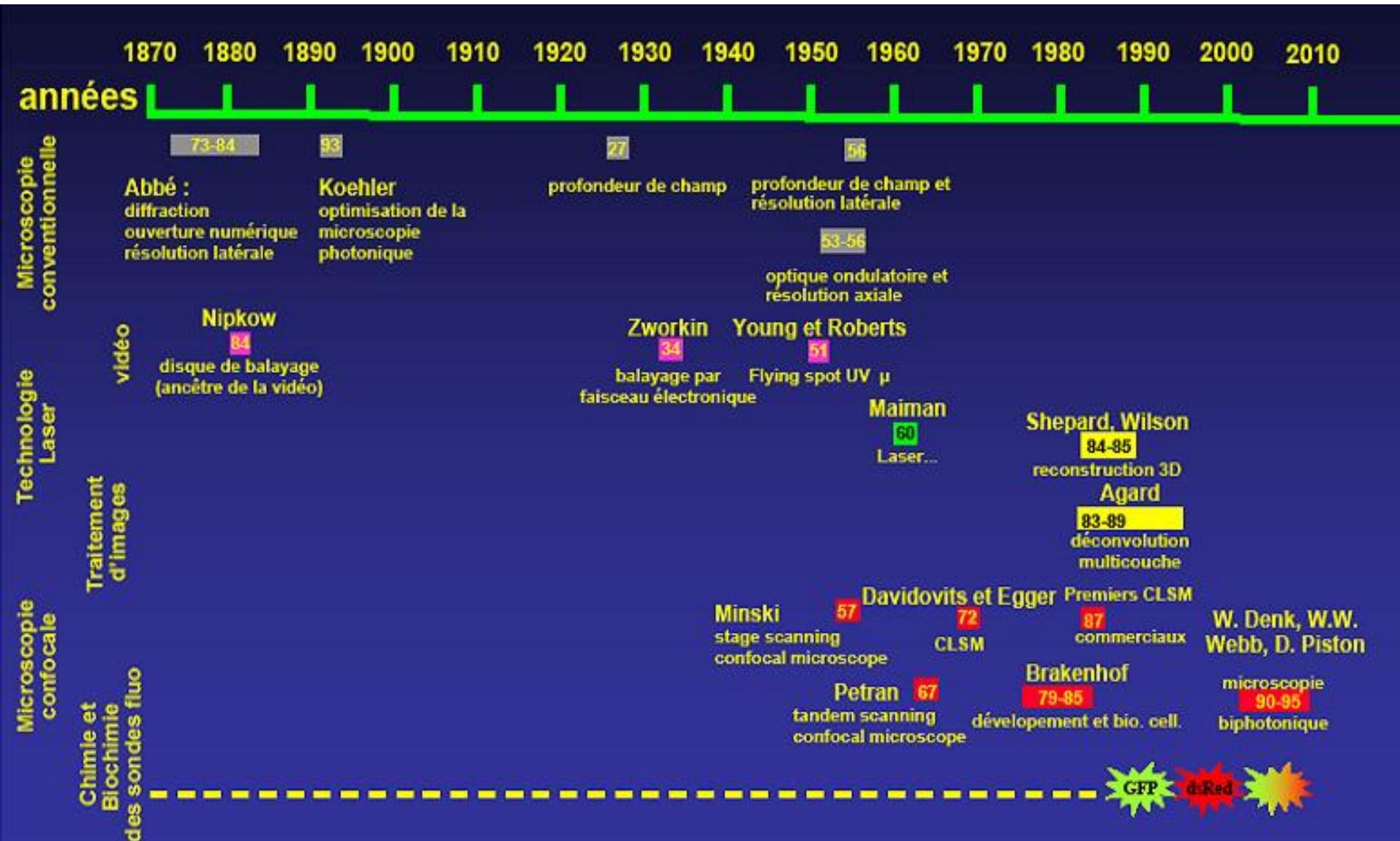


Microscopie Photonique

Principes et Applications

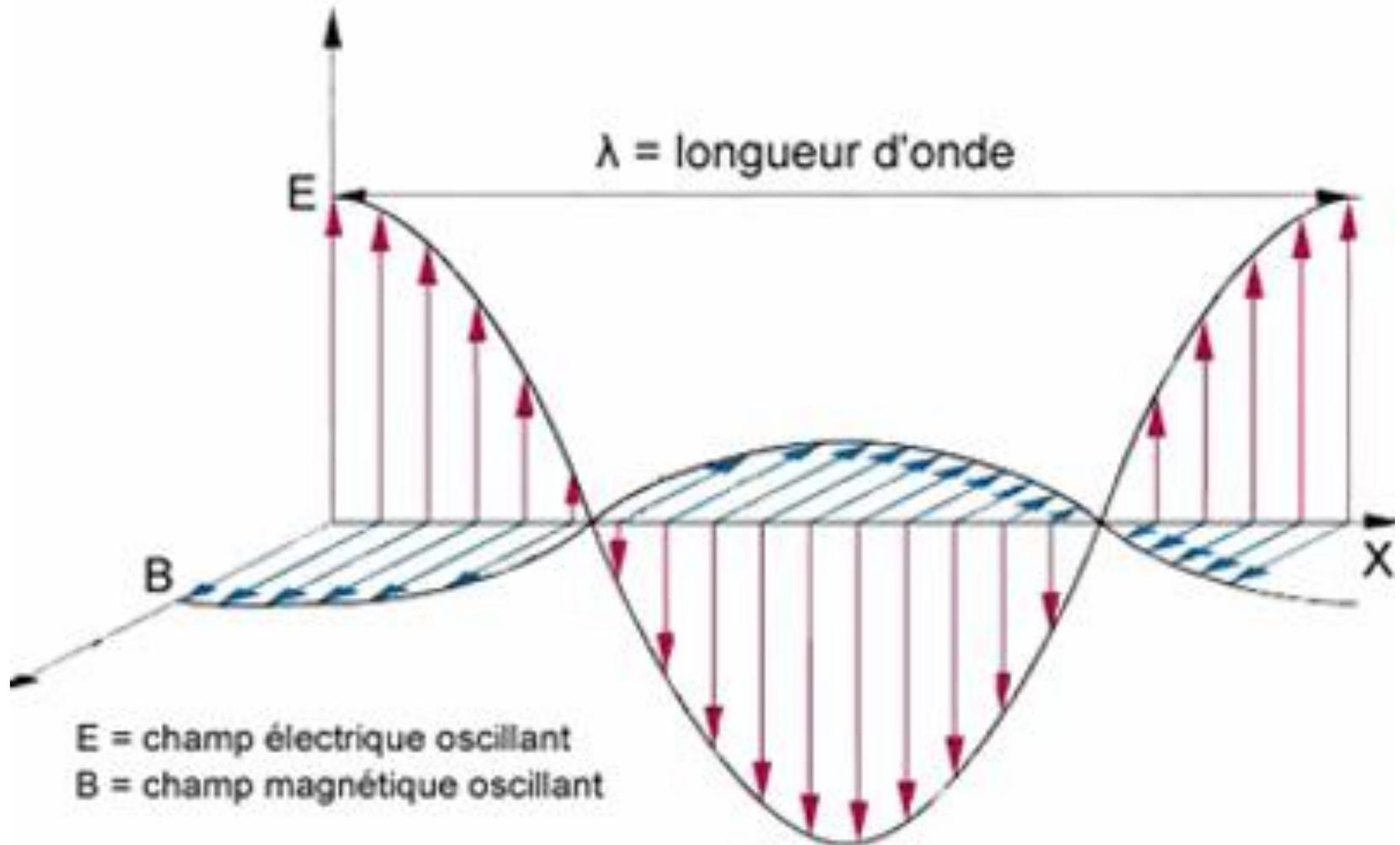
Evolution des techniques de microscopie



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).

Onde électromagnétique



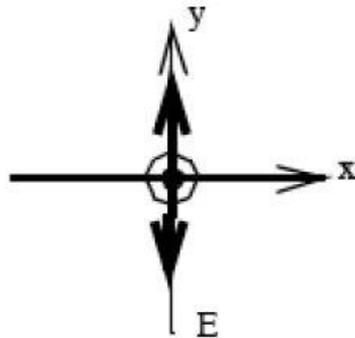
Le photon

- Le photon est une particule de vitesse c et d'énergie $E = h \nu$
 h est la constante de Planck
 $h = 6.626\ 0693 \cdot 10^{-34}$ J.s
 ν est la fréquence de l'onde associée

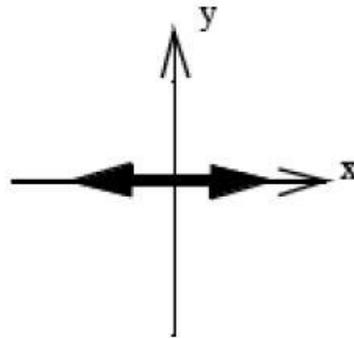
Propriétés d'une onde électromagnétique

- **Longueur d'onde (λ)** : la longueur d'onde (λ) 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).

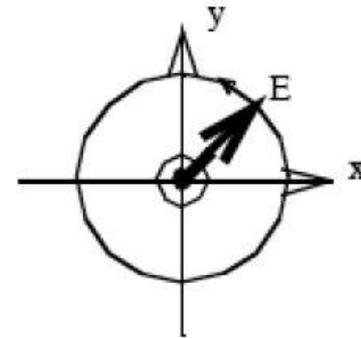
Polarisation de la lumière



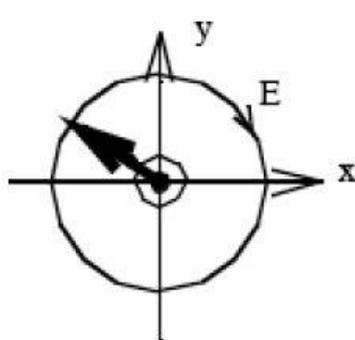
linear polarization
y-direction



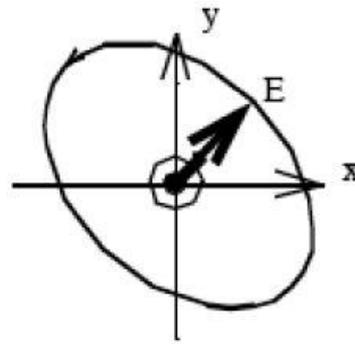
linear polarization
x-direction



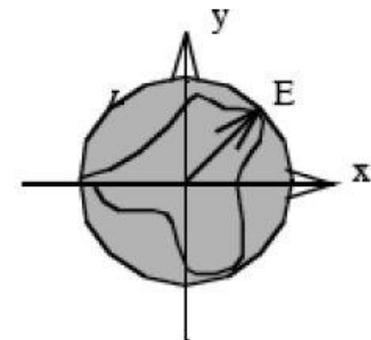
right circular
polarization



left circular
polarization



elliptical
polarization



unpolarized
(polarization-vector)
fluctuates randomly

Relations

- La longueur d'onde (λ) est la distance parcourue par l'onde lumineuse durant un temps (T) appelé période.
- On a les relations :

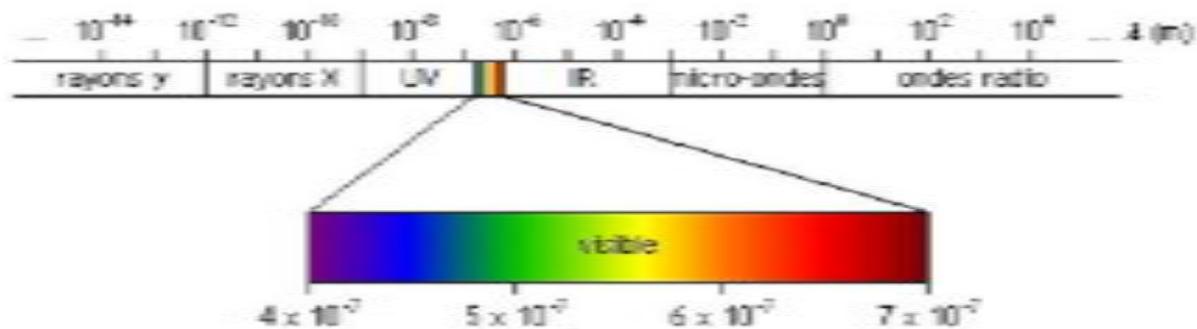
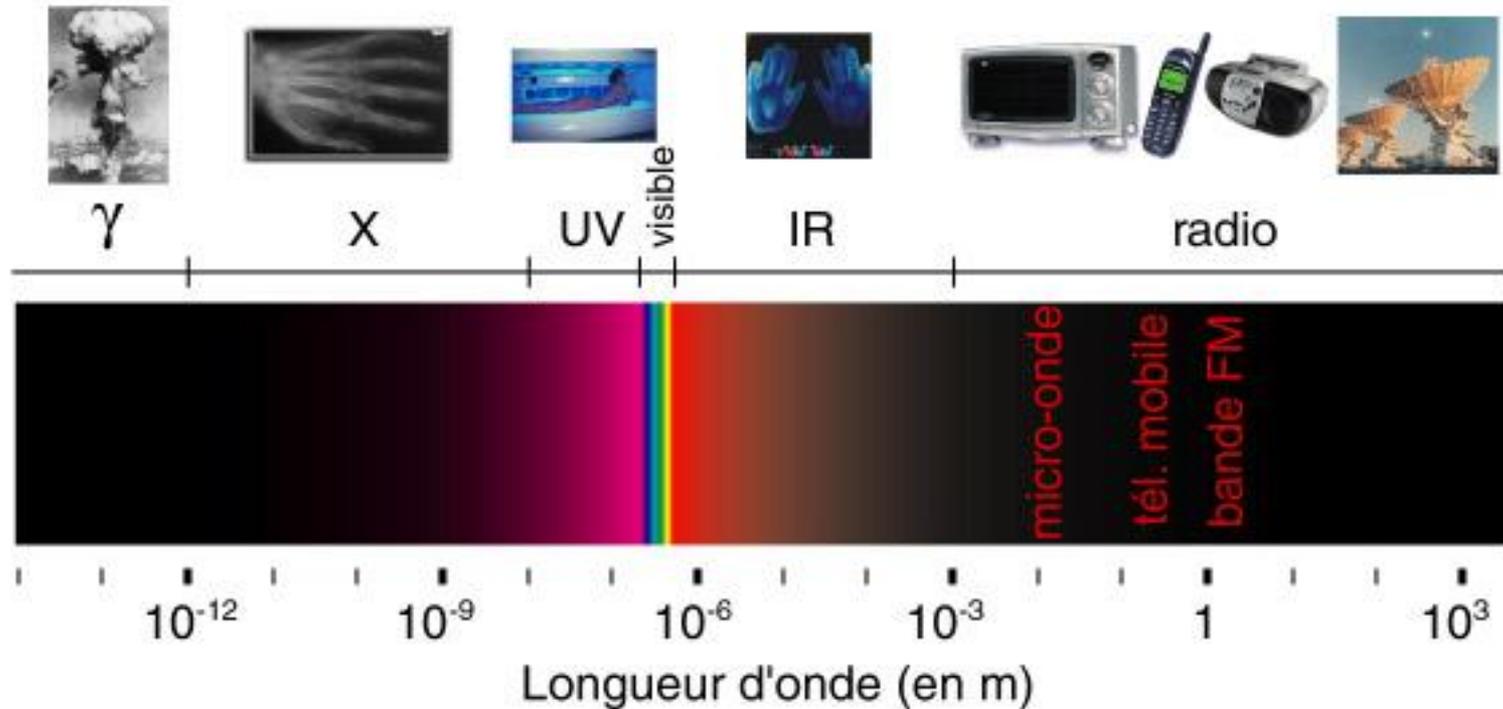
$$\lambda = \text{Vitesse} \times \text{Période}$$

$$\text{Période} = 1 / \text{Fréquence}$$

$$\lambda = \text{Vitesse} / \text{Fréquence}$$

- On utilise l'expression "lumière visible" pour désigner la partie du spectre électromagnétique comprise entre 400 nm et 760 nm.

Spectre électromagnétique



Interaction d'une onde lumineuse avec la matière

- 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).

Indice de réfraction

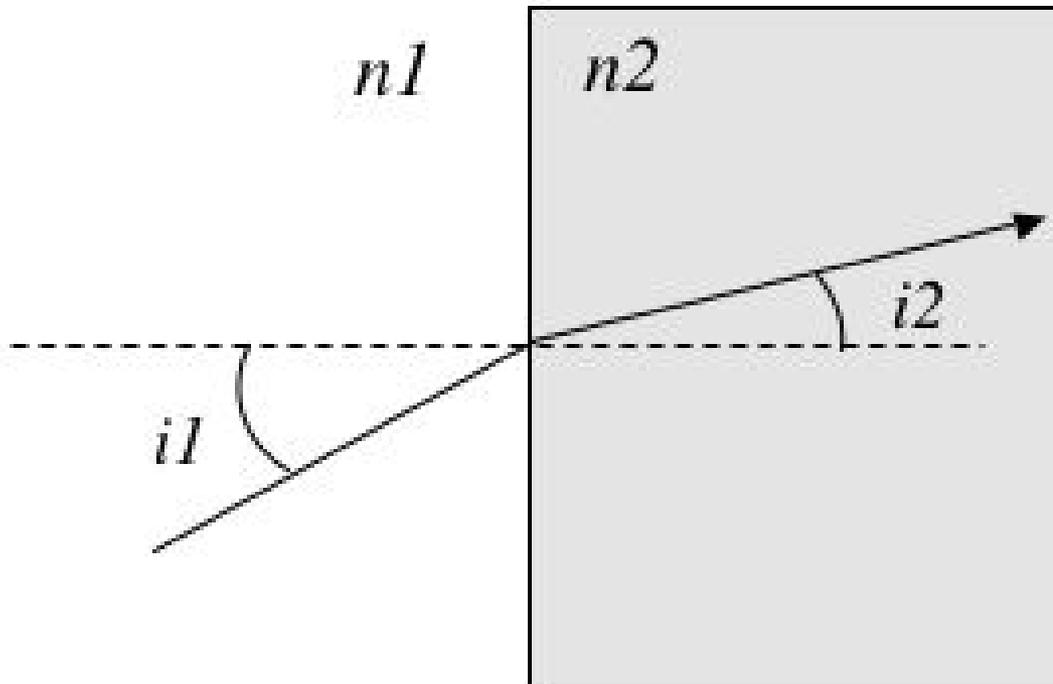
- Quand la lumière traverse des corps transparents, sa vitesse est plus ou moins freinée suivant la nature du milieu traversé, le rapport des vitesses dans le vide (300 000 km/s) et dans le corps traversé donne l'indice de réfraction du milieu (n).
 - Exemple : dans l'eau, la vitesse de la lumière est 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 |

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.

La réfraction

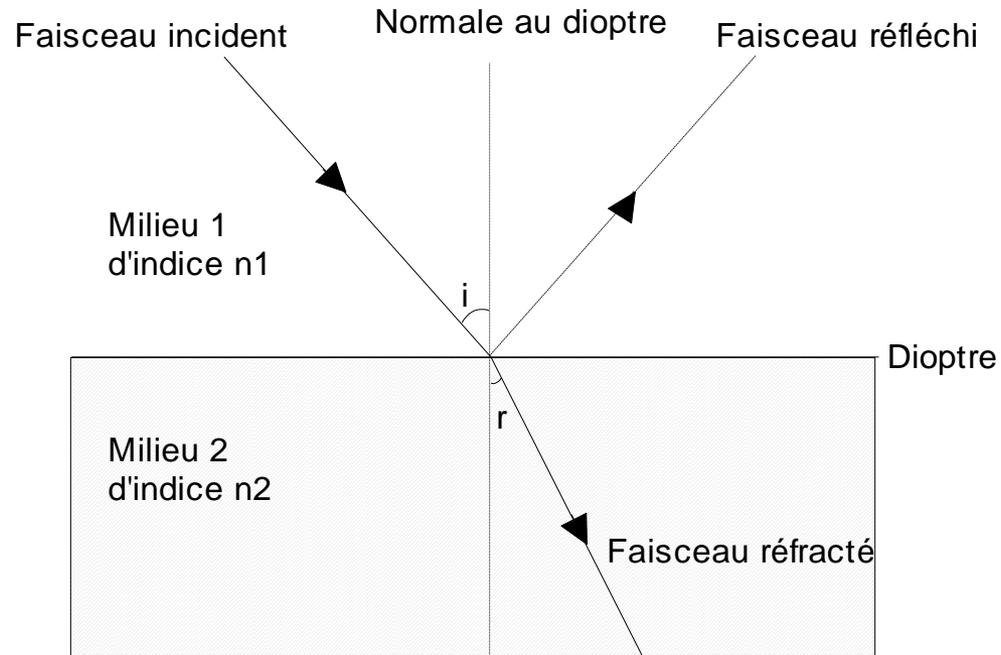
La réfraction apparaît lors du passage de la lumière d'un milieu d'indice $n1$ dans un milieu d'indice $n2$. Le trajet de la lumière est alors dévié d'un angle qui dépend de l'angle d'incidence et du rapport des indices de réfraction des deux milieux, suivant la formule : $n1 \sin(i1) = n2 \sin(i2)$



La réfraction

- 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.

Lois de la réfraction



Lois de la réfraction:

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

$$n1.\sin(i) = n2.\sin(r)$$

Virtual Image Observed by Refraction

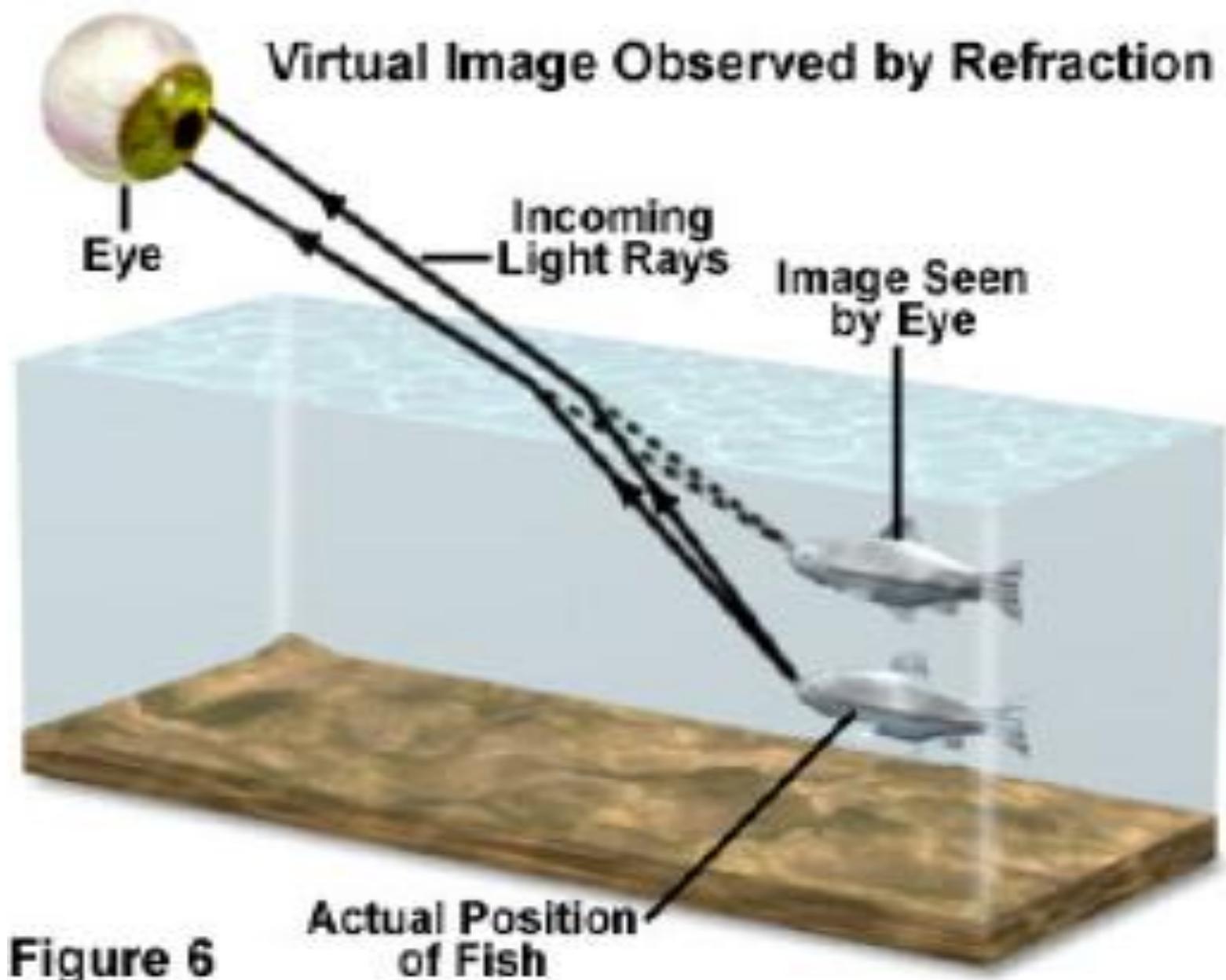
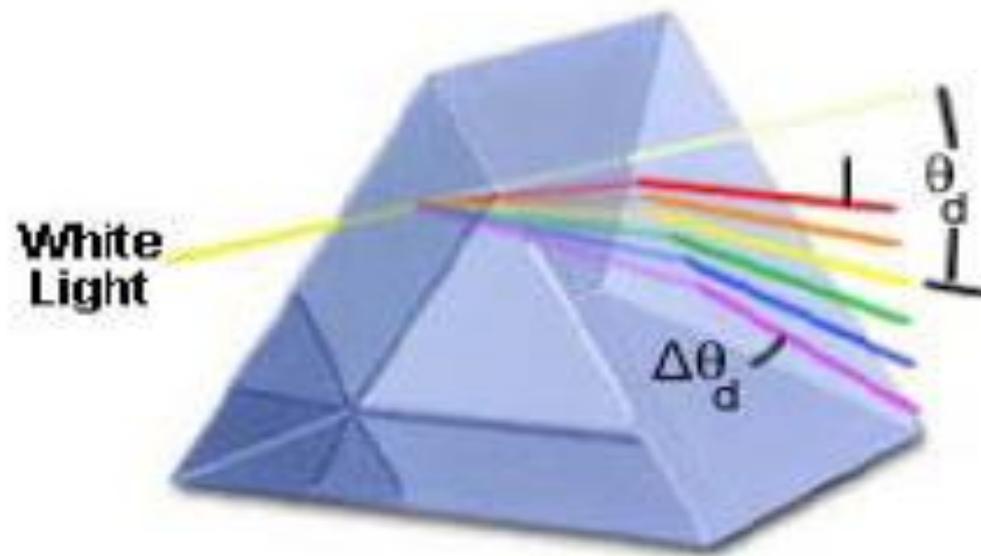


Figure 6

Dispersion de la lumière blanche par un prisme



$$\theta_d = 23.41^\circ$$

$$\Delta\theta_d = 23.83^\circ$$

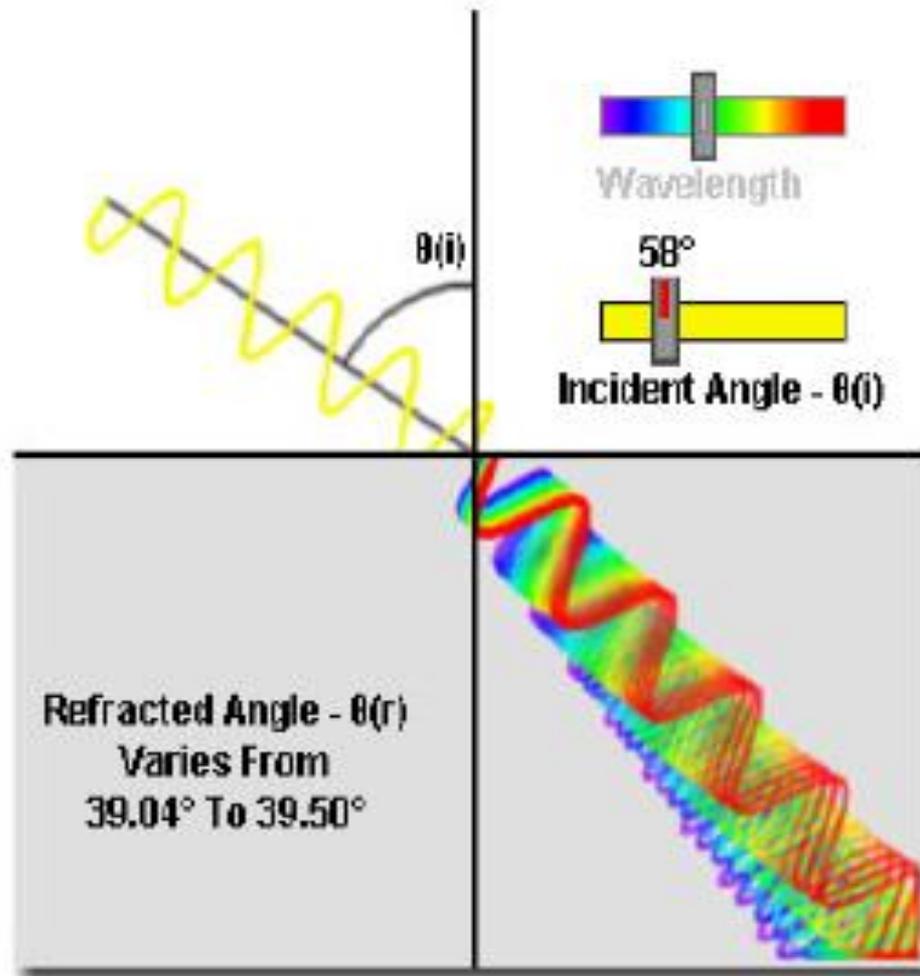
1.52



47°



Réfraction et dispersion



- White Light
- Monochromatic

Choose A Material (RI)

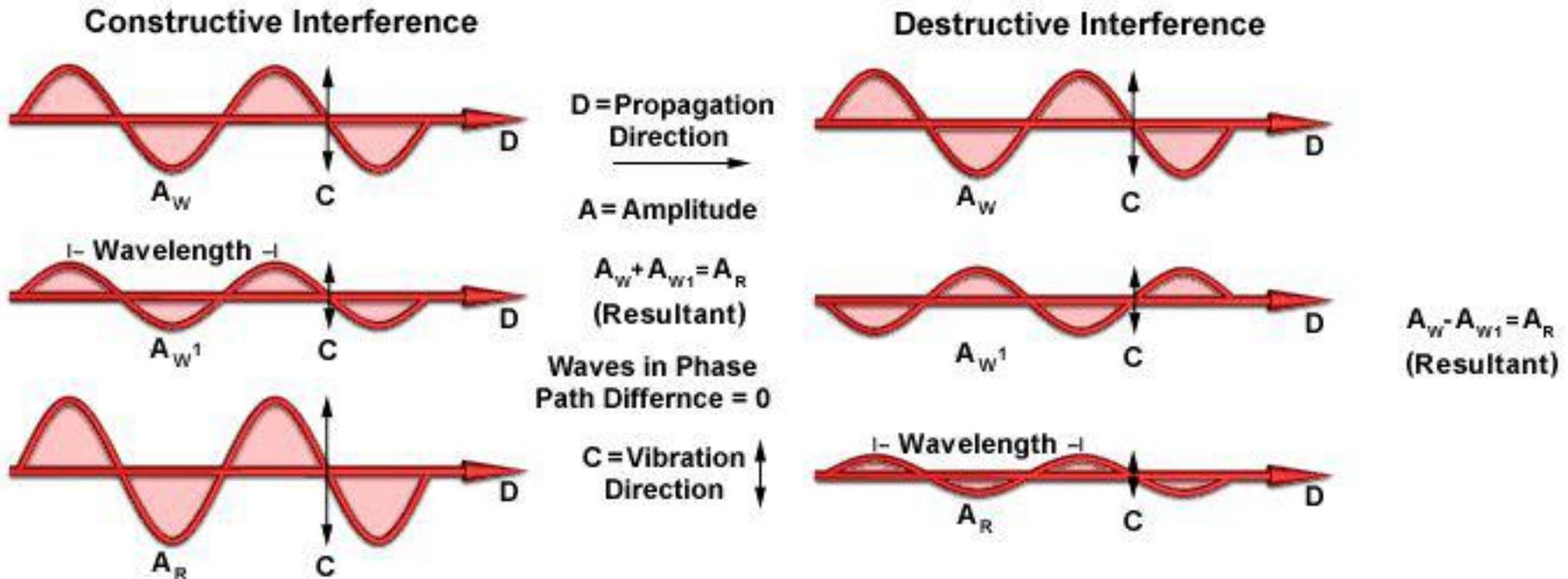
Water - 1.3330

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**.



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 (Δx); λ étant la longueur d'onde de l'onde incidente on a :

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

La diffraction

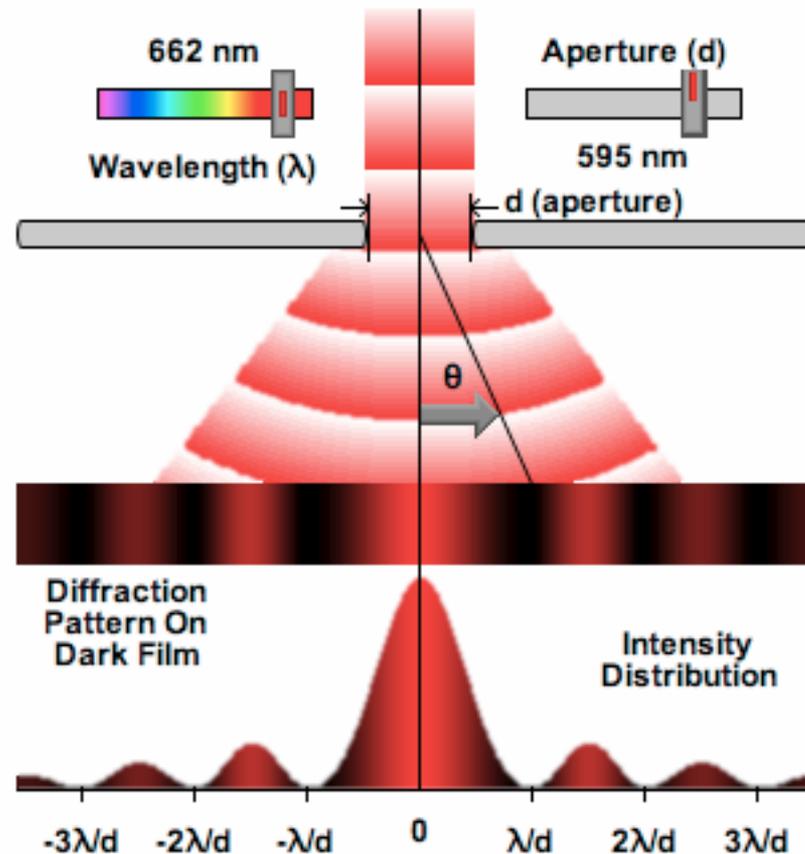
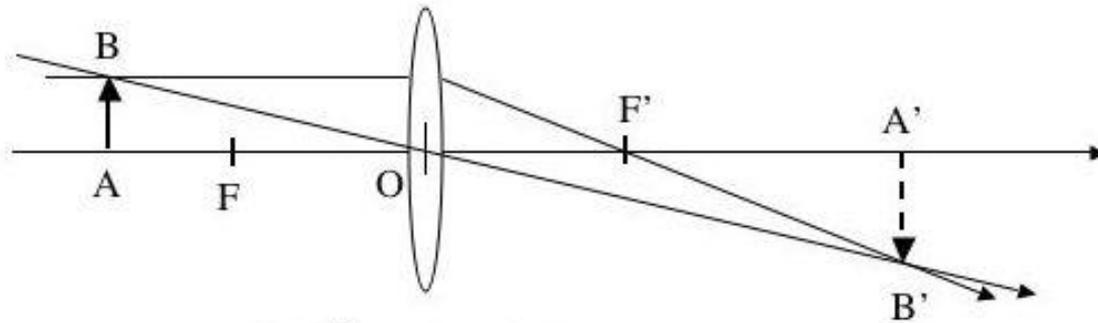


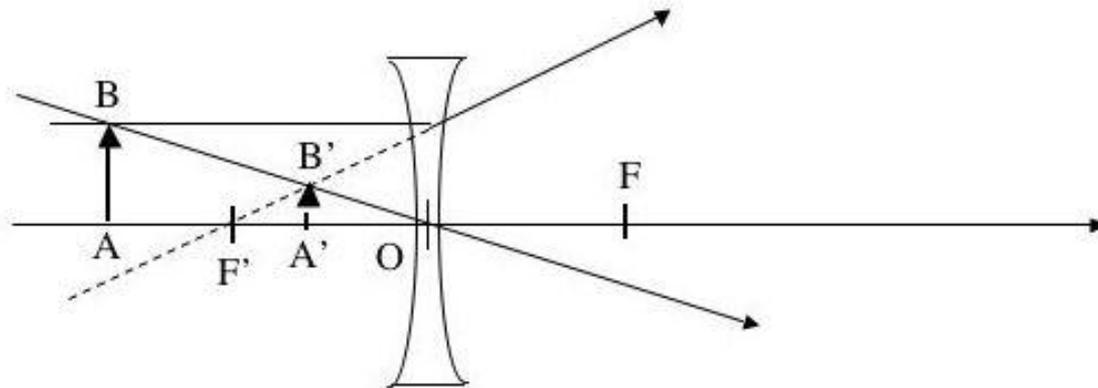
Figure de diffraction de la lumière passant par une fente fine. On obtient sur un écran une alternance de bandes claires et noires, centrées sur une bande claire correspondant à la projection de la fente elle-même.

Les lentilles

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



Lentille convergente



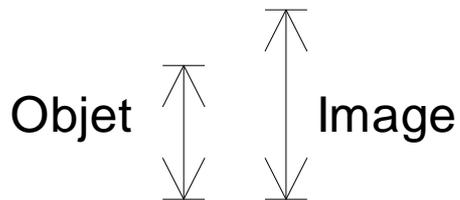
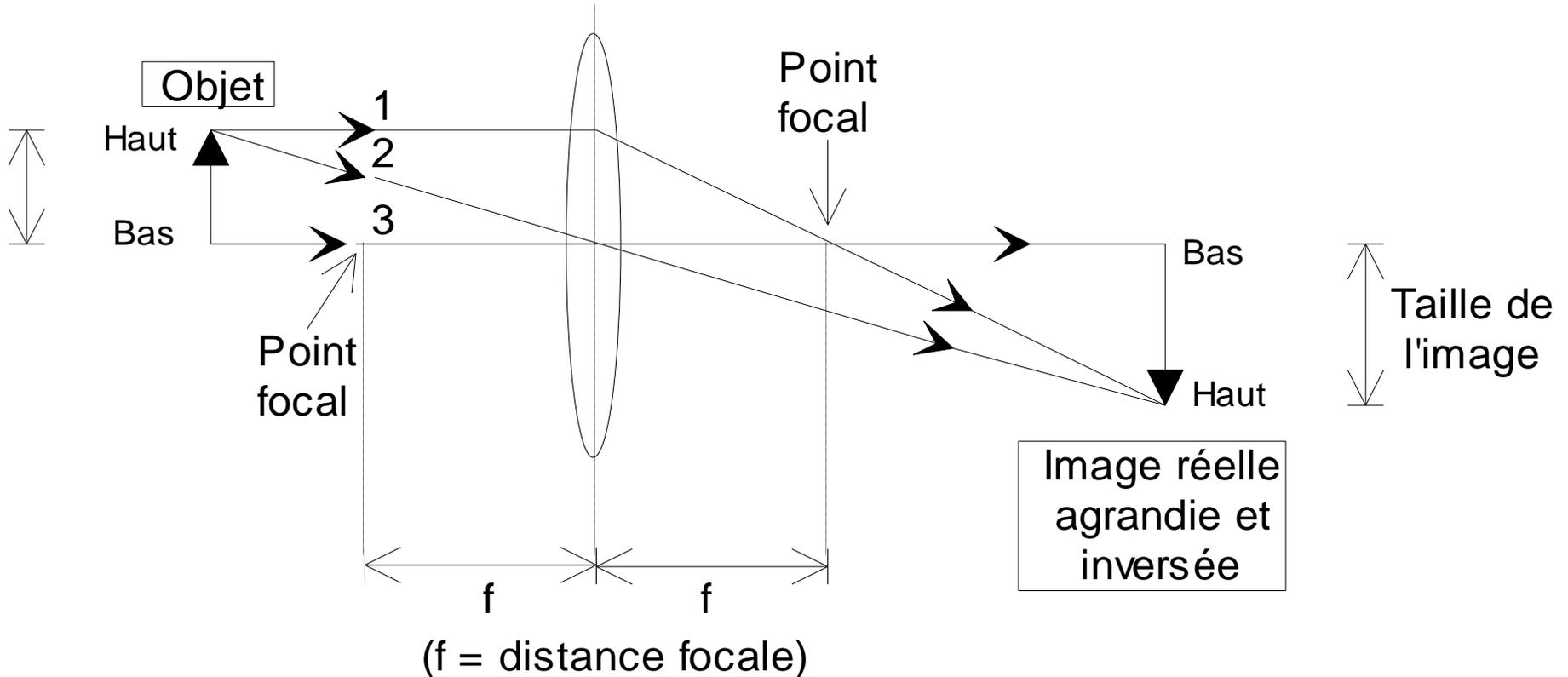
Lentille divergente

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 ($f =$ 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

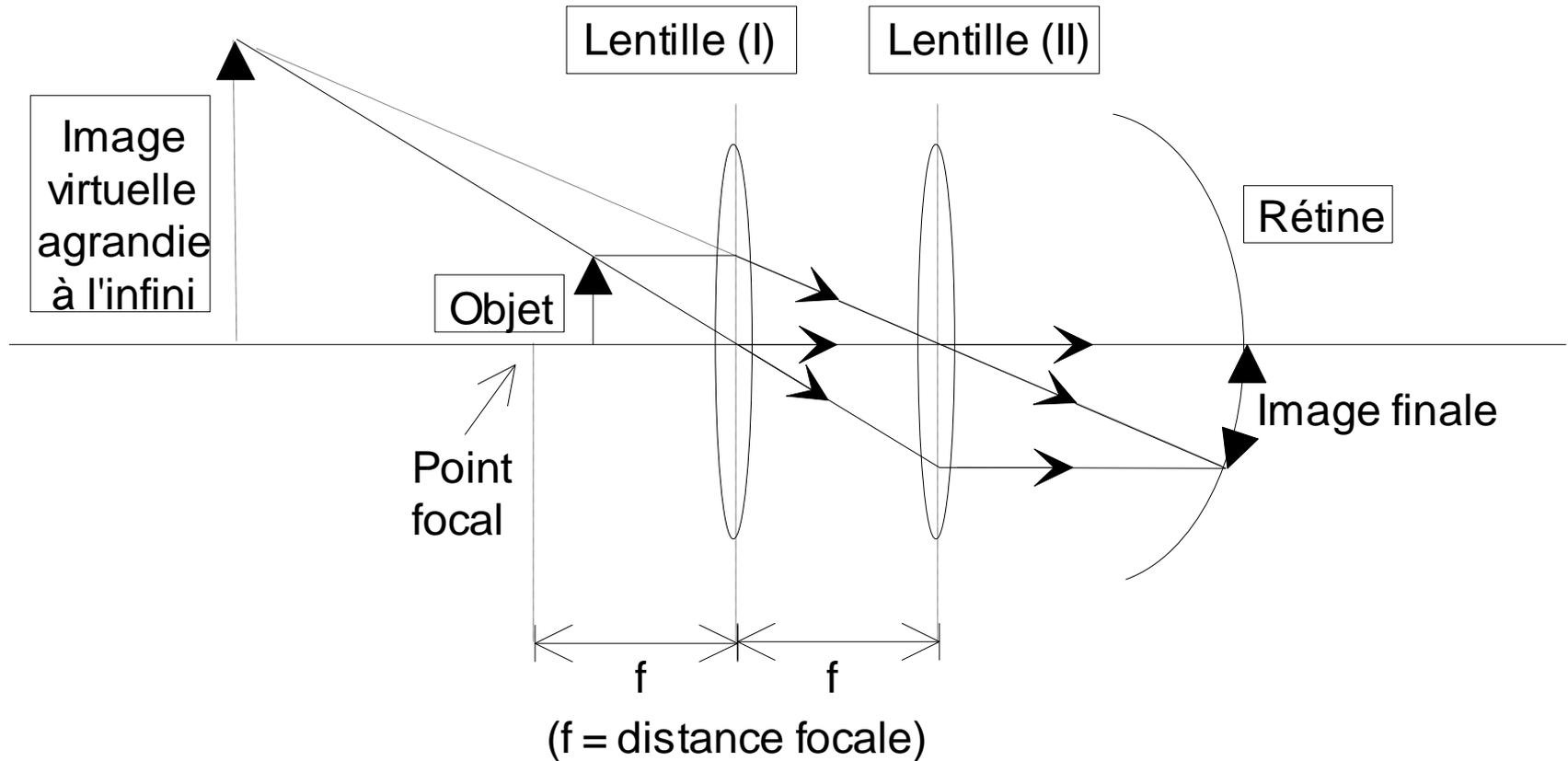
Lentille convergente



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



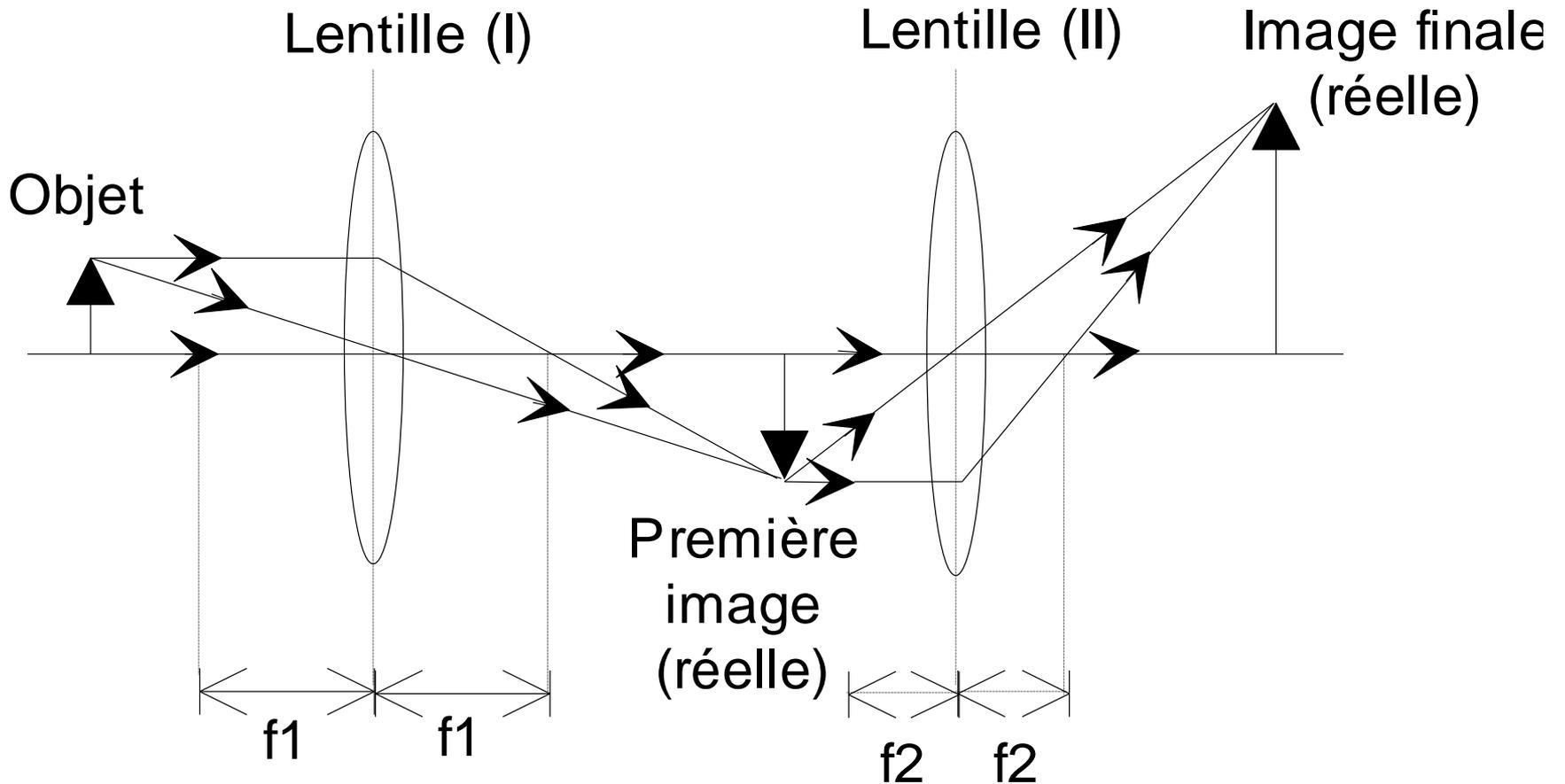
L'utilisation de deux lentilles permet d'augmenter le grossissement

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

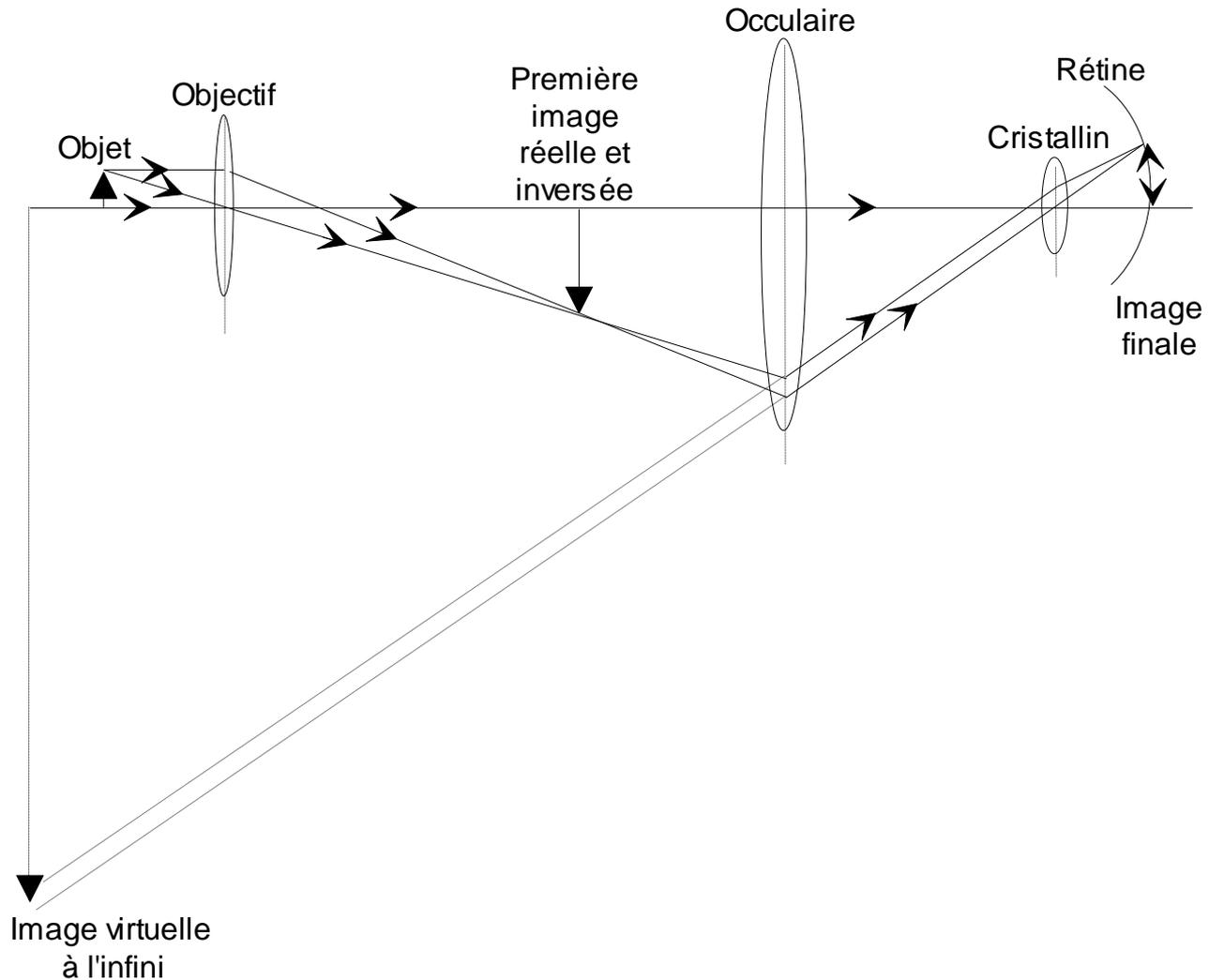
Grossissement par deux lentilles convergentes combinées



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



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 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 longueur d'onde.

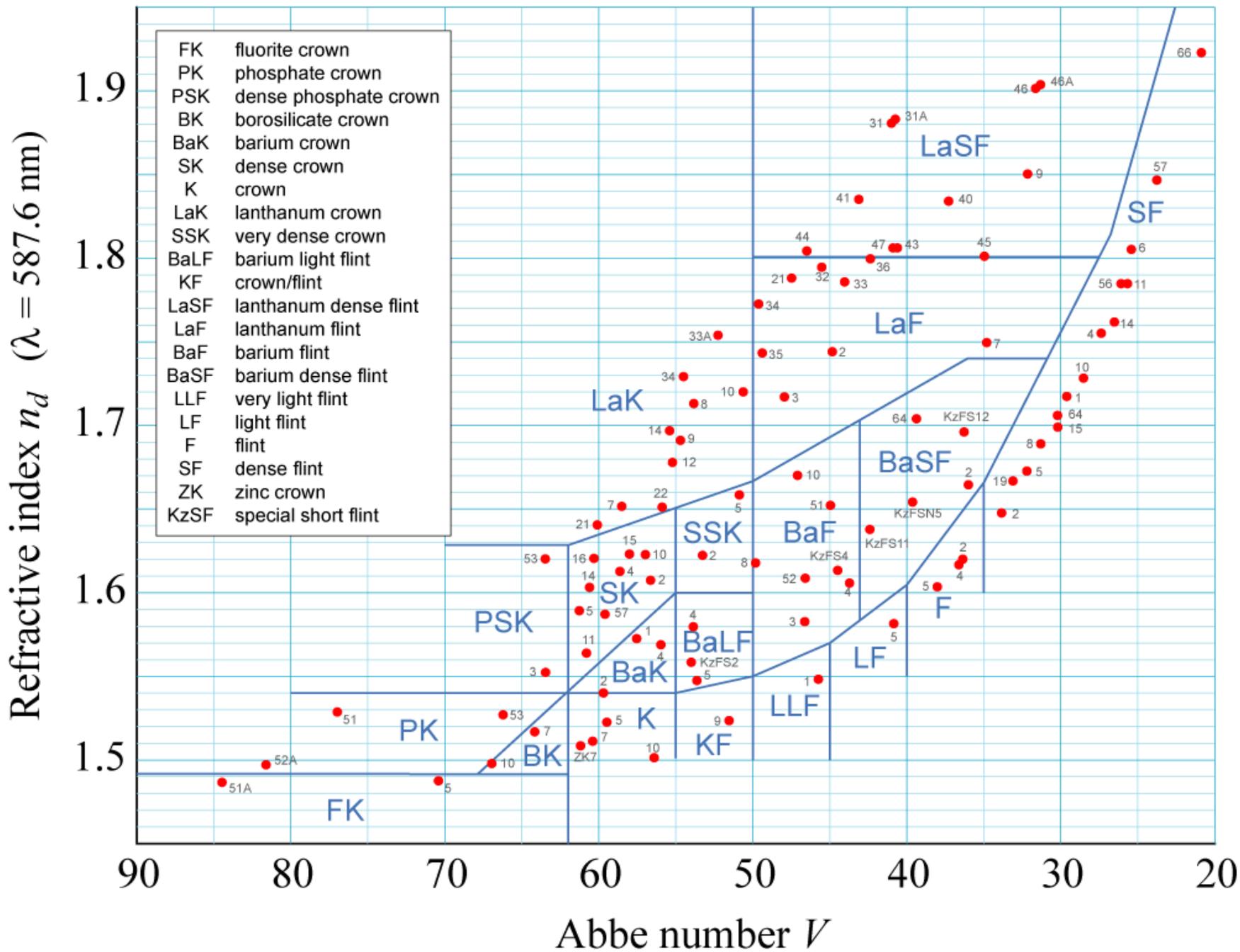
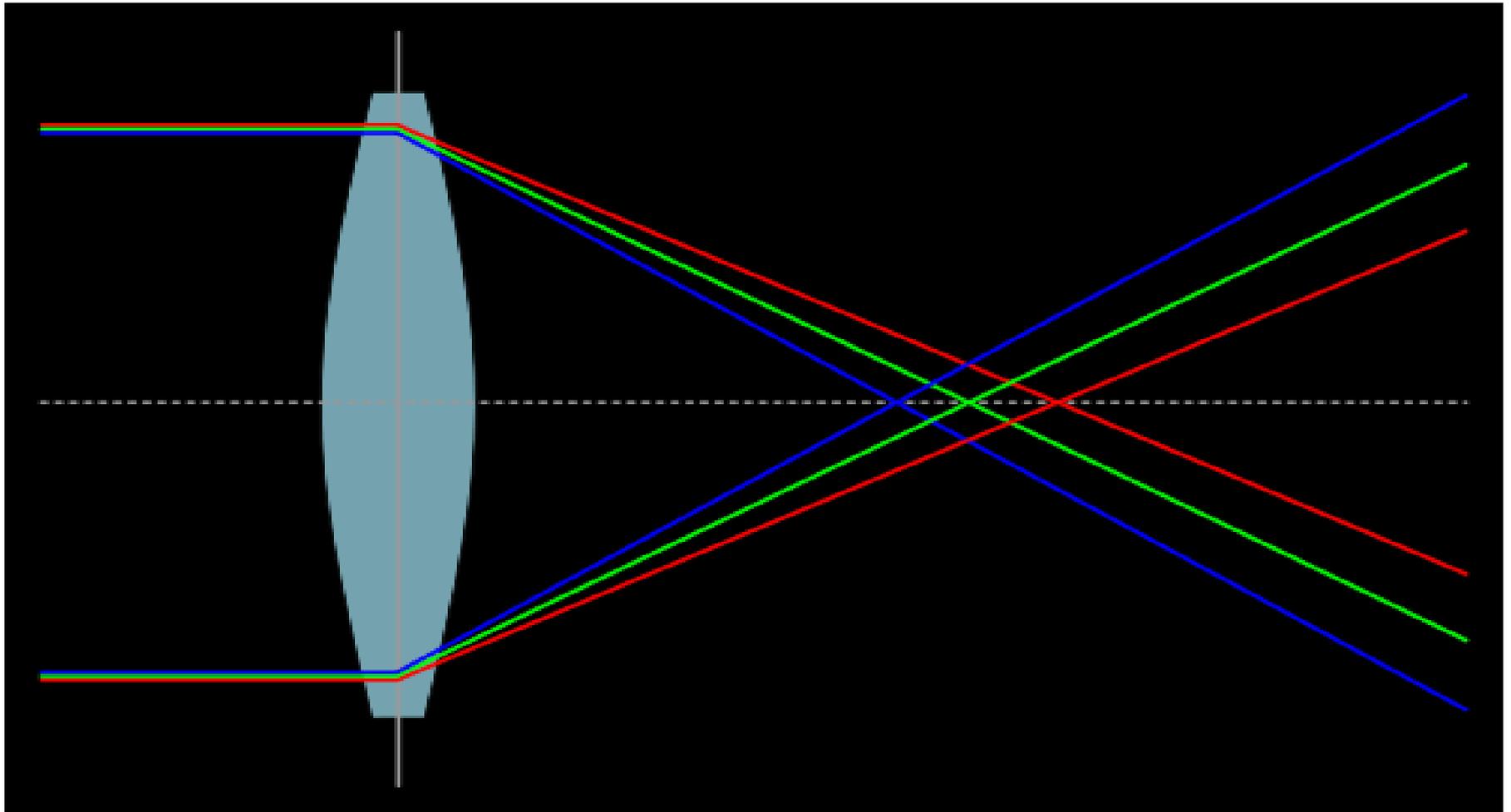


Diagramme d'Abbe

- 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).

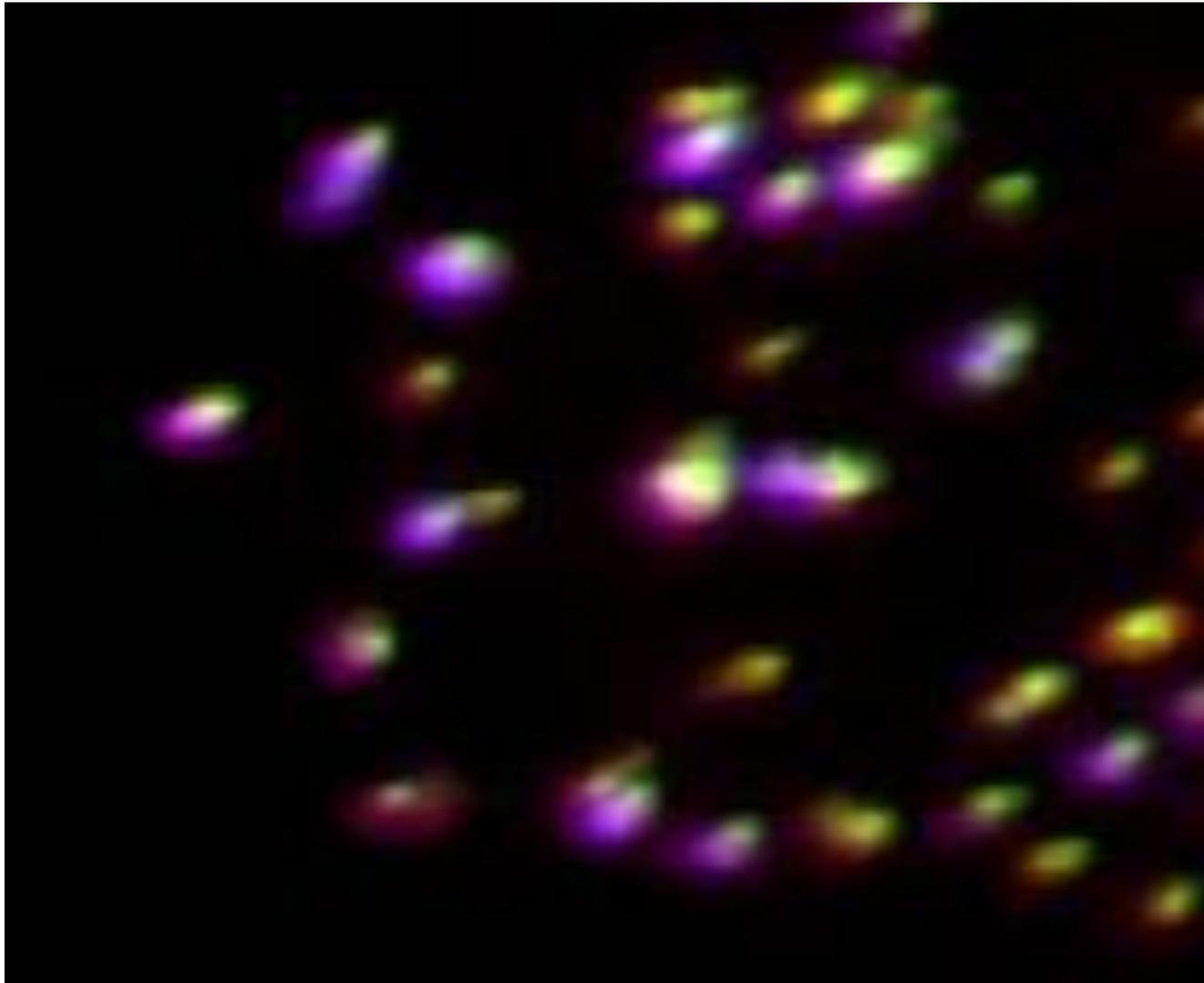
Aberration chromatique



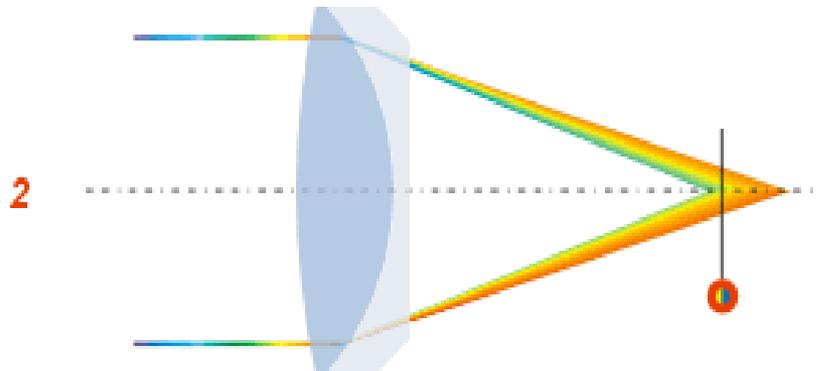
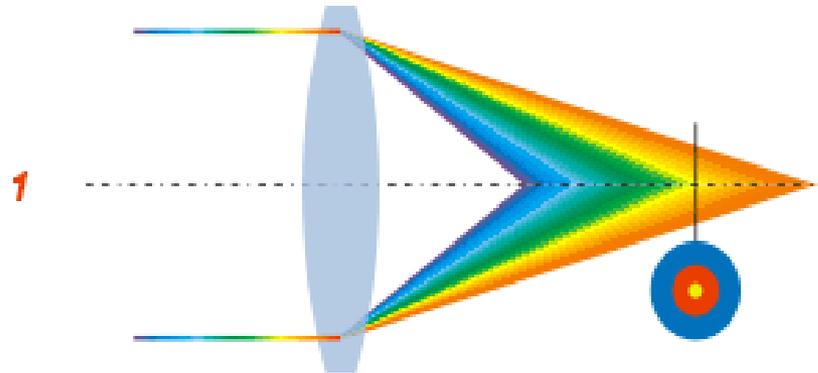
Abberation chromatique

- 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.

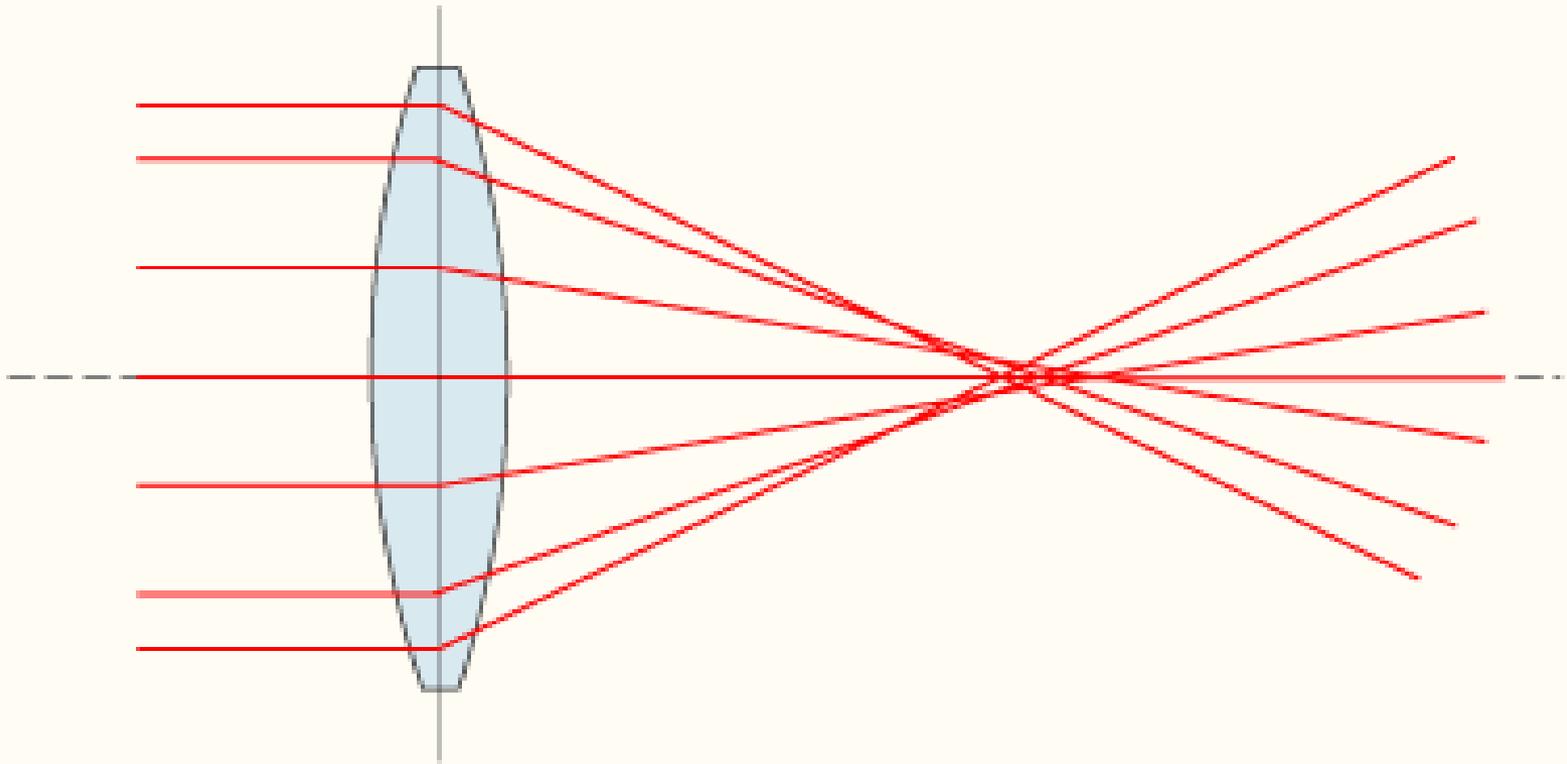
Aberration chromatique



Correction de l'aberration chromatique par 2 lentilles



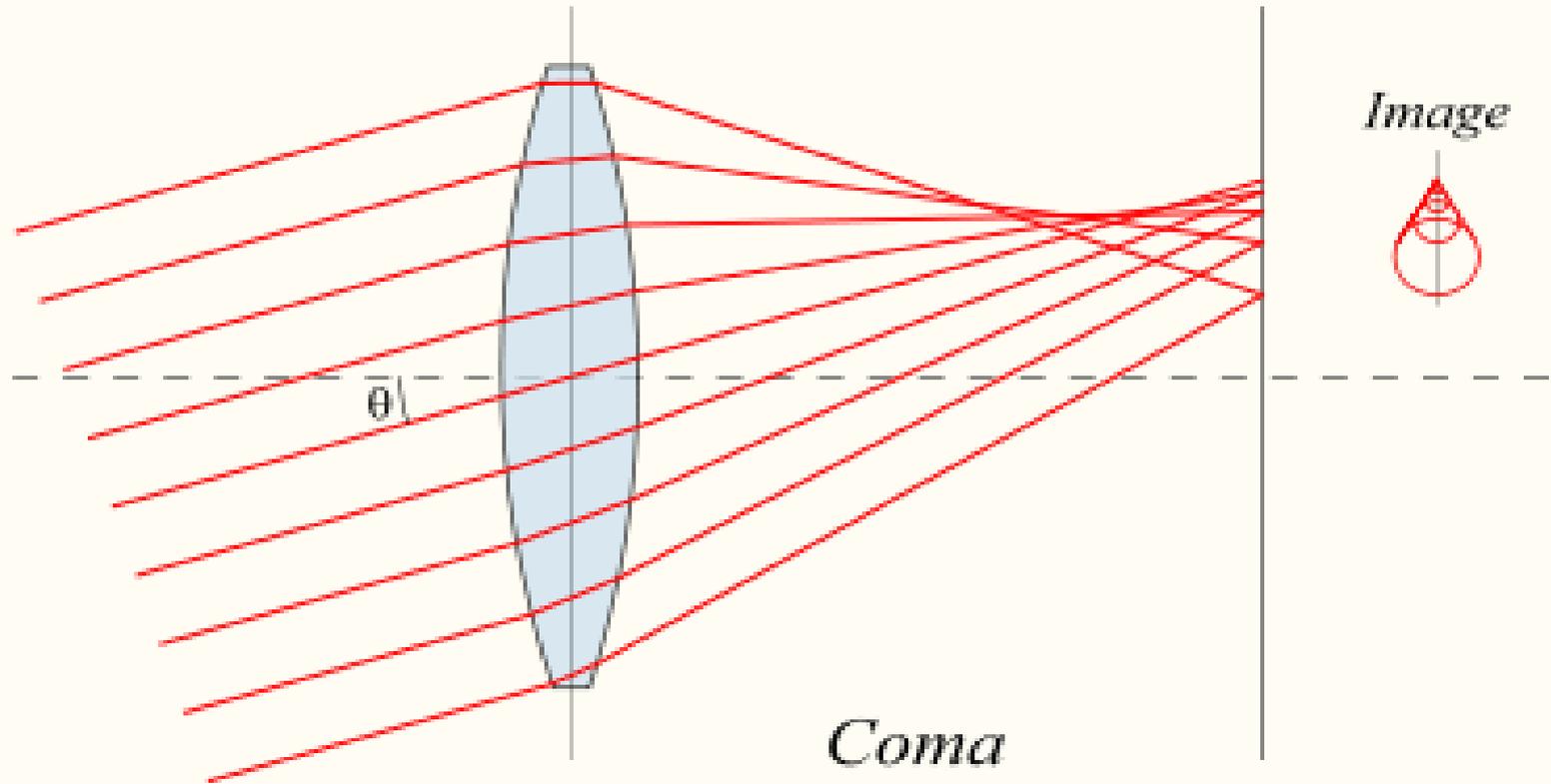
Aberration sphérique



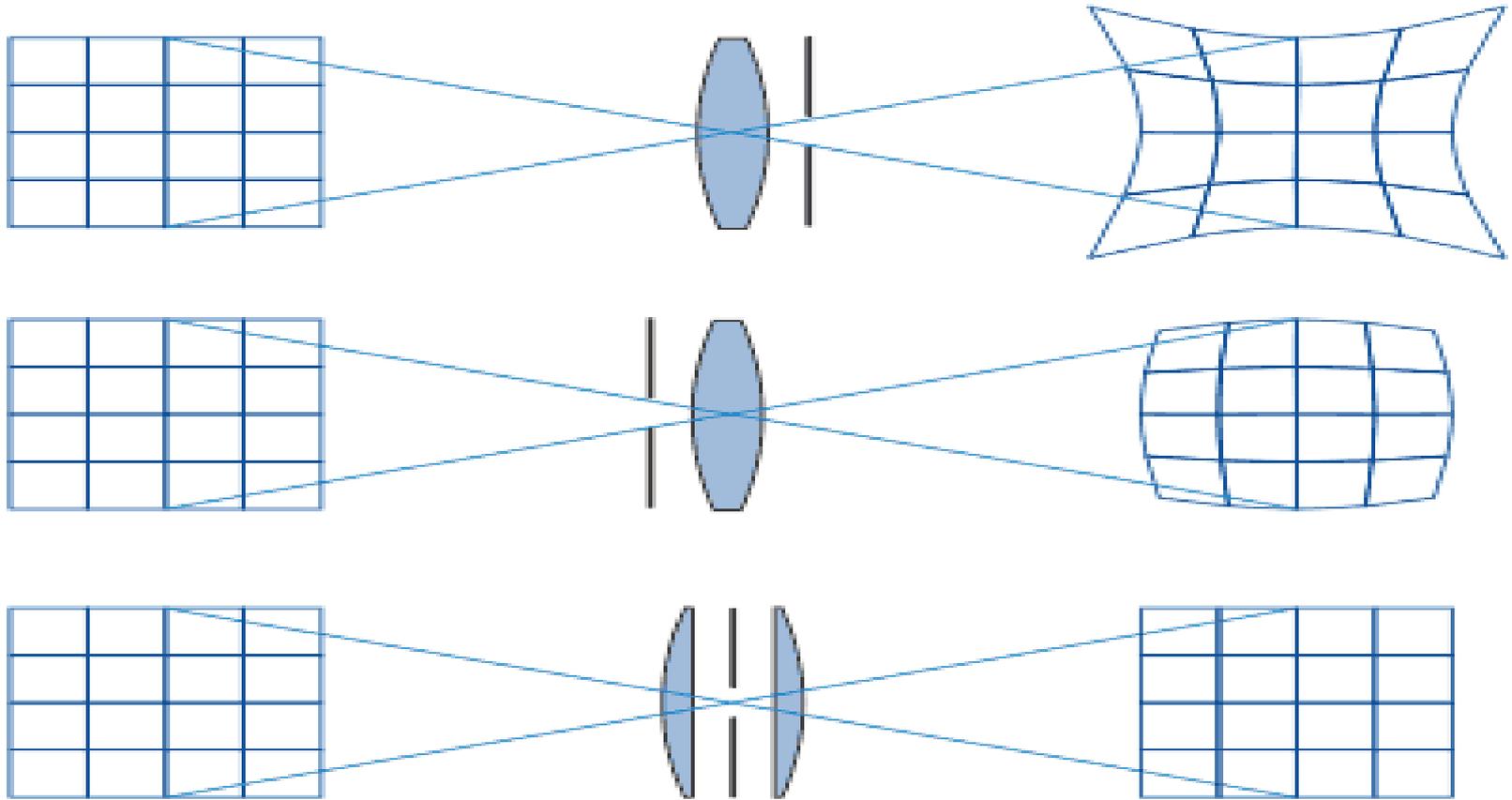
Aberration sphérique

- 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.

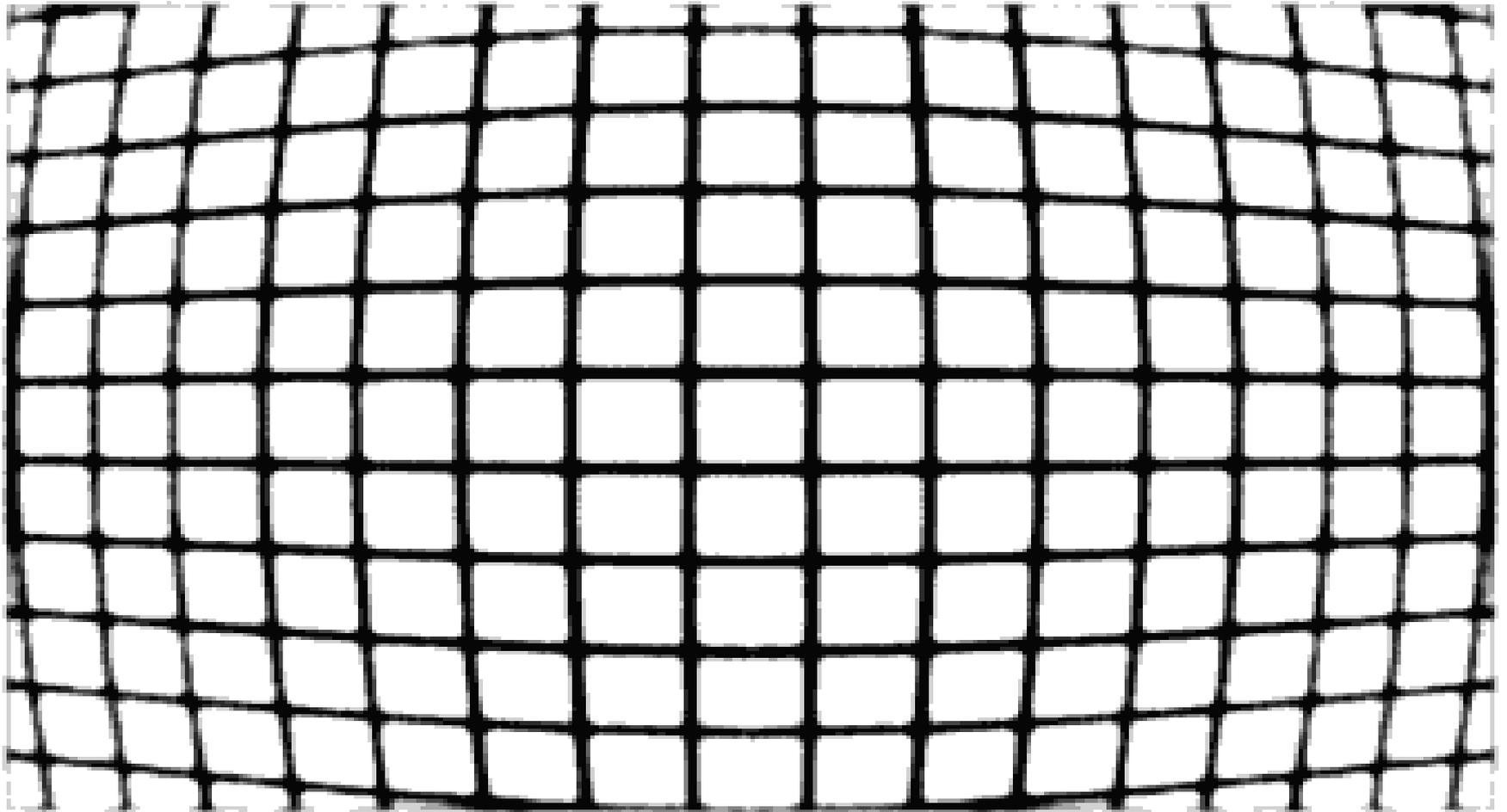
Autres aberrations : coma



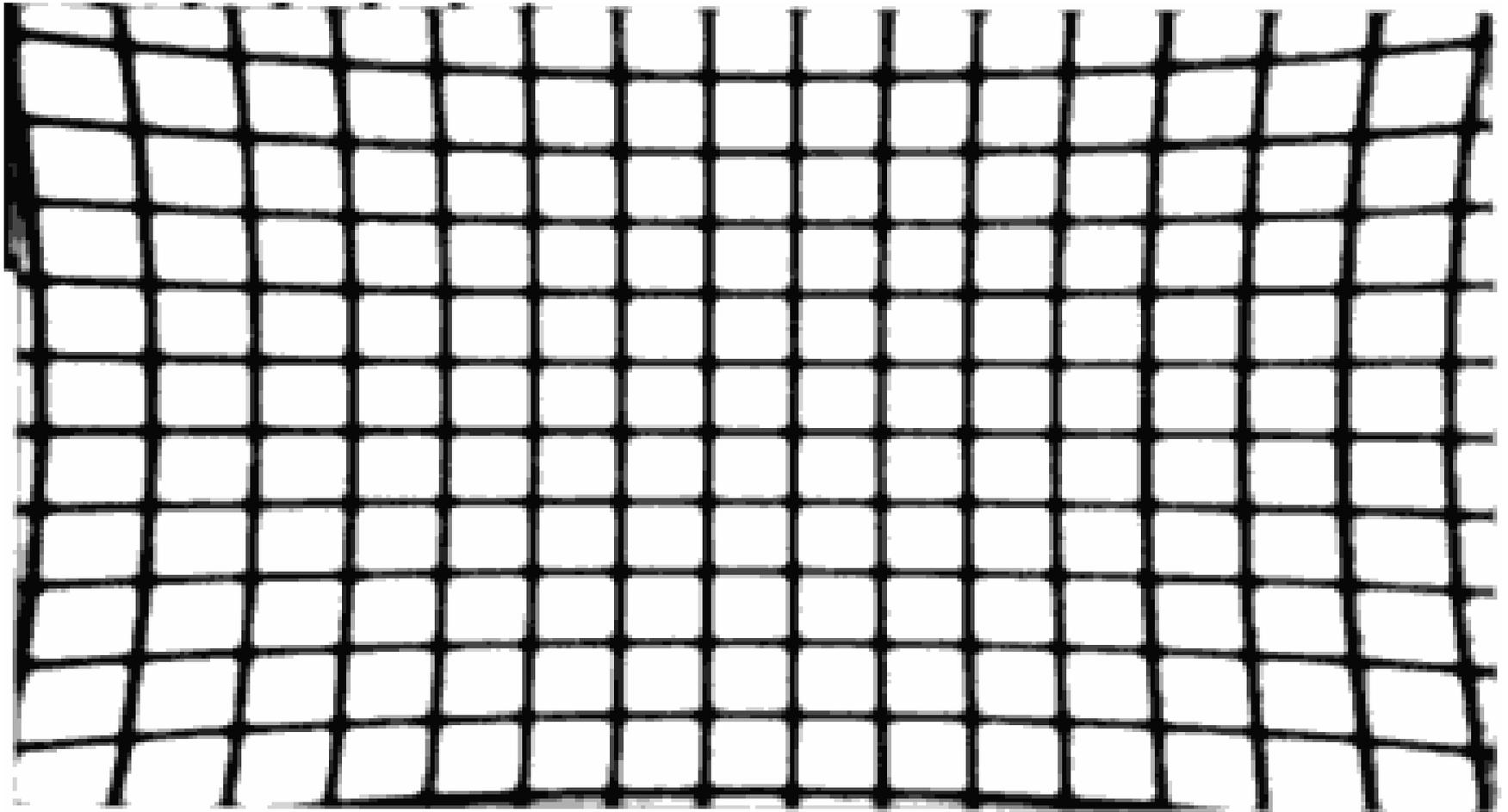
Autres aberrations : astigmatisme, distorsion...



Distorsion en barillet



Distorsion en croissant

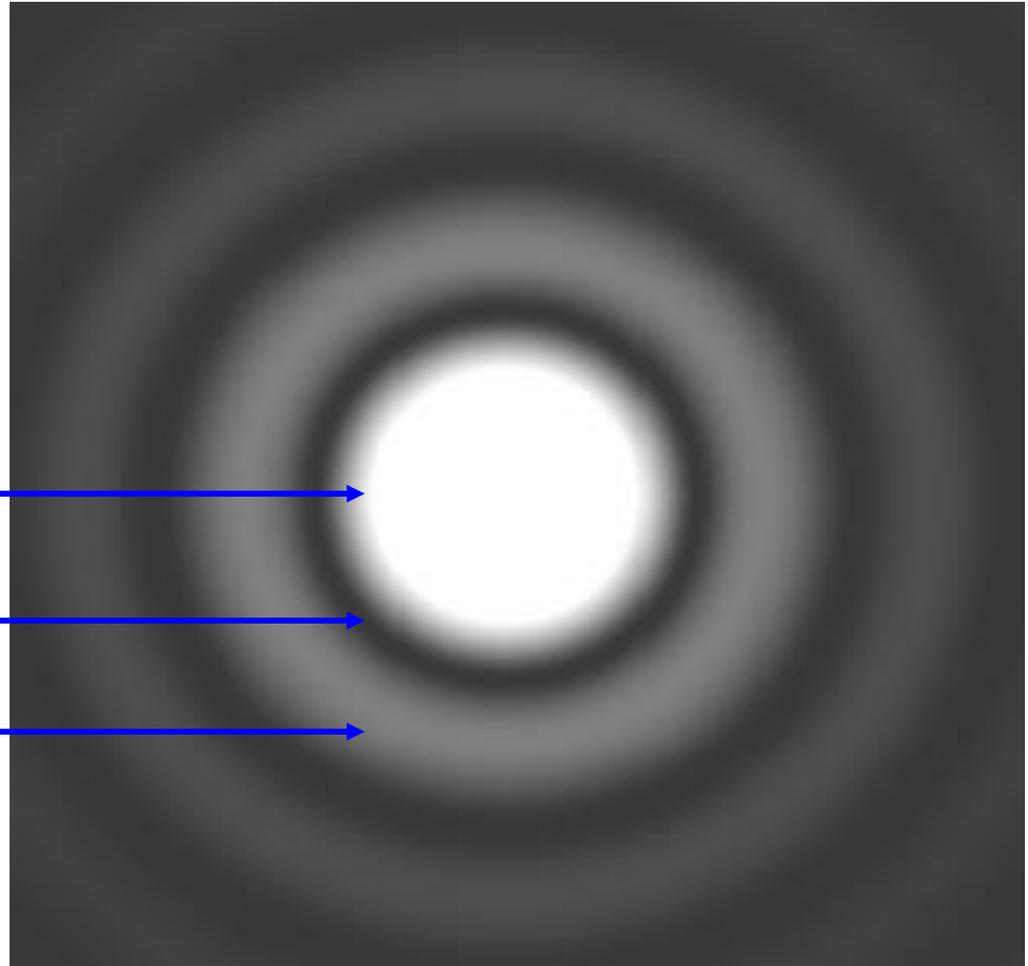


Résolution latérale en microscopie

- 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

Résolution latérale en microscopie

Tache d'Airy



Disque central brillant →

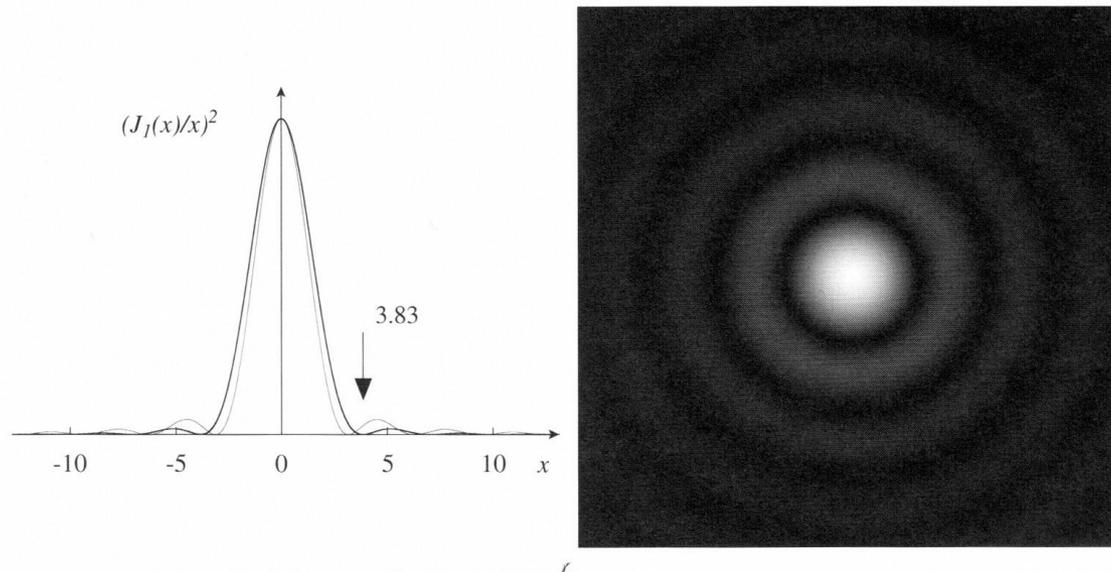
Anneau sombre →

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.



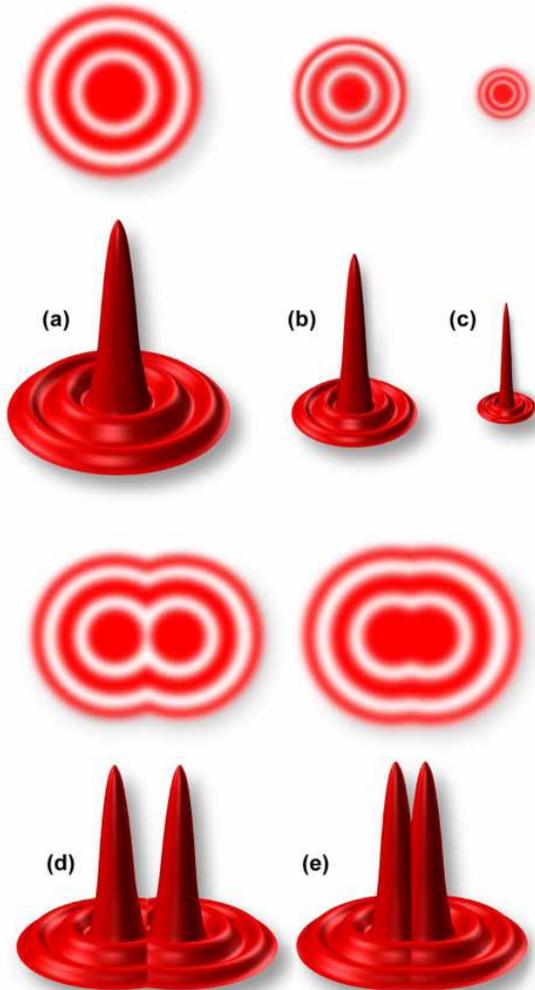
Cette situation est d'une grande importance dès que l'on forme une image avec un instrument d'optique ayant une ouverture circulaire. La tache d'Airy est en effet l'image que l'on obtient d'une source ponctuelle. La diffraction conduit donc à une dégradation des images, nous y reviendrons à la **section 3.1**.

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.

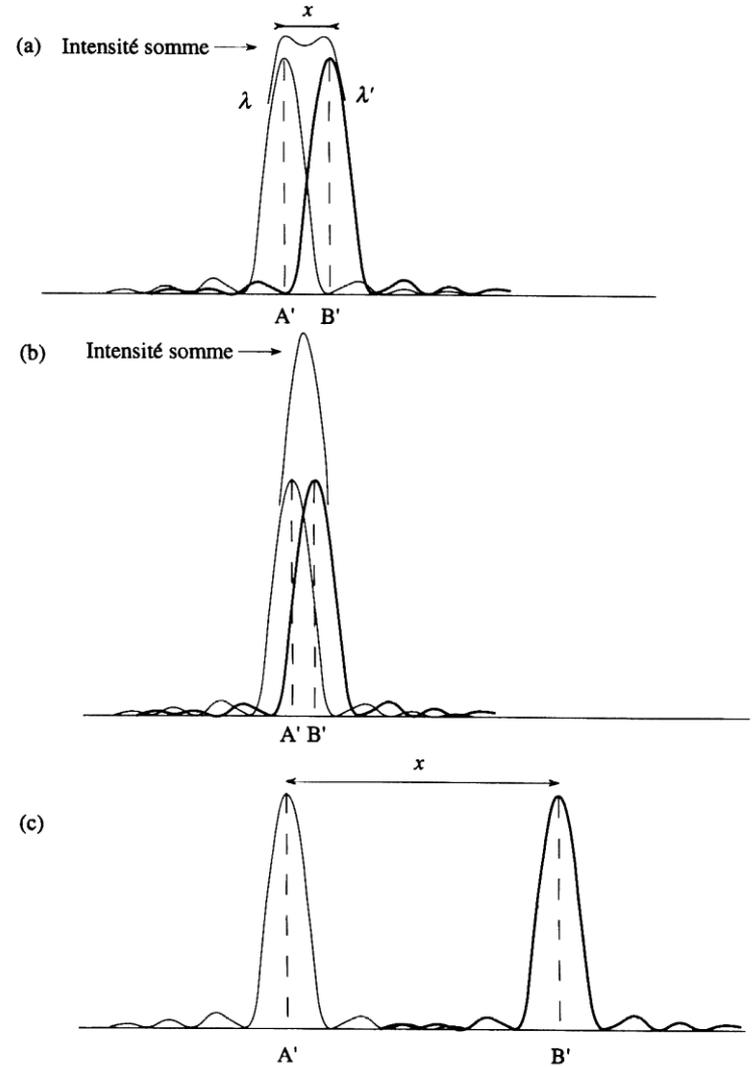
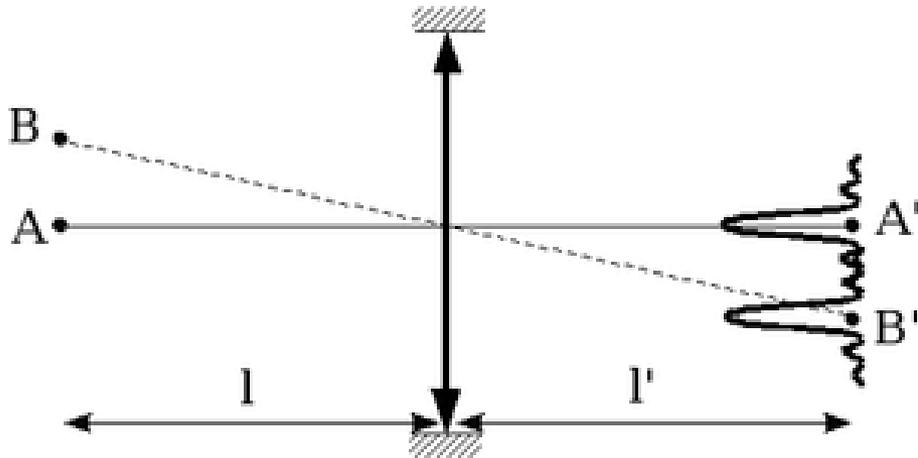
Critère de Rayleigh

- 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 sépare 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 ne sont pas résolus.*
 - (c) *Les objets A et B sont distingués sans ambiguïté.*

Critère de Rayleigh



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

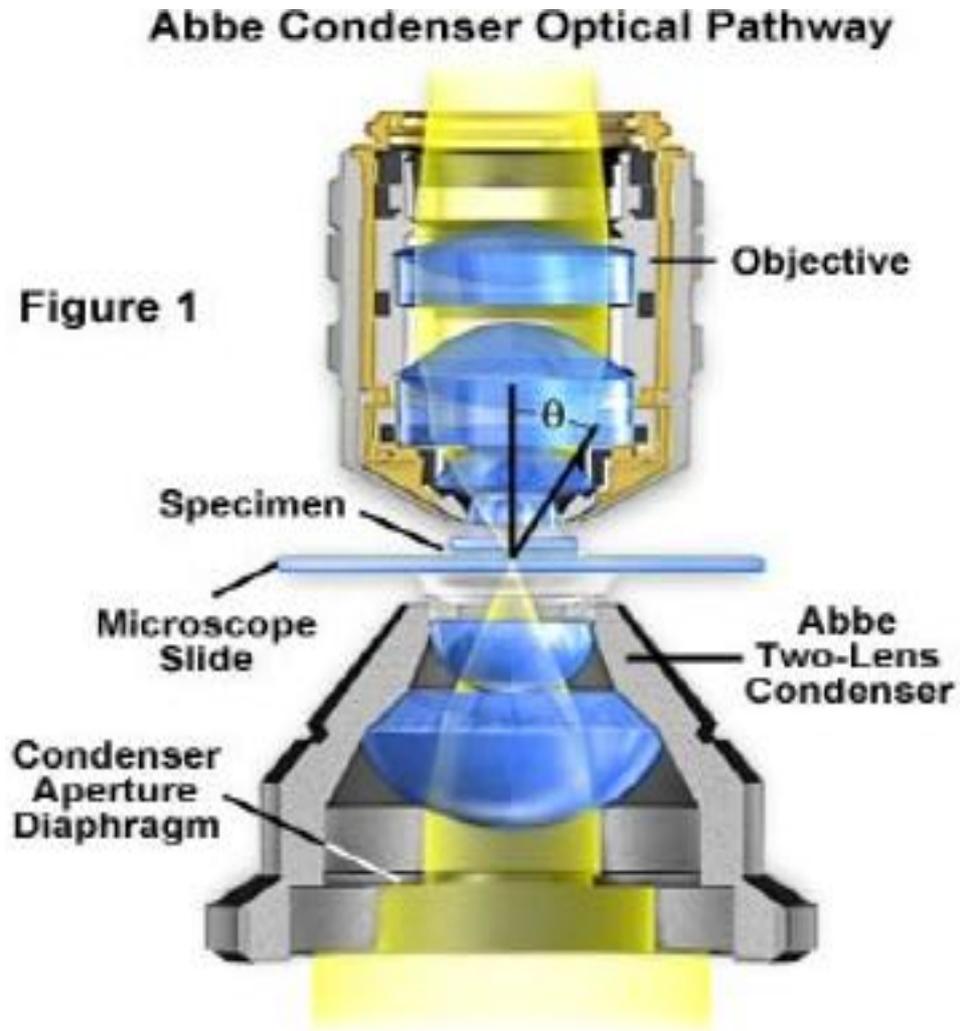
Critère de Rayleigh en microscopie

- 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
- Soit $d \geq 0,61 \lambda / \text{ON}$
 - d = distance
 - λ = longueur d'onde de la lumière utilisée
 - ON = Ouverture Numérique de l'objectif

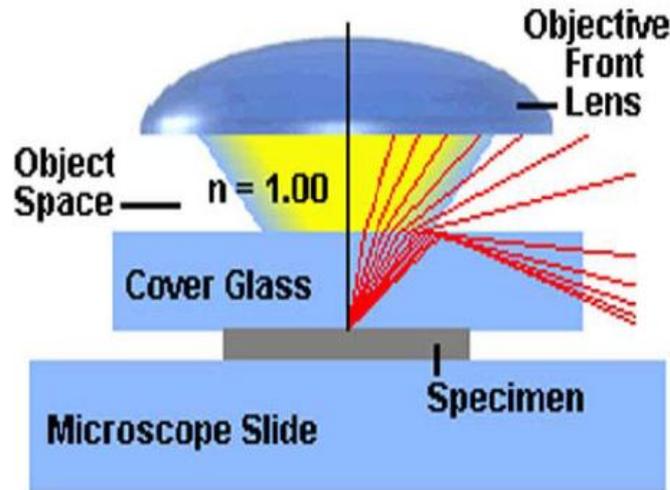
Ouverture Numérique de l'objectif : définition

- $ON = n \sin(\theta)$
 - θ = demi-angle du cône de lumière entrant dans l'objectif
 - n = indice de réfraction du milieu entre l'objet et la lentille de l'objectif

Ouverture numérique de l'objectif



Ouverture numérique de l'objectif



n = Refractive Index

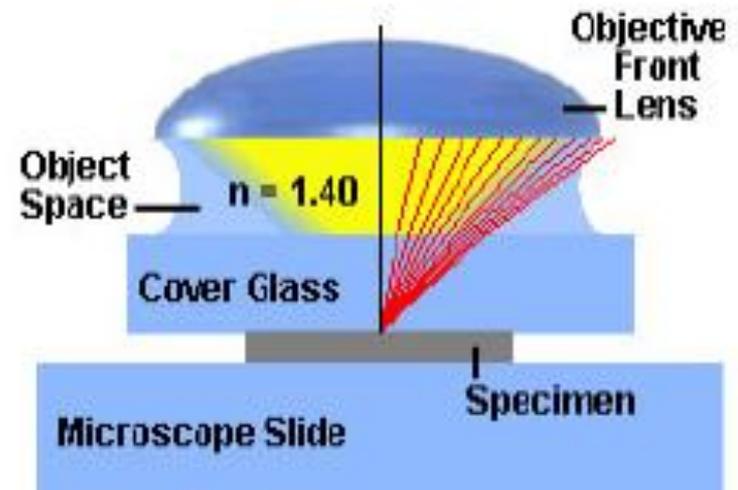


$$\text{Numerical Aperture (NA)} = n \sin(\theta)$$

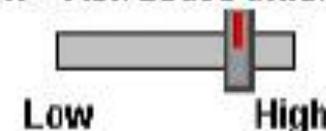
$$\text{NA} = 1.00 \sin(65^\circ)$$

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

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



n = Refractive Index



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

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

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

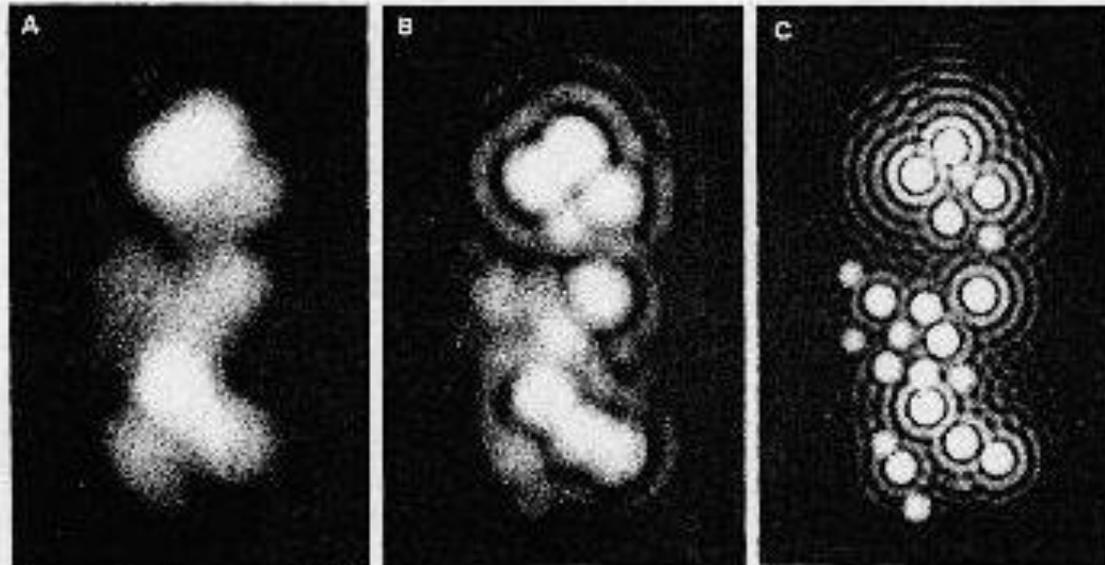
$$\theta = \text{Angular Aperture} = 65^\circ$$

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

0,12

N.A.

0,87



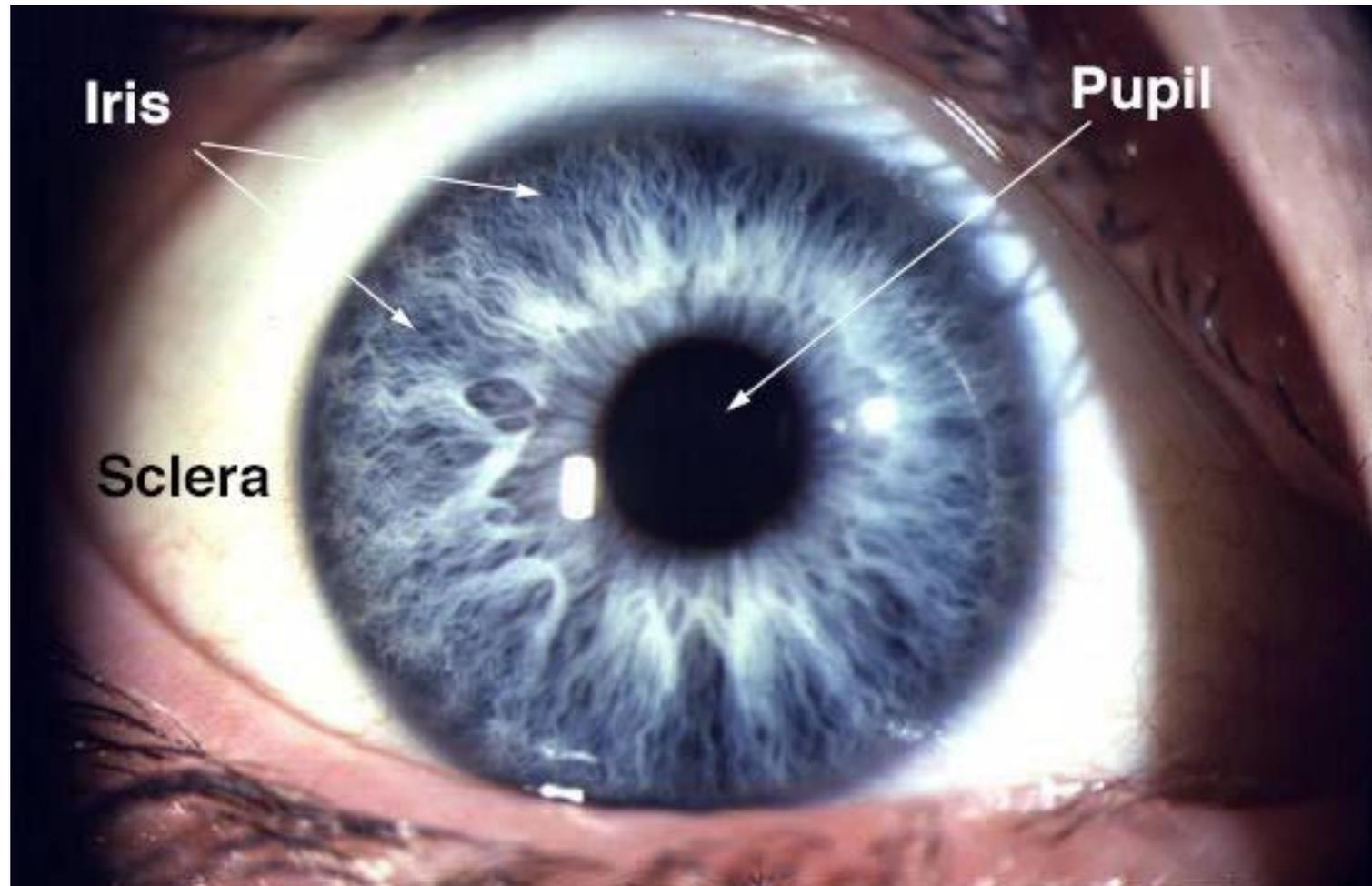
faible
résolution

haute
résolution

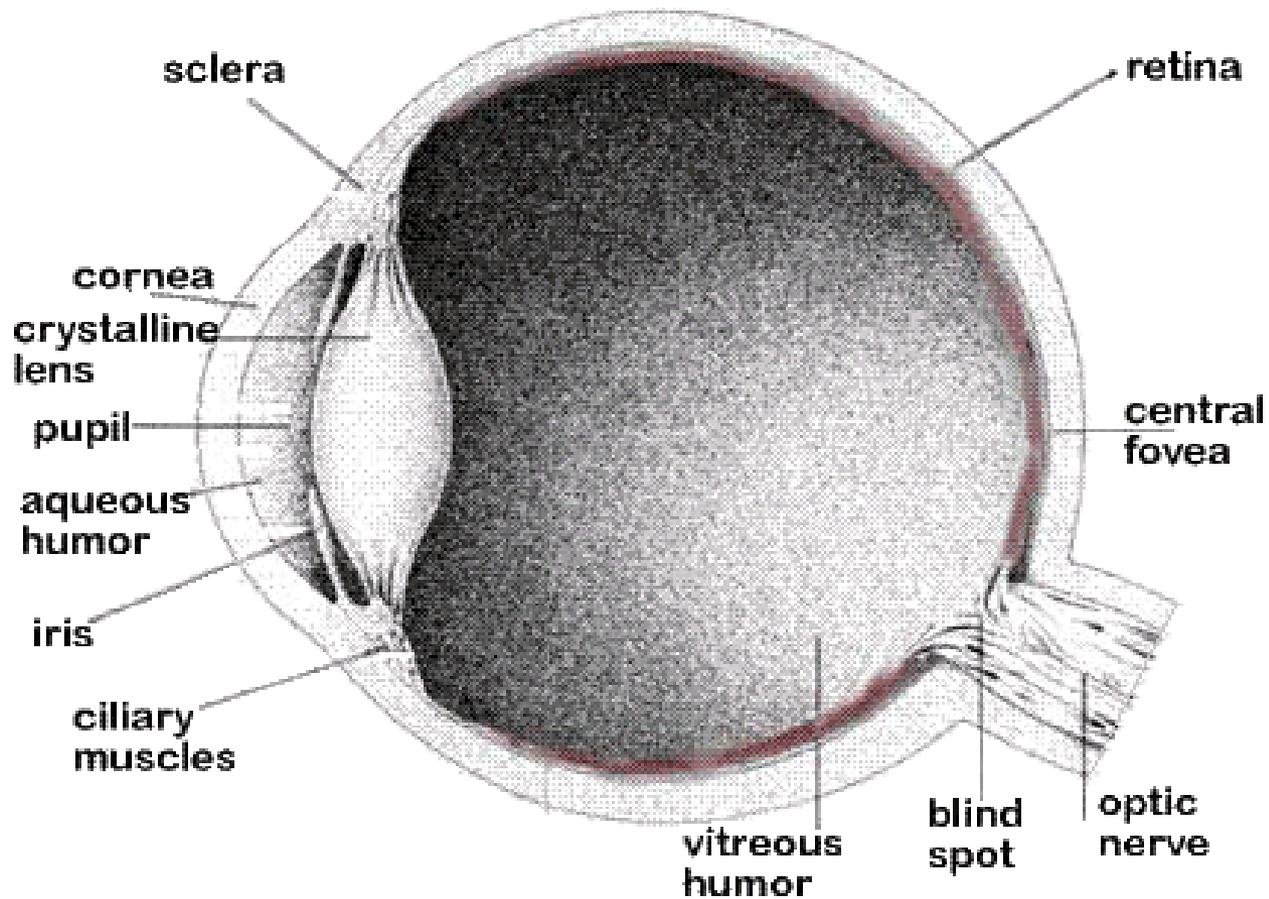
Résolution de l'œil humain

- 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 μm), (environ 1/10 mm).

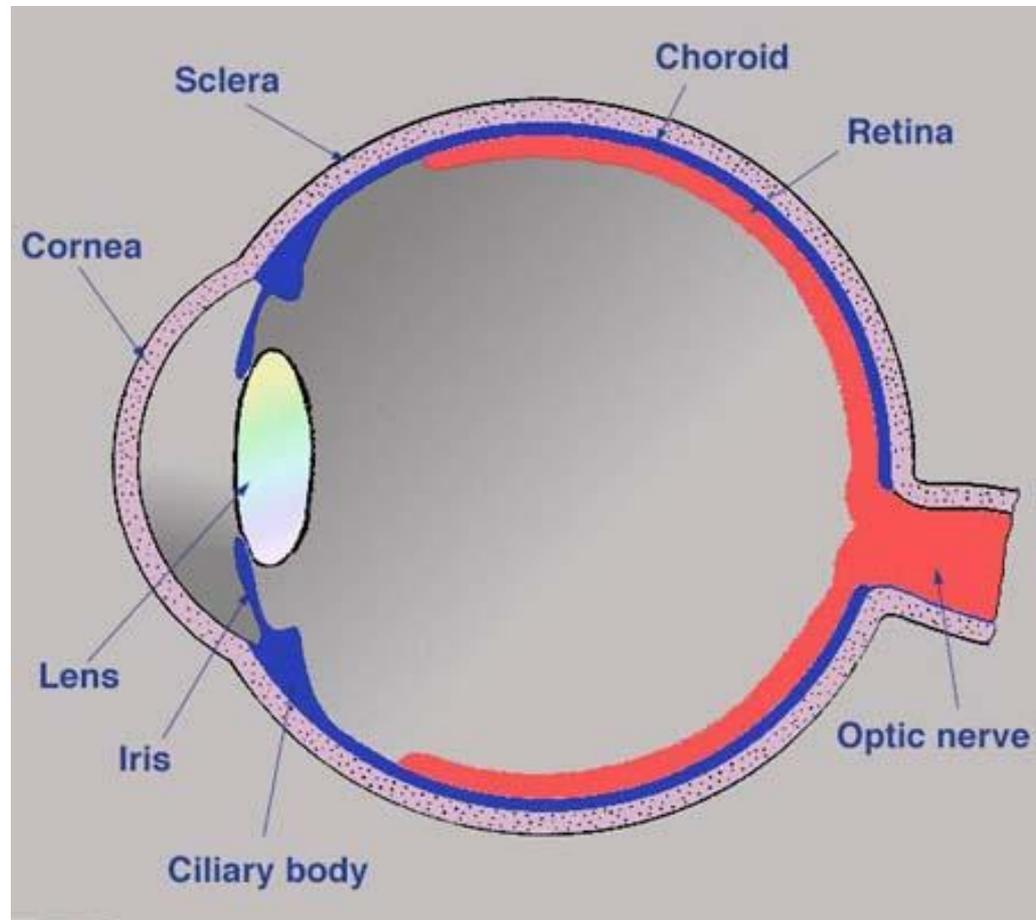
Résolution de l'œil humain



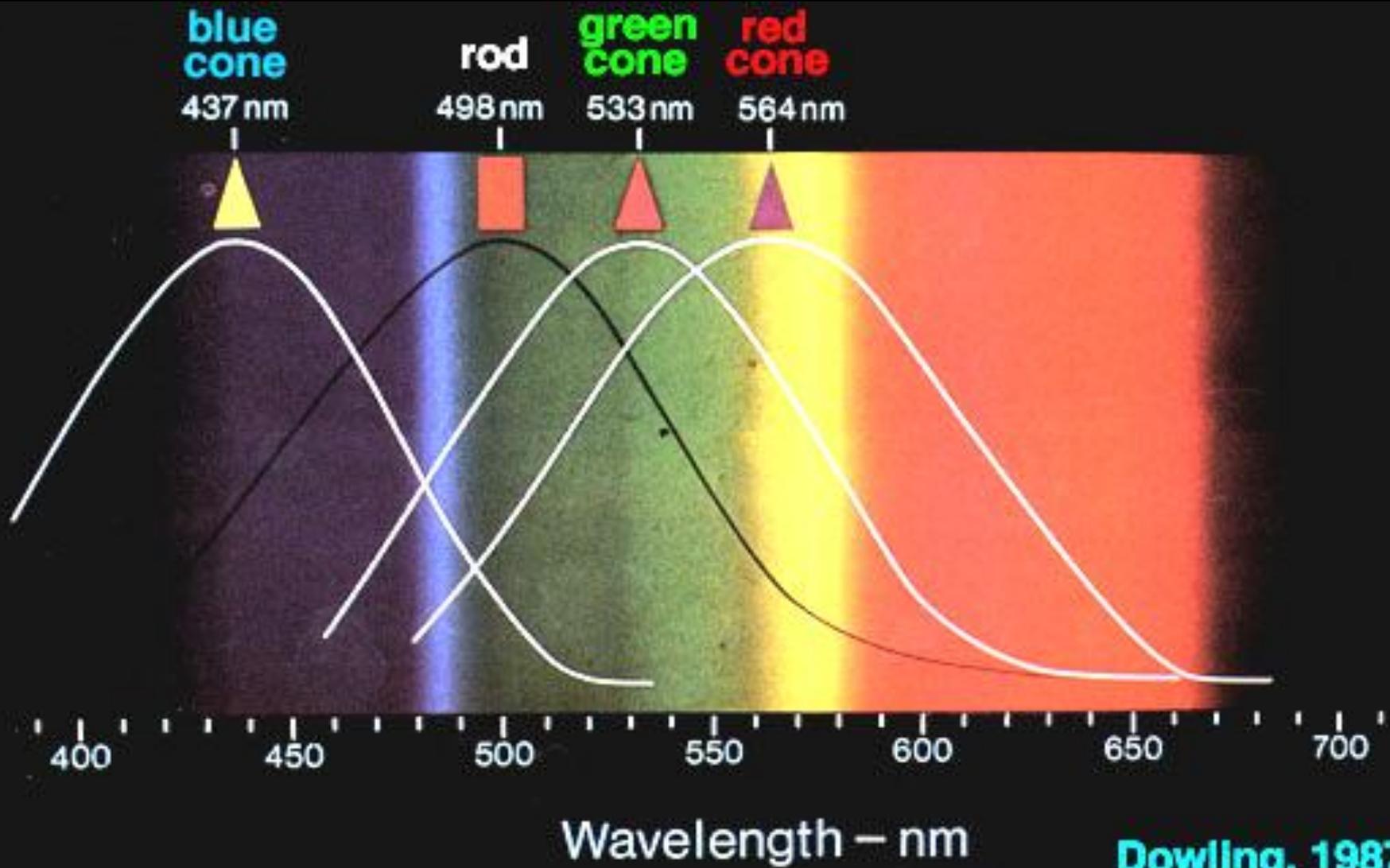
Résolution de l'oeil humain



Résolution de l'œil humain



Relative Absorbance



Dowling, 1987

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 λ =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 (*Tableau 1*)
 - et θ = 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 μm) dans le domaine de résolution de l'œil (100 μm) 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

Milieu de montage	Indice de réfraction
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

Grandissement	Ouverture Numérique	Résolution théorique (μm)	Grossissement utile
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

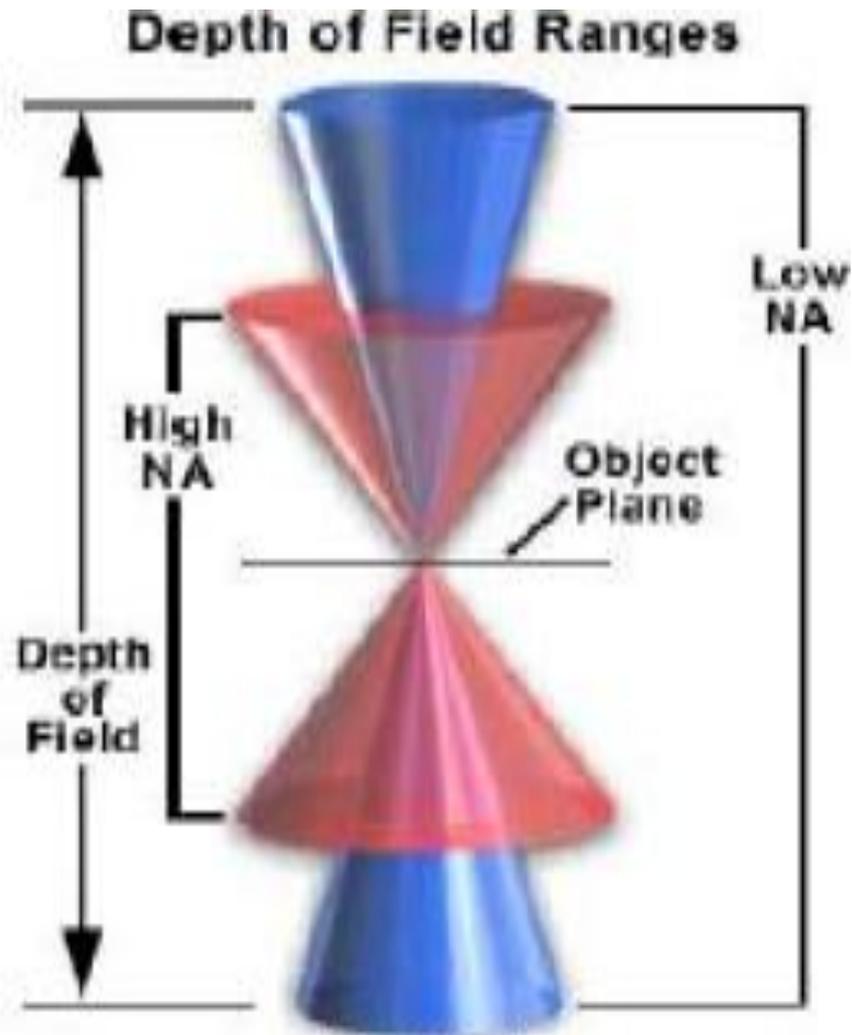


Figure 1

Profondeur de champ

PROFONDEUR DE CHAMP (côté objet)

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

Tableau pour des objectifs achromates

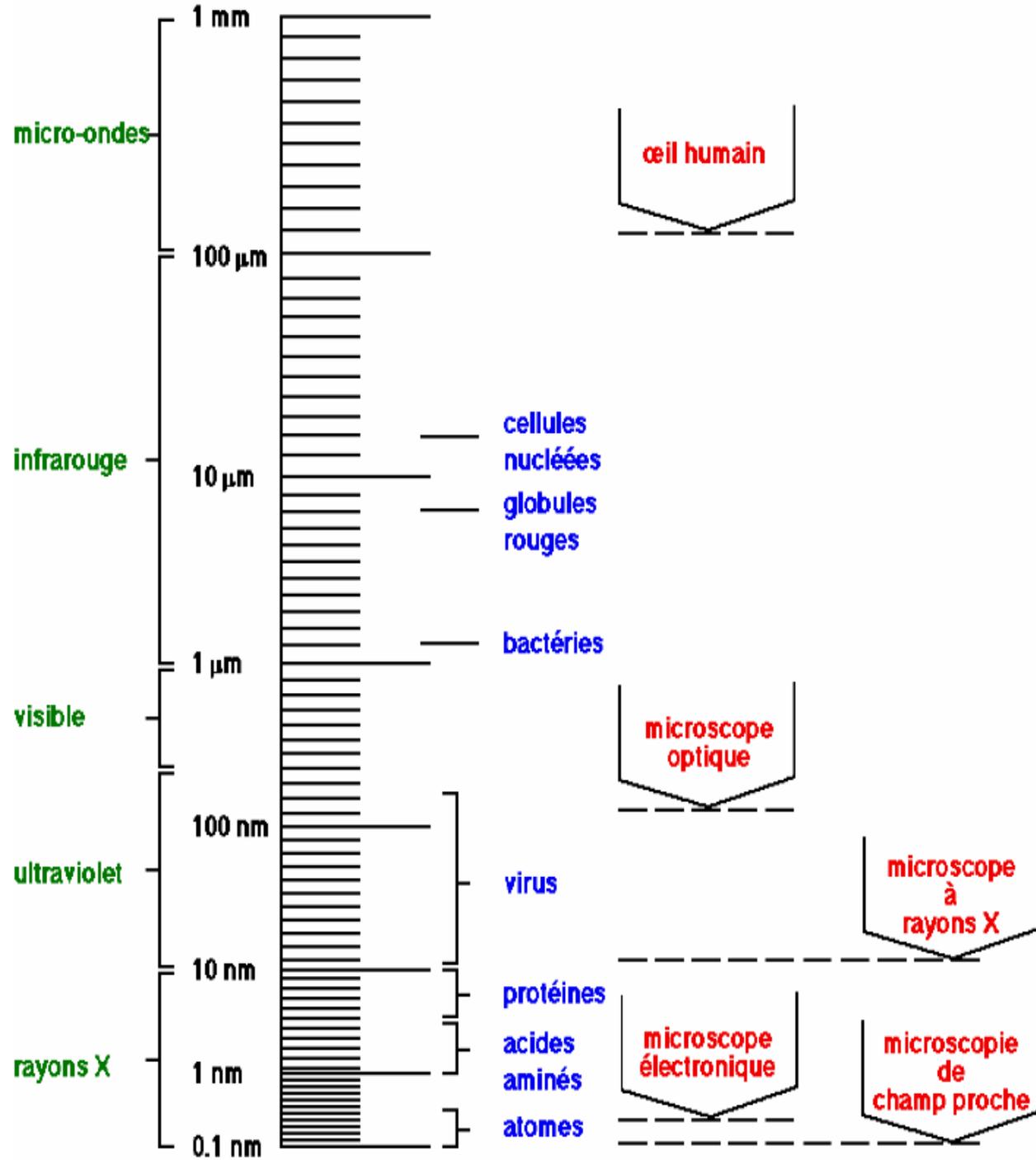
Grossissement de l'objectif	Ouverture Numérique	Profondeur de champ théorique (en microns)	Profondeur de champ pratique (en microns)
4x	0,1	50	172,5
10x	0,25	8	27,6
40x	0,65	1,2	3
100x	1,3	0,3	0,7

Grossissement utile d'un microscope

- $0,15 \text{ mm} = 150 \text{ }\mu\text{m} = 150\,000 \text{ nm}$ = pouvoir séparateur de l'œil humain
- $0,2 \text{ }\mu\text{m} = 200 \text{ nm}$ = pouvoir séparateur d'un microscope optique
- $150/0,2 = 750$ = grossissement utile d'un microscope optique
- Cela signifie qu'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'œil humain.
- Sur un microscope optique le grossissement maximum utilisé est d'environ 1200.

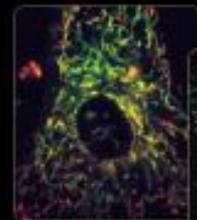
Grandissement / Grossissement

- 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



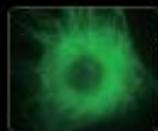
Mitochondria

- M2512 Mitochondria™ Red CMR05
- M2514 Mitochondria™ Green CM
- M2516 Mitochondria™ Orange CMR05
- S11719 Selective™ Alexa Fluor™ 488 Cytochrome c Labeling Kit
- I1148 JC-1
- 45481 anti-cytochrome oxidase subunit I



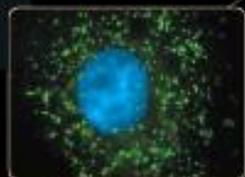
Plasma Membrane

- V11005 DMPE-L-ANL™ (lipid analog of DMPE-L-ANL) membrane stain
- V20895 Vybrant™ DM cell labeling solution
- V20896 Vybrant™ DBO cell labeling solution
- V20897 Vybrant™ DBO cell labeling stain kit
- M11102 Alexa Fluor™ YH anti-human epidermal



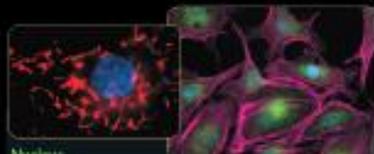
Cytoskeleton/Tubulin

- F12216 Dendra Green™ 02 Label
- A11015 anti- α -tubulin



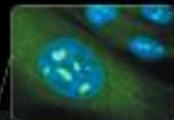
Parasitomes

- S14291 Selective™ Alexa Fluor™ 488 Parasitome Labeling Kit



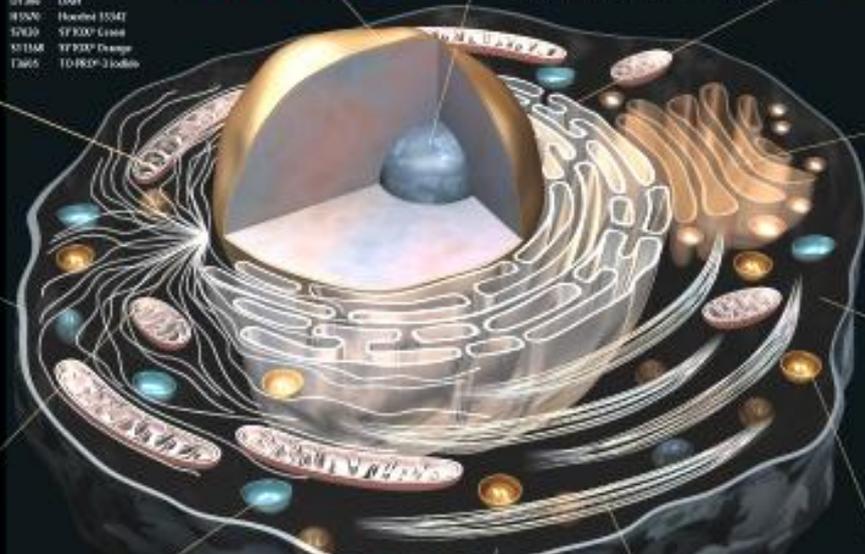
Nucleus

- D1264 DAPI
- I1926 Hoechst 33342
- S2620 SYTO23™ Green
- S11148 SYTO23™ Orange
- T3665 TO-PRO-3 iodide



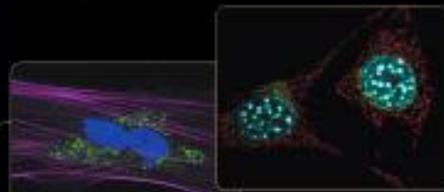
Nucleoli

- S12791 Y1117™ BNAlexa™ green fluorescent cell stain



Endoplasmic Reticulum

- I12150 ER Tracker™ Blue-AR12 DPX
- S11200 Selective™ Alexa Fluor™ 488 Endoplasmic Reticulum Labeling Kit
- R14491 Inhibitor A, BODIPY™ 155,568 conjugate™ (green)™



Golgi

- 421216 anti-Lamp1 IgG
- M24251 Mito-C™, acridine conjugate™ (red)
- R12526 BODIPY™ FL-1, C, acridine conjugate™ (red)
- R14490 BODIPY™ FL-C, acridine conjugate™ (red)

Cytosolic Biosensors

Cytosolic Ca²⁺

- I1123 Indo-1, AM
- I1211 Fura-2, AM
- I14205 Fura-4, AM
- R12088 JcaM-2, AM

Cytosolic pH

- M1504 mag-fura-4, AM
- M1251 mag-fura-2, AM

Zn²⁺

- I24125 Fluor-Zn™ 1, AM
- R14551 Fluor-Zn™ 3, AM

Cytosolic pH

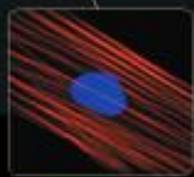
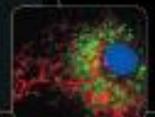
- R1158 BCE-1, AM
- C1221 SNARF™ 1, acetoxymethyl ester, acetate

Cytosolic p25

- CM21 CM1 (ACTEA) (Bioss general)
- D51142 3,6-dihydroxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (green)

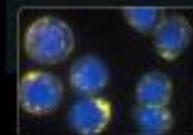
Cytosolic p30

- 92200 anti-ubiquitin, rabbit IgG (antibody)
- E02842 DAPI (blue)



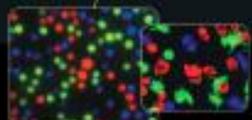
Cytoskeleton/Actin

- A12127 Alexa Fluor™ 488 phalloidin
- R4151 mCherry™ phalloidin
- A12131 Alexa Fluor™ YH phalloidin



Lipid Rafts

- R12910 BODIPY™ FL-C, ganglioside GM₁
- S14816 Vybrant™ Alexa Fluor™ 488 Lipid Raft Labeling Kit
- S14818 Vybrant™ Alexa Fluor™ 555 Lipid Raft Labeling Kit
- S14815 Vybrant™ Alexa Fluor™ 594 Lipid Raft Labeling Kit



Cytosol

- C11088P calcein, AM
- CM25 Cell Tracker™ Green CMR05
- C11102 Cell Tracker™ Red CMR05

Lysosomes

- L1528 Lyso Tracker™ Red (Lys)™ (R)
- L1526 Lyso Tracker™ Green (Lys)™ (R)
- L1545 LysoSensor™ Yellow Blue (Lys)™ (R)

Molecular Probes
Invitrogen detection technologies

www.molecularprobes.com | www.invitrogen.com

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.

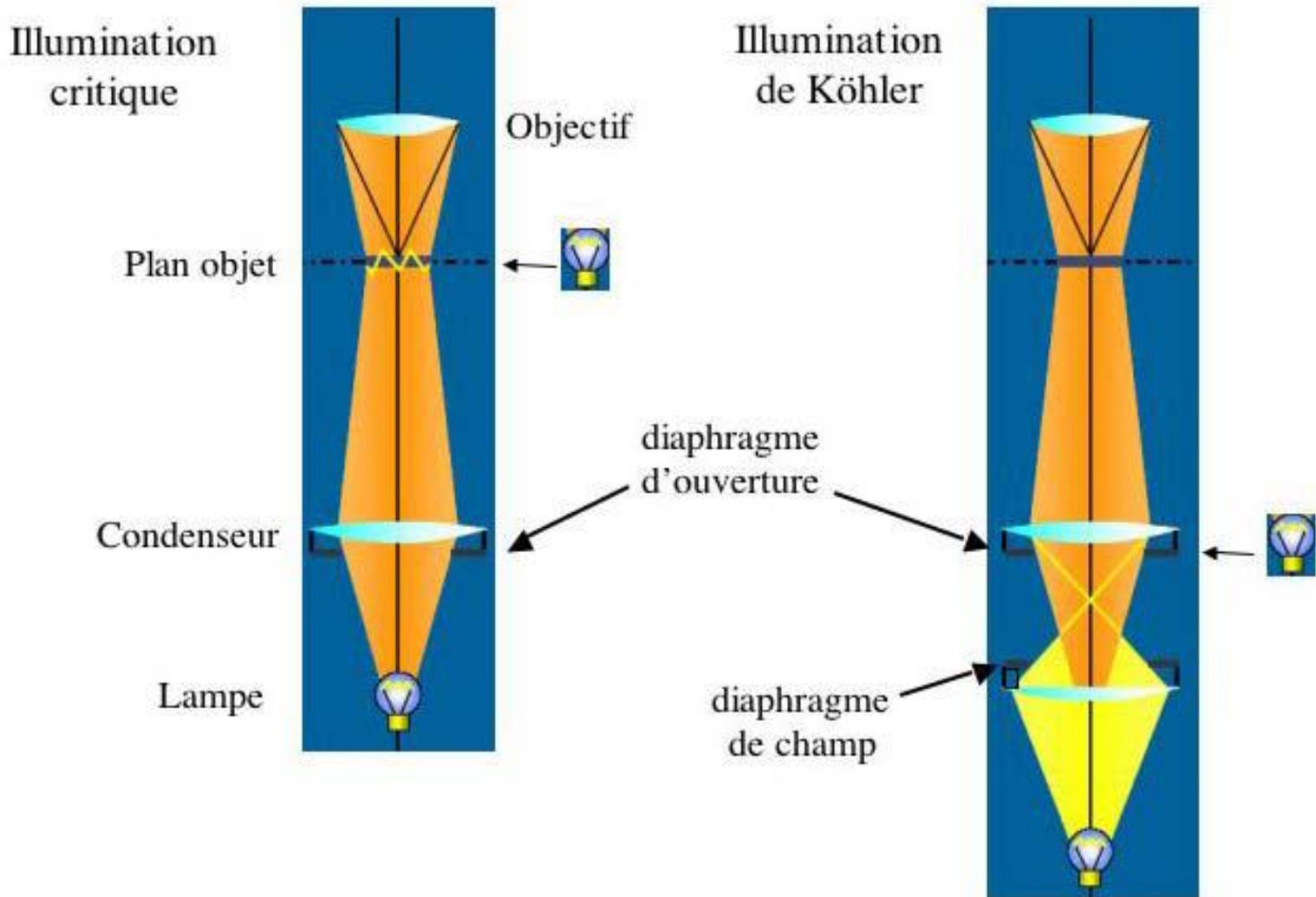
- **Eclairage de Köhler**

- 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.

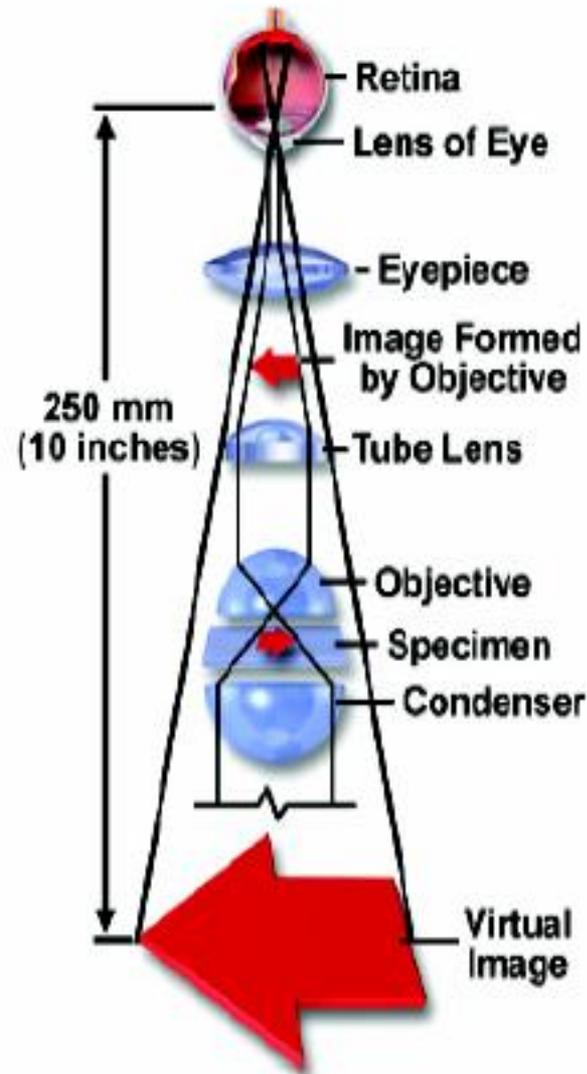
Microscopie en lumière transmise

- **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

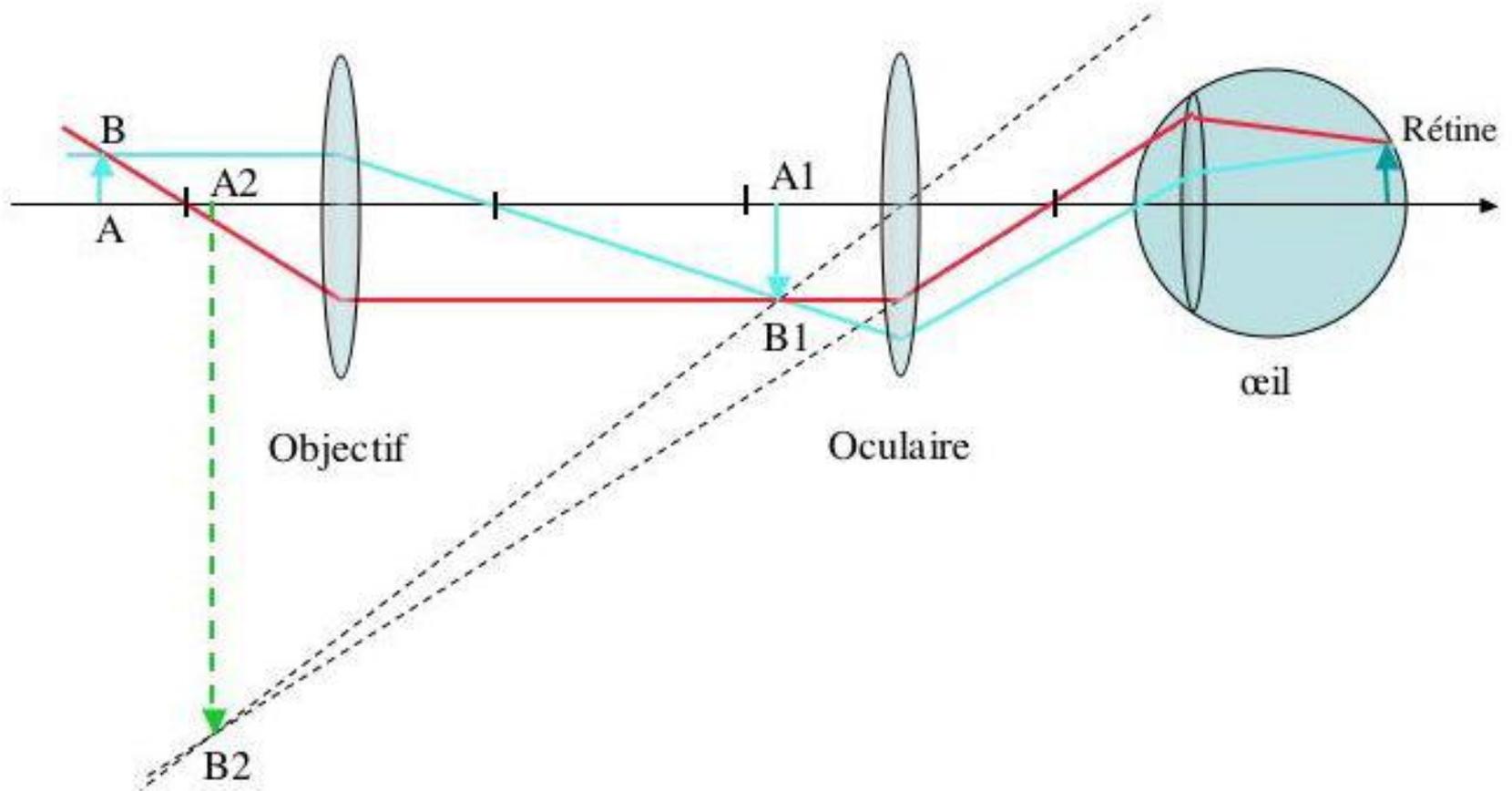


Principe du microscope optique



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.



Lumière transmise

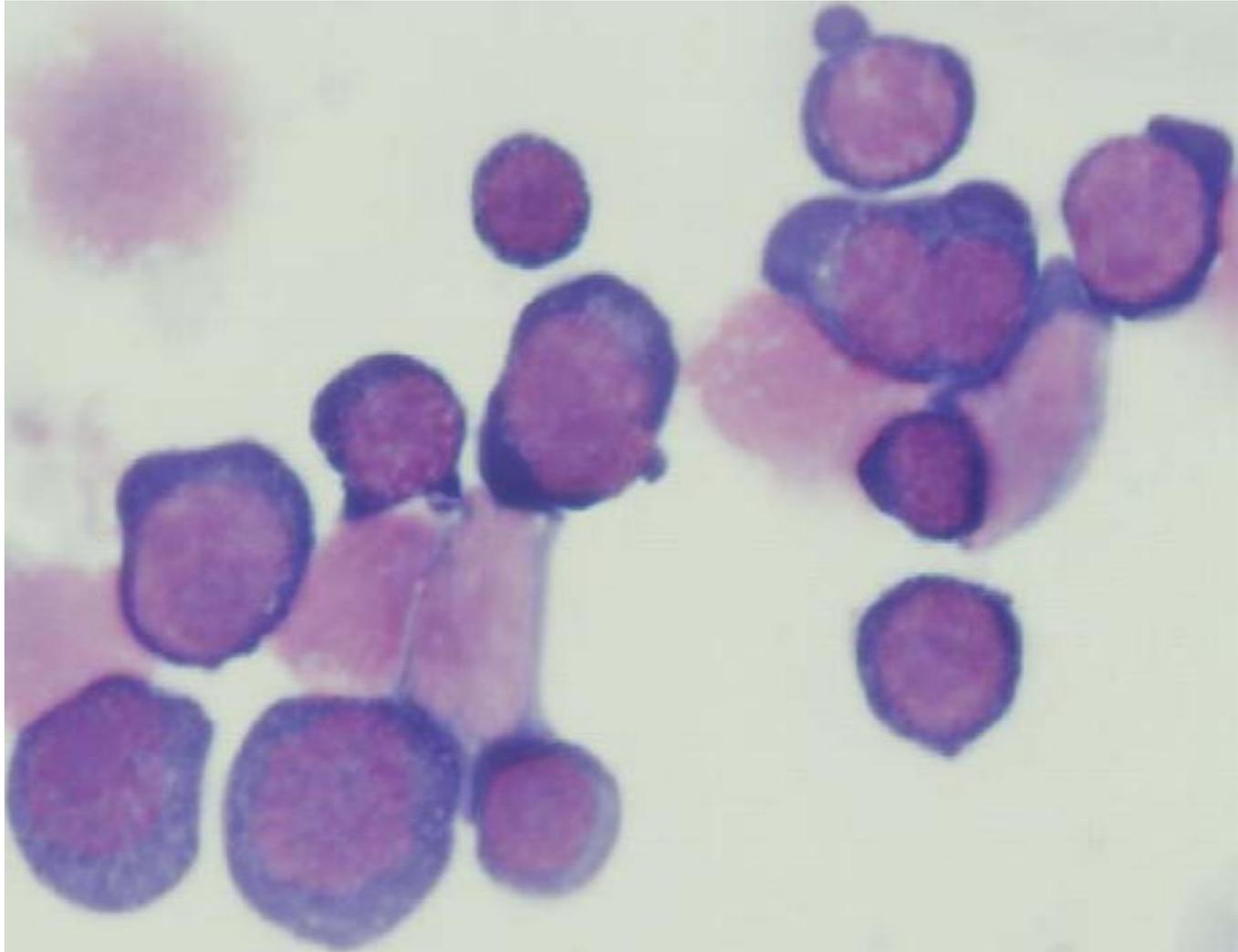
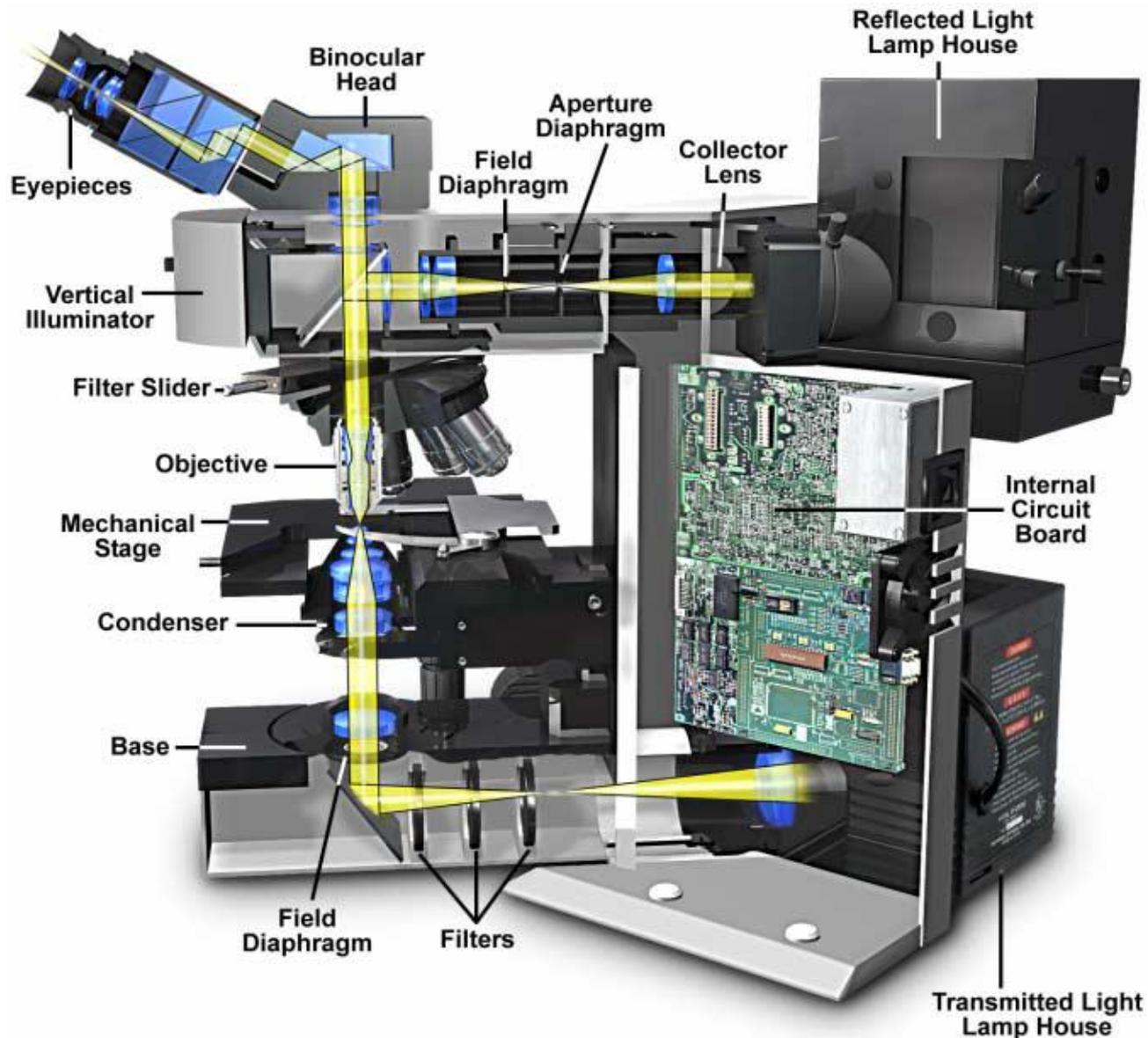


Schéma d'un microscope



Sources lumineuses

- Lampe halogène

Condenseur

Achromat/Aplanat Condenser (Numerical Aperture = 1.38)

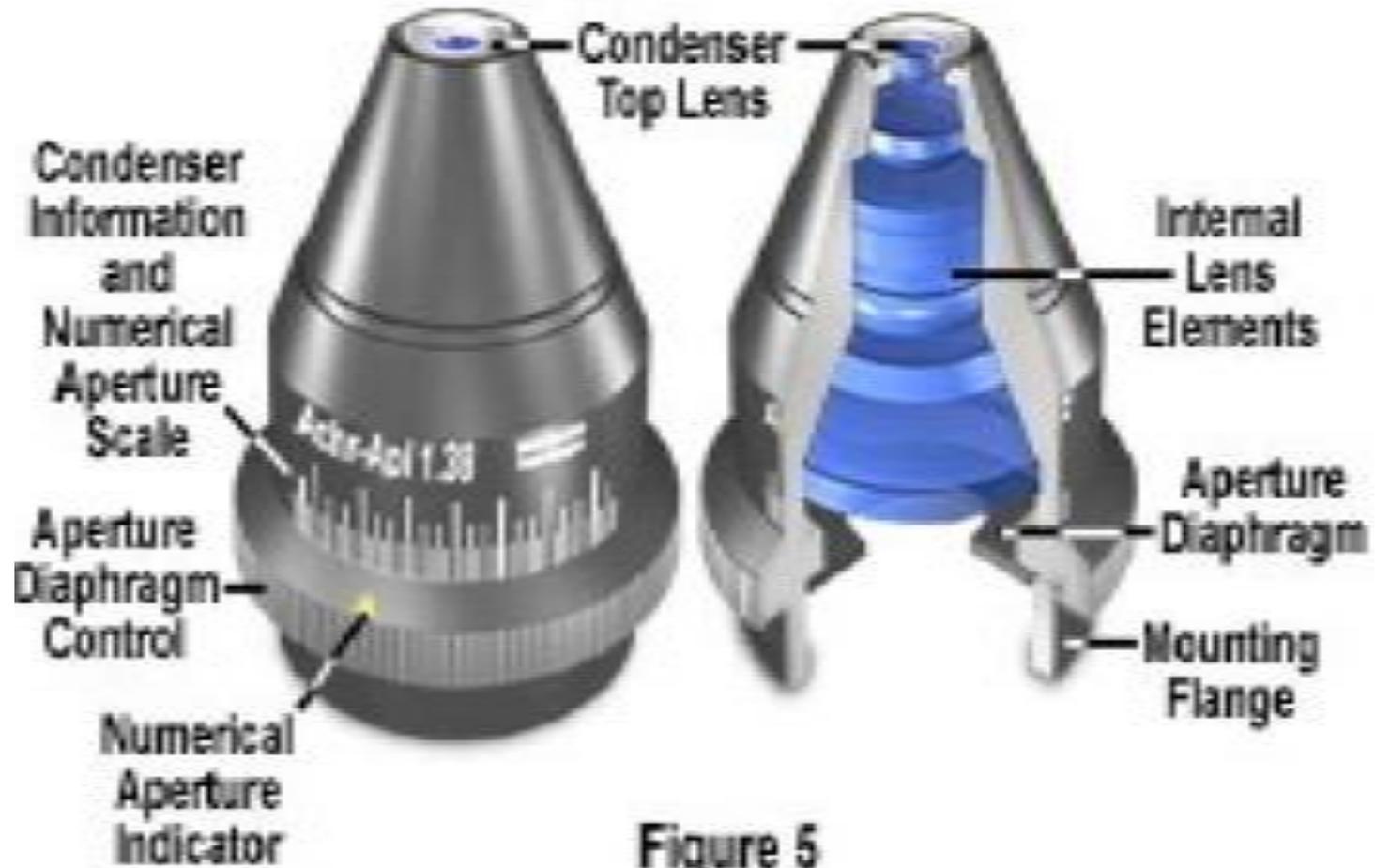


Figure 5

Objectif



Occulaire

Aberration-Free 10x Eyepiece With Diopter Adjustment

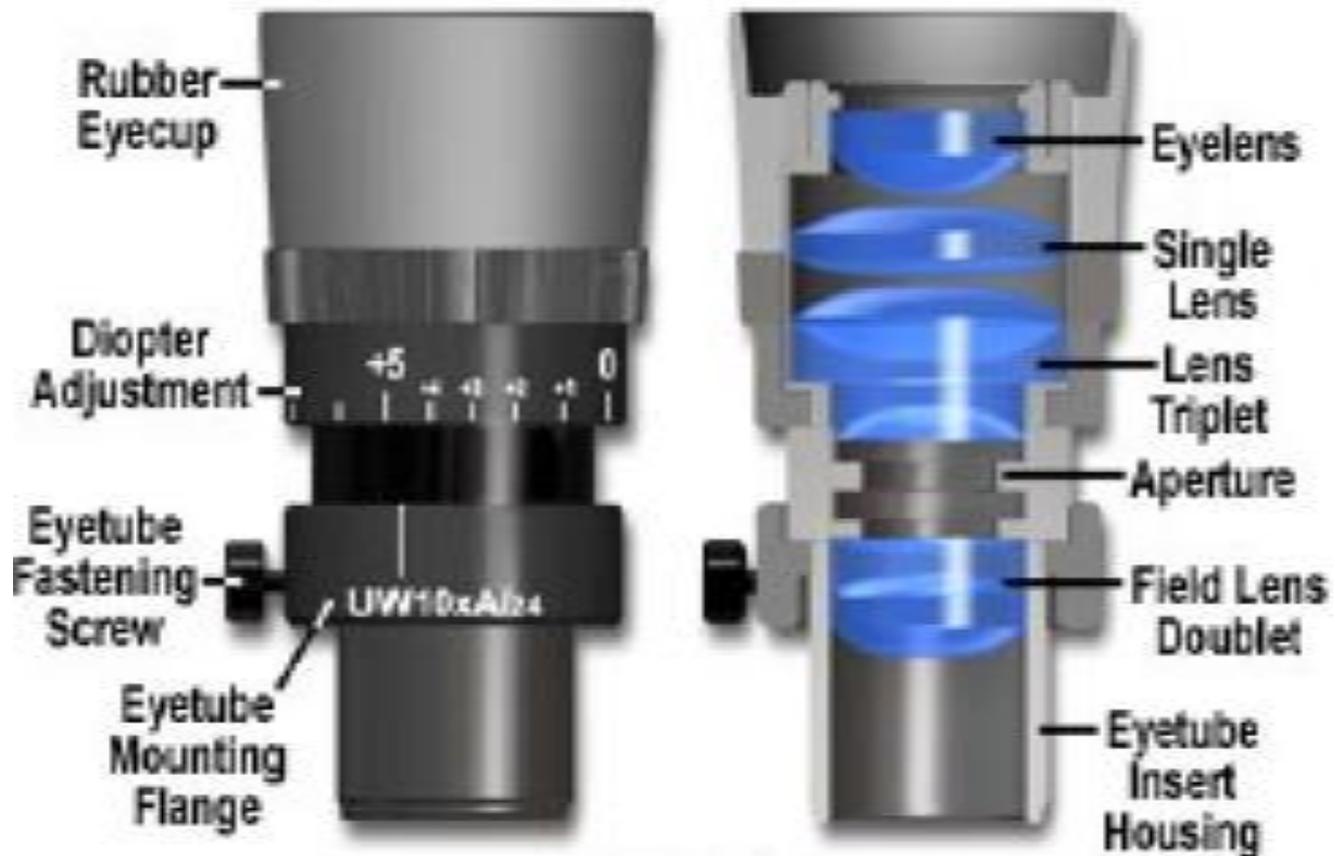


Figure 1

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

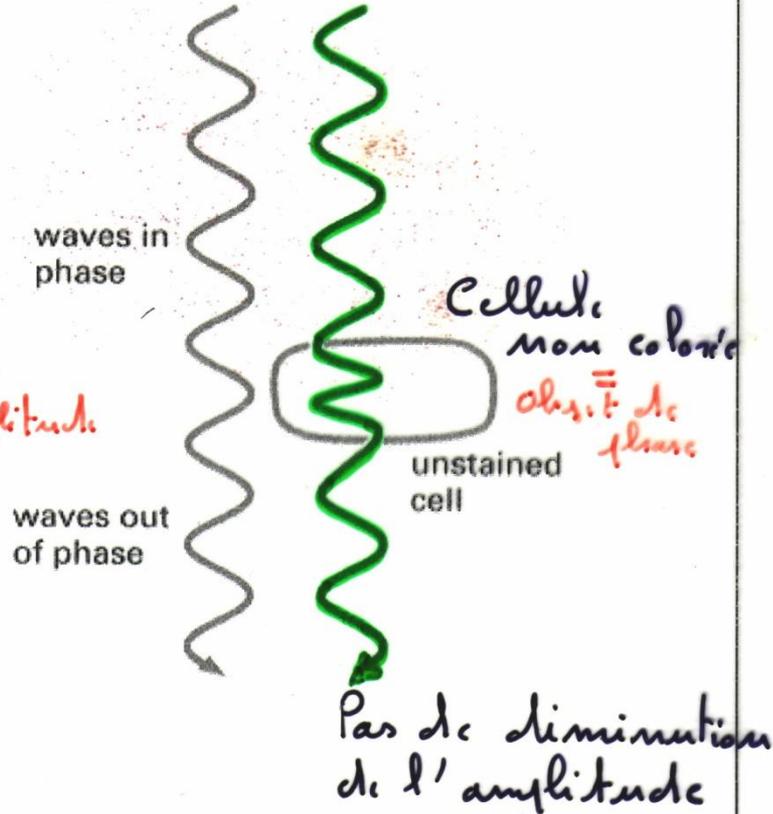
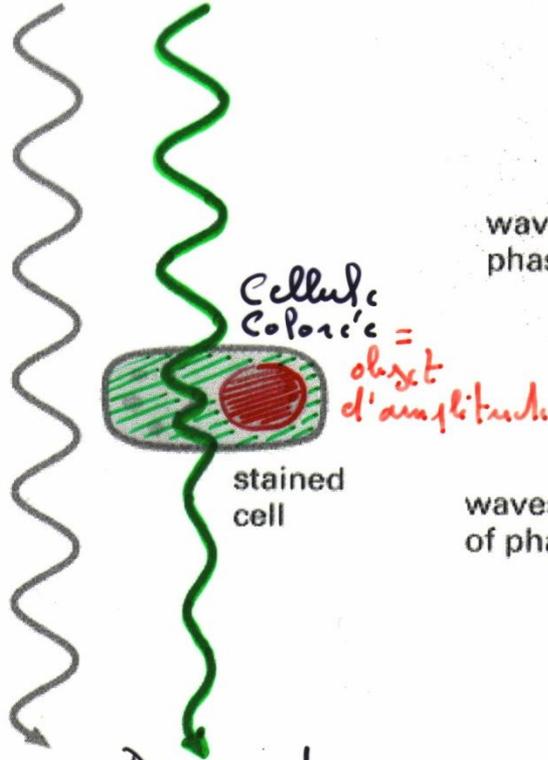
Lumière Transmise

Fond Clair

Contraste de Phase

(A) incident light

(B) incident light



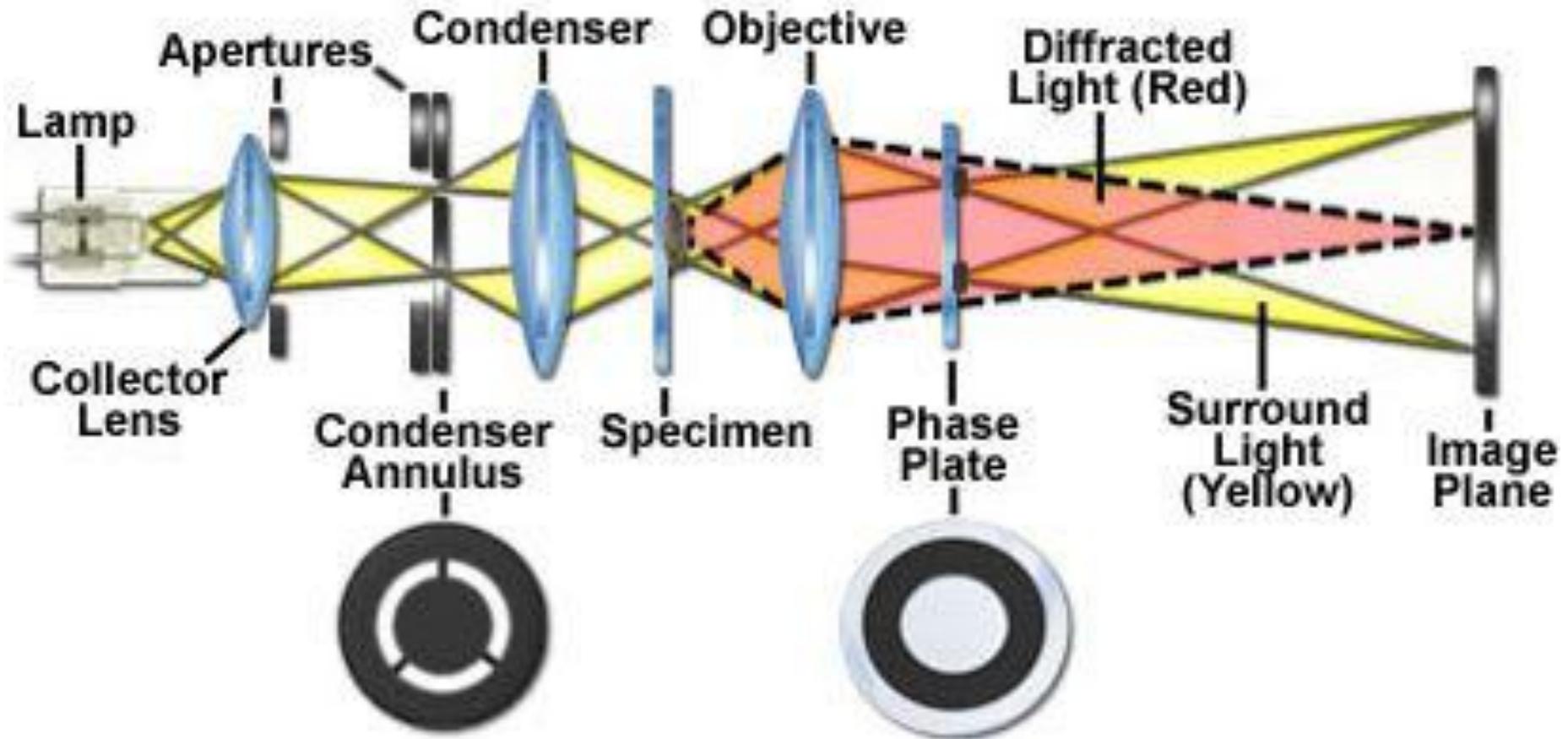
Diminution de l'Amplitude

From The Art of MBoC³ © 1995 Garland Publishing, Inc.

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

Ondes en opposition de phase

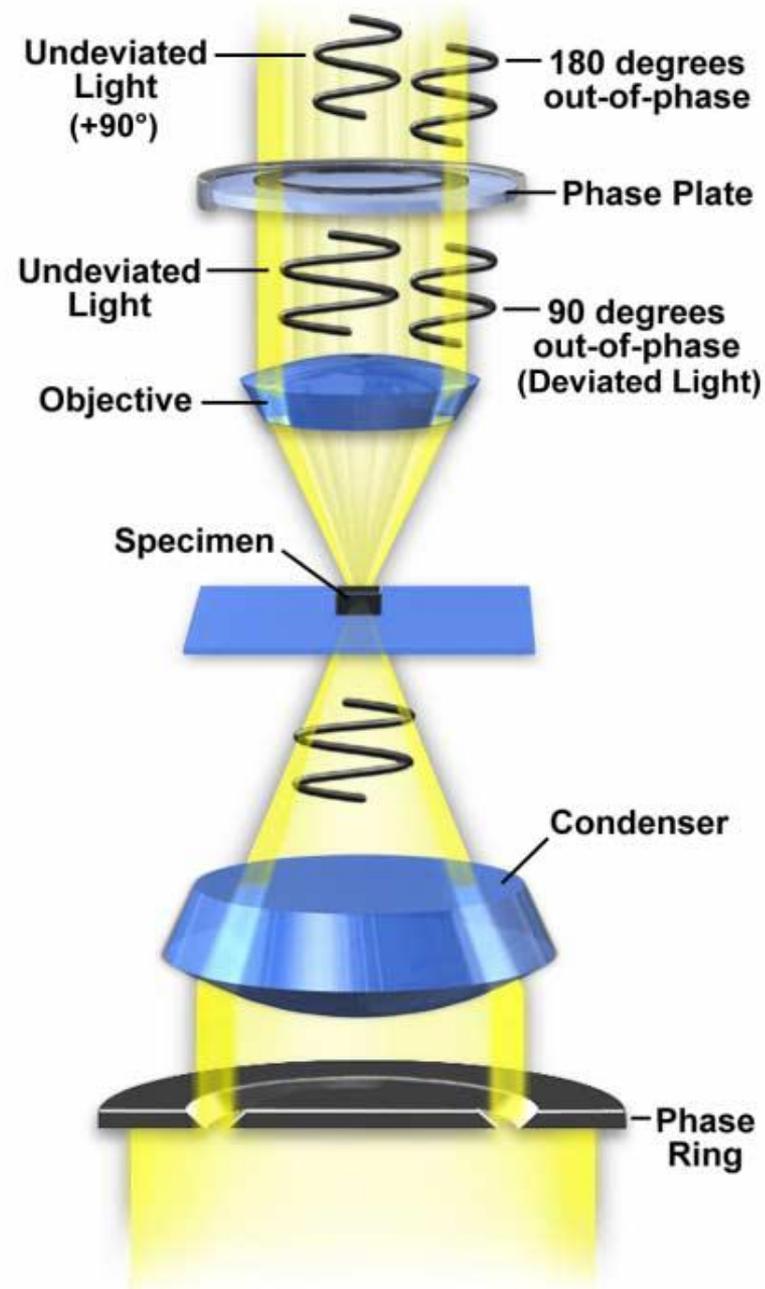
Contraste de phase



Contraste de phase



Phase Contrast Microscopy



Contraste de phase

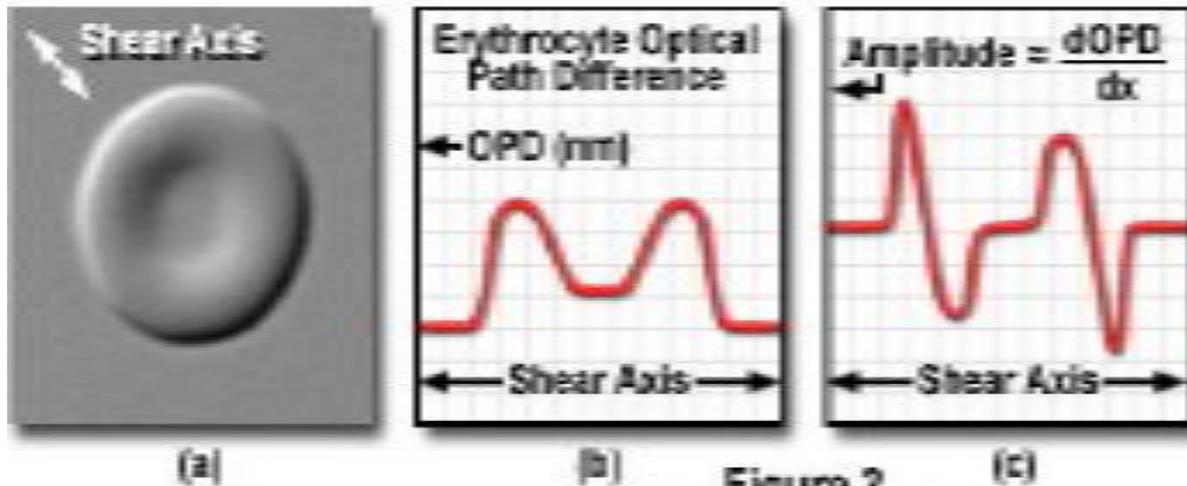


Contraste interférentiel (DIC / Nomarski)

- 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
Intensité $\sim d\text{OPD}/dX$
- **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 destructives et constructives 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

Contraste interférentiel

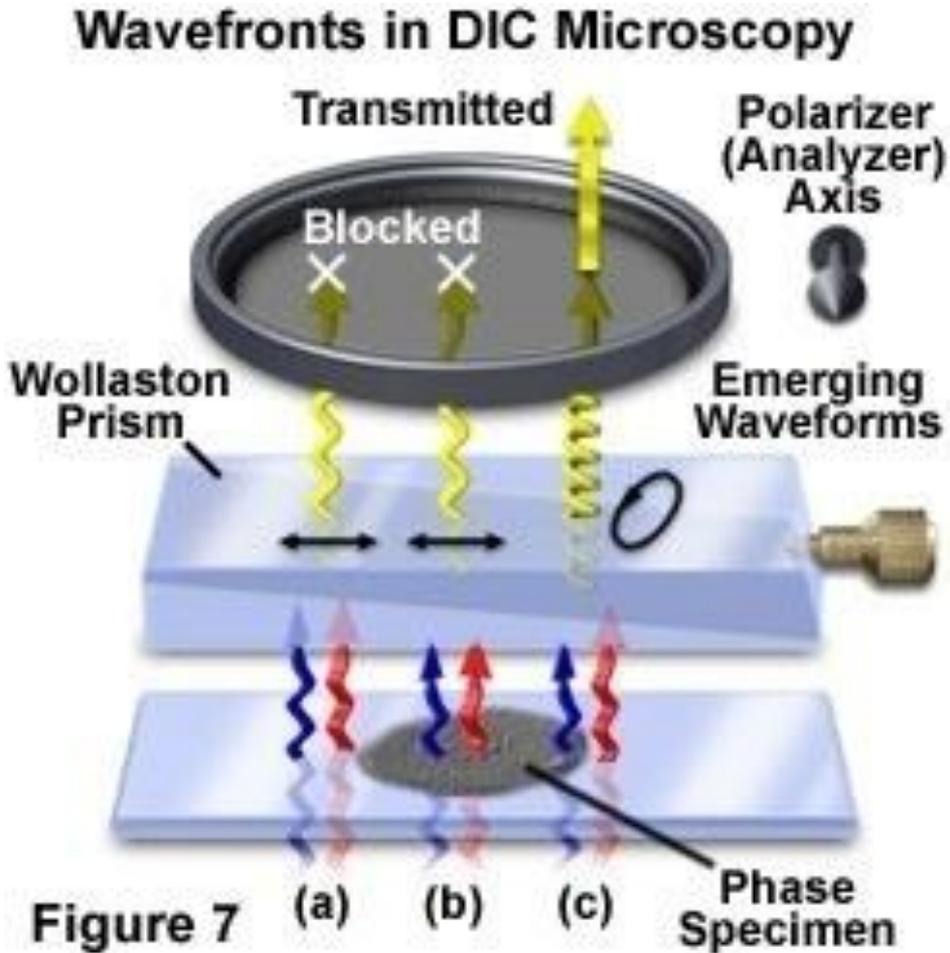
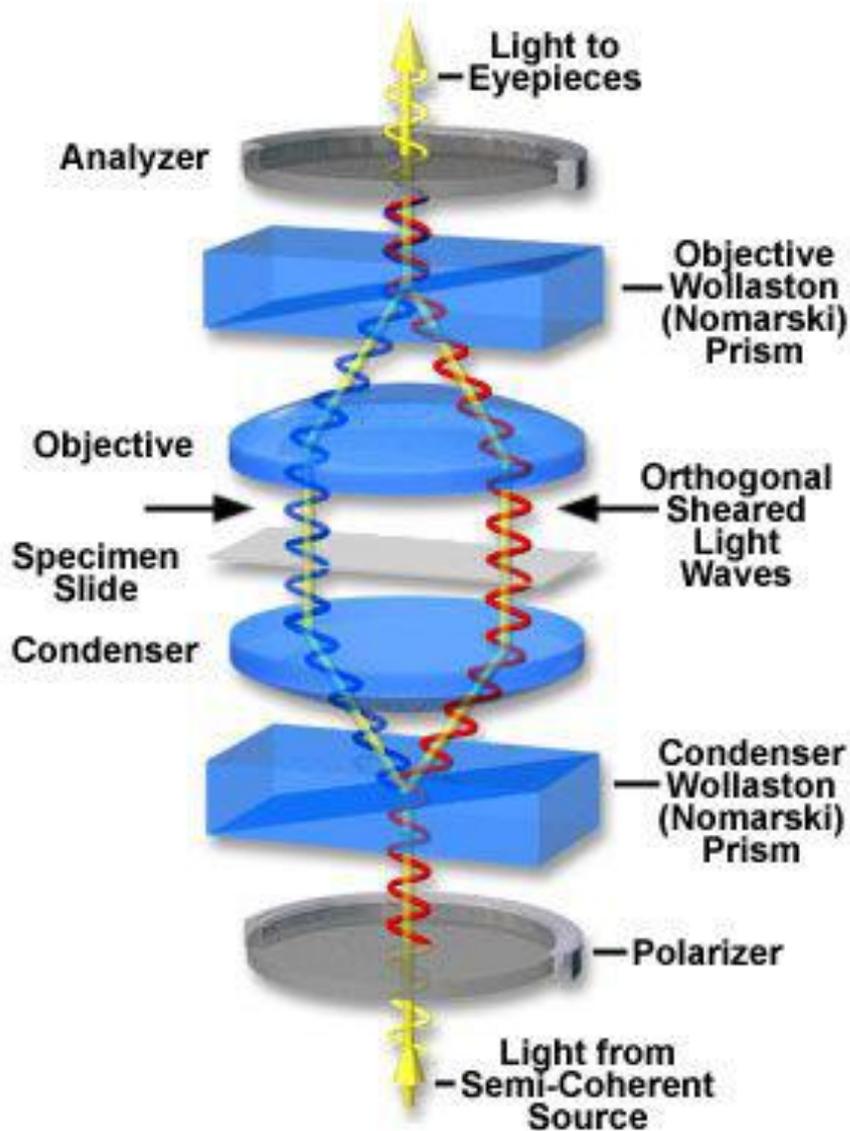
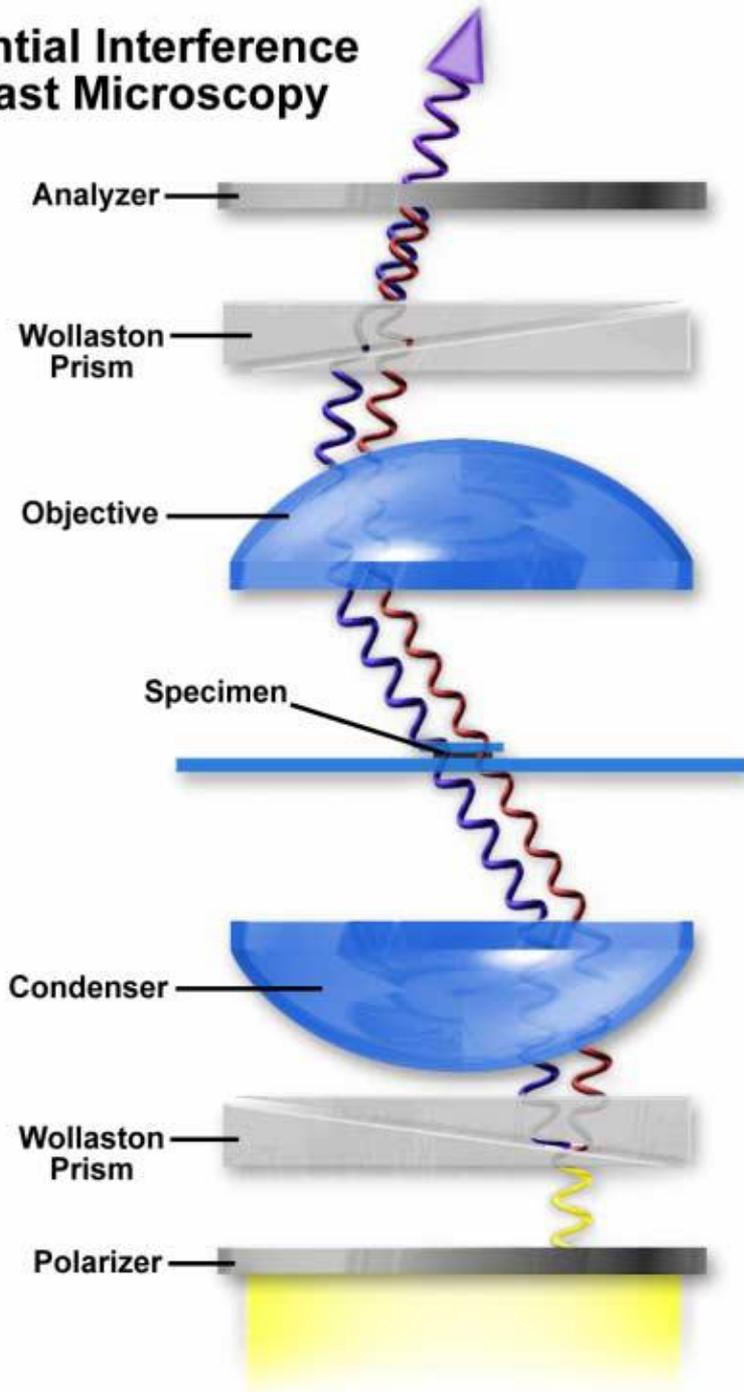


Figure 7

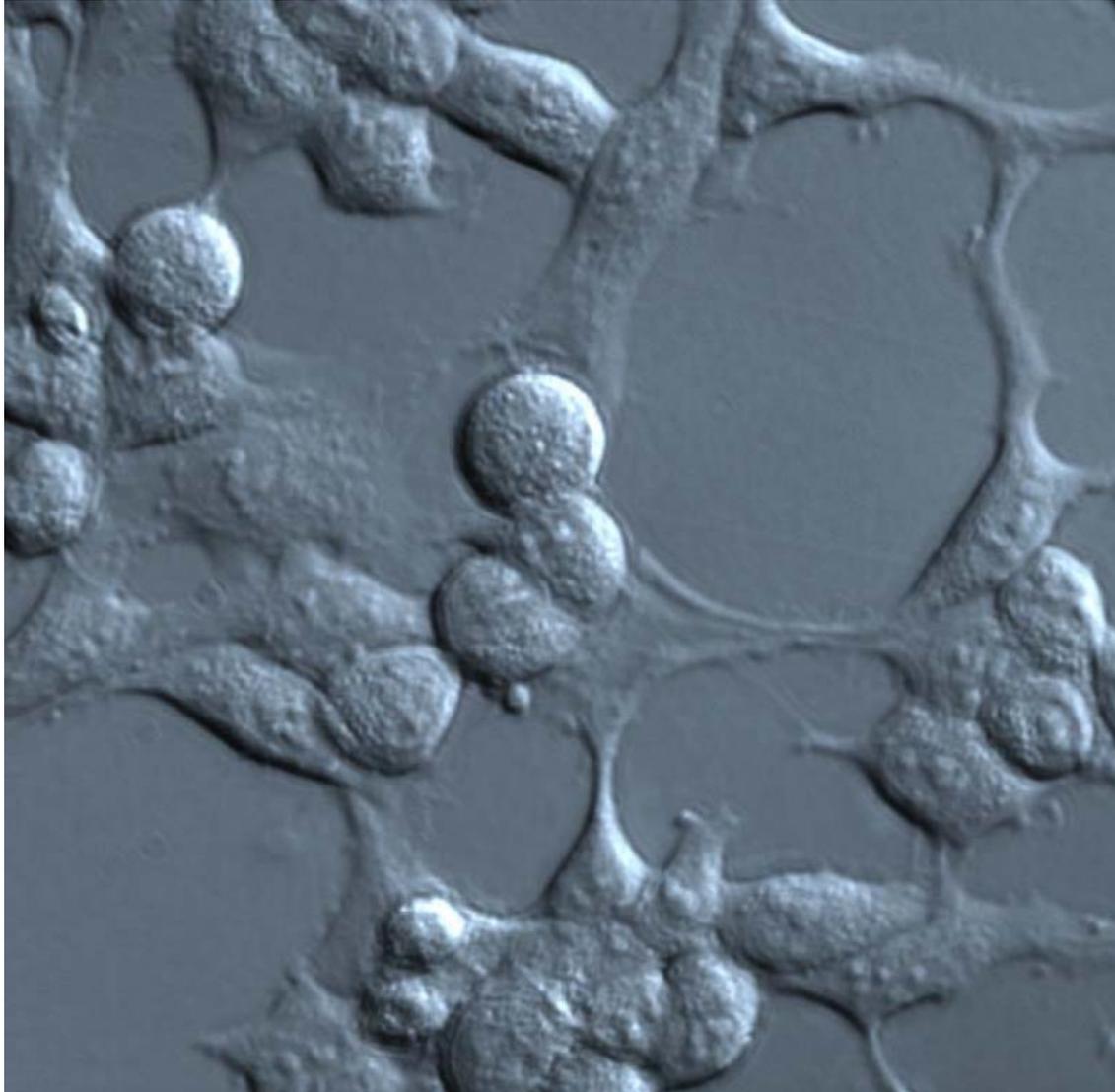
Differential Interference Contrast Microscopy



DIC



Contraste interférentiel



Transmitted Light Contrast Modes



(a)



(b)



(c)

Figure 2

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.
- Ceci permet de détecter des molécules uniques et d'en suivre la dynamique.

La fluorescence

- Lorsqu'une molécule fluorescente 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 fluorophore excité par de la lumière bleue émettra dans le vert (décalage de Stockes). En réalité, il existe une gamme de longueur d'onde 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**).

Caractéristiques de la fluorescence

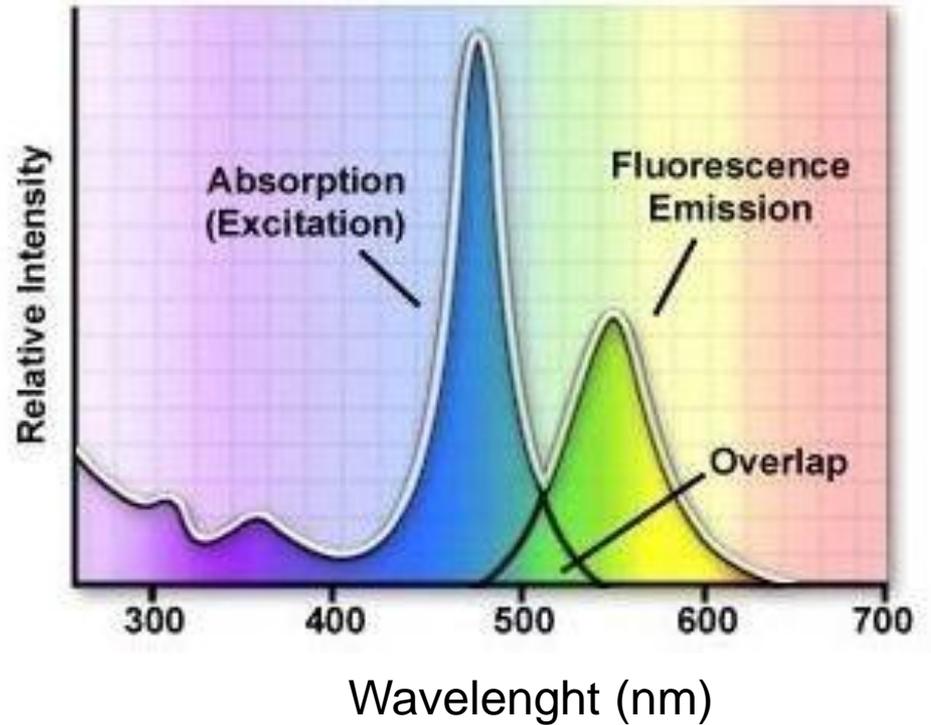
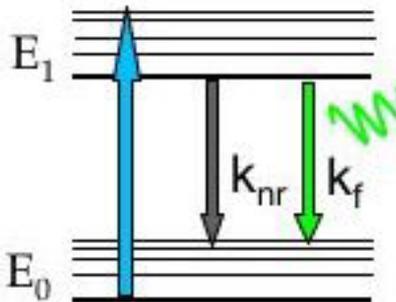
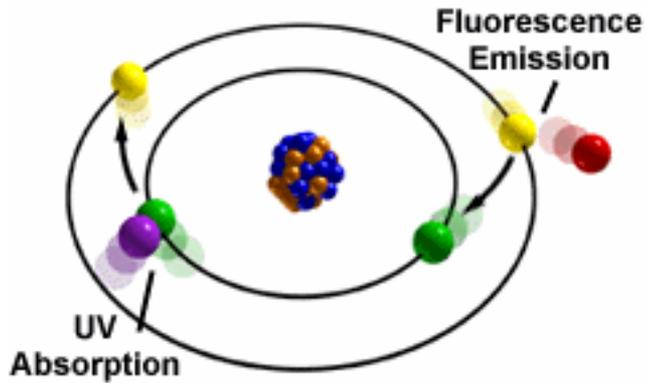
- Rendement quantique
 - Nombre de photons émis / Nb photons absorbés (compris entre 0,1 et 1)
- Coefficient d'extinction (ϵ)
 - Probabilité d'absorption d'un photon
 - Plus ϵ est élevé, plus la fluorescence est élevée (à intensité incidente et rendement quantique égaux)
- Durée de vie
 - Temps moyen 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

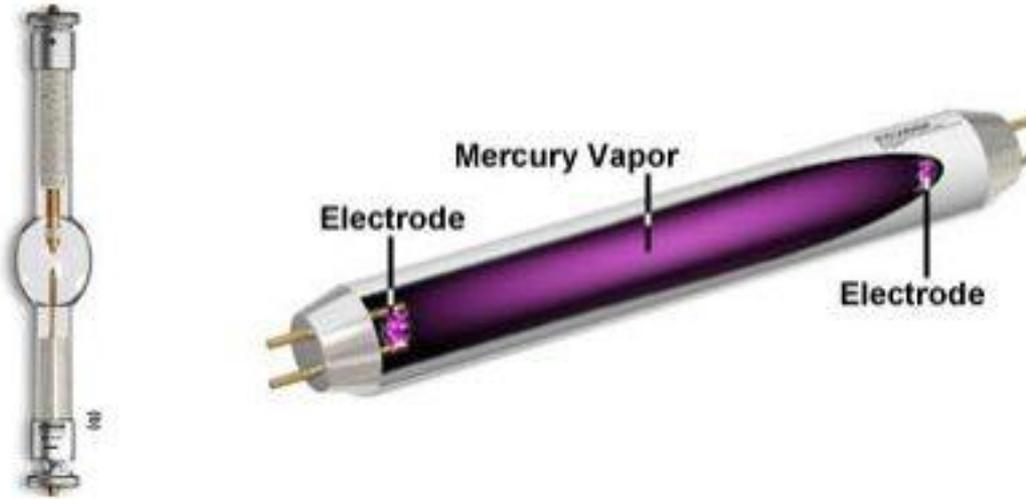
La fluorescence

Stokes' Observation



Microscope à fluorescence

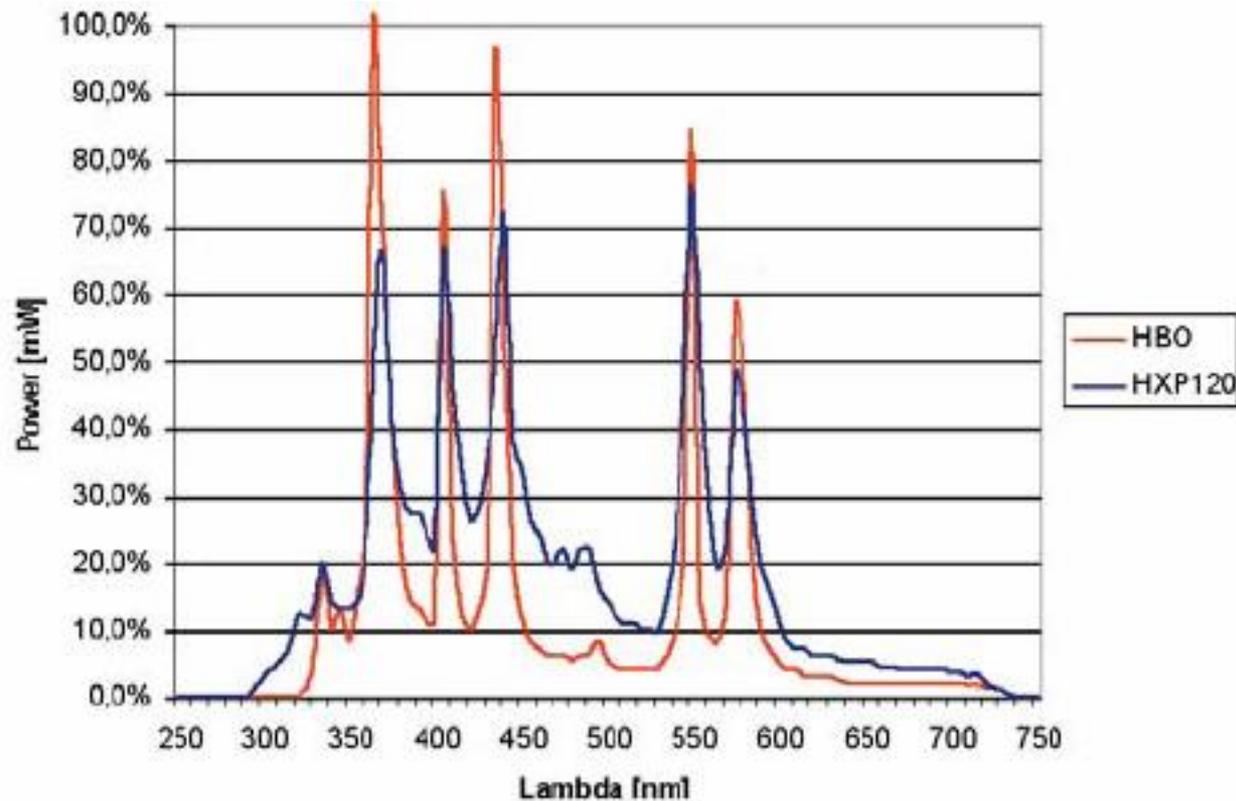
- Source de lumière : lampe à vapeur de mercure



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).

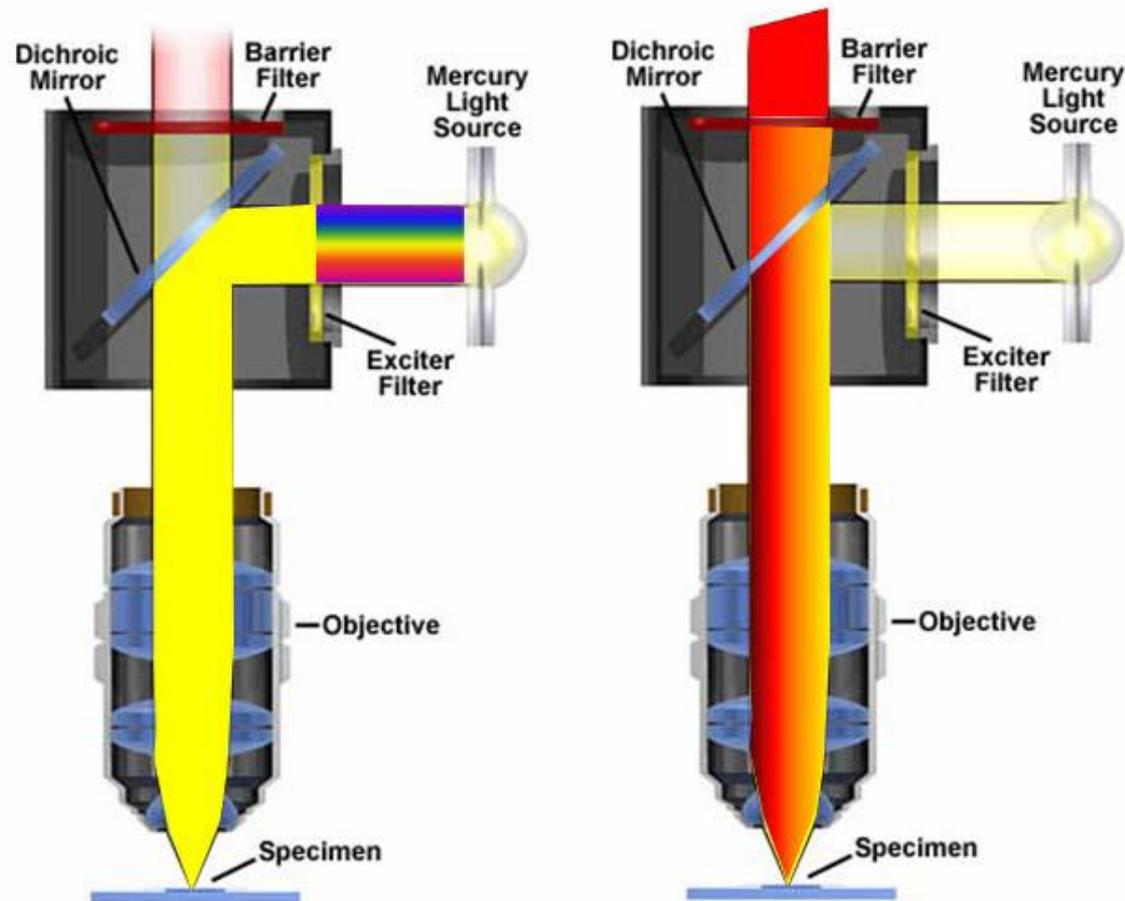
Lampe à vapeur de mercure



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

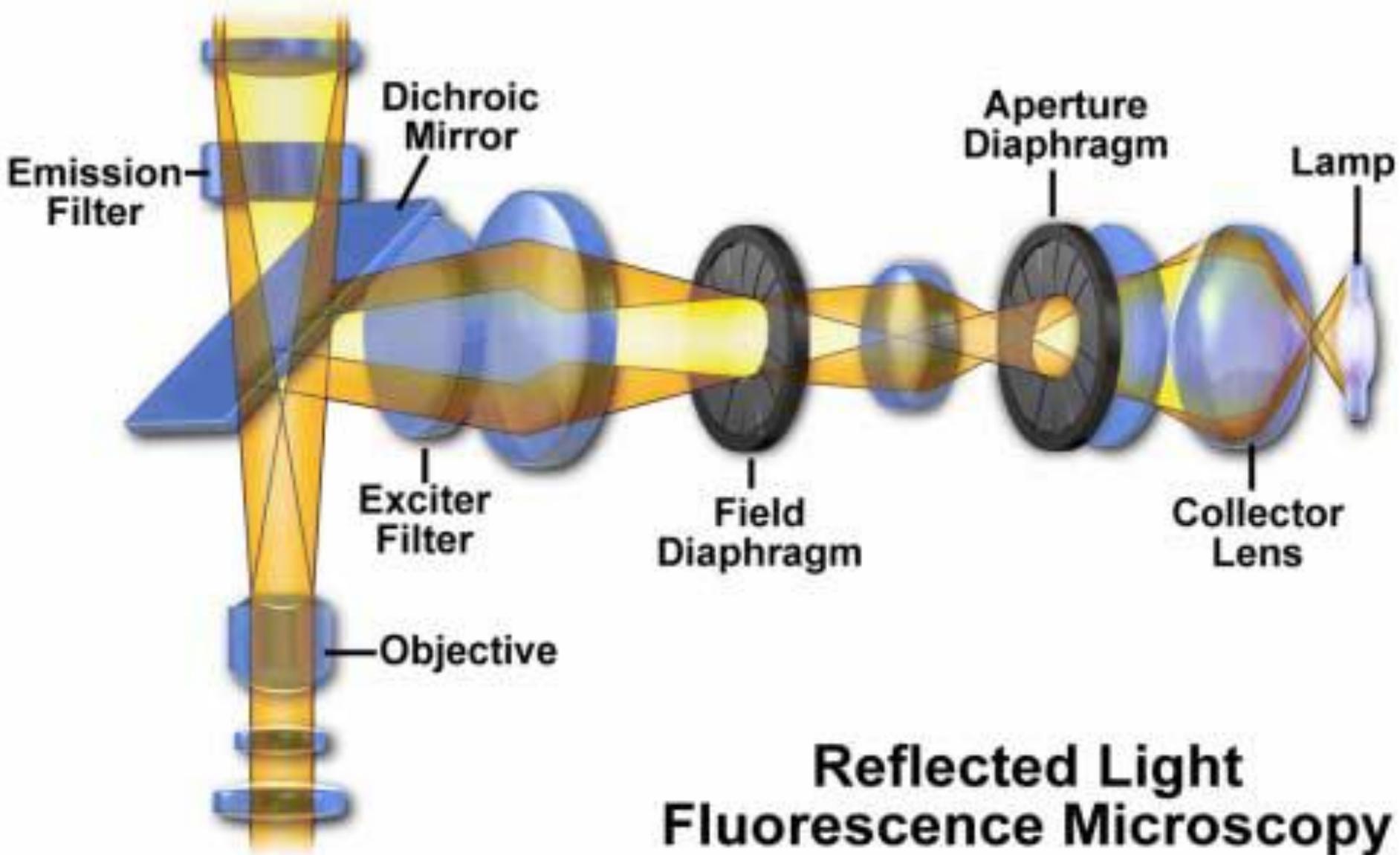
Microscope à fluorescence

Trajet optique dans un microscope en épifluorescence



Excitation

Emission

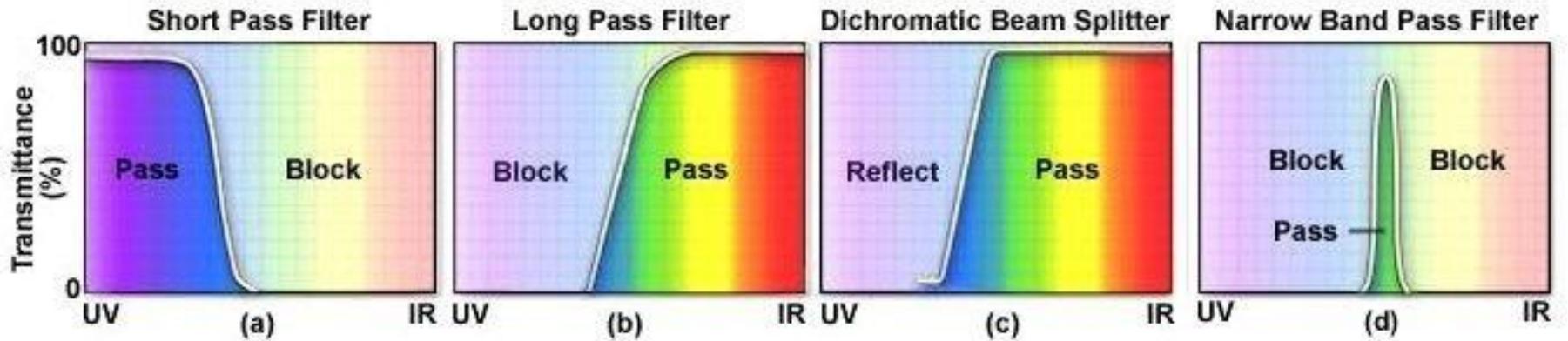


**Reflected Light
Fluorescence Microscopy**

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

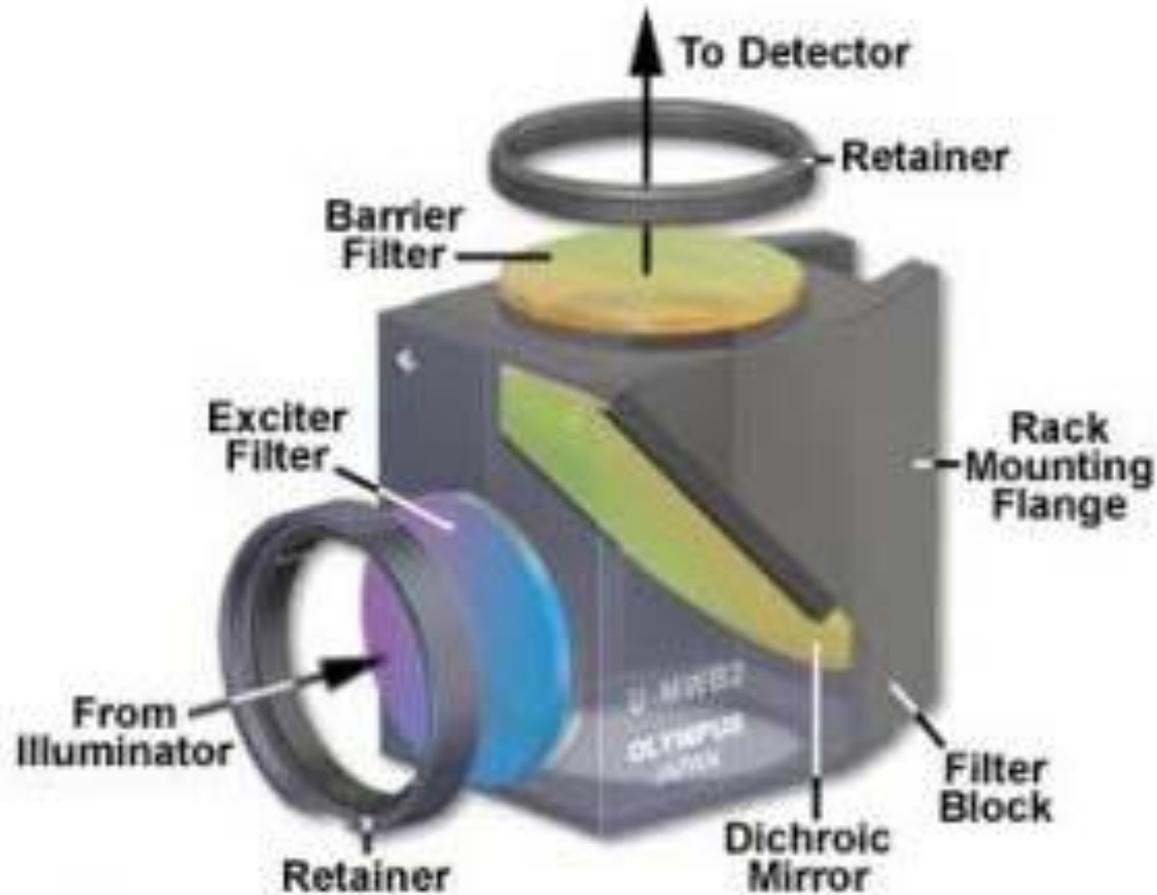


Les 4 différents types de filtres

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.

Filtres

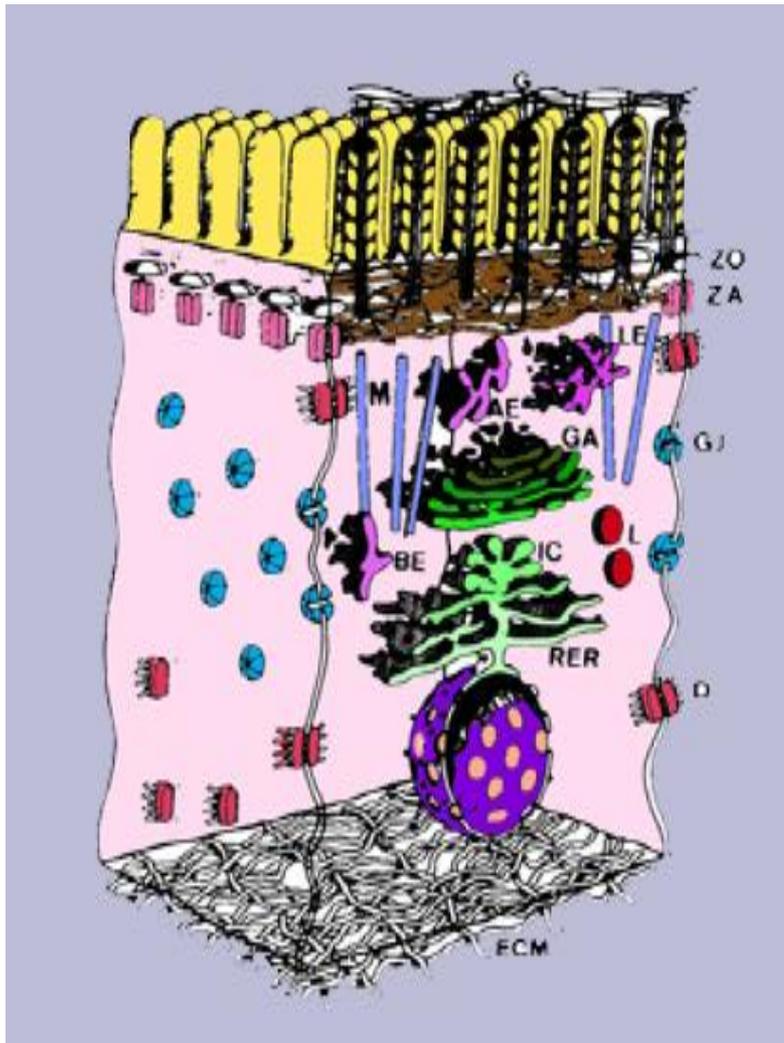


Cube à filtres pour la fluorescence

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 : C₁₆H₁₇Cl₂N₅
- PM : 350.25
- Spectres : Spectres d'absorption et d'émission du DAPI lié à l'ADN (voir schéma).

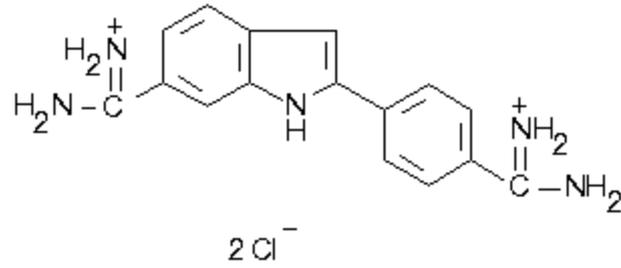
- **FITC** :

- 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 : C₂₁H₁₁NO₅S
- PM : 389.38
- Spectres : Spectres d'absorption et d'émission du FITC à pH 9.

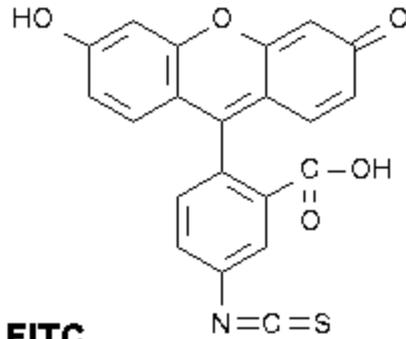
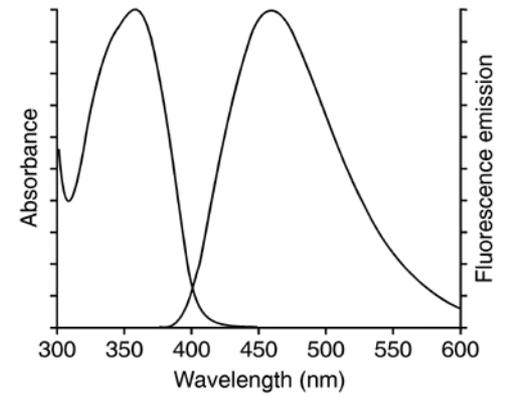
- **RHODAMINE** :

- Nom : Rhodamine 123
- Formule : C₂₁H₁₇ClN₂O₃
- PM : 380.83
- Spectres : Spectres d'absorption et d'émission de la rhodamine 123 dans le méthanol.

DAPI

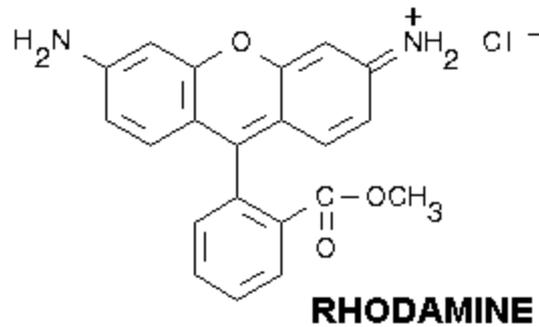
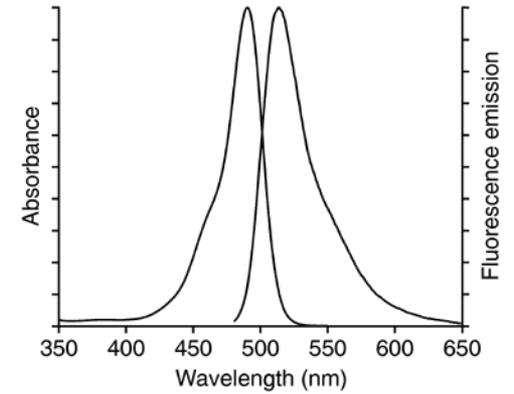


DAPI



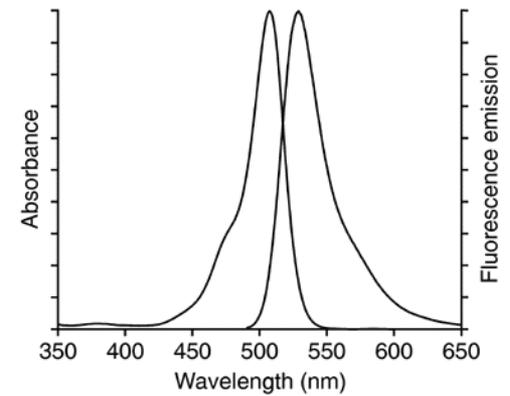
FITC

FITC

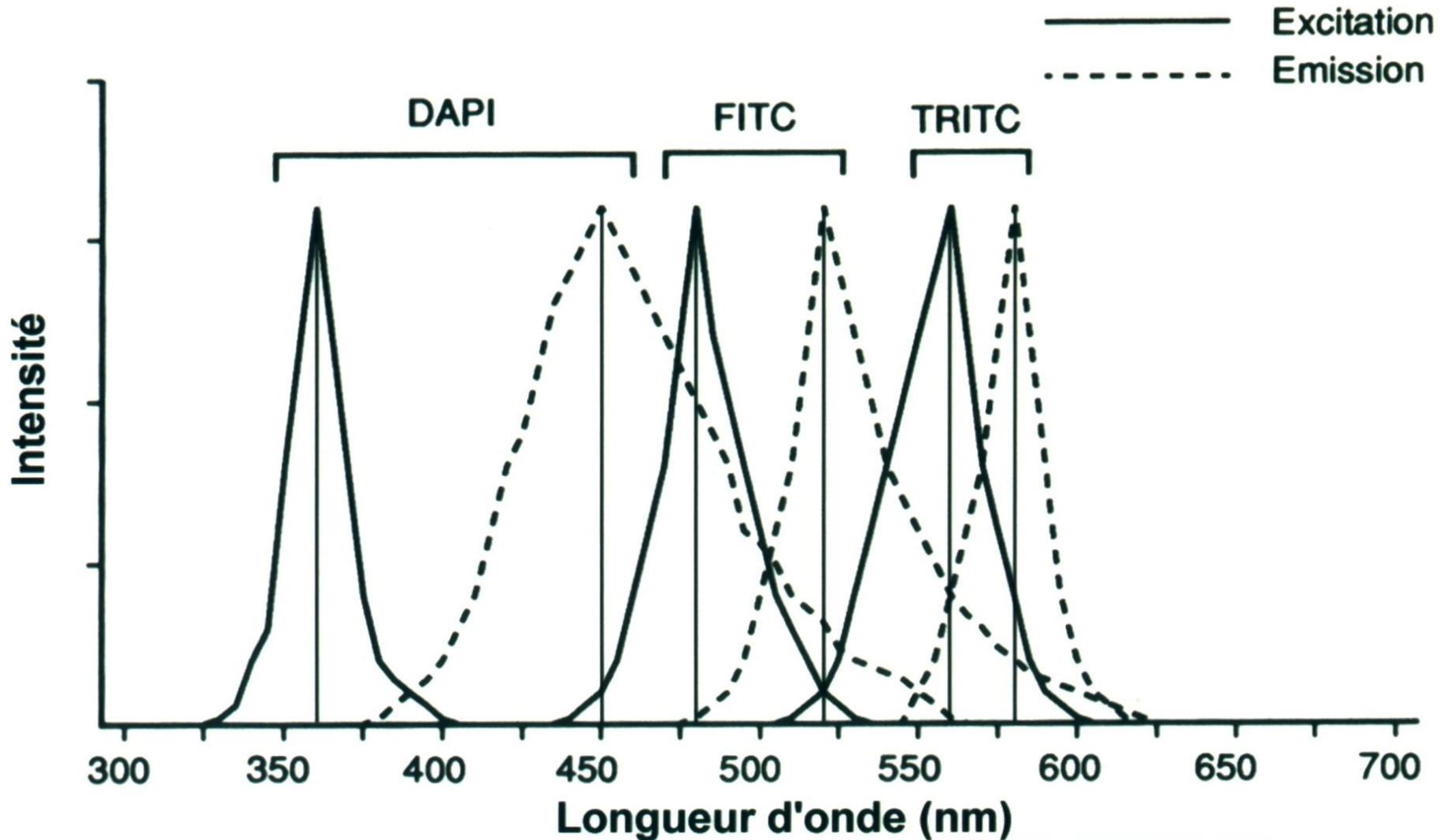


RHODAMINE

RHODAMINE



Fluorochromes : DAPI, FITC, TRITC



U.V.



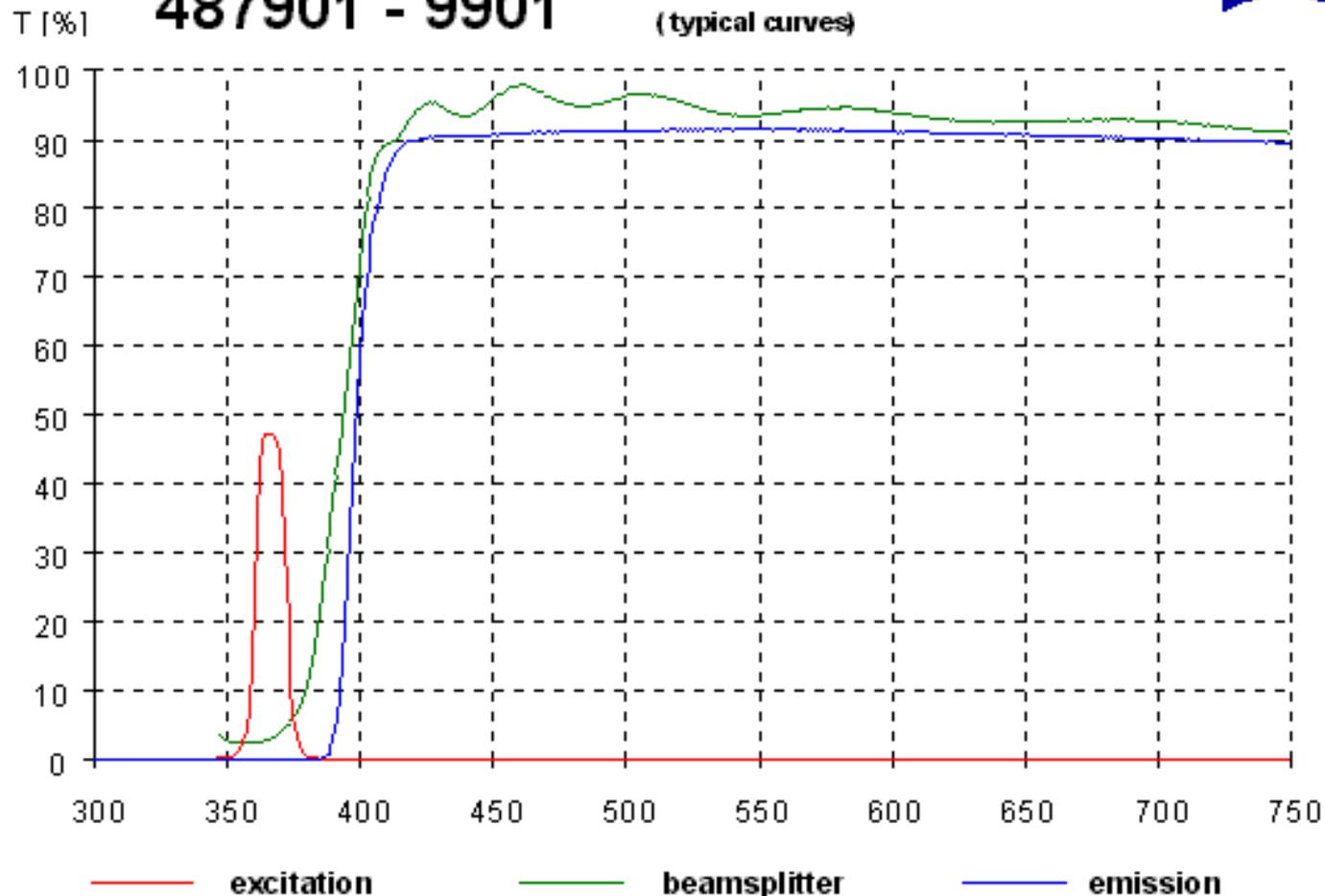
VISIBLE

I.R.

Bloc filtres DAPI

Filter set 01
487901 - 9901

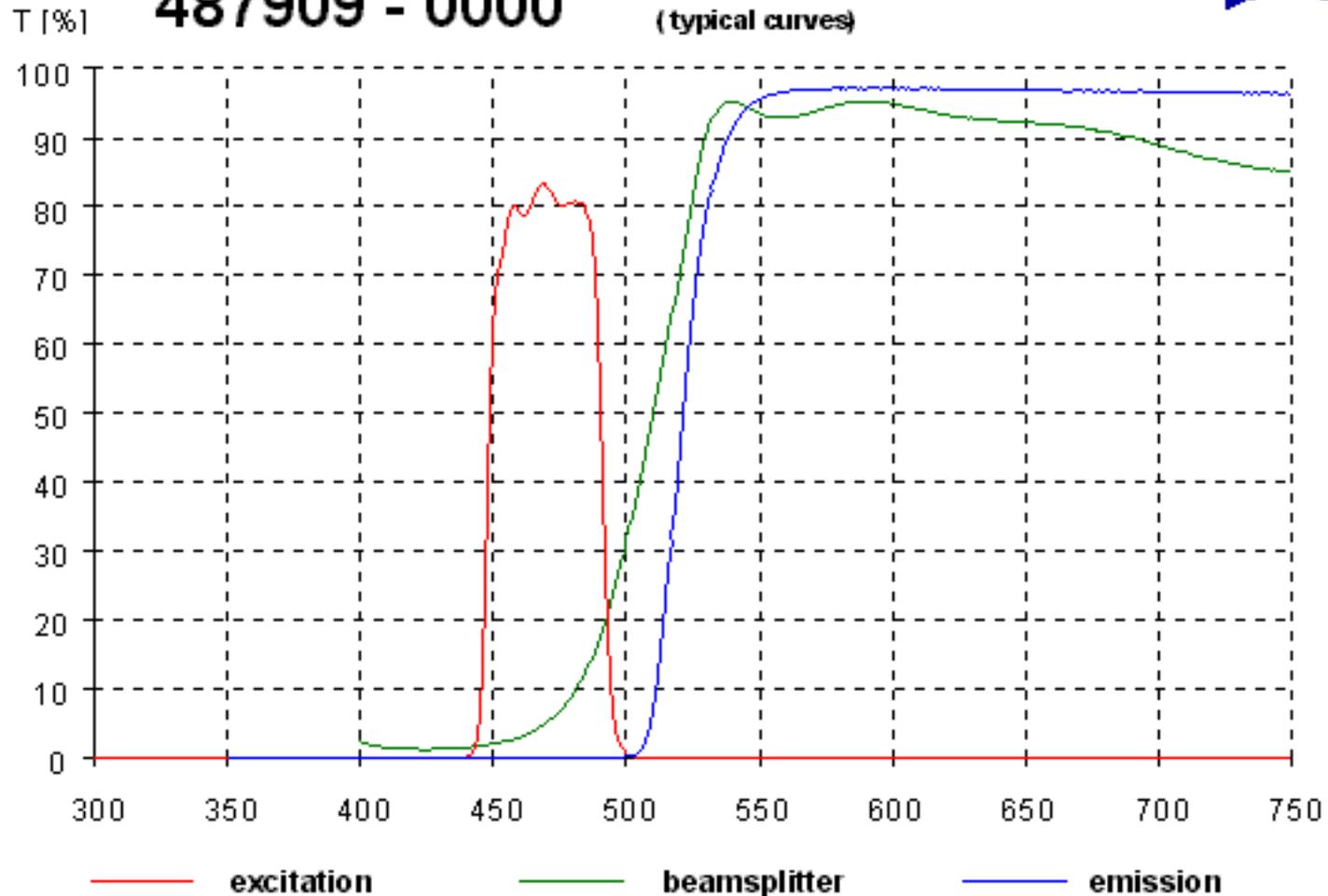
excitation: BP 365 / 12
beamsplitter: FT 395
emission: LP 397
(typical curves)



Bloc filtres FITC

Filter set 09
487909 - 0000

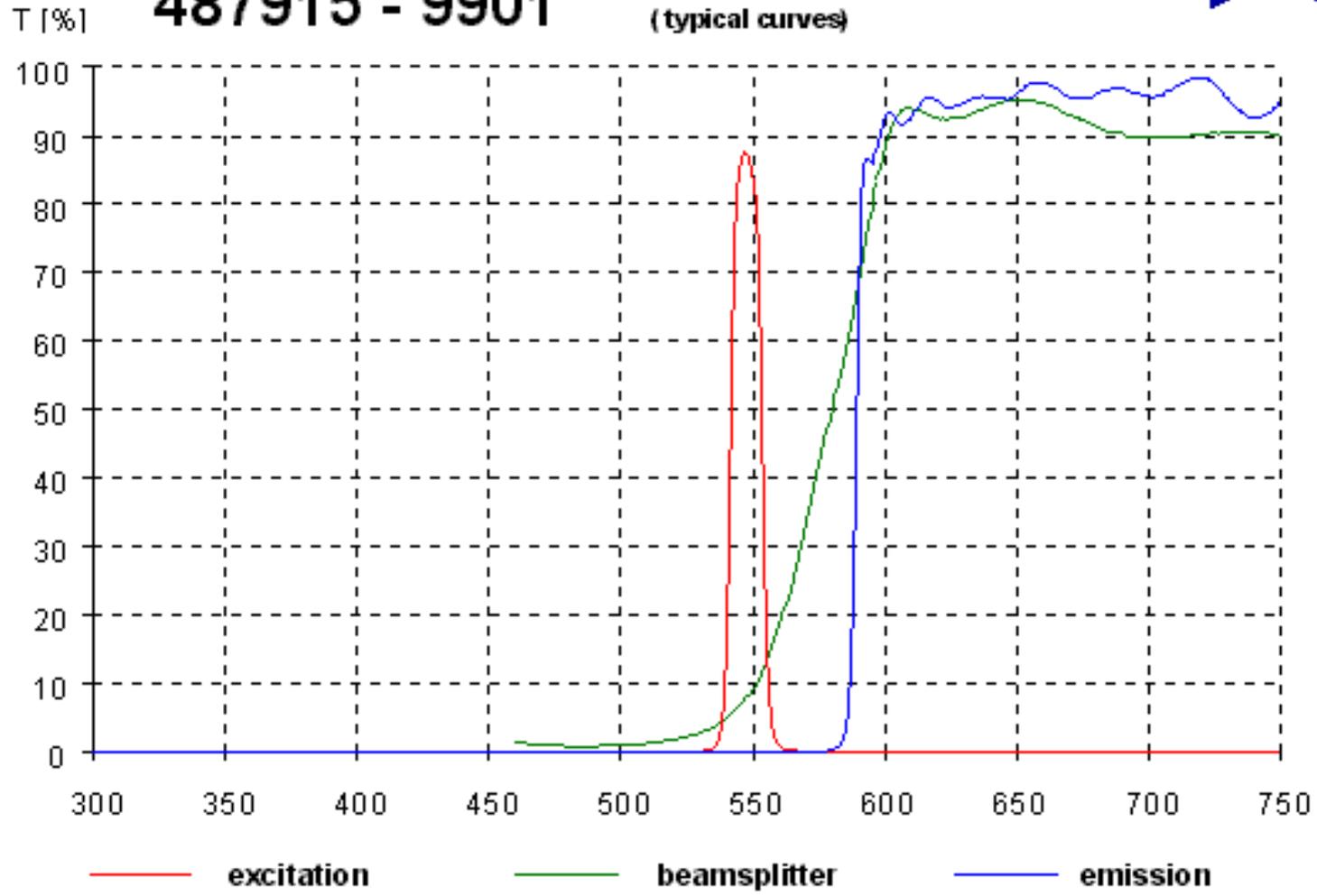
excitation: BP 450 - 490
beamsplitter: FT 510
emission: LP 520
(typical curves)



Bloc filtres Rhodamine 123

Filter set 15
487915 - 9901

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

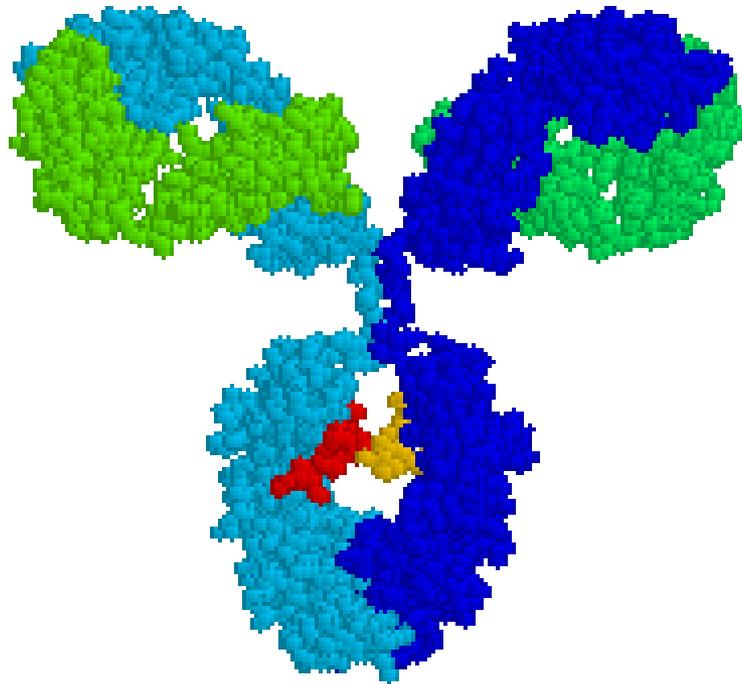


Fluorochromes

- ***Recouvrement des spectres d'émission***
 - Prendre d'autres fluorophores
 - Faire des **acquisitions séquentielles** dans le temps avec changement de configuration
 - 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.



Green Fluorescent Protein (GFP)

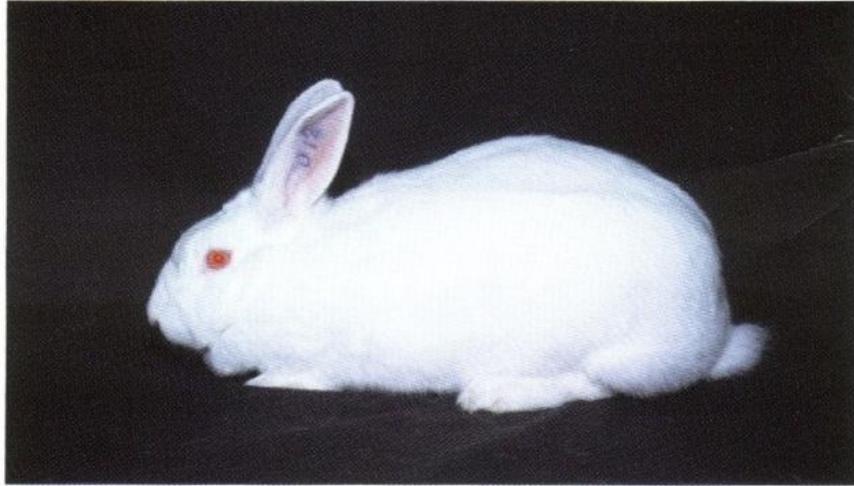


Fig. 17 Cette lapine transgénique, conçue par des biologistes de l'INRA, émet une fluorescence jaune-vert sous rayonnement ultraviolet (cliché B. Nicolas © INRA).

Green Fluorescent Protein

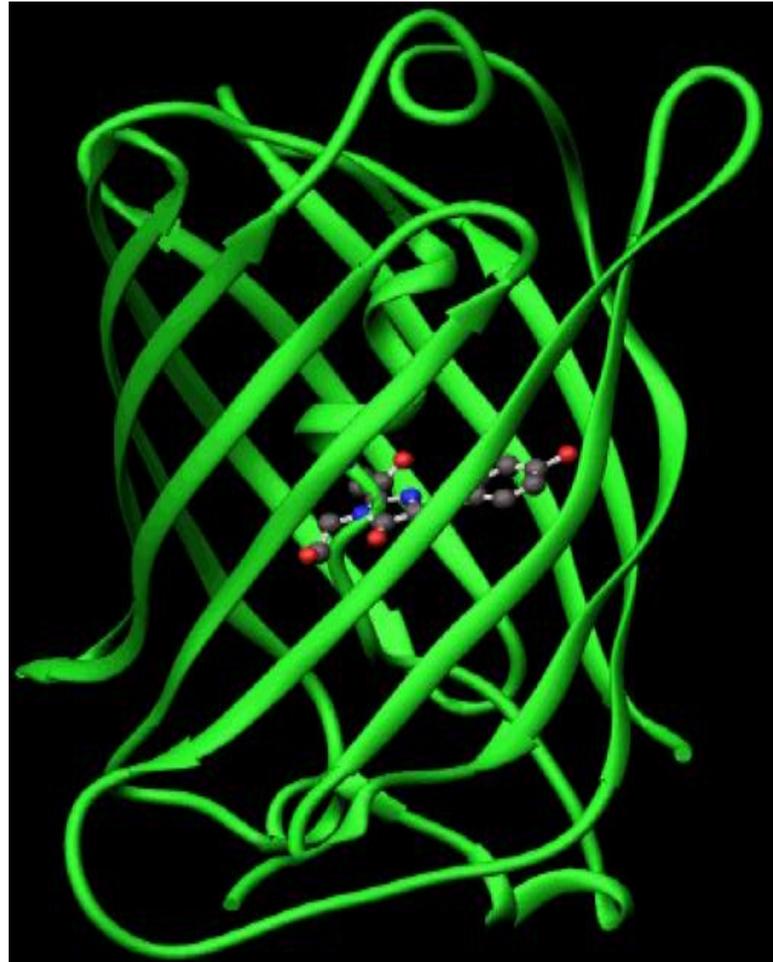
- **1962** Découverte de la GFP (Shimomura et al.)
- **1992** Clonage du gène pour la GFP (Prasher et al.)
- **1994** Expression dans autres organismes (Chalfie et al.,
(C. elegans et E.coli) Inoué et Tsuji)
- **1996** Optimisation de l'usage des codons,
Augmentation de la thermo-stabilité (Yang et al.)
Amélioration de la maturation à 37°C
- **1997** Elimination d'un intron cryptique (Haseloff et al.)
pour utilisation dans les plantes
-Variants spectraux, protéines fluorescents
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 et O₂. En complexe, elle excite ainsi par transfert d'énergie non radiatif la GFP, laquelle émet ensuite de la lumière verte.**

GFP

La GFP est constituée de 238 acides aminés en 11 « β -sheets » et une α -hélice centrale. L'ensemble forme un protéine de 28 kDa avec une structure appelé β -tonneau. Les extrémités N-terminal et C-terminal sont accessible à la liaison avec autres protéines.



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 α 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.

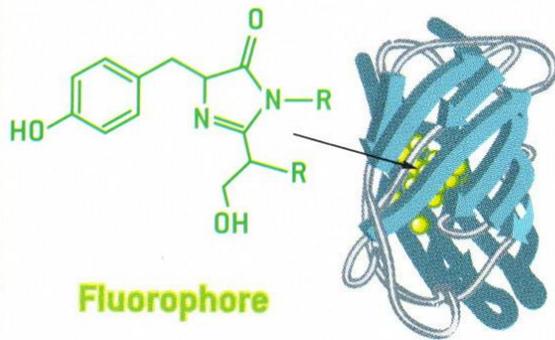
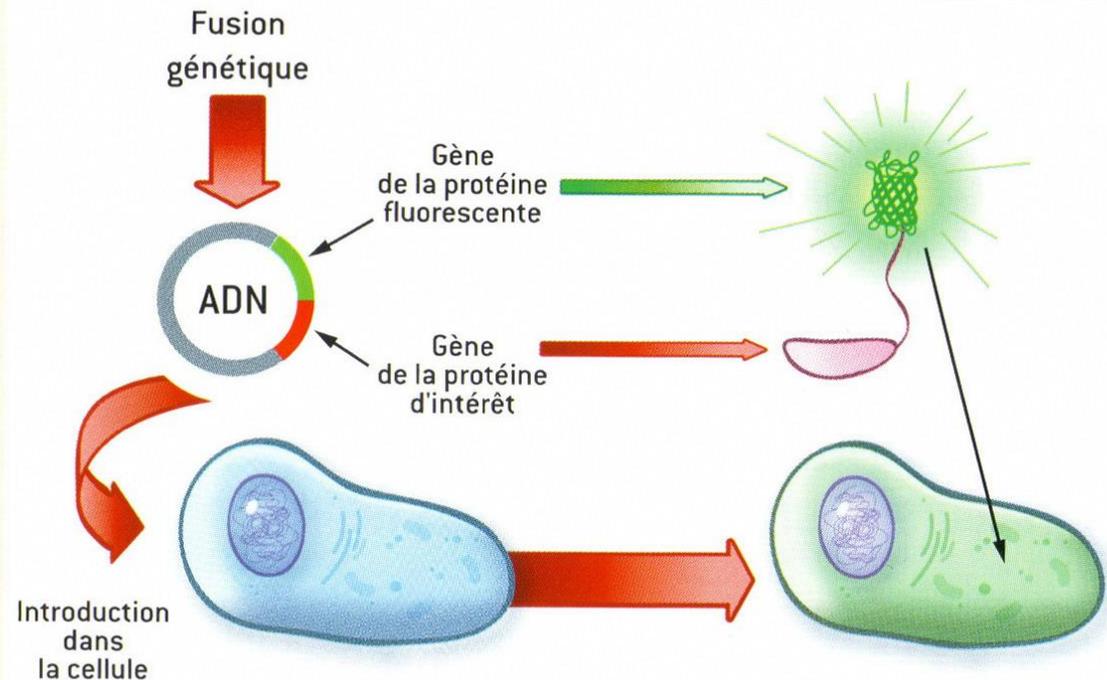
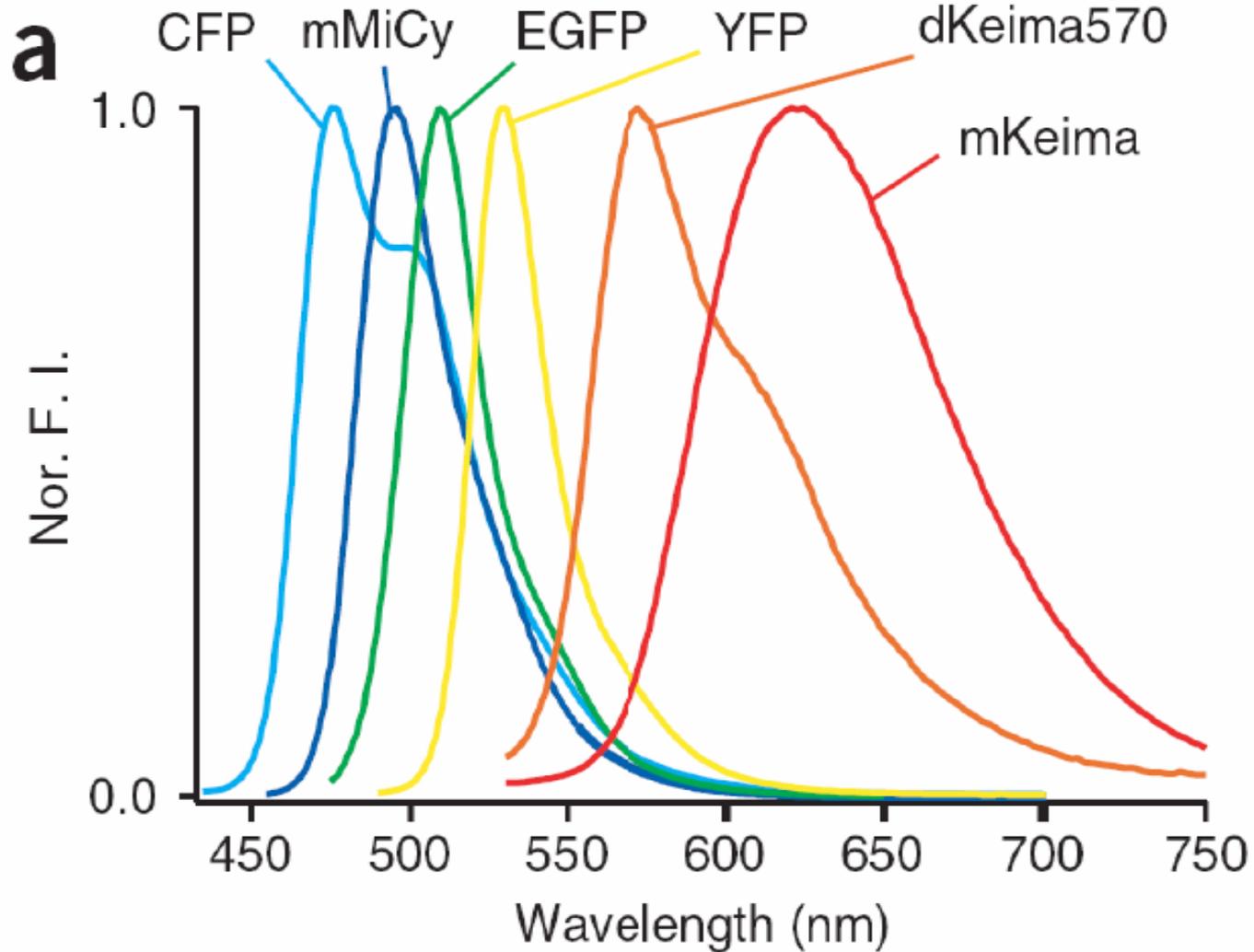


Fig. H1 Structure et localisation du fluorophore responsable de la fluorescence de la GFP.

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.

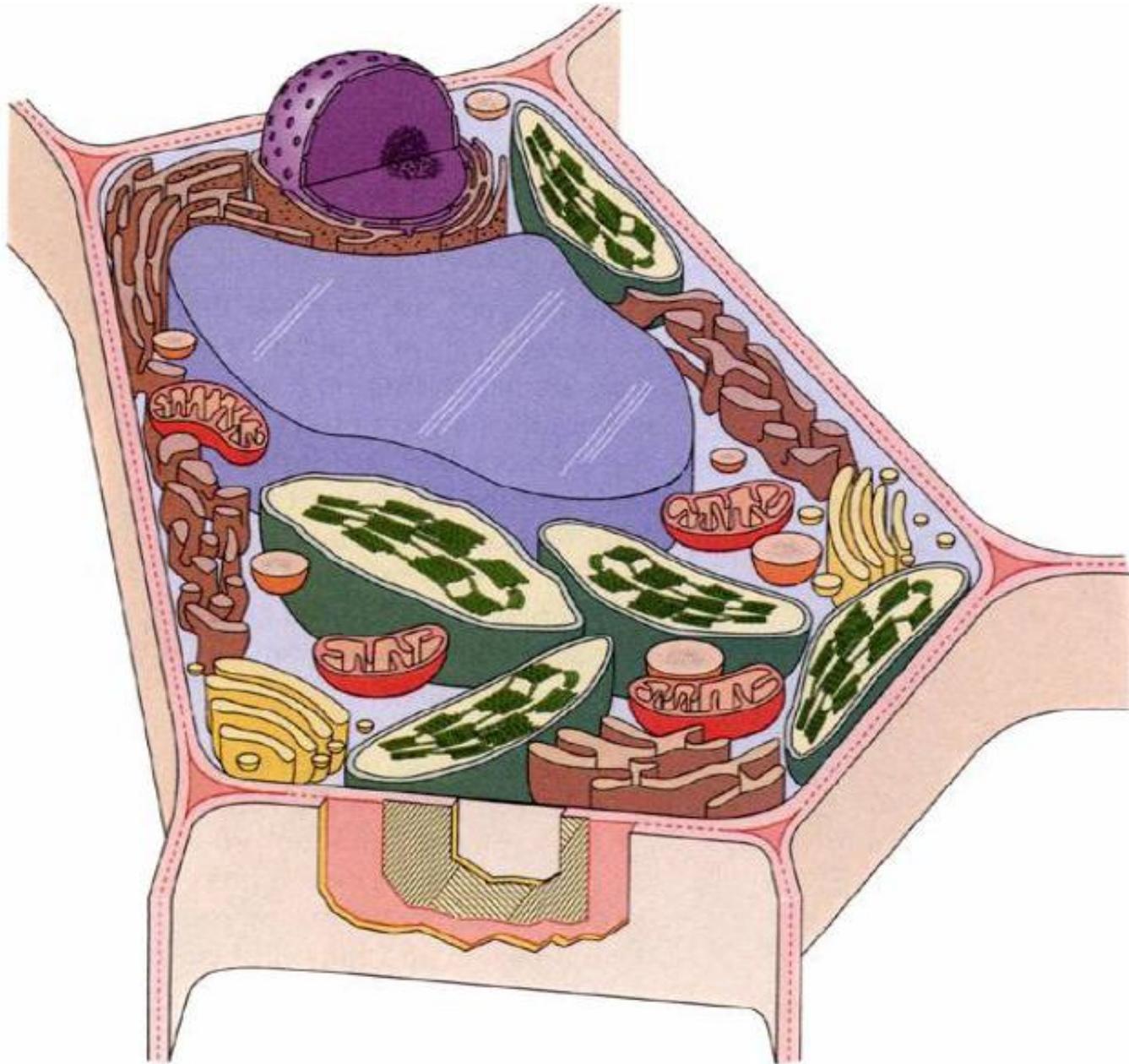


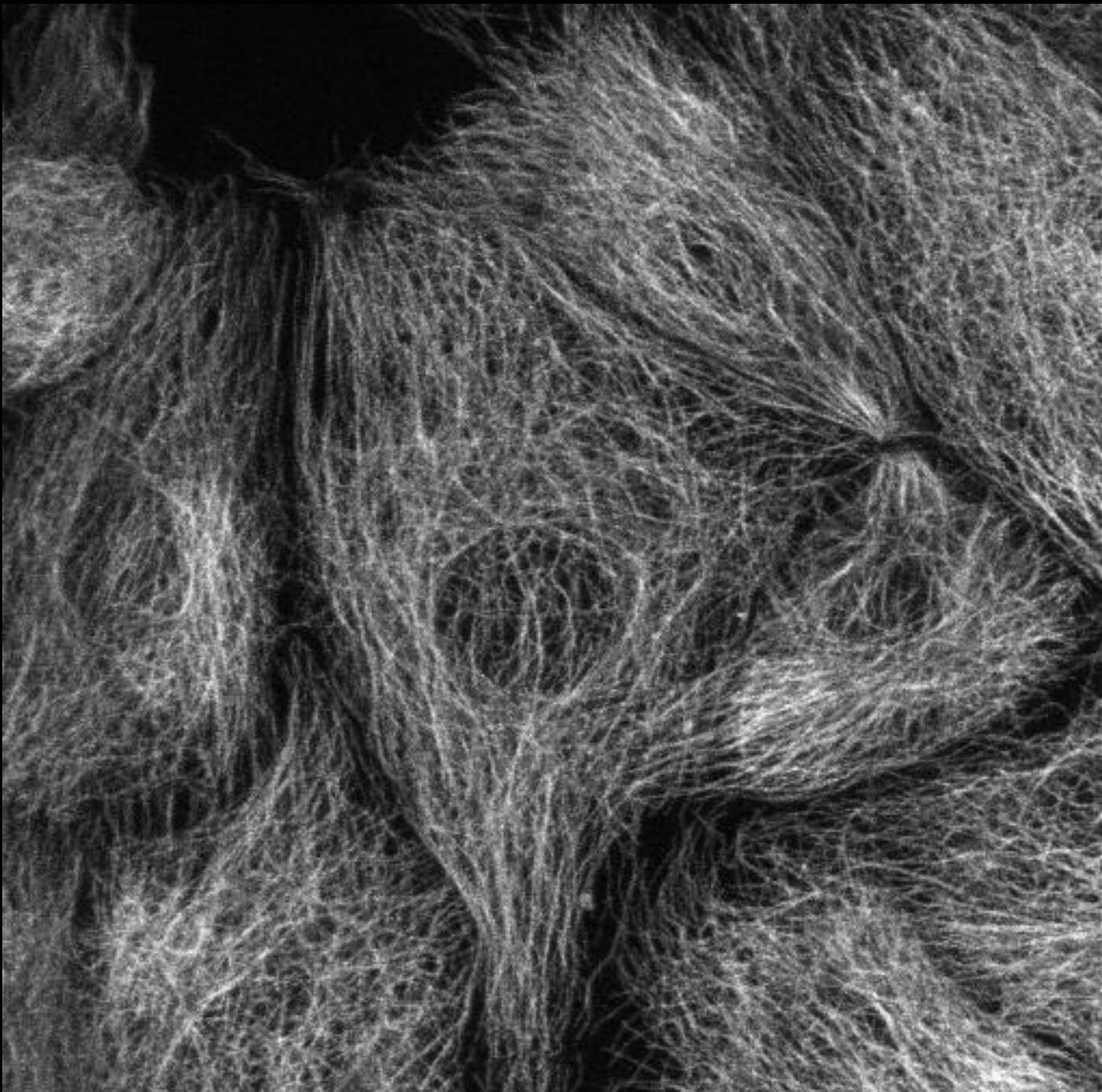
GFP et dérivés

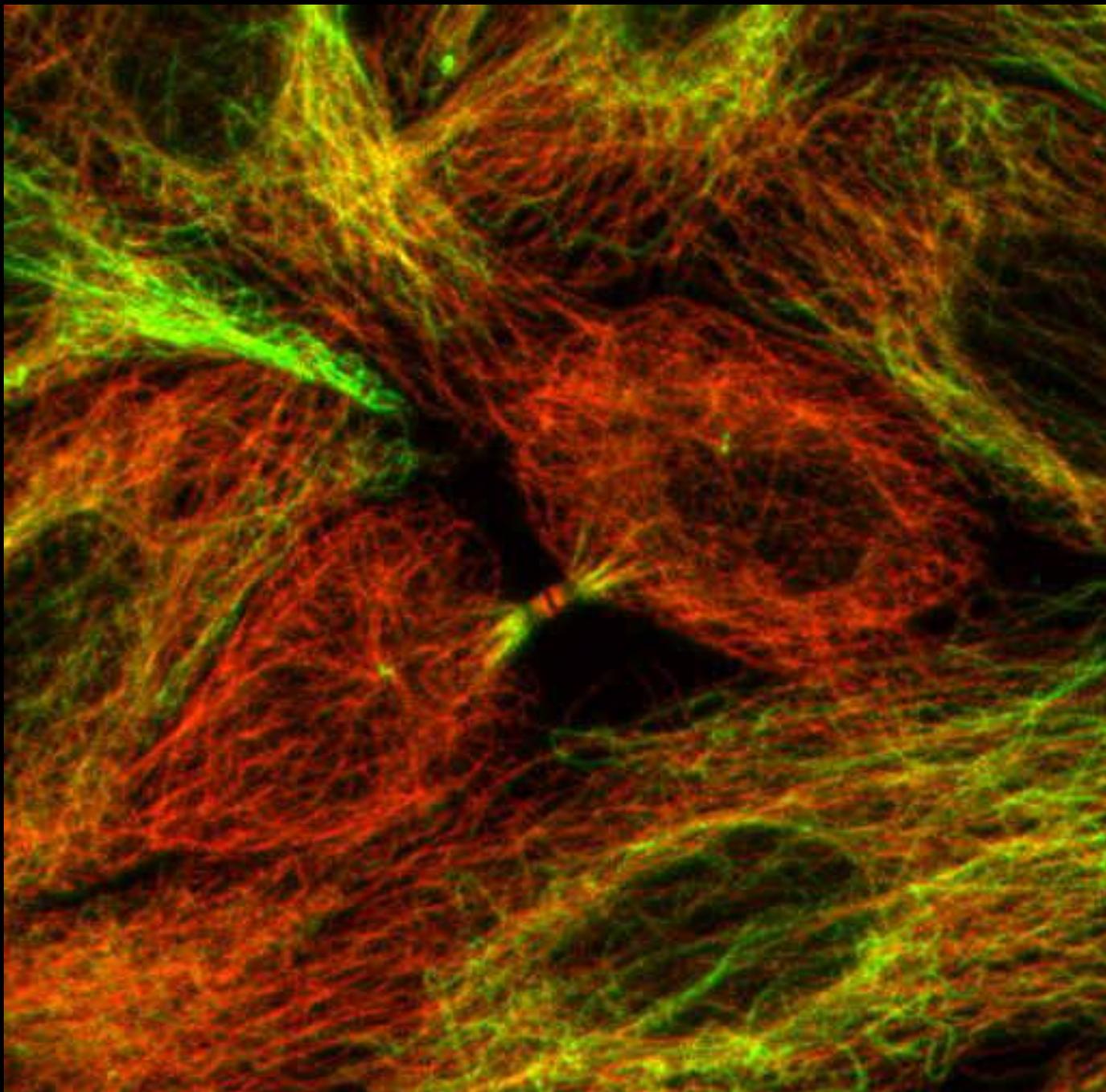


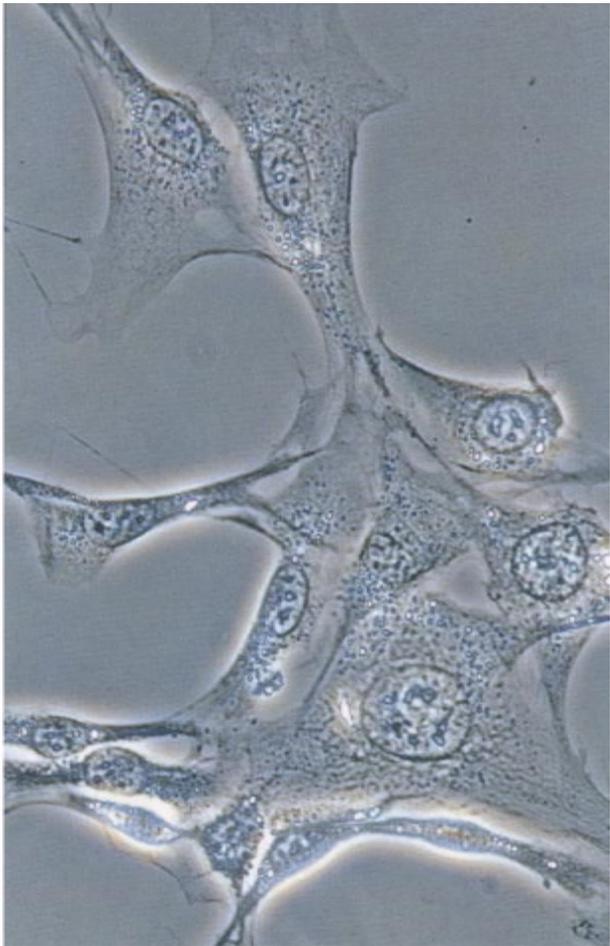
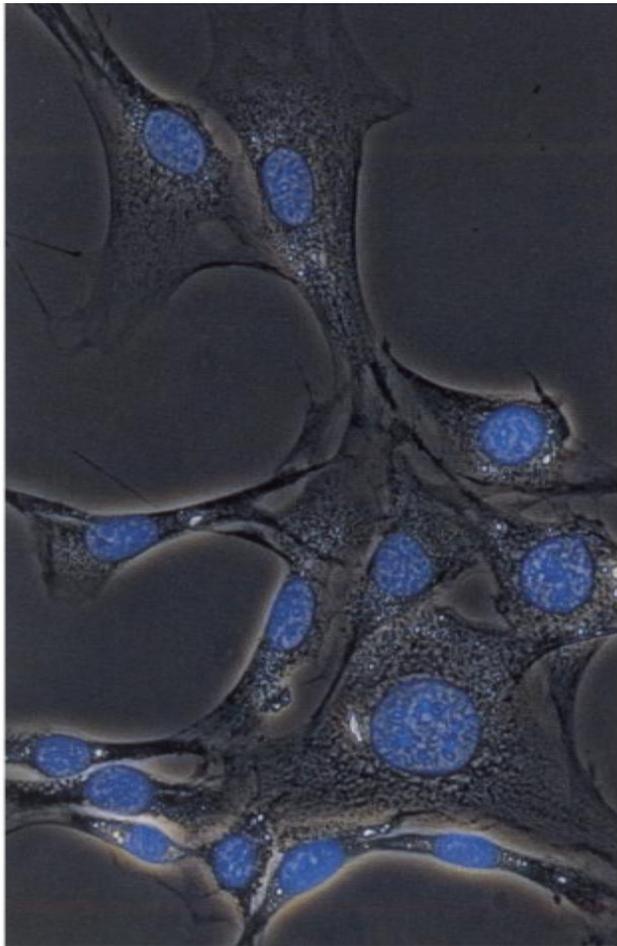
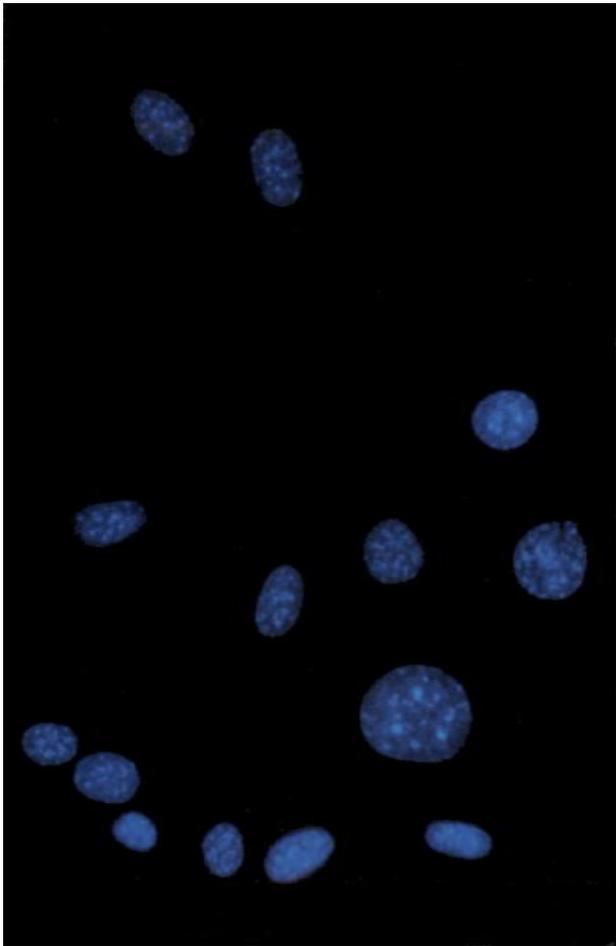
Applications

- **Co-localisation**
- **Localisation sub-cellulaire**
- **Dynamique du transport**
- **Interactions protéiques**

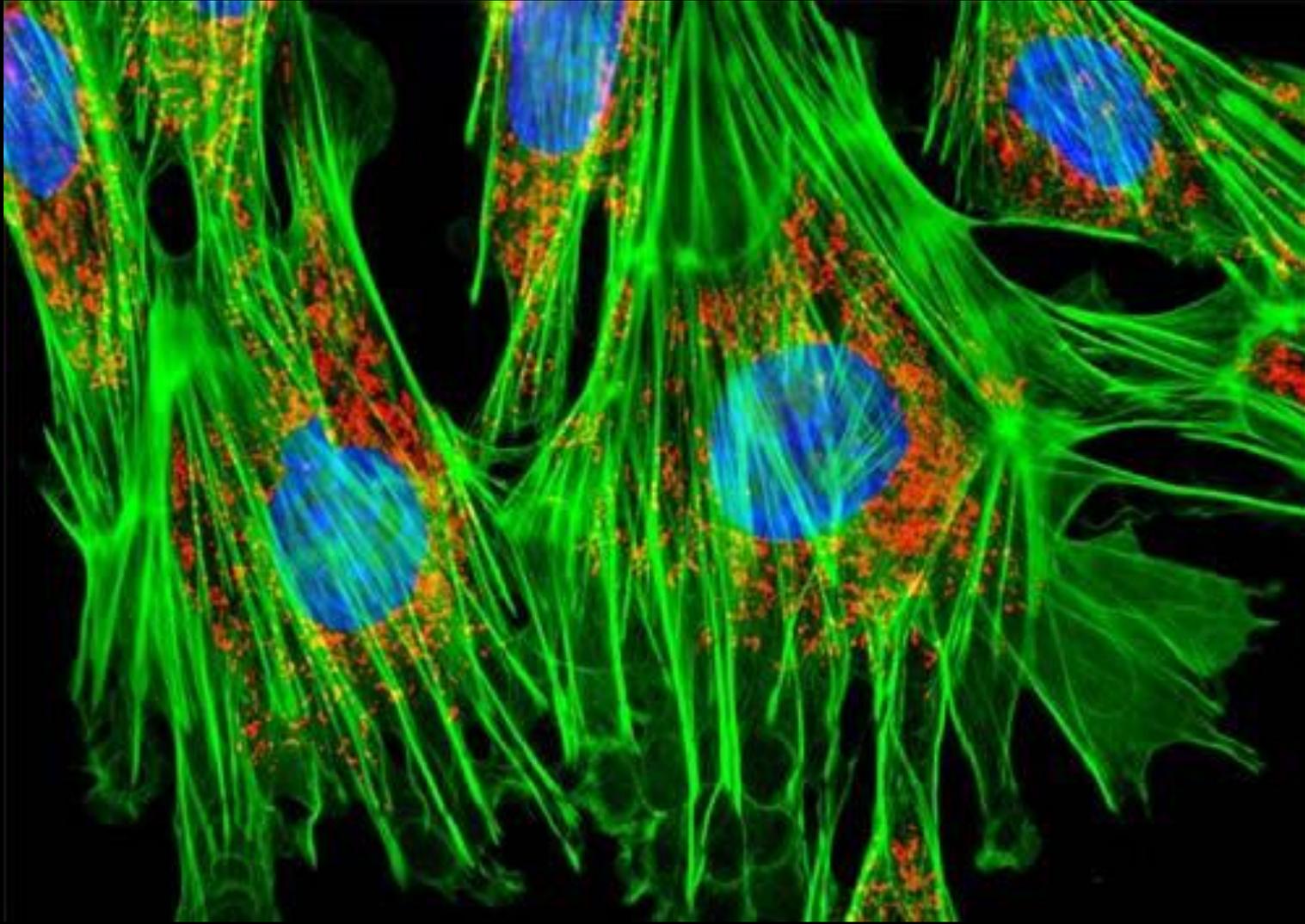








Images en fluorescence



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

