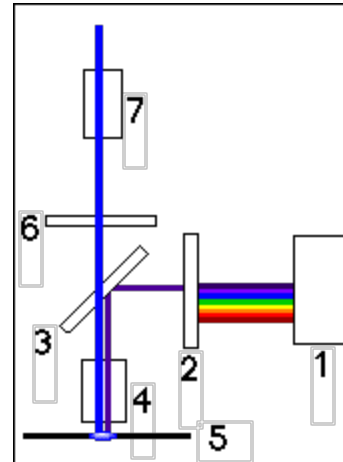
Fluorescence rouge des kinétochores aux pôles du fuseau.

Jeu de filtres pour fluorescence verte

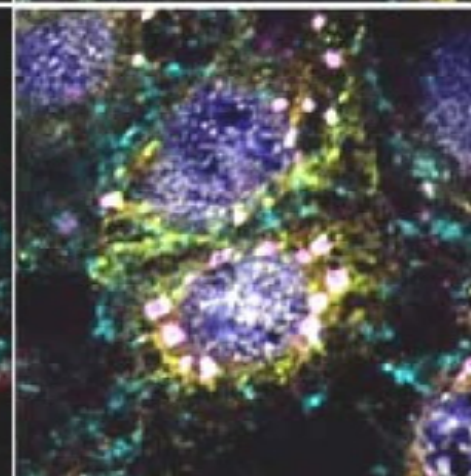
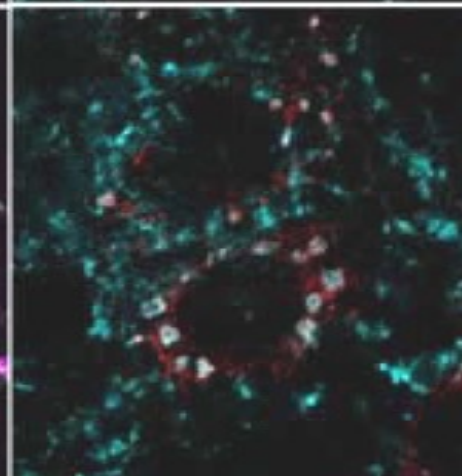
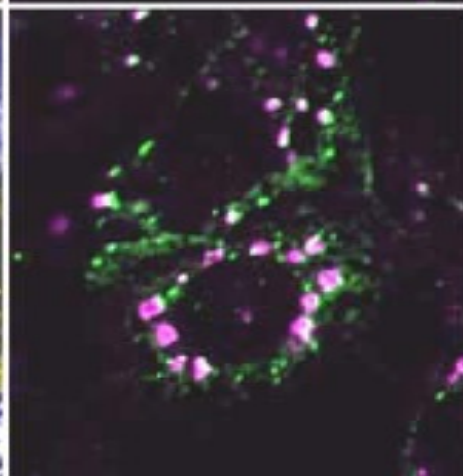
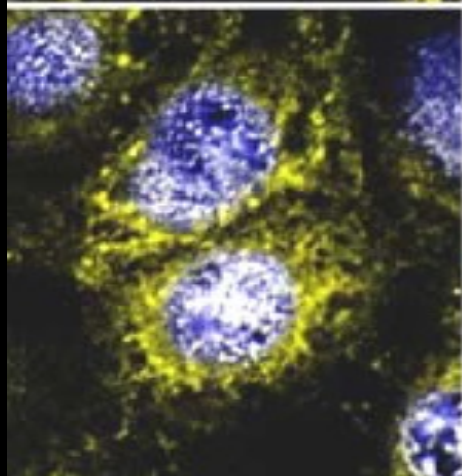
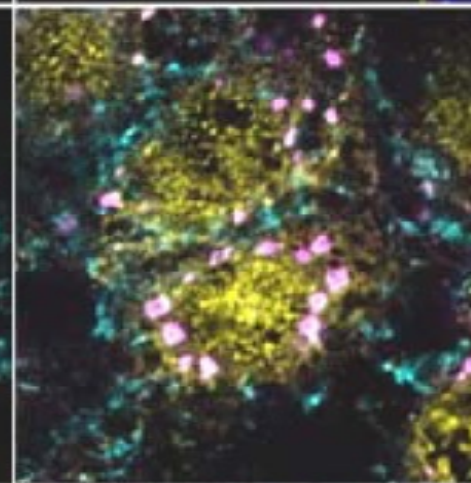
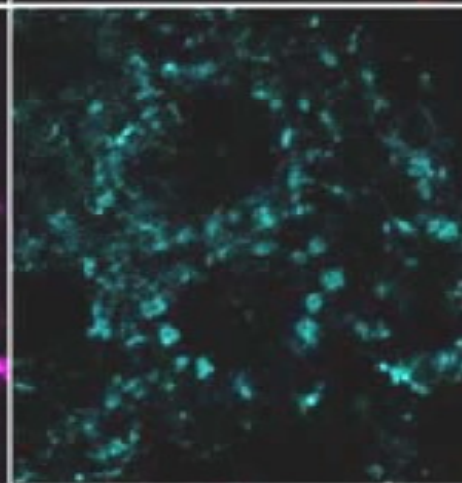
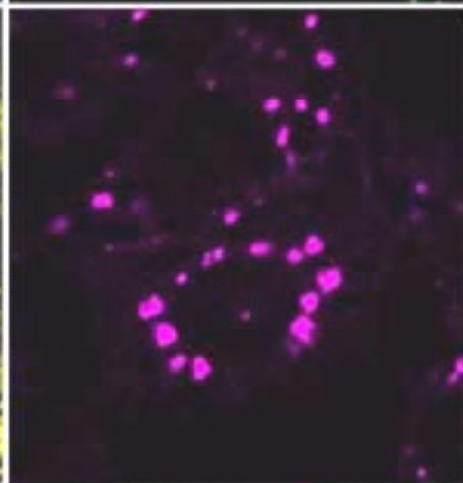
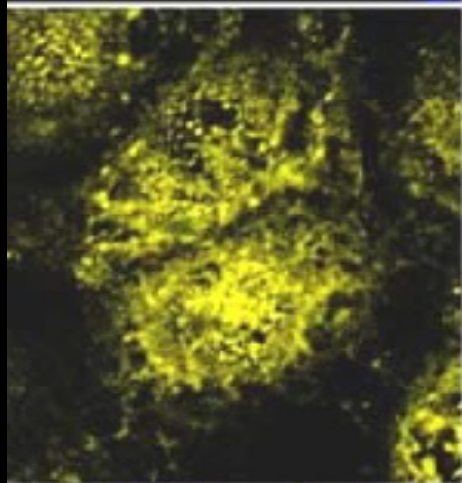
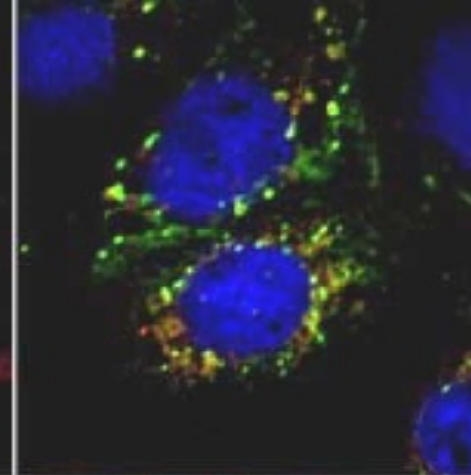
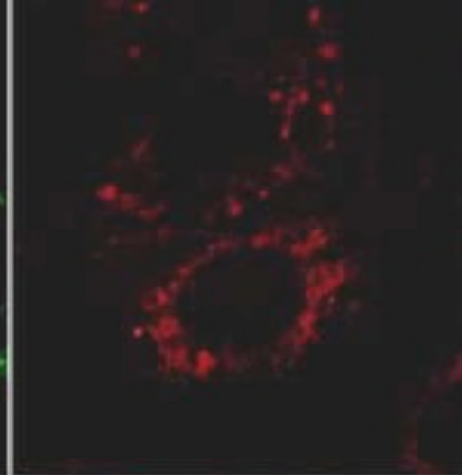
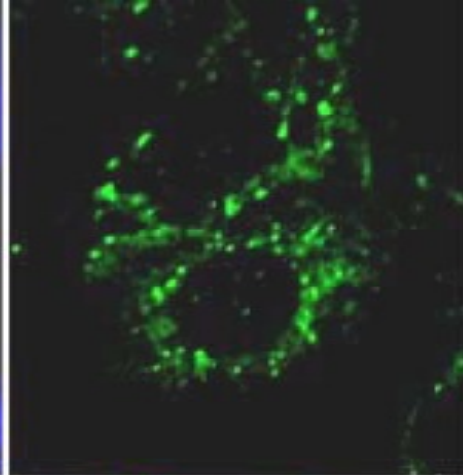
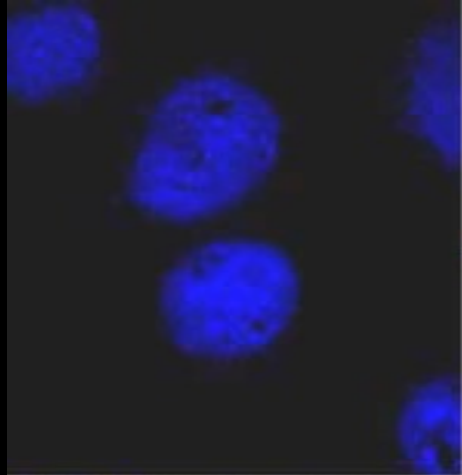


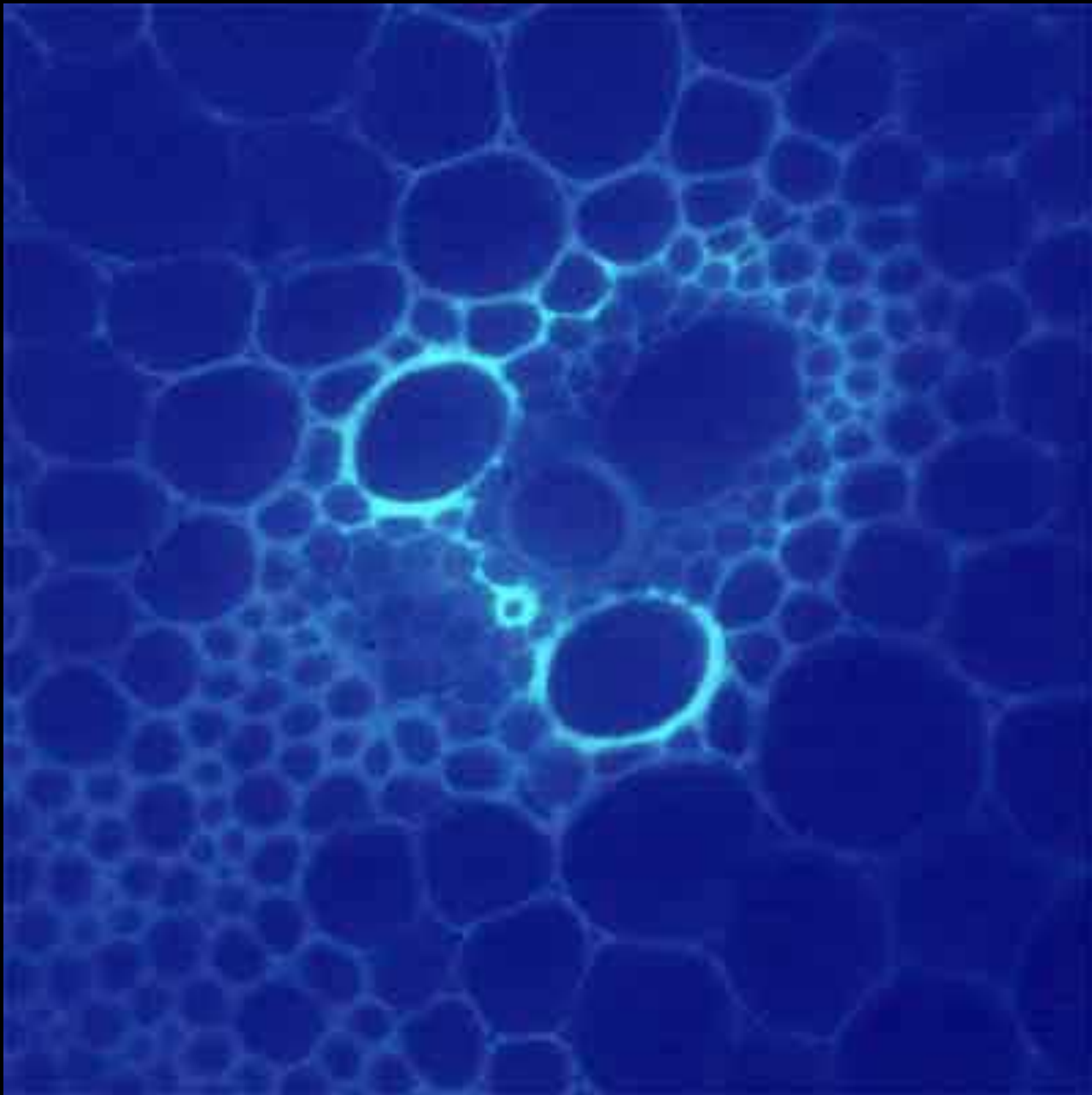
Fluorescence verte des microtubules du fuseau.

Jeu de filtres pour fluorescence bleue

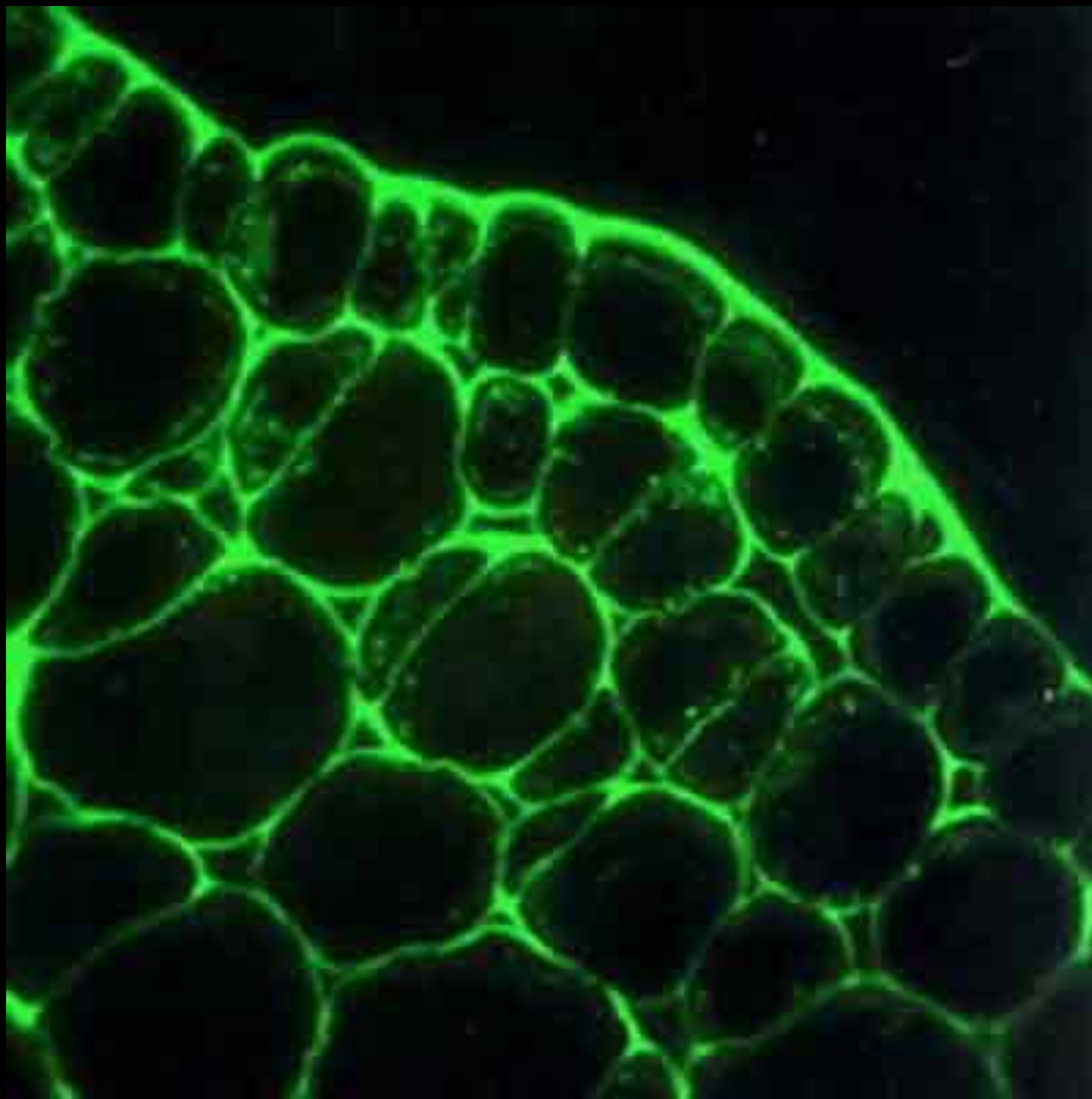


Fluorescence bleue de l'ADN dans les noyaux en interphase et des chromosomes de l'anaphase.

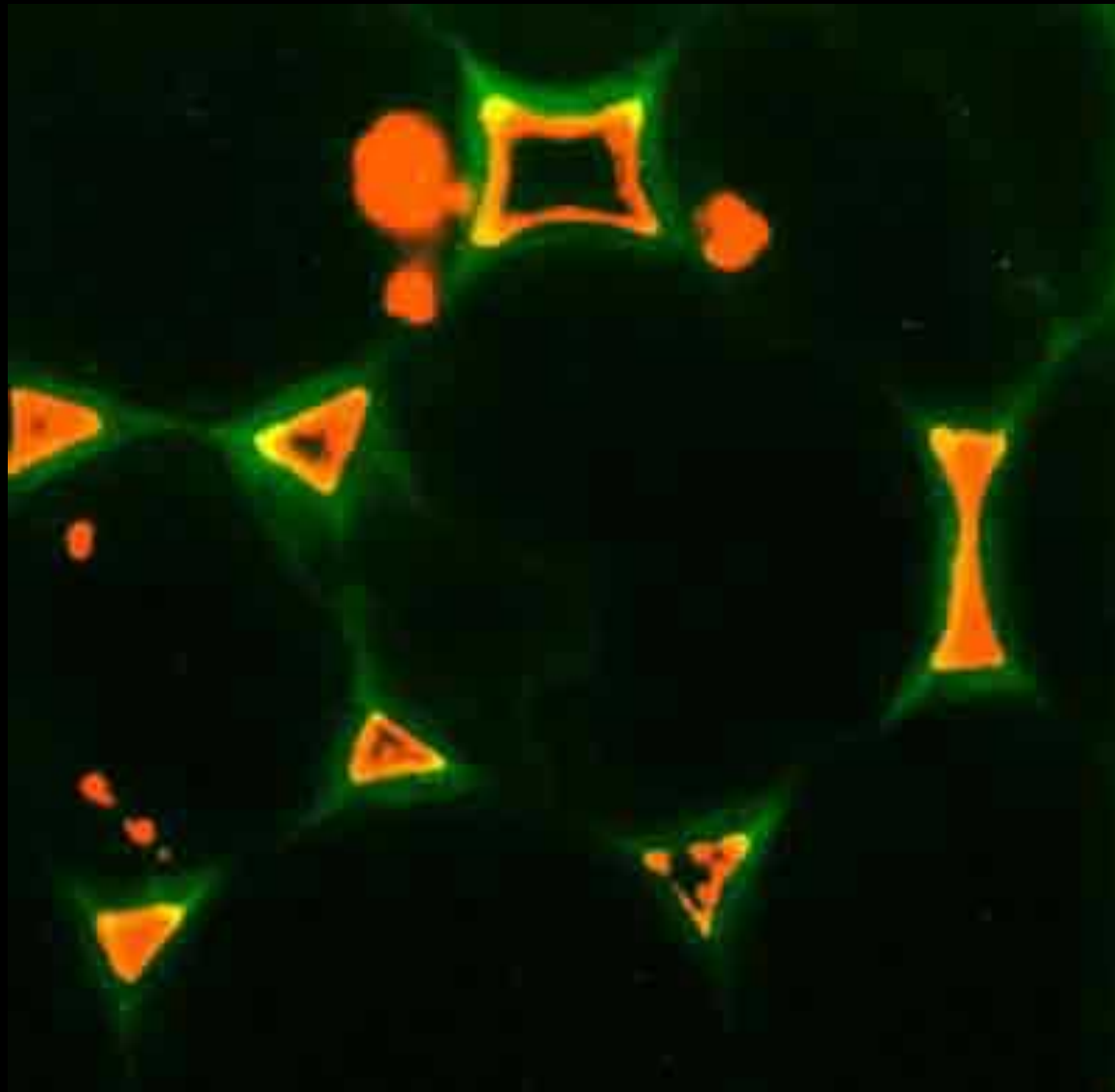




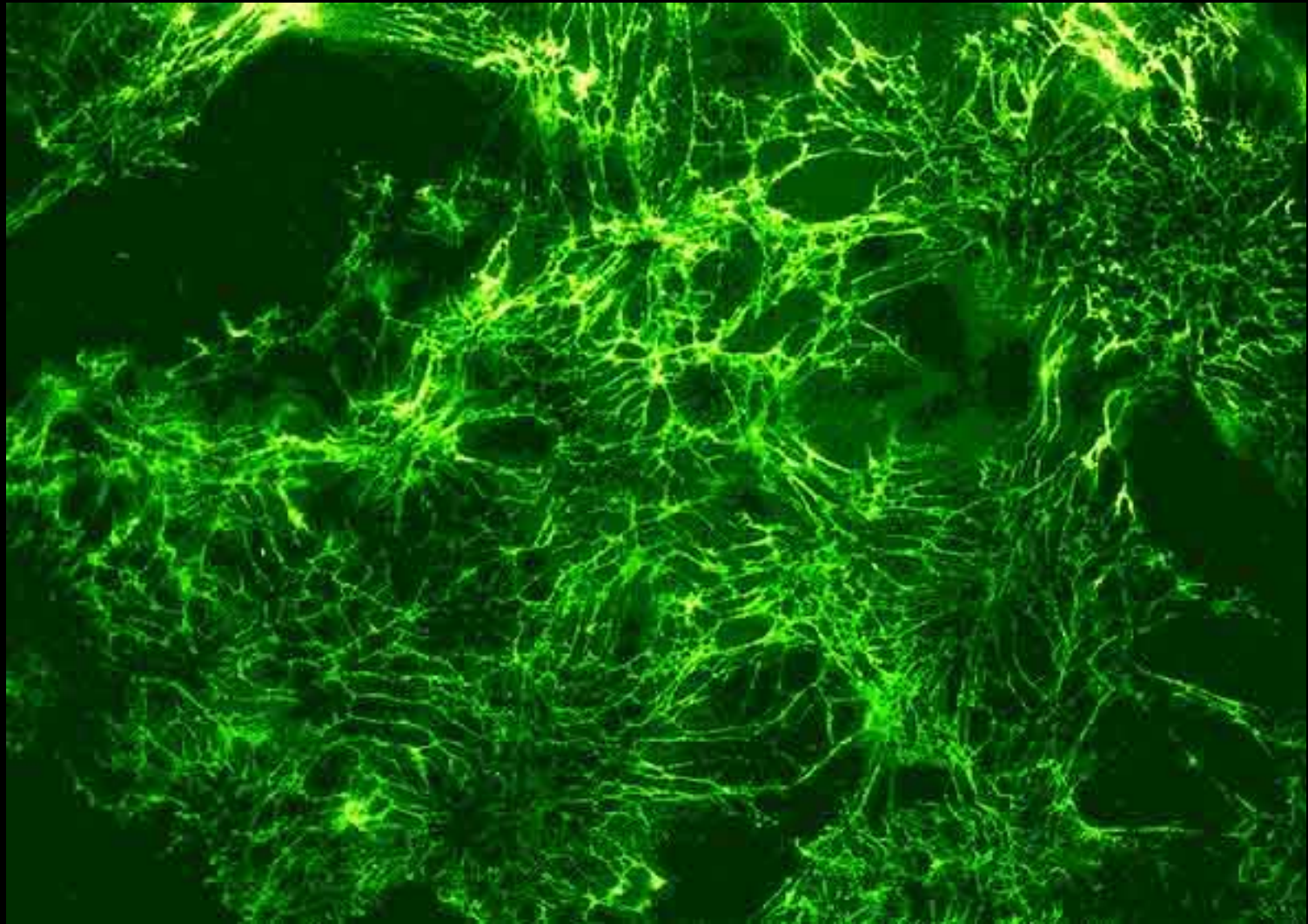
Faisceau cribro-vasculaire de feuille de blé : fluorescence naturelle de la lignine



Coupe transversale d'hypocotyle de soja : reconnaissance des pectines par un anticorps anti-pectines et marquage par la fluorescéine

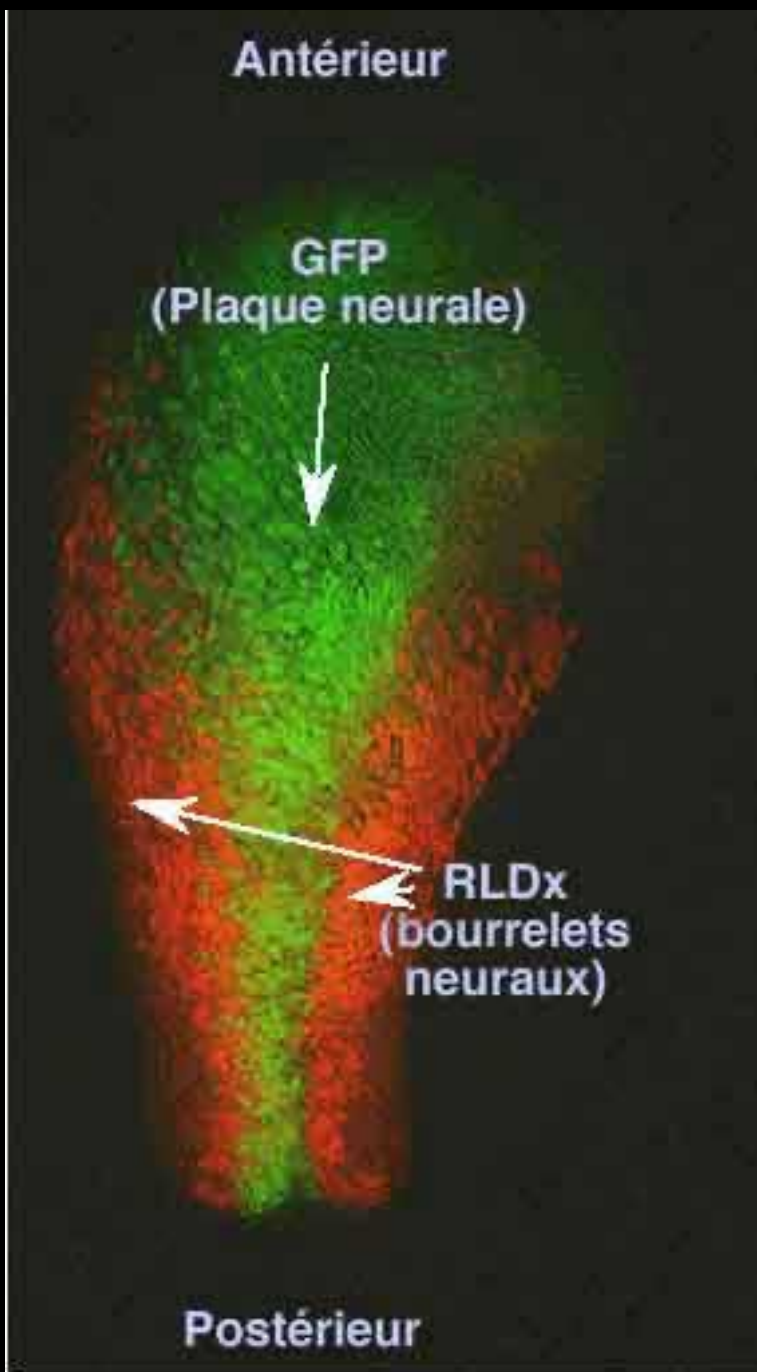


Coupe transversale d'hypocotyle de soja : anticorps anti-pectines-methyl-estérases (PME) marqué à la rhodamine et anticorps anti-pectines marqué à la fluorescéine. La totalité des parois contient des pectines alors que les PME sont localisées autour des méats.

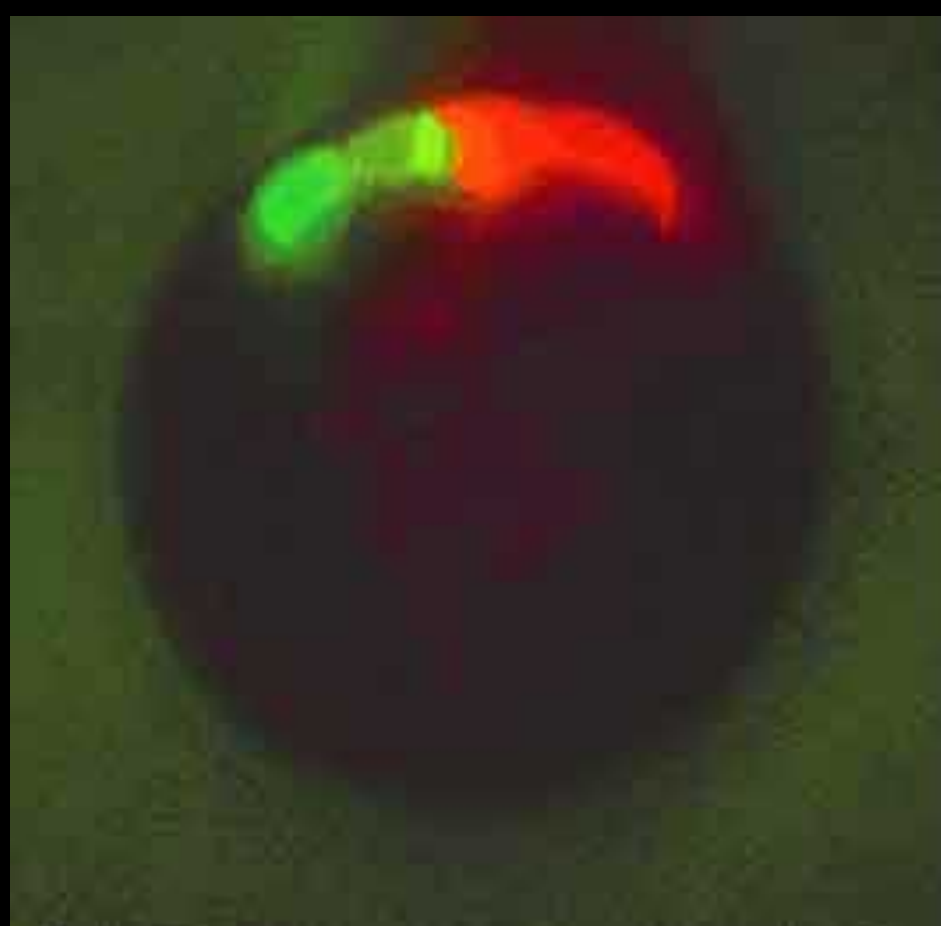


Vue in toto du réseau fibrillaire tridimensionnel de la matrice extracellulaire située sur le plafond du blastocoele d'une jeune gastrula d'amphibien. La fluorescence verte correspond à la mise en évidence de la fibronectine par un anticorps couplé à la fluorescéine.





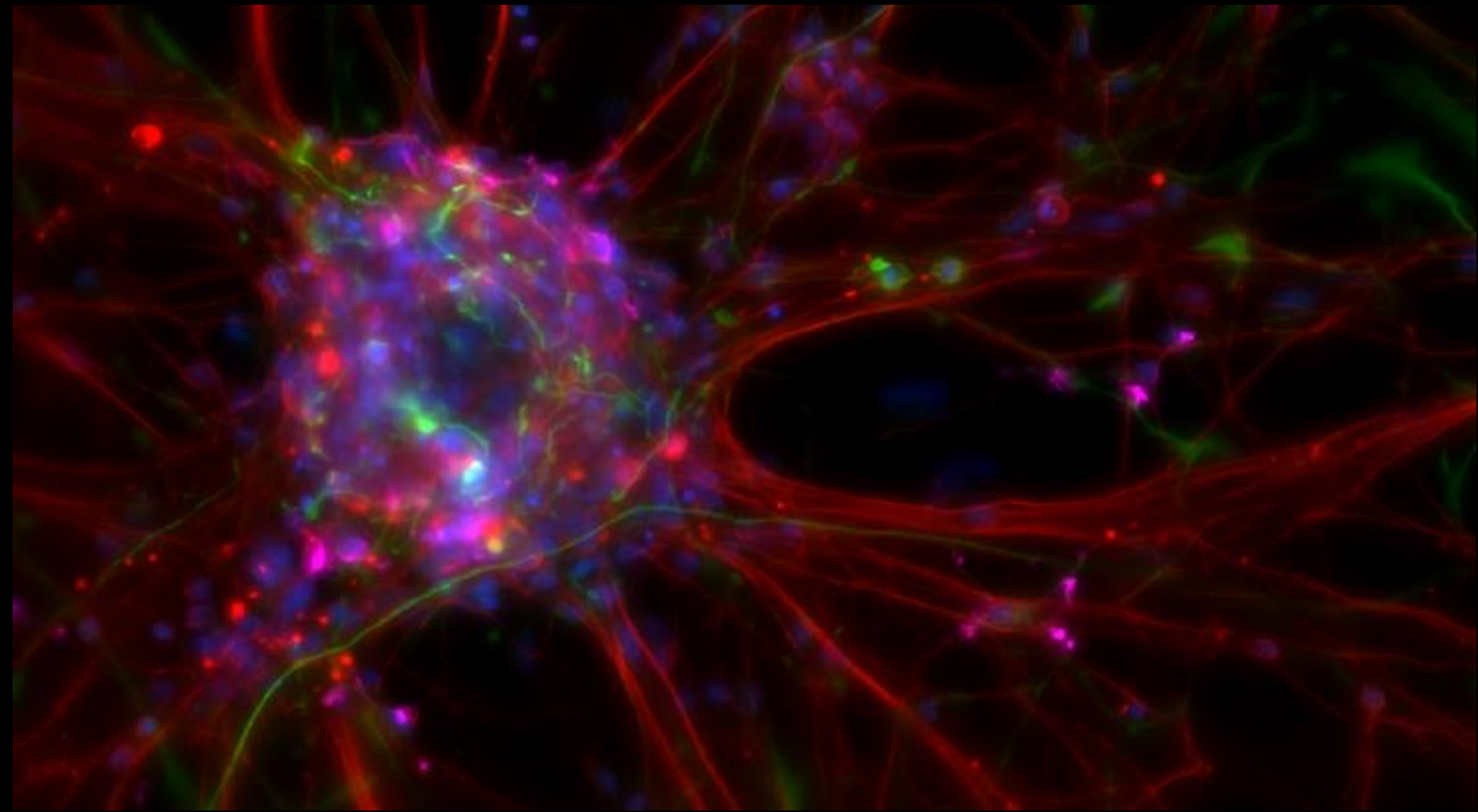
Les ARNm de la GFP sont microinjectés dans un blastomère au stade 32 cellules. A mesure que les cellules filles se divisent, l'ARNm est traduit en protéine. Ici, le clone cellulaire marqué par la GFP est observé au stade jeune neurula au niveau de la plaque neurale. Il est encadré par deux clones latéraux issus de blastomères marqués au RLDx, comme précédemment, au niveau des bourrelets neuraux.



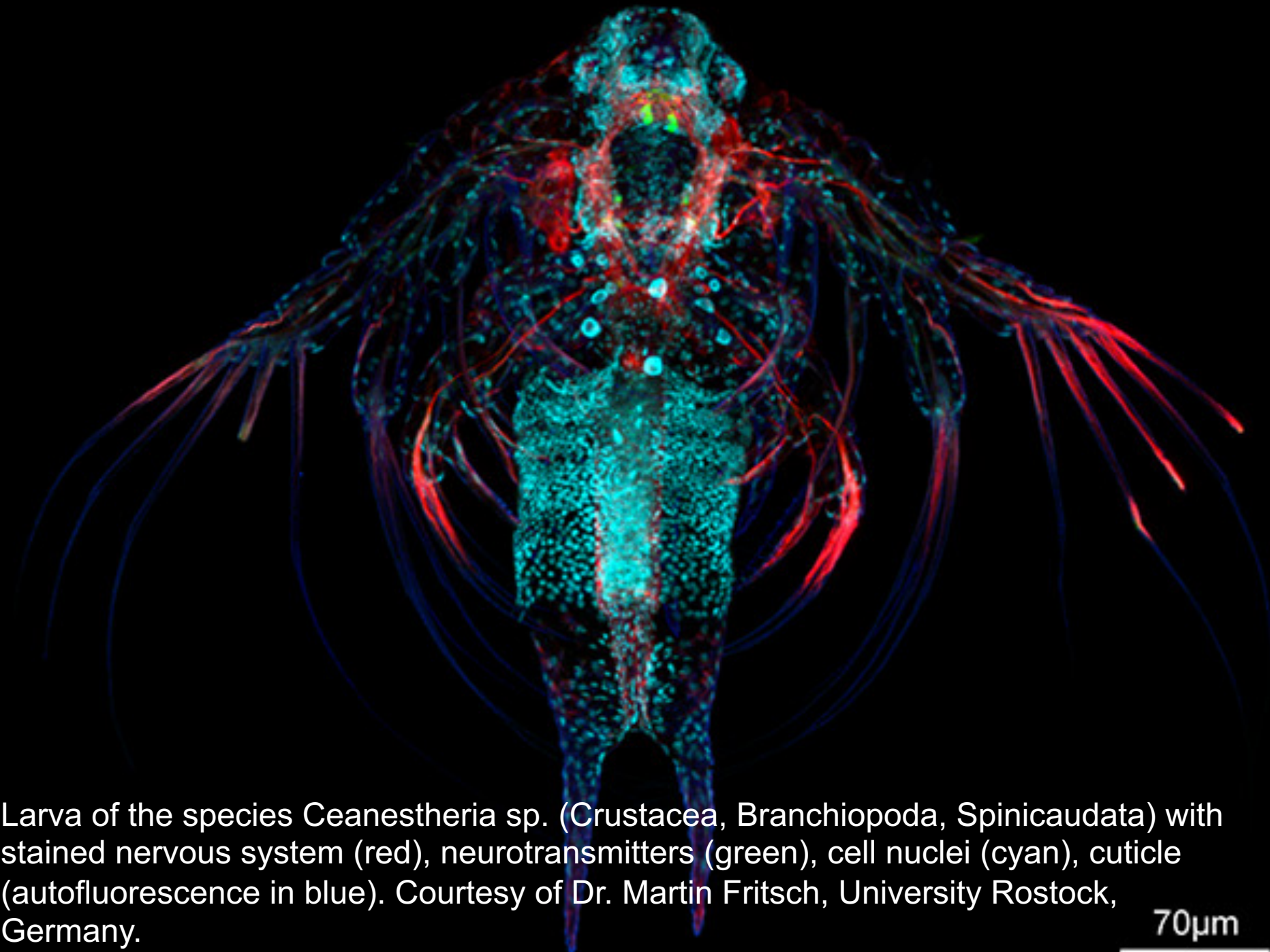
A gauche, double lignage cellulaire au cours du développement embryonnaire chez un amphibien. A droite, embryon correspondant observé en lumière normale.

Sur l'image de gauche, au stade 32 cellules, deux cellules adjacentes, sont microinjectées avec des traceurs fluorescents différents. L'une, en vert, est marquée avec du FLDx (Fluorescéine-Lysine-Dextran), l'autre en rouge, est marquée avec du RLDx (Rhodamine-Lysine-Dextran).

Sur l'image de gauche, les deux cellules marquées ont entamé leur division cellulaire. L'embryon passe du stade 32 à 64 cellules.



Cultured neuronal cells. Merged fluorescent multichannel image made out of four fluorescent channels sequentially acquired using a [Leica DFC3000 G](#) digital camera. Blue: nuclei, green: astrocytes, red: mature neurons, purple: immature neurons. Sample courtesy of FAN GmbH, Martinsried, Germany.



Larva of the species *Ceanestheria* sp. (Crustacea, Branchiopoda, Spinicaudata) with stained nervous system (red), neurotransmitters (green), cell nuclei (cyan), cuticle (autofluorescence in blue). Courtesy of Dr. Martin Fritsch, University Rostock, Germany.

70µm

STANDBY

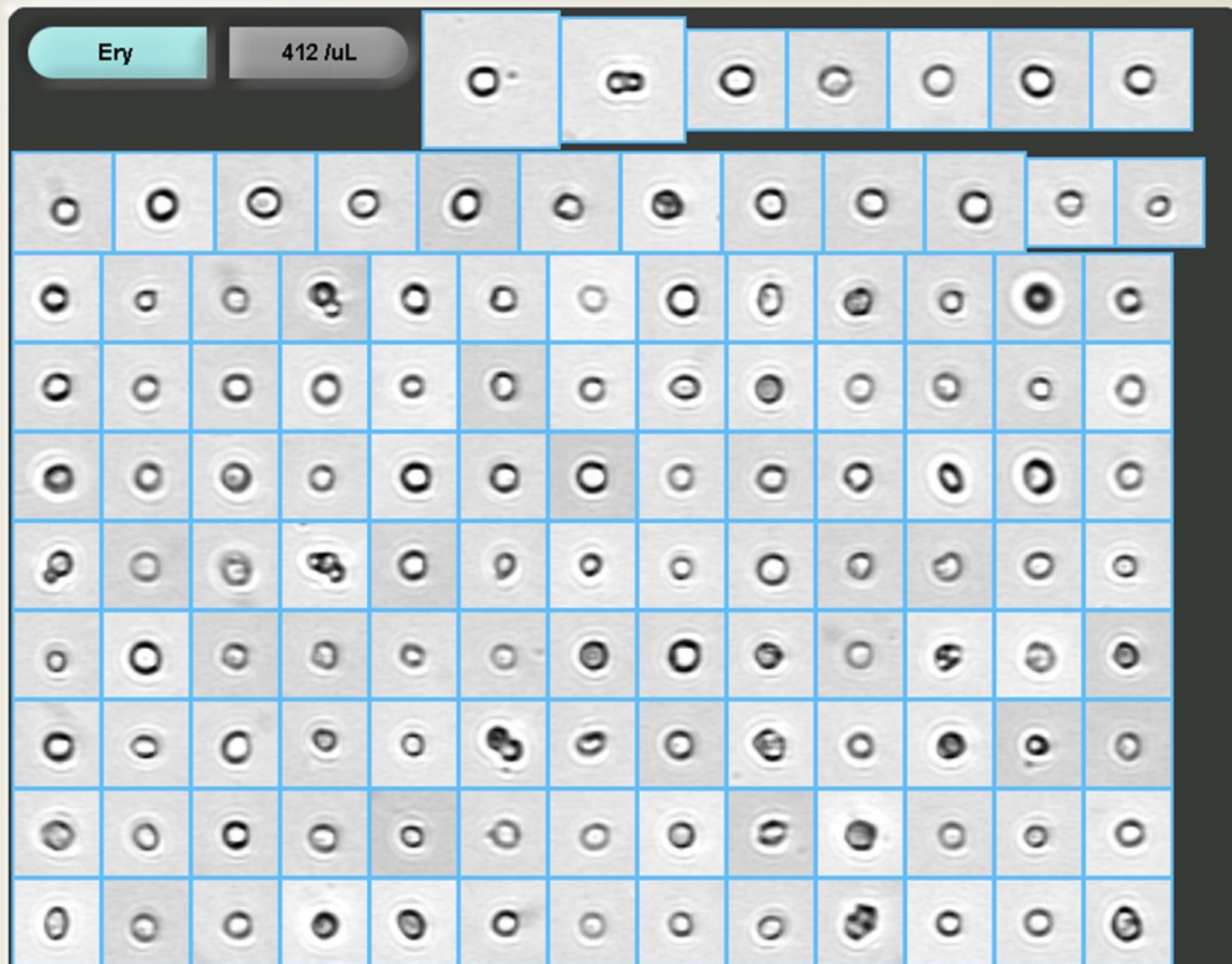
Specimens

Found List (226)

Instrument

Ery

412 /uL



Leu

Bakterie

Ery

Crystals...

Dl. epi.

Casts...

Shluky Leu

Others...

Kulate epi

Artefakty

Info...

&lt;&lt;Released&gt;&gt;

8404071477

2014-01-06 10:01:08

6/5(496717)

1:1

All Small Particles: 8226/uL

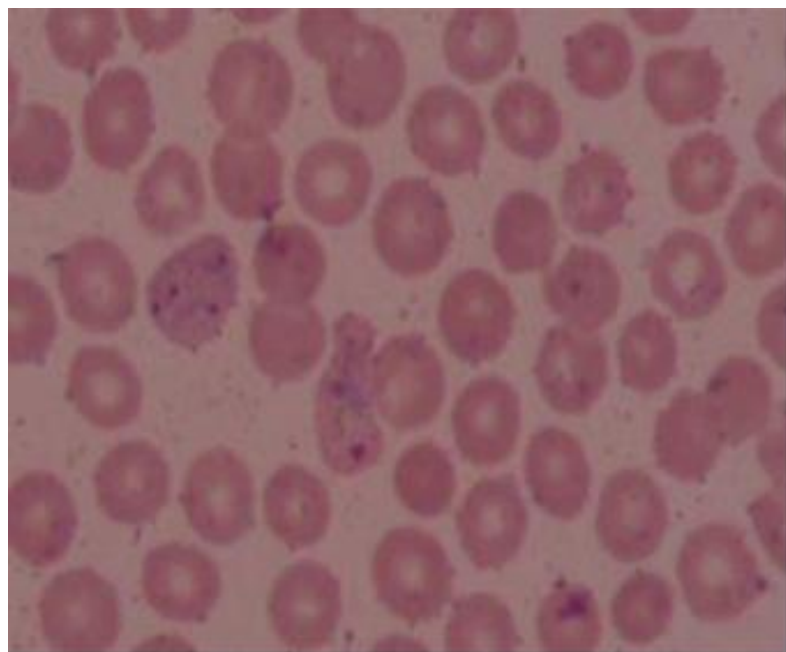
	GLU	Normal
H	PRO	+2
	BIL	-
	URO	Normal
	PH	6.0
H	Krev	+1
	KET	-
	NIT	Negative
H	LEU	+4
H	CLA	Turbid
	SPGR	1.016
	COL	Yellow

Cleared flags:

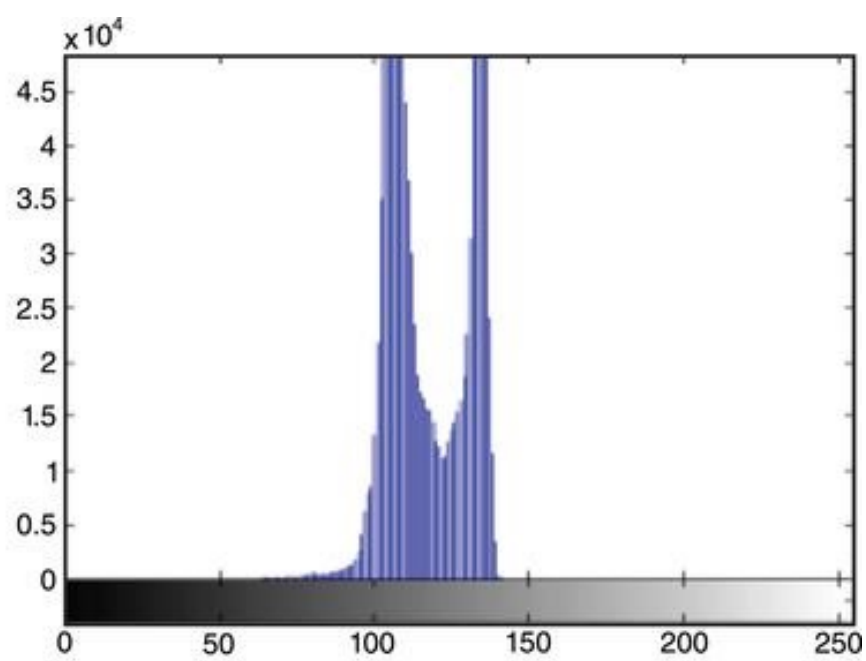
HIGH CONCENTRATION  
Possible Amorphous

Results

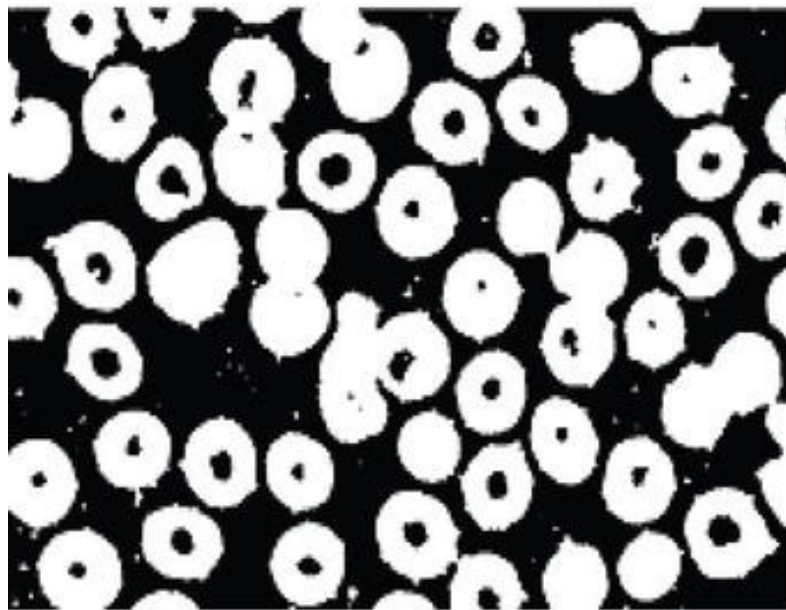
Print Screen



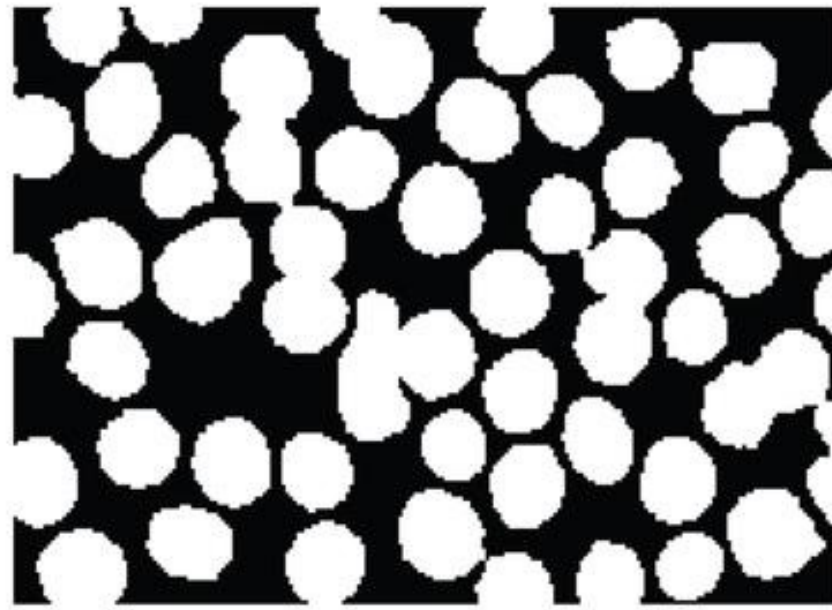
(a)



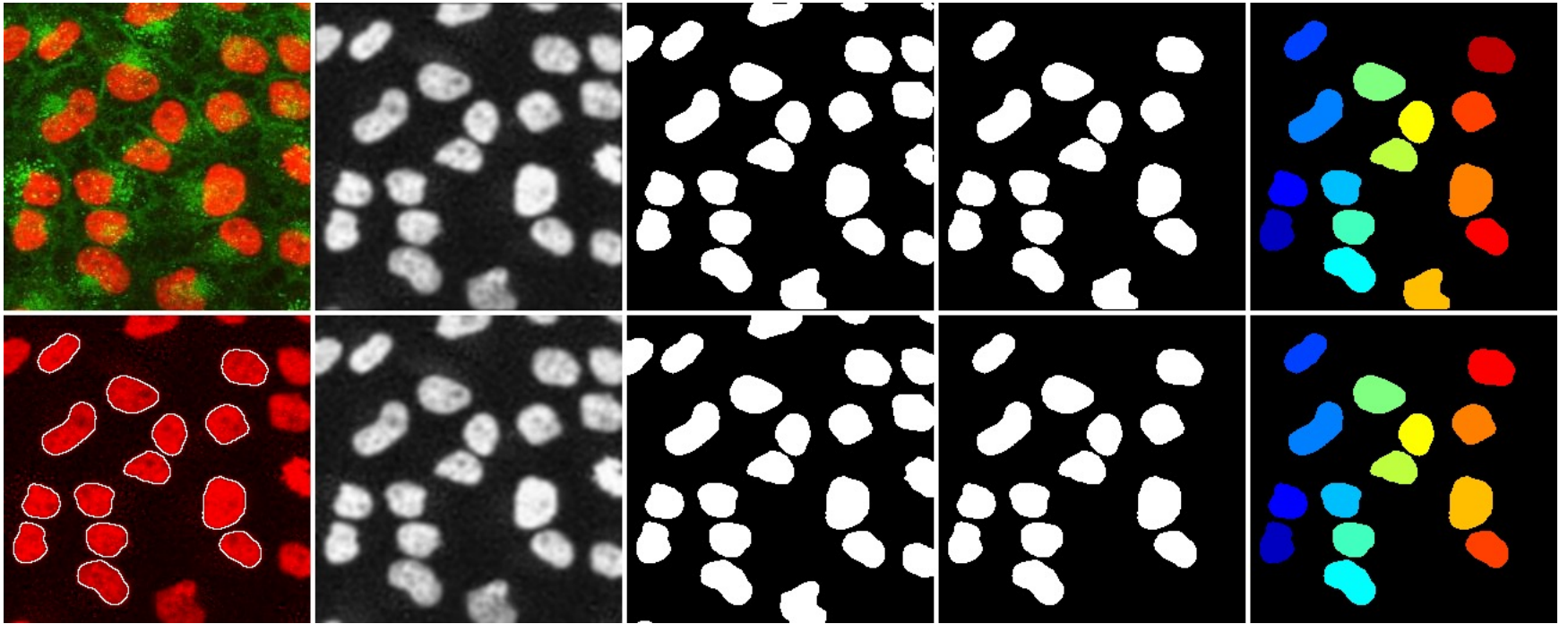
(b)

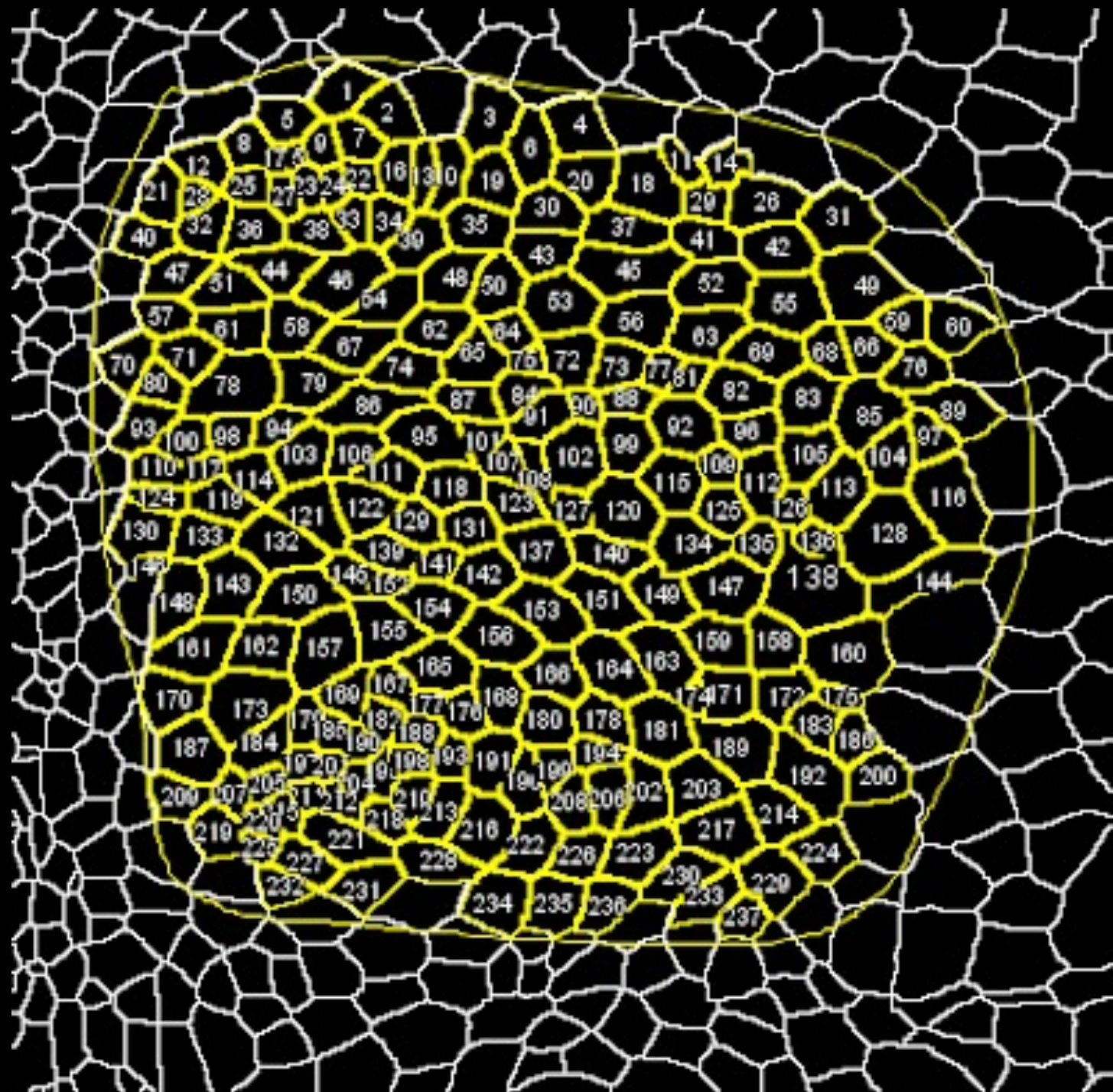


(c)



(d)



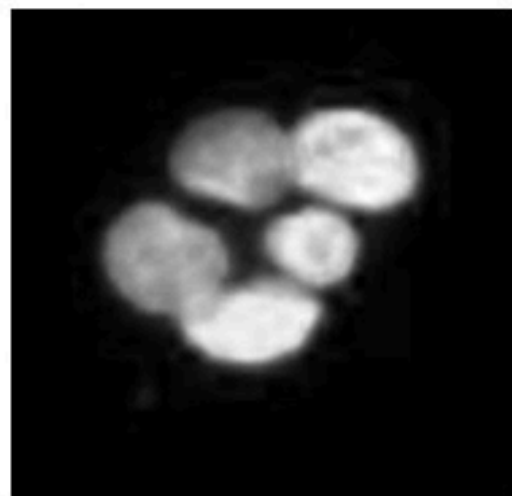
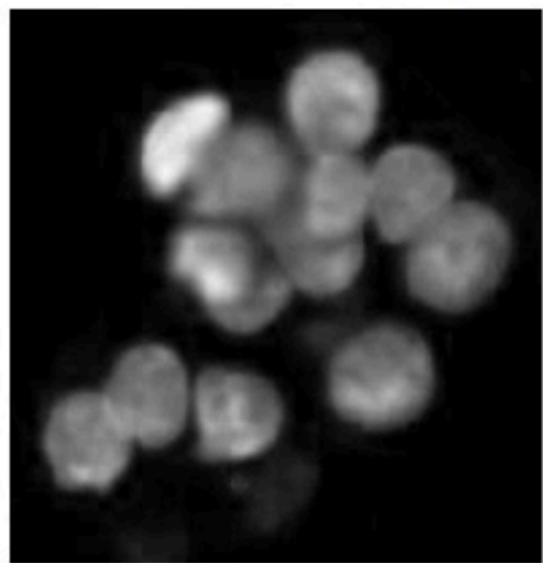


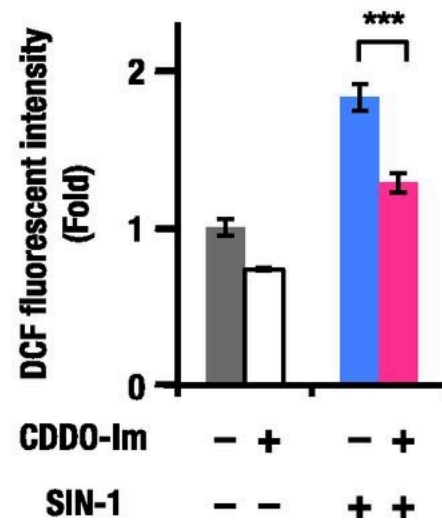
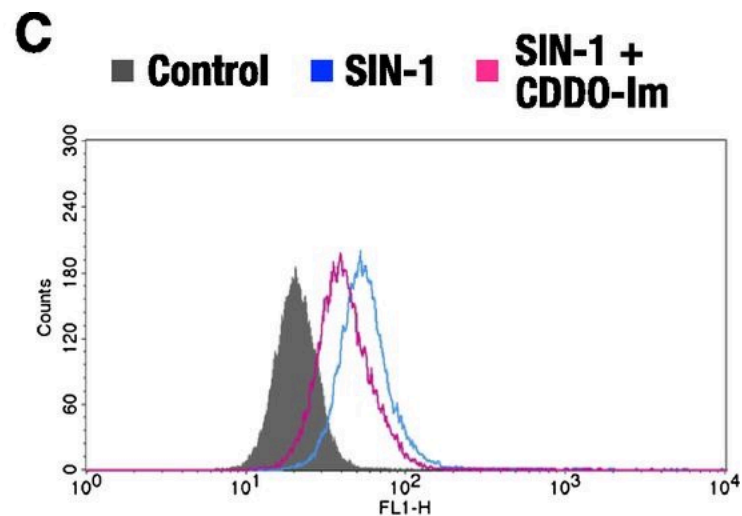
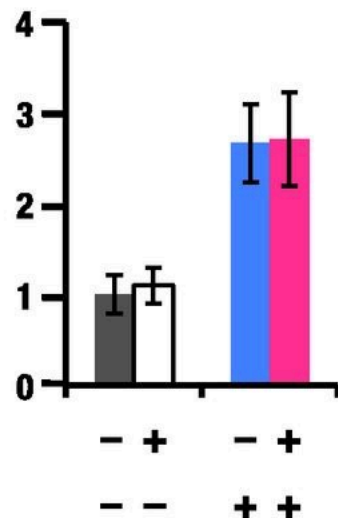
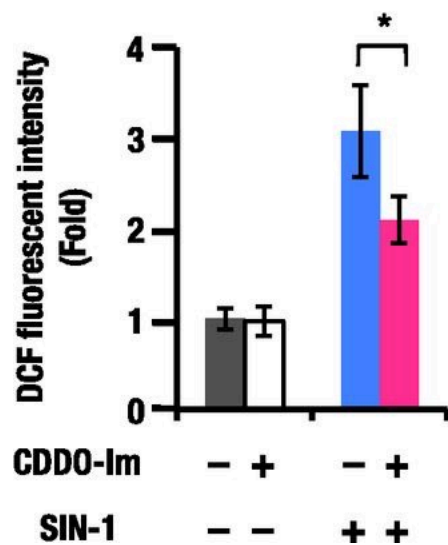
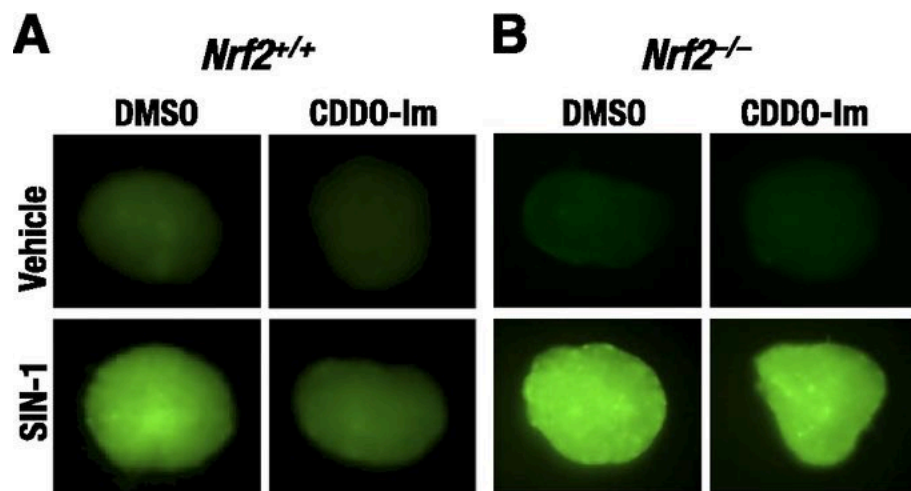


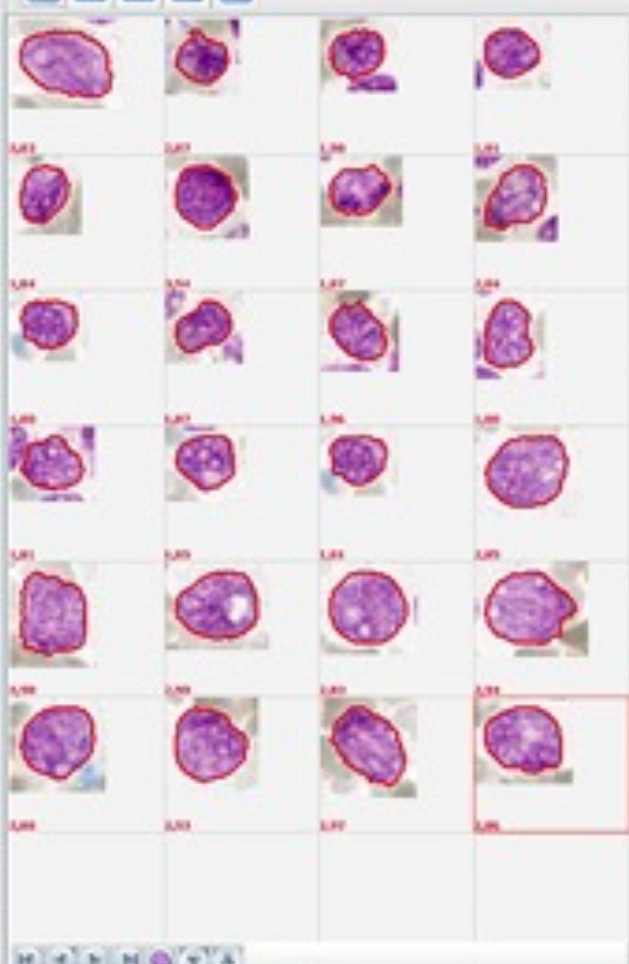
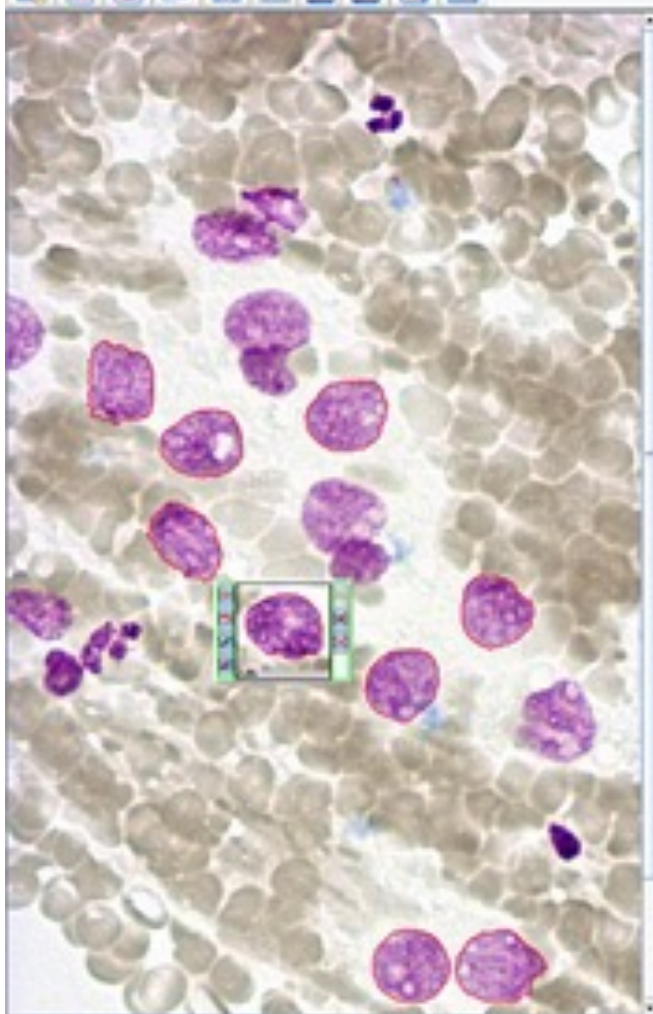
Input 2D Gray Image

Primitive Markers

Segmented Cell Nuclei







#	Color	Name	Min	Max	MinArea	MaxArea	Ch
1	Blue	Normal Epithelial	20	20	20	20	20
2	Green	Normal	20	20	20	20	20
3	Blue	Abnormal	20	20	20	20	20
4	Green	Lymphocyte	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
5	Red	Abnormal	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

