

# Videomicroscopie

## Applications à la biologie cellulaire

# Fluorescence Microscope with Digital Camera



Figure 1

## Live-Cell Imaging Configuration

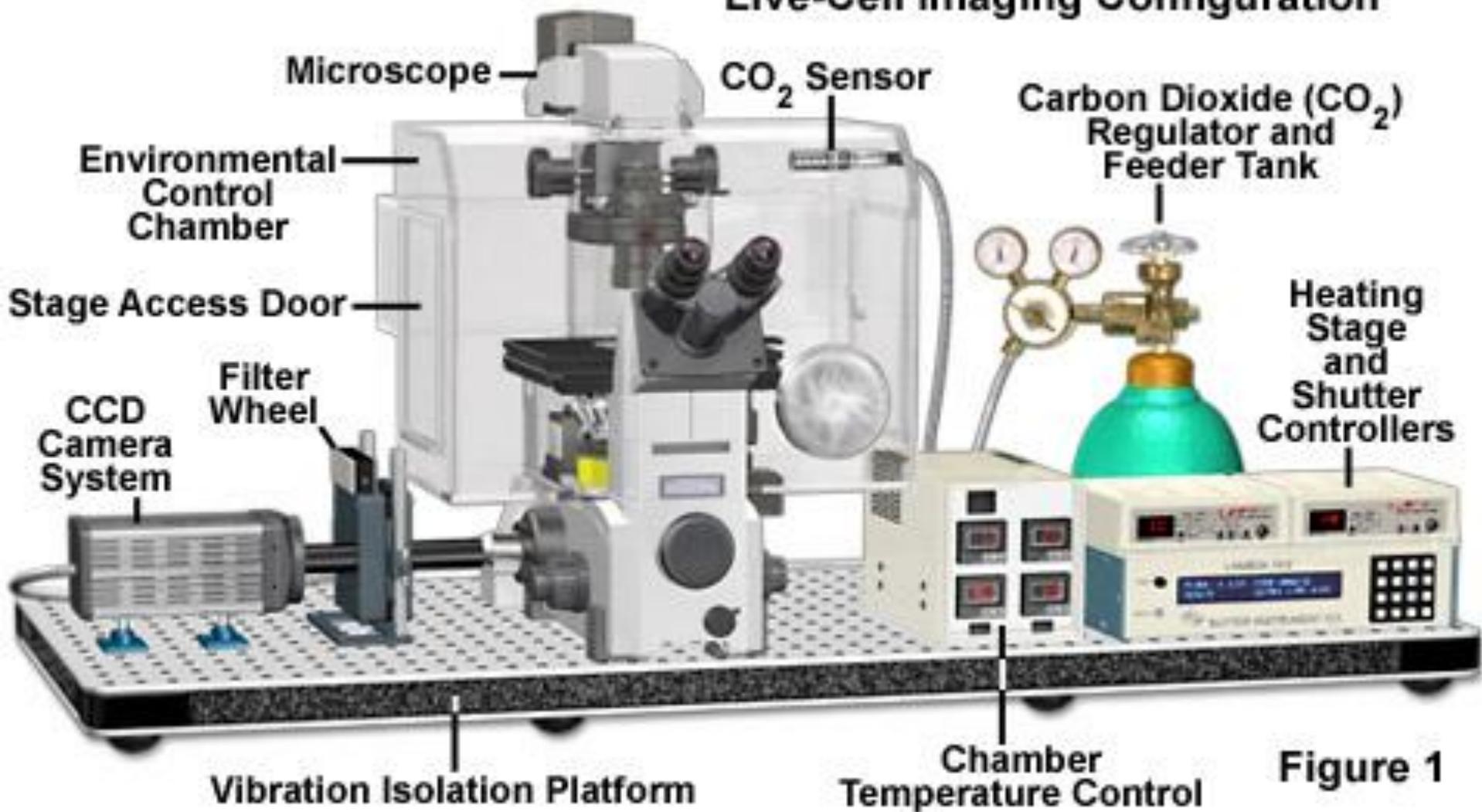


Figure 1

# Live-Cell Imaging Chamber and Controlled Environment Microscope Incubator

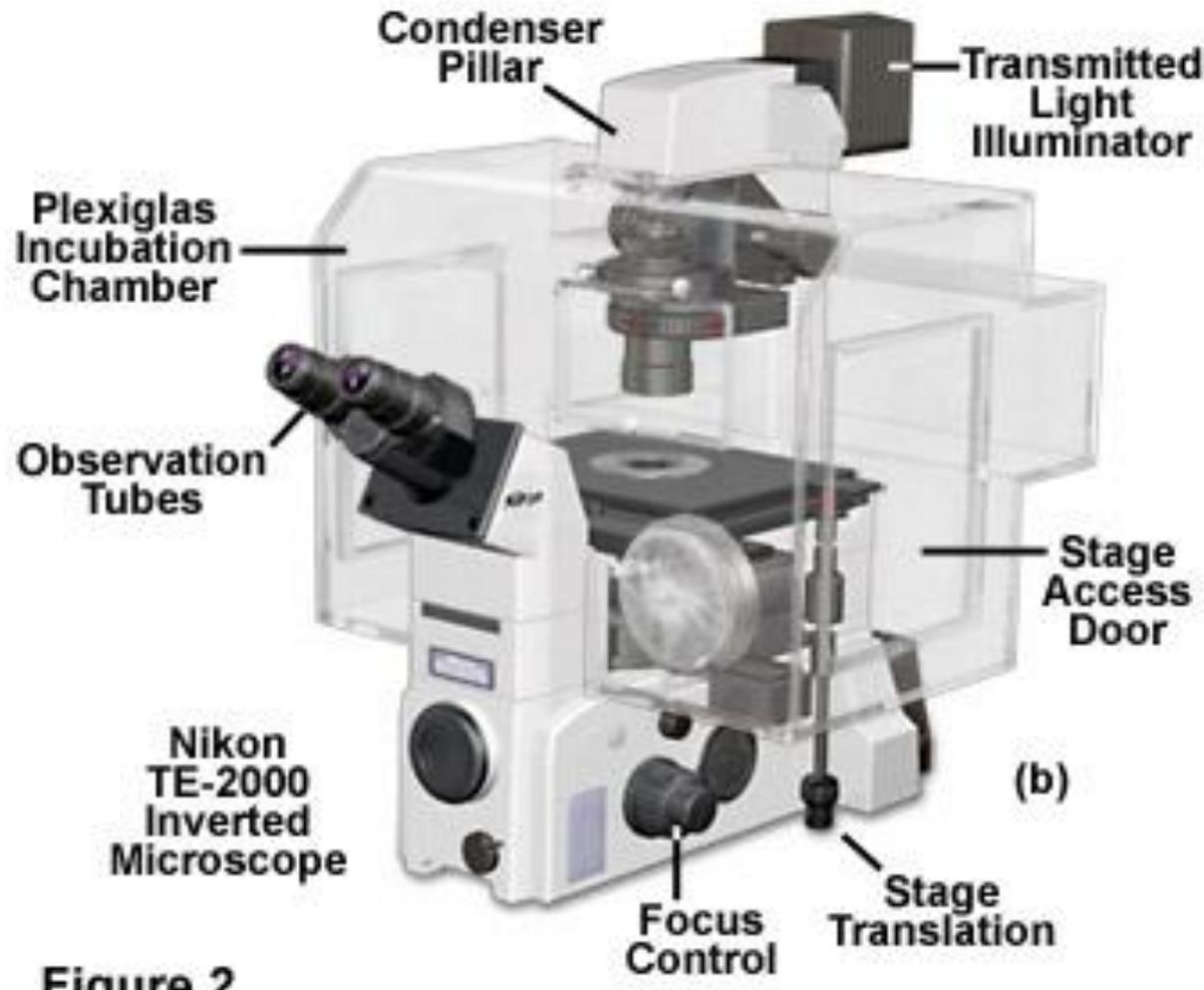
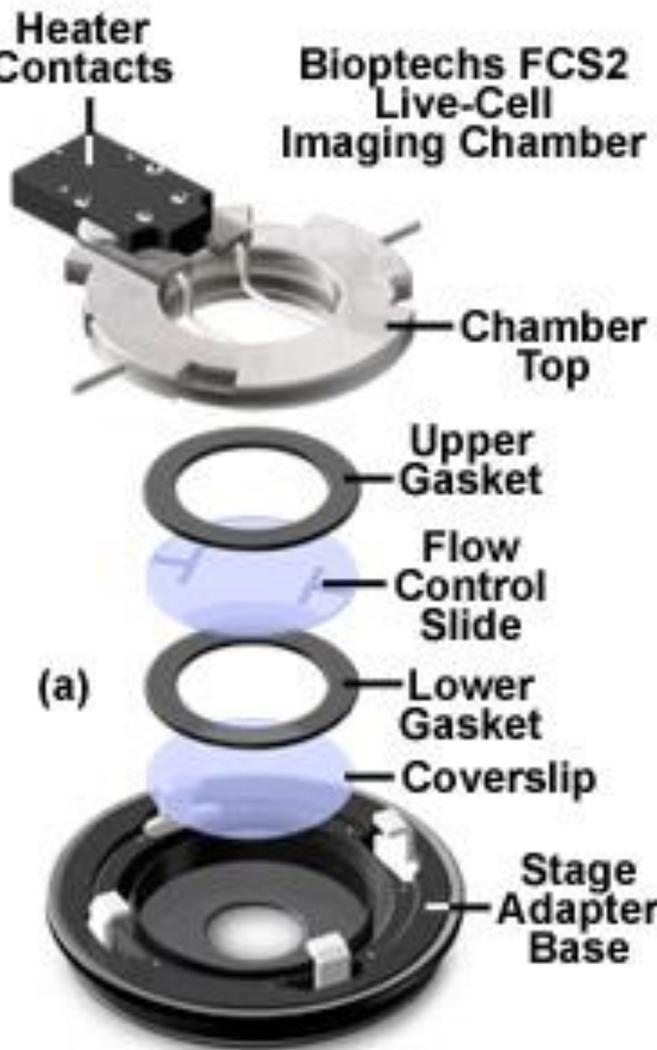


Figure 2

## Objective Heater Designs for Live-Cell Imaging

### Figure 3



**Metal Foil Blanket  
with Velcro Anchor**



**Copper Tubing  
Water Jacket**



**Proportionally-Controlled  
Closed Loop Heater**

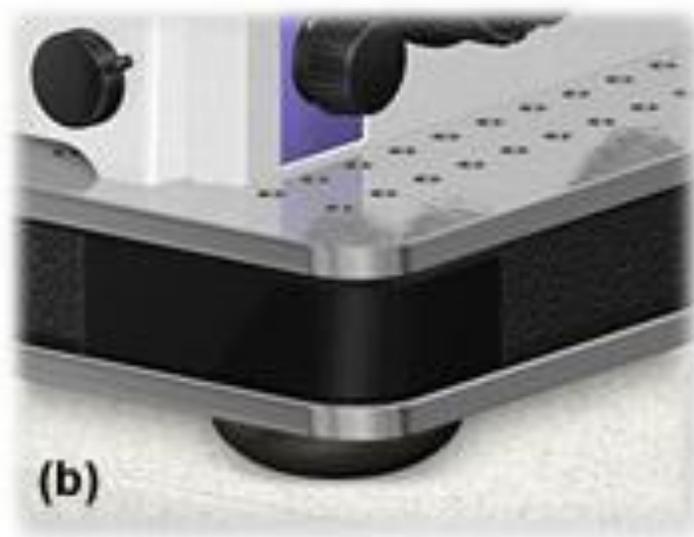
# Vibration Isolation Systems

Figure 4



(a)

Neoprene Damping Pads



(b)

Sorbothane Damping Pads



(c)

Vibration Isolation Table

Carbon  
Dioxide  
Gas  
Cylinder

Environmental  
Chamber

### Inverted Microscope Automatic Focus System

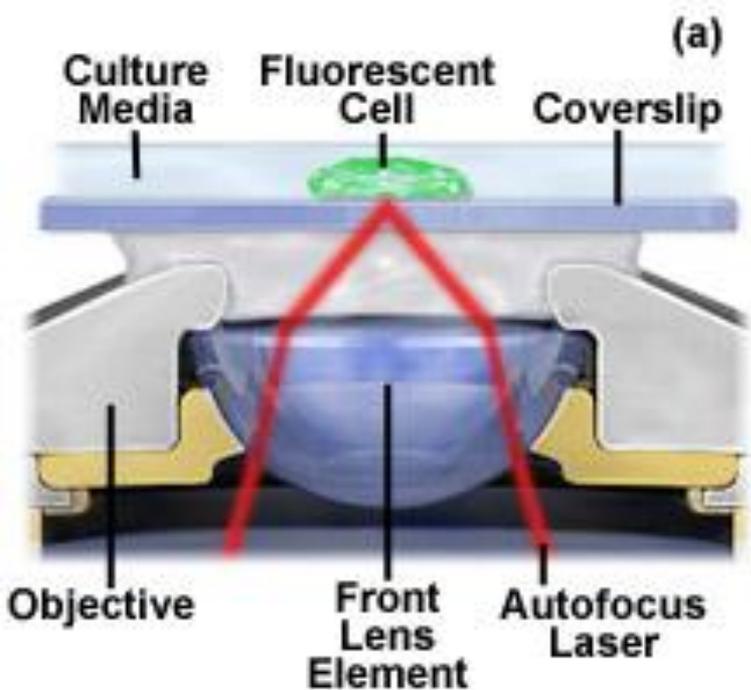
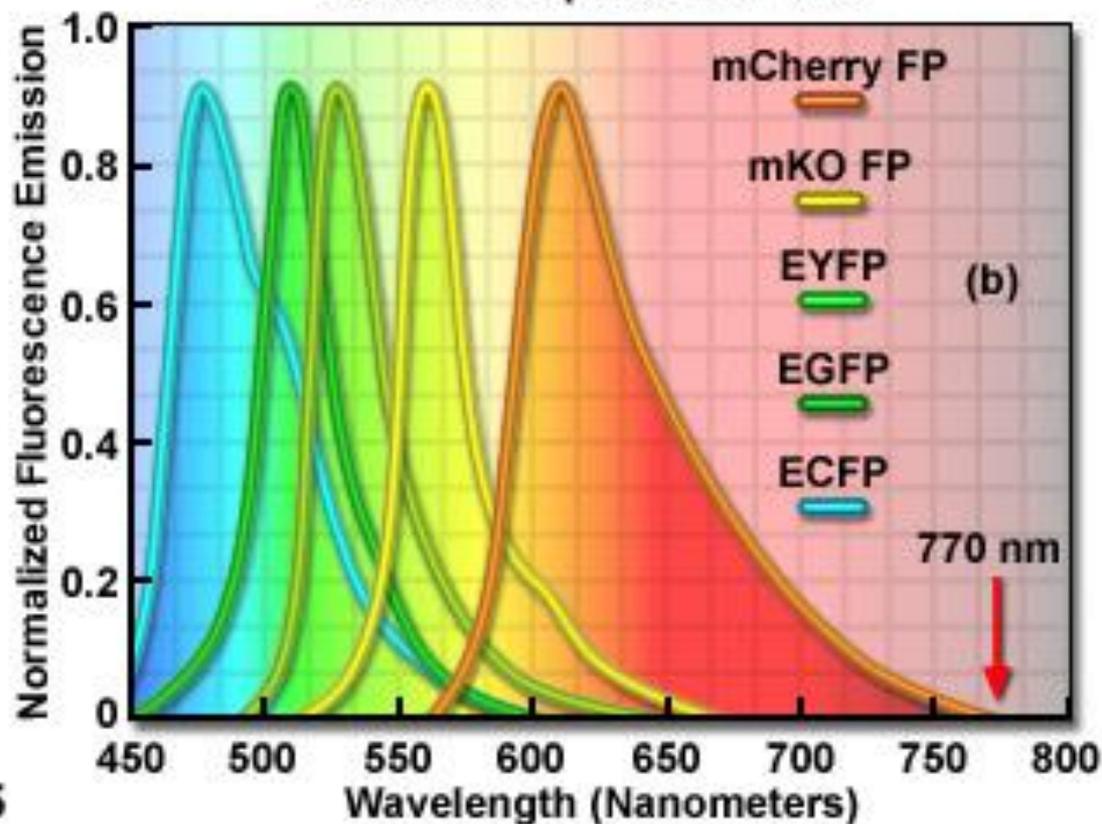
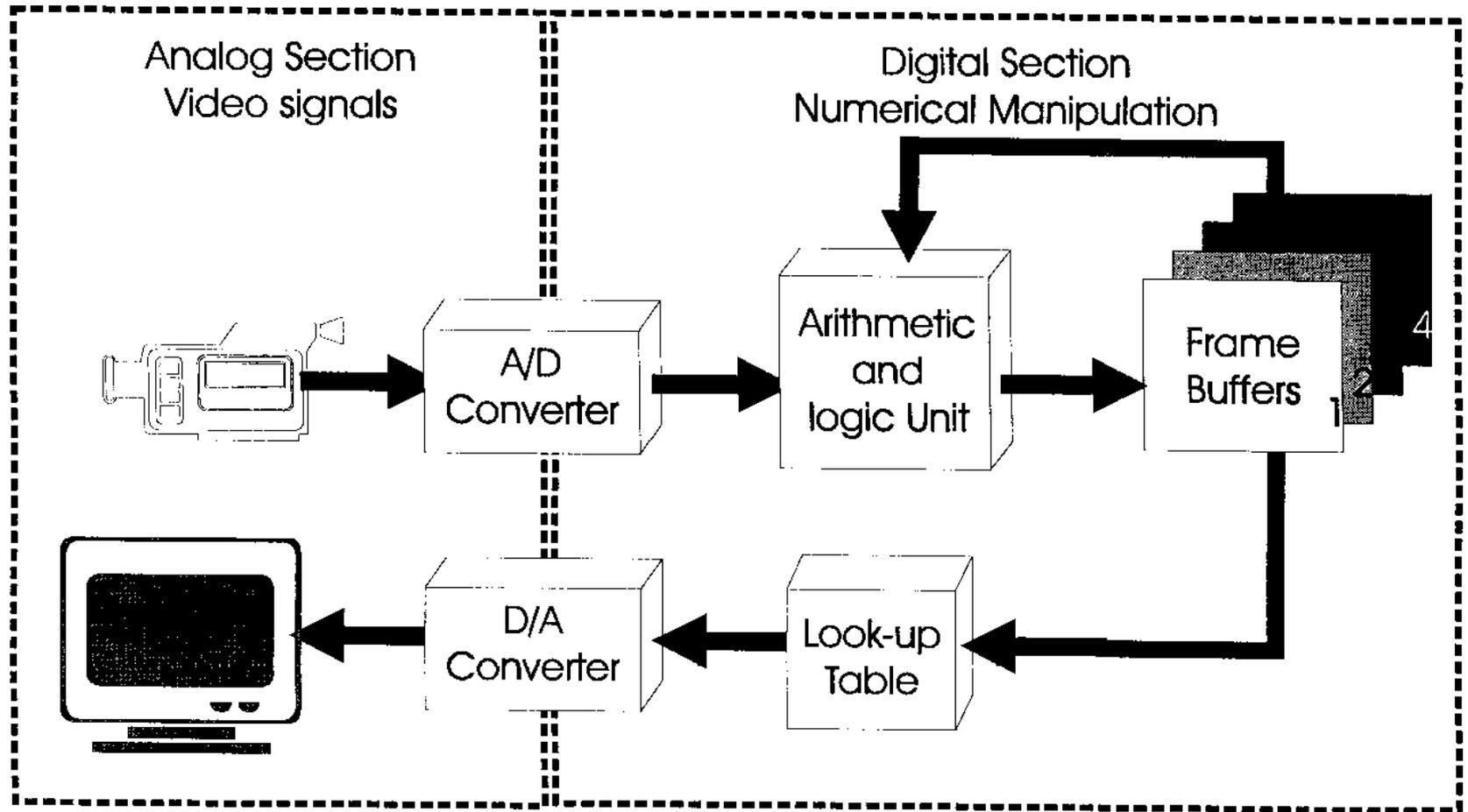


Figure 5

### Autofocus Spectral Window



# Eléments d'une chaîne video



# CAPTEURS A TRANSFERT DE CHARGES (CCD)

- Ces capteurs sont constitués par l'alignement, dans une dimension (capteurs linéiques des scanners) ou dans deux dimensions (capteurs surfaciques des caméras), d'éléments photosensibles de type photodiode ou photocapacité MOS (Metal Oxyde Semi-conductor).
- Ces capteurs possèdent un grand nombre de détecteurs élémentaires de petite surface :
  - 1 détecteur = 1 pixel
  - en moyenne 1 élément CCD mesure  $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$
  - un capteur CCD surfacique comporte de  $100 \times 100$  à  $4000 \times 4000$  détecteurs (ou plus) et mesure quelques centimètres carrés.
- Le fonctionnement des détecteurs CCD est basé sur **l'effet photoélectrique**.

## CCD Scanning Formats

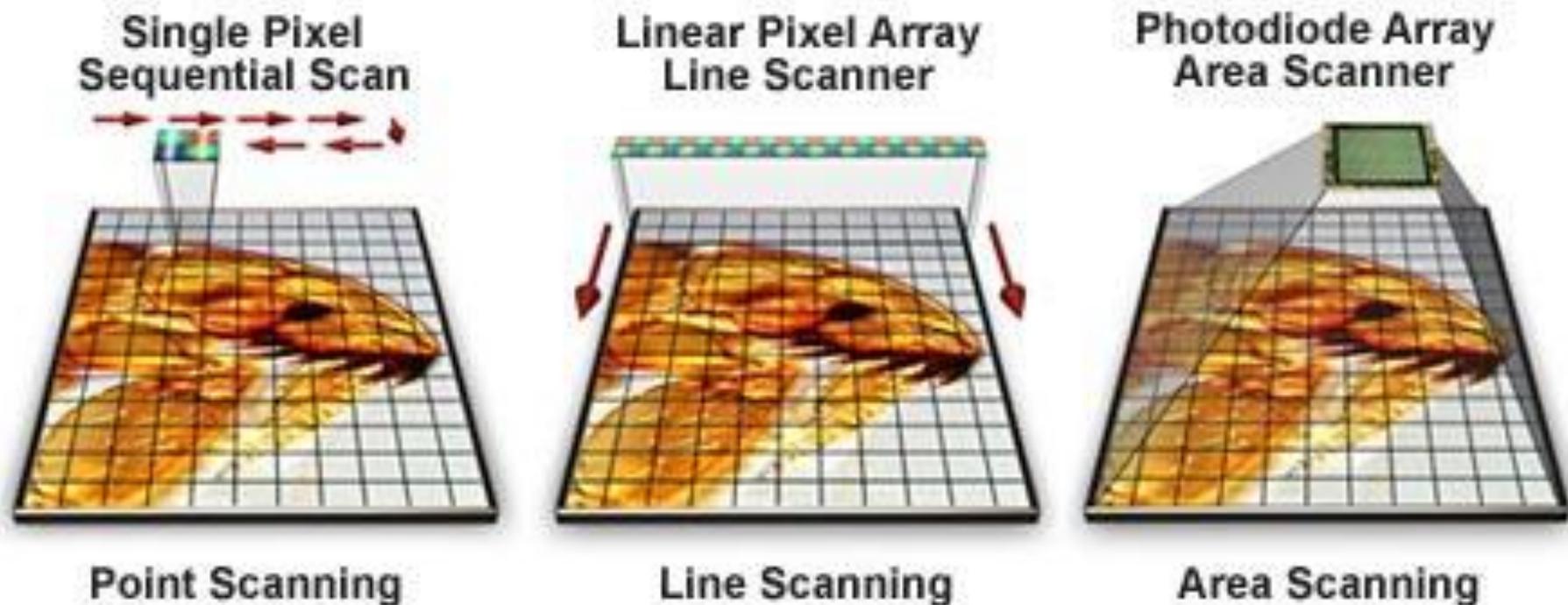


Figure 1

# Historique - CCD

- - 1887 : Hertz montre l'émission d'électrons par des corps recevant du rayonnement électromagnétique
- - 1905 : Einstein fournit une interprétation de l'effet photoélectrique (intuition du photon)
- - 1950 : premiers tubes de télévision Vidicon
- - 1960 : améliorations des tubes : Plumbicon
- - 1970 : améliorations des tubes : Saticon, Chalnicon, Newvicon
- - 1975 : tubes vidicon solides
- - **1980** : arrivée des technologies basées sur les semi-conducteurs; photodiodes et photocapacités MOS interrogées par des registres **CCD**

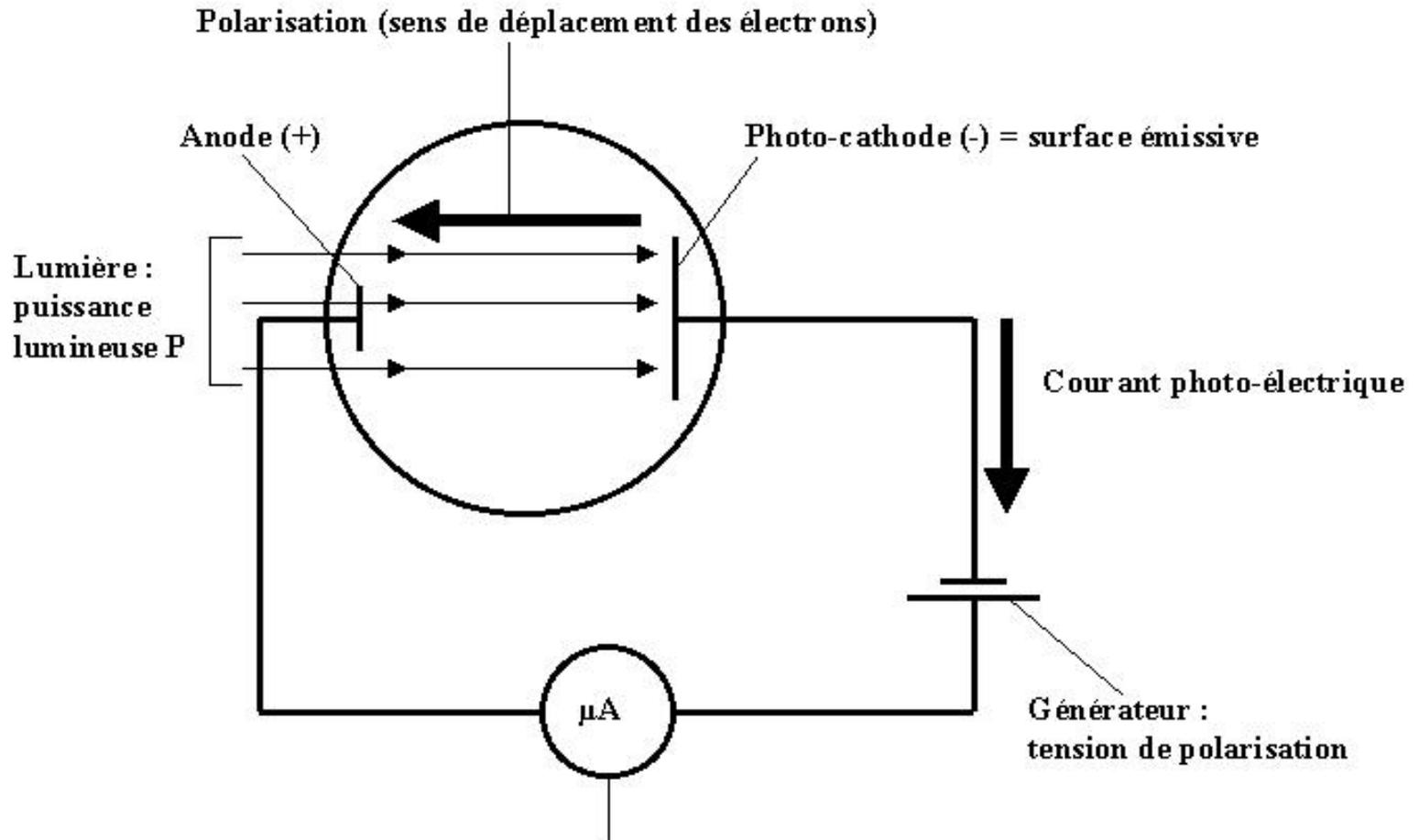
# Fonctionnement des capteurs CCD

- Ces capteurs fonctionnent grâce à l'**effet photoélectrique** :
  - conversion de l'énergie lumineuse (photons) en énergie électrique (électrons)
  - cette conversion est possible sur certains corps sur lesquels l'énergie des photons, si elle est suffisante (notion de sensibilité), libère des électrons piégés dans la matière (notion de rendement).
- On peut schématiquement considérer qu'un élément CCD fonctionne suivant le même principe qu'une cellule photoélectrique à vide

# Deux phases de fonctionnement d'une cellule photoélectrique

- **Phase d'intégration** ou de stockage (notion de **temps d'intégration**)
  - phase de conversion de l'énergie lumineuse en paquets de charges électriques
  - pendant cette période on n'applique pas de tension de polarisation
- **Phase de lecture** (notion de **temps de lecture**)
  - permet de quantifier le nombre d'électrons accumulés (conversion charge-tension)
  - pendant cette période une tension de polarisation est appliquée et permet de faire circuler les électrons
  - après la phase de lecture, la cellule est réinitialisée et peut être réutilisée pour une nouvelle intégration

# Principe de fonctionnement d'une cellule photoélectrique



**Micro-Ampèremètre :**  
mesure du courant transporté par les électrons, proportionnel à la puissance lumineuse reçue P.

# Principe de fonctionnement d'une cellule photoélectrique

- *Une tension de polarisation permet de capter les électrons provenant d'une surface émissive*
  - *Une mesure de la quantité de photons reçus est possible grâce à un microampèremètre*
  - *l'intensité du courant est proportionnelle à la puissance lumineuse reçue.*
- *Temps d'intégration (variable)*
  - *formation d'un nombre  $N_e$  d'électrons au bout d'un temps  $T_i$*
  - *$N_e$  dépend de  $T_i$  et de  $P$  (puissance lumineuse reçue = nombre total de photons reçus  $N_p$ )*
  - *en pratique  $N_e < N_p$*
  - *$N_e/N_p < 1$  = rendement quantique du détecteur*
  - *Le rendement quantique dépend de la longueur d'onde du rayonnement reçu.*
- *Temps de lecture (quelques millisecondes)*
  - *au bout du temps  $T_i$ , on applique une tension de polarisation qui permet de faire circuler les électrons libérés ; on mesure alors l'intensité du courant*
  - *Généralement  $T_{lecture} < T_i$*
  - *Après la lecture on peut refaire une intégration etc....*

# Metal Oxide Semiconductor (MOS) Capacitor

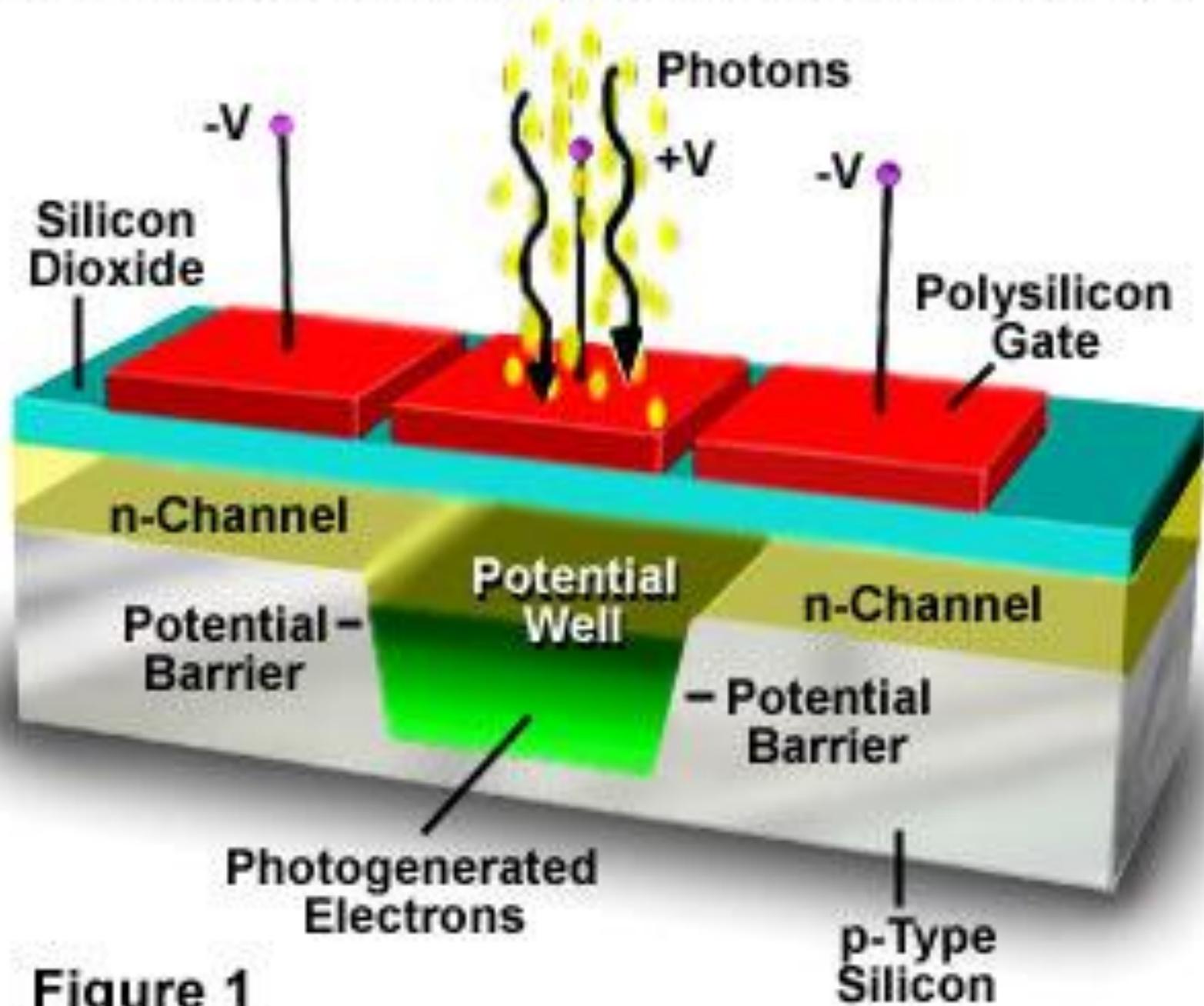


Figure 1

# Composition d'une matrice CCD

- Les **matrices CCD** sont schématiquement composées de **quatre parties** :
  - la **zone image** (zone photosensible)
  - la **zone mémoire** (zone masquée à la lumière et de même taille que la zone image) : sauf dans le cas des capteurs pleine trame qui en sont dépourvus
  - la **zone de lecture** permettant la lecture ligne par ligne de la zone mémoire (registre horizontal)
  - **l'étage de sortie** assurant l'extraction des charges et leur conversion en tension
- Des « **horloges** » **verticales et horizontales** contrôlent le déplacement des charges qui sont acheminées vers la broche de sortie du capteur

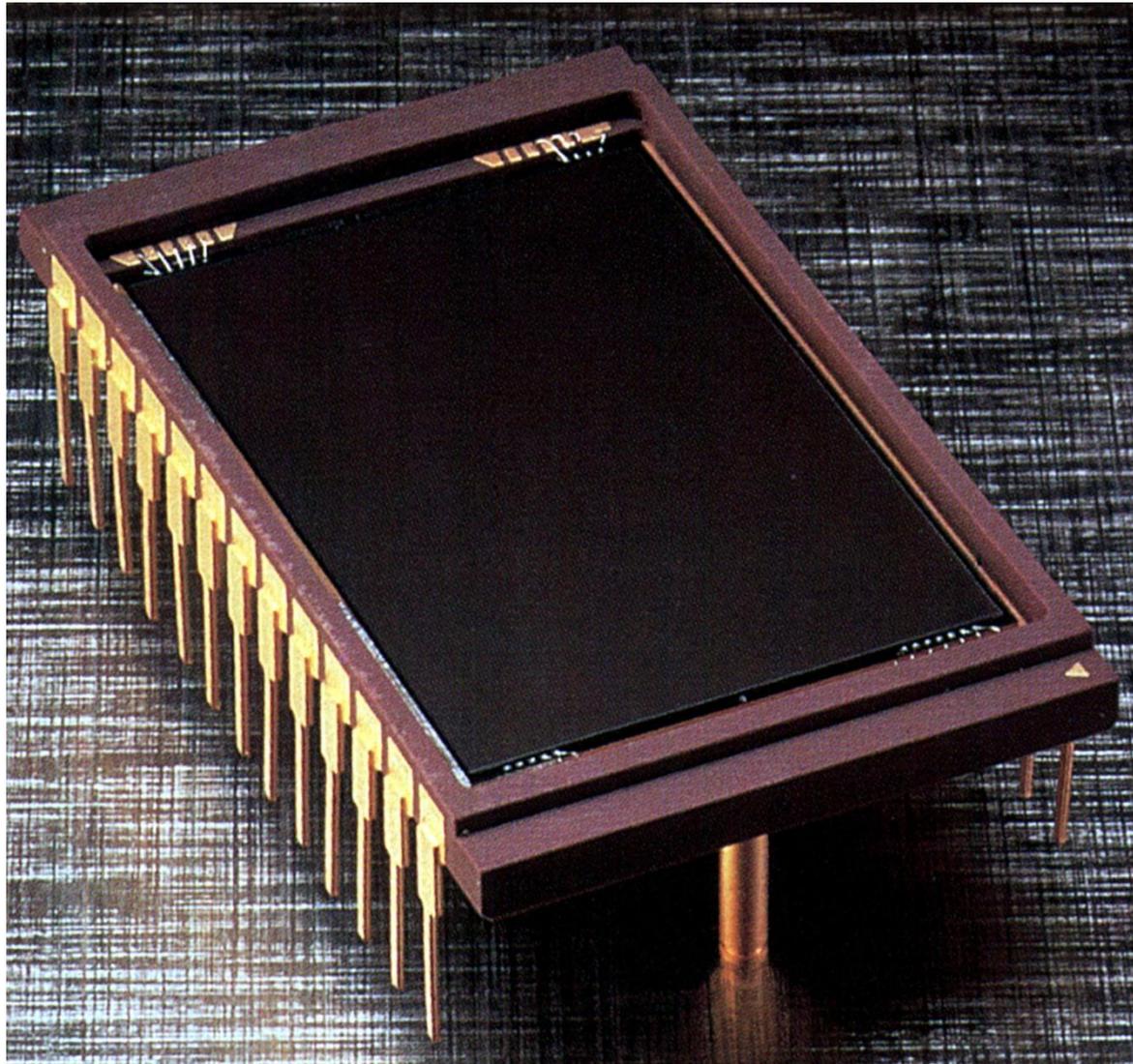
# Echantillonnage spatial et quantification

- Les capteurs CCD réalisent, de part leur structure, un **échantillonnage spatial** (dépendant de la taille des éléments CCD)
- Une **quantification du signal** est réalisée par un circuit **convertisseur analogique-numérique**

# Types de capteurs matriciels CCD

- **Trois types de capteurs CCD** sont définis en fonction du **mode de transfert** utilisé :
  - les capteurs **pleine trame** (Full frame)
    - ces capteurs sont dépourvus de zone mémoire et nécessitent l'utilisation d'un **obturateur mécanique** (shutter) qui coupe la lumière pendant la phase de lecture (il peut subsister un effet de « traînage » dans ce type de capteur)
    - Un des avantages de ce type de capteurs est qu'ils sont constitués de pixels continus ce qui leur confère la **meilleure résolution spatiale**.

# Capteurs pleine trame



# Full-Frame CCD Architecture

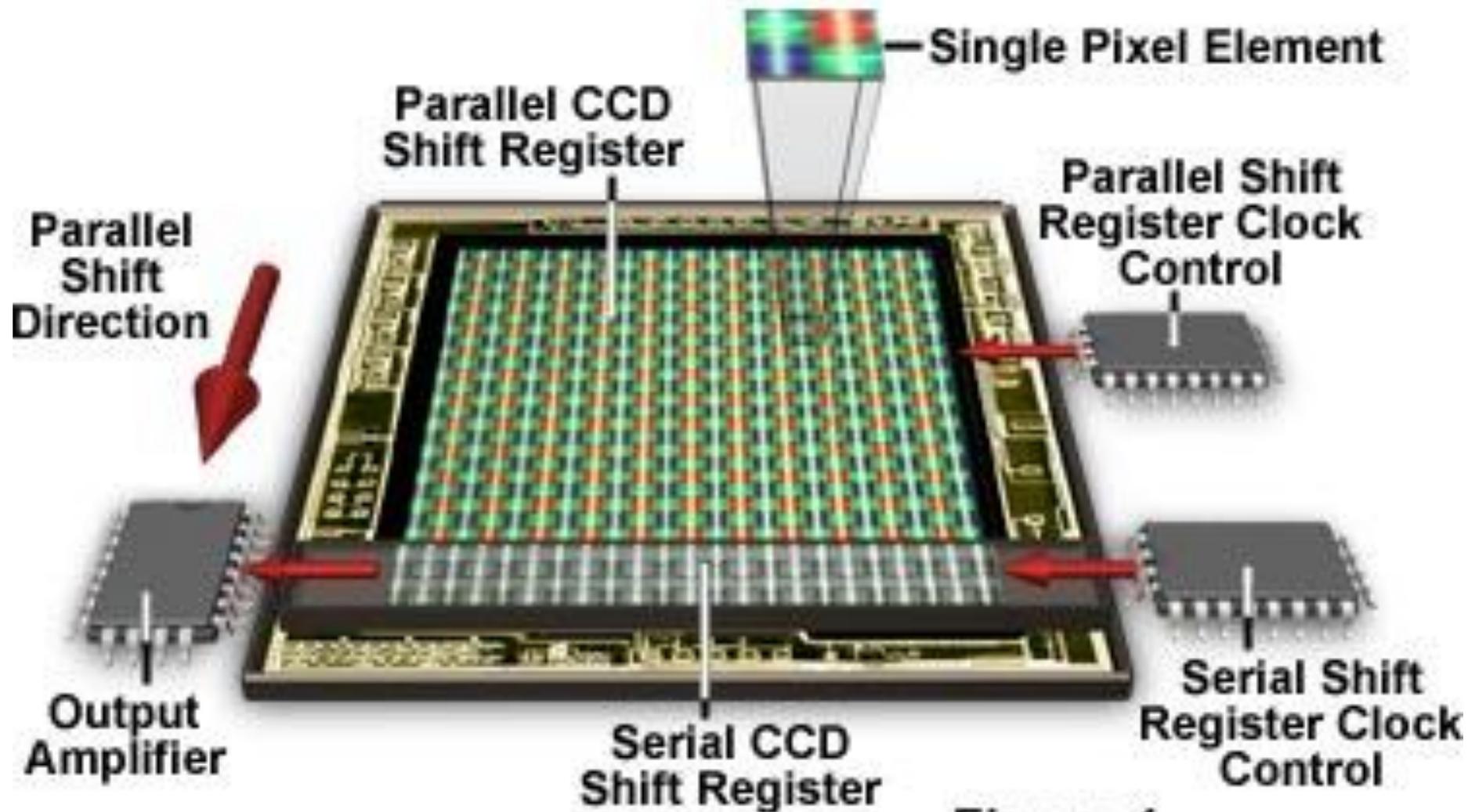
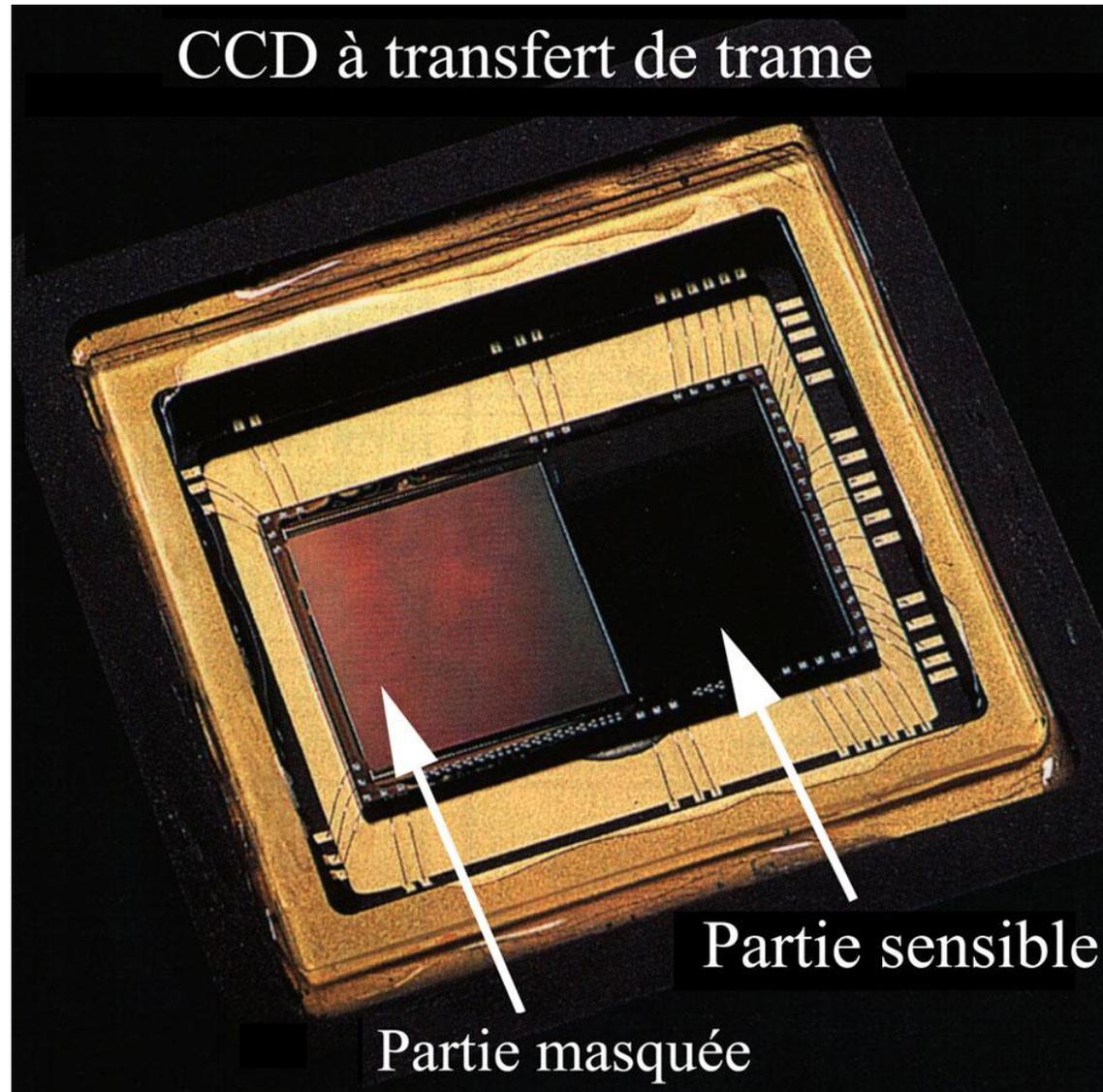


Figure 1

# Types de capteurs matriciels CCD

- les capteurs à **transfert de trame** (Frame transfert)
  - Composés d'une **zone image** et d'une **zone mémoire** de même taille
  - Ce type de construction permet de lire les données dans la zone mémoire simultanément à l'exposition de la zone image d'où une **fréquence de saisie plus importante** que pour les capteurs pleine trame (ne nécessite pas d'obturateur mécanique)

# Capteurs à transfert de trame



# Frame-Transfer CCD Architecture

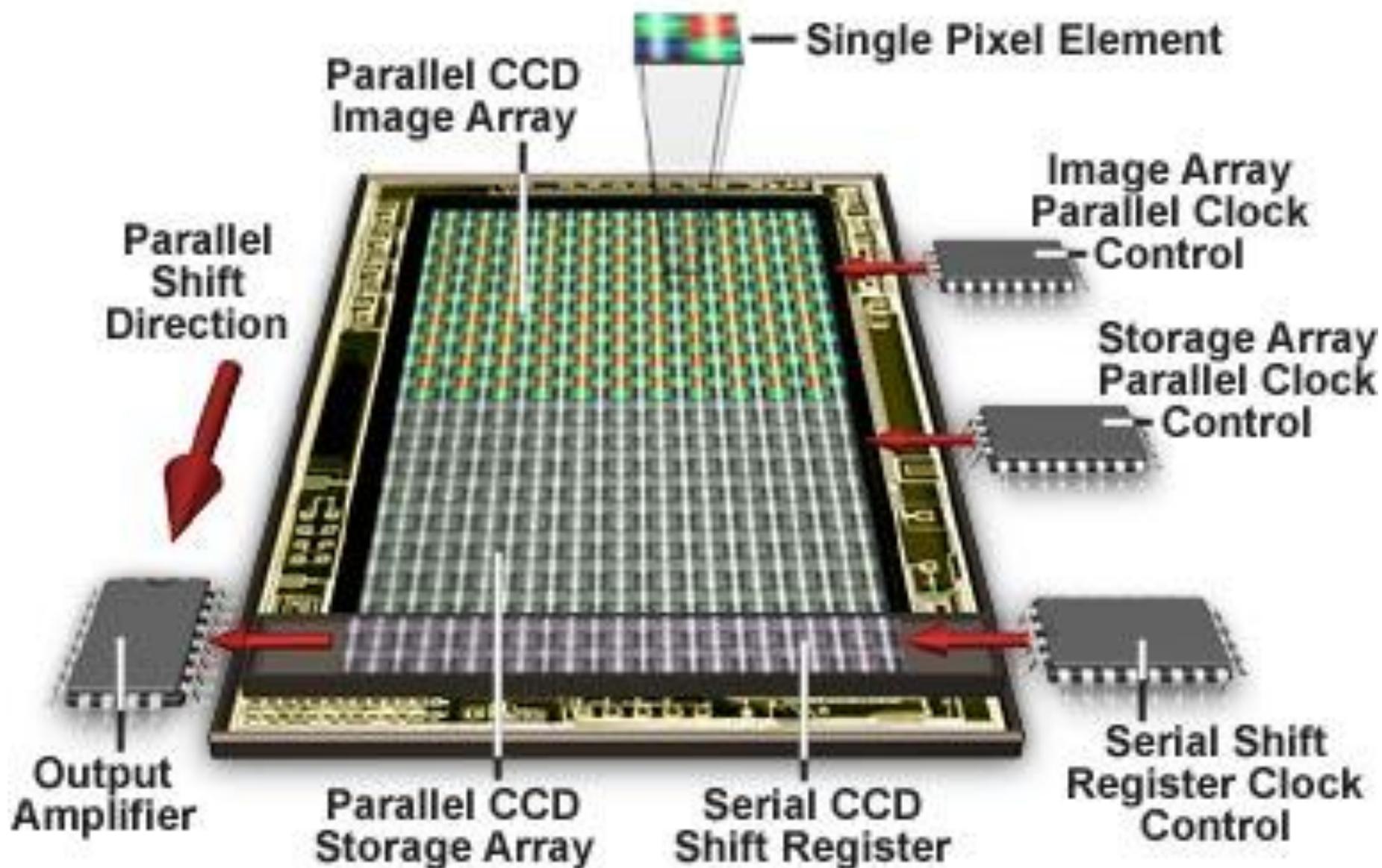


Figure 1

# Capteurs à transfert de trame

ACQUISITION

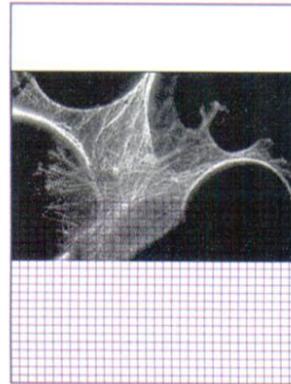
ZONE  
SENSIBLE



(a)

(a) . Exposition initiale :  
illumination de la moitié  
supérieure du CCD

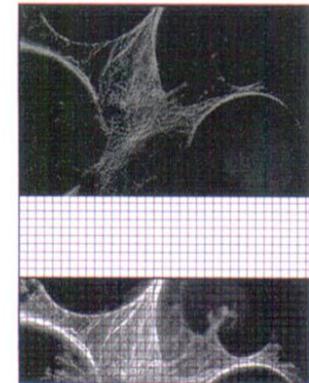
TRANSFERT



(b)

(b). Déplacement des charges  
vers la zone masquée

ACQUISITION / LECTURE



(c)

(c). Quand le transfert est complet  
les charges sont lues et une autre  
image est enregistrée

## Dual Amplifier Electron Multiplying CCD Architecture

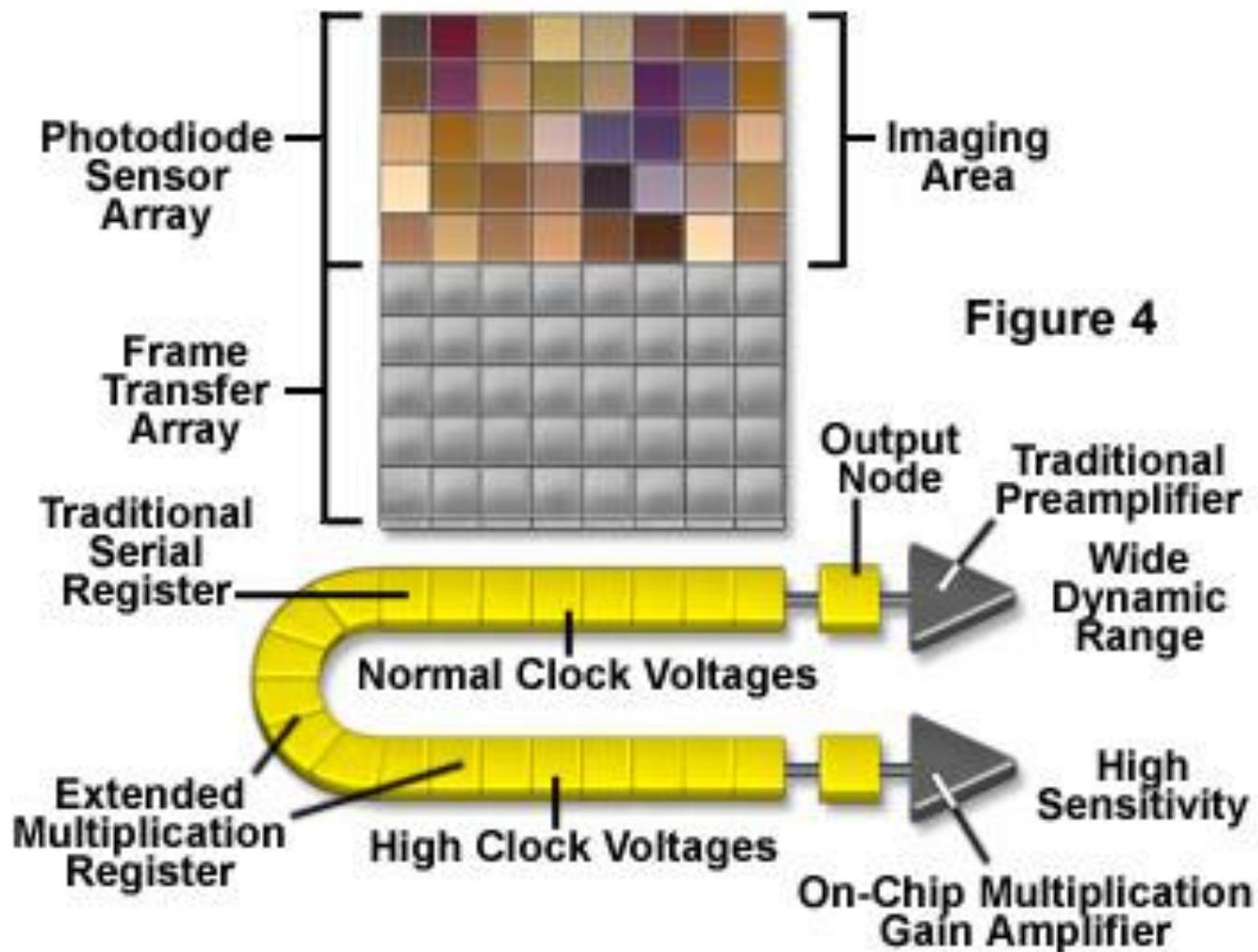
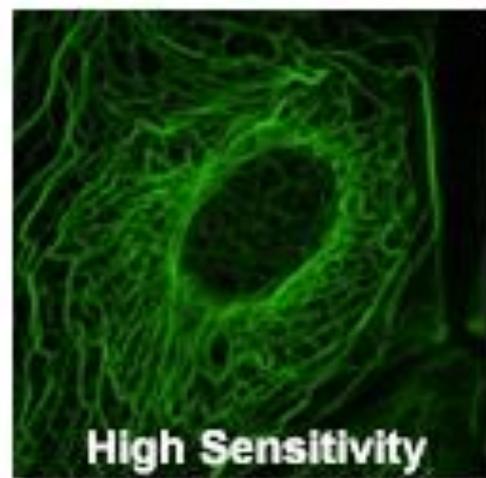
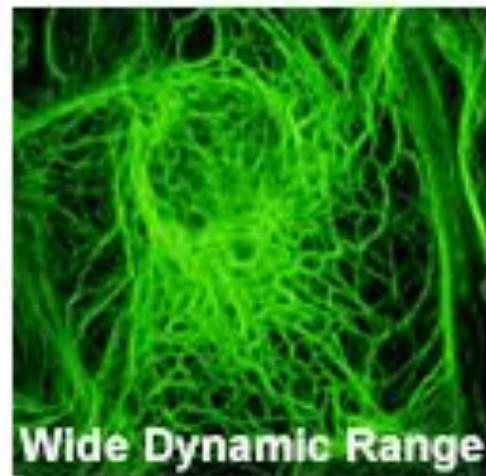


Figure 4



# Types de capteurs matriciels CCD

- Les capteurs à **transfert interligne** (Interline transfert)
  - La **zone mémoire (ou masque) est en forme de grille** et le transfert de la zone image à la zone mémoire se fait simultanément et quasi instantanément pour chaque ligne (environ 1 $\mu$ s)
  - **Fréquence de saisie très rapide** : fréquence vidéo (30 images/s) ou plus sur certains modèles
  - Les anciens capteurs CCD à transfert interligne étaient beaucoup moins performants que les autres types en ce qui concerne la résolution de l'image et le rendement quantique (15%). Les nouvelles générations de capteurs à transfert interligne (en particulier Sony) corrigent ce défaut par l'utilisation de micro-lentilles placées devant le capteur
    - ces micro-lentilles collectent la lumière qui est dirigée sur les régions masquées et la dirigent vers un élément photosensible; il y a autant de micro-lentilles que d'éléments photosensibles ce qui permet d'obtenir un rendement quantique de 30% en moyenne et même 55% à 510nm (pic d'émission de la GFP) sur certains modèles (Sony HAD ICX-601).

# Interline Transfer CCD Architecture

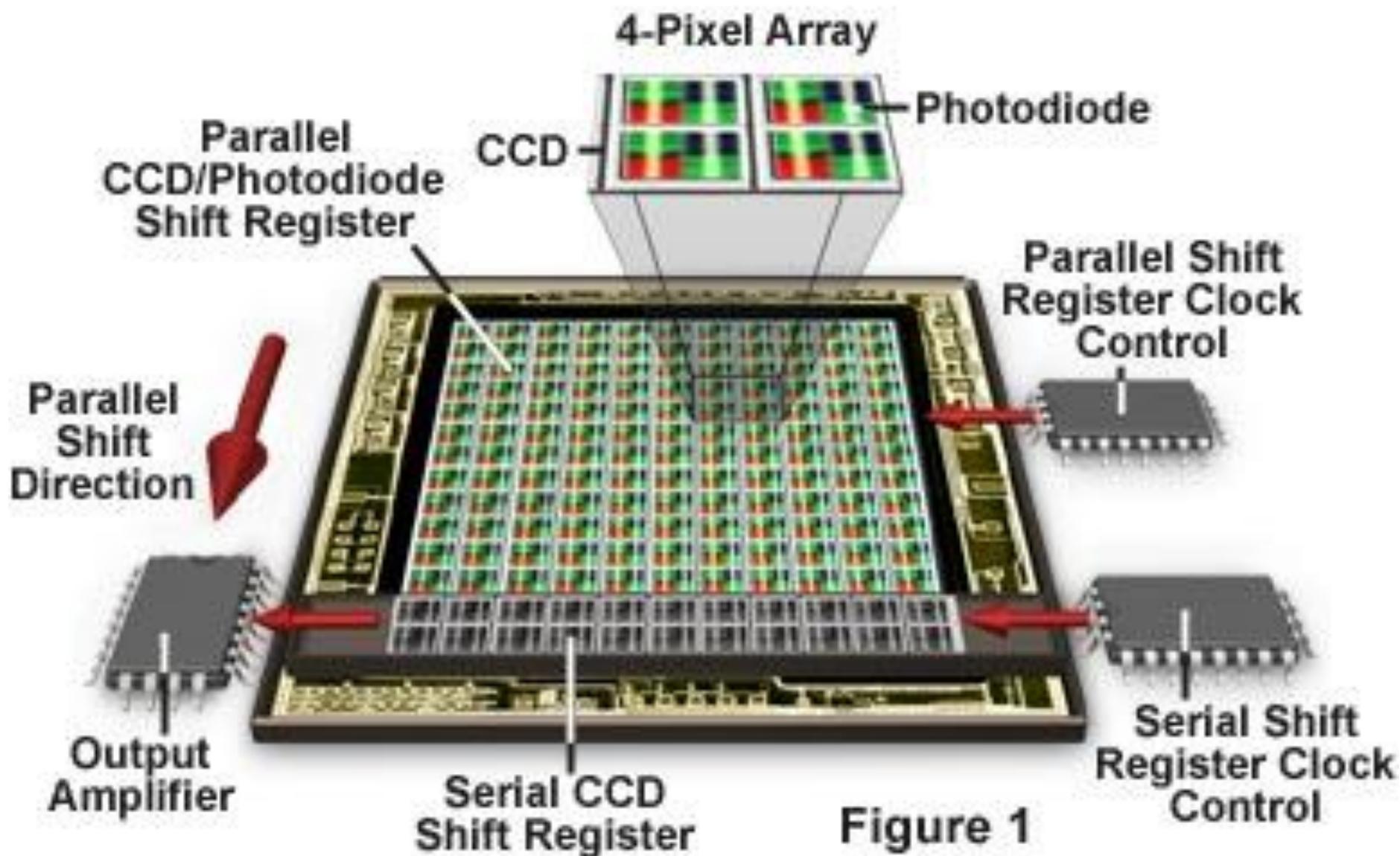
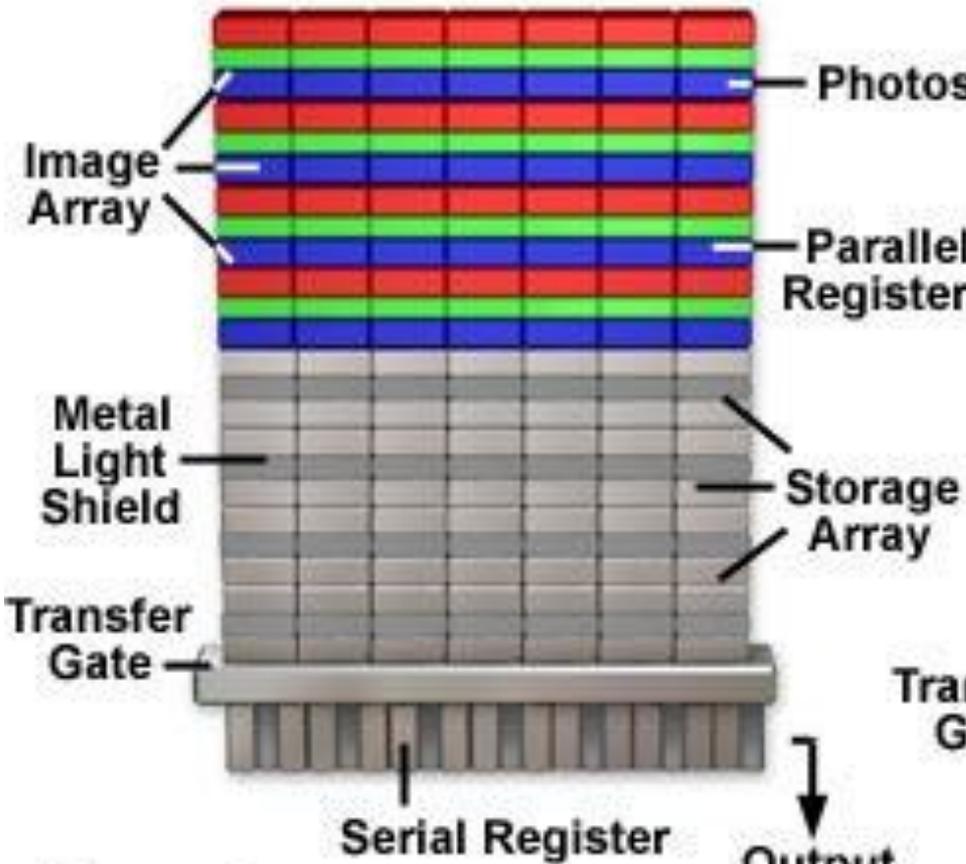


Figure 1

# Charged Coupled Device Architecture

## Frame Transfer CCD



## Interline Transfer CCD

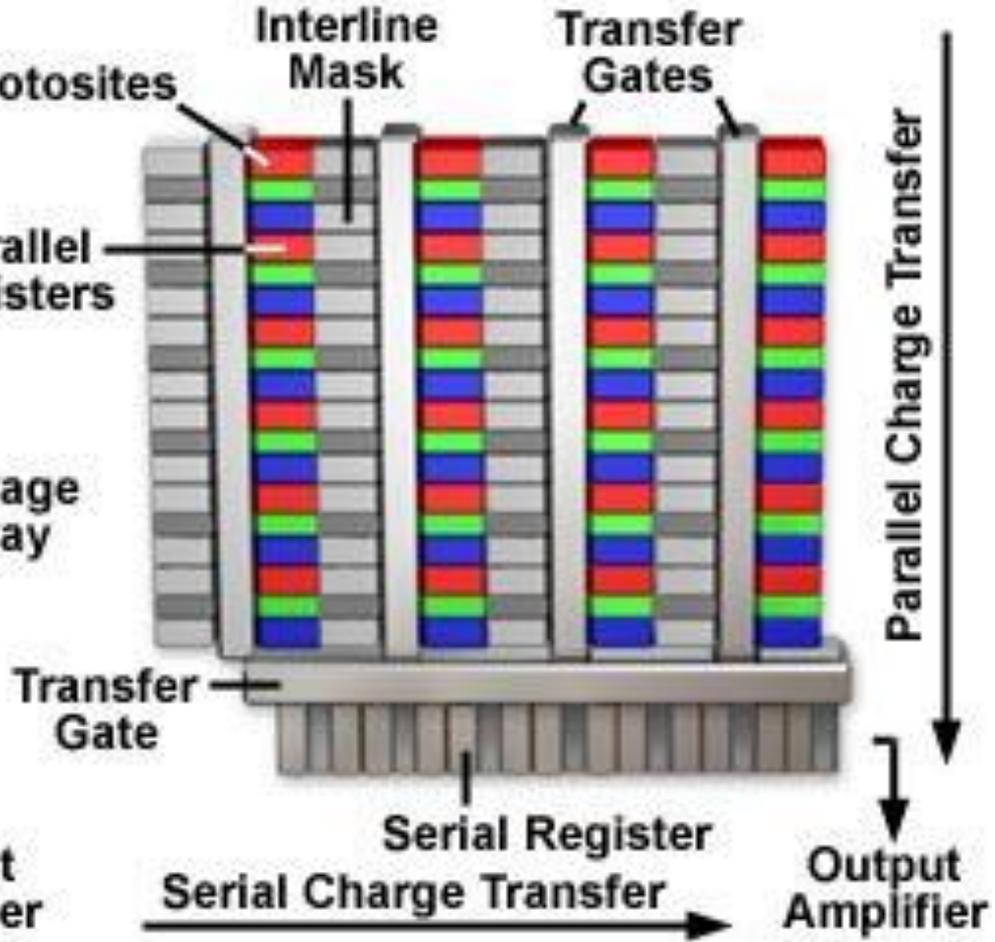


Figure 5

Output Amplifier

Output Amplifier

## Microlens or Lenslet Arrays

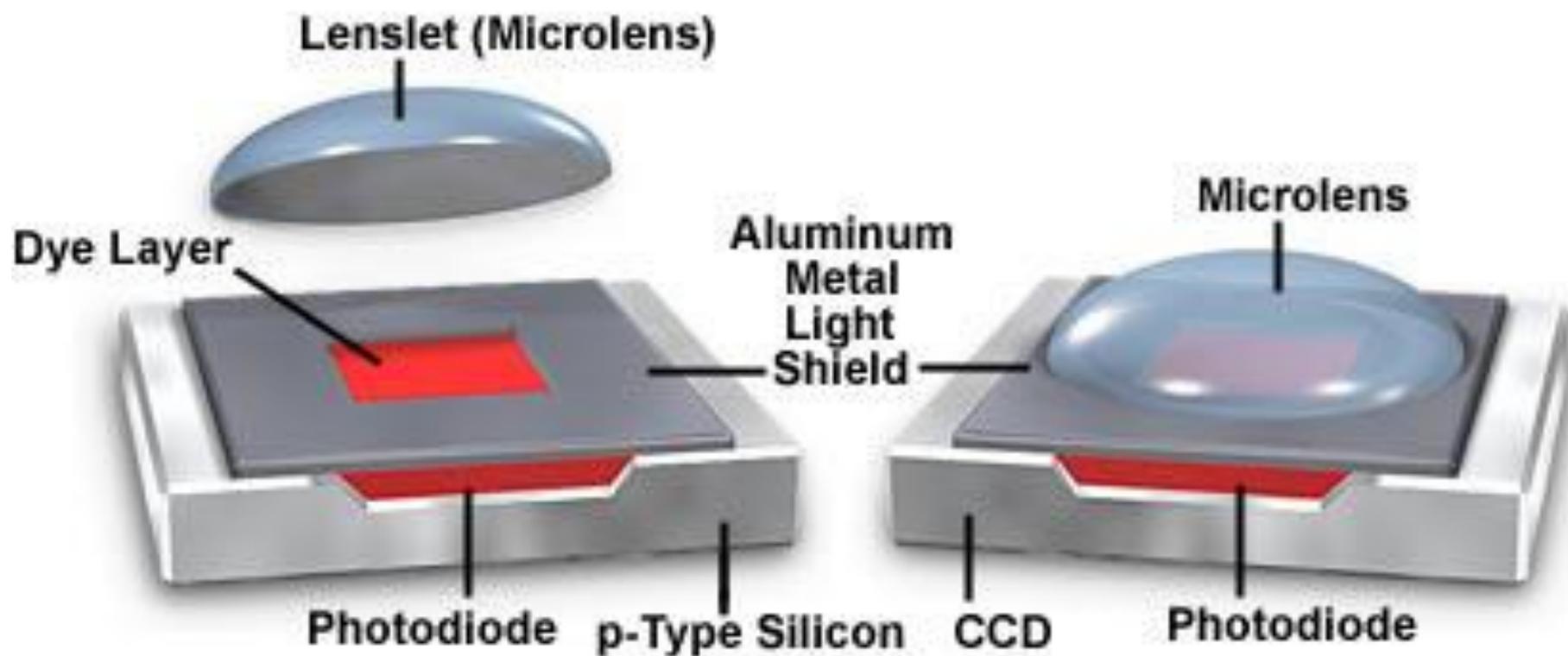


Figure 1

# Microlens Array Architecture

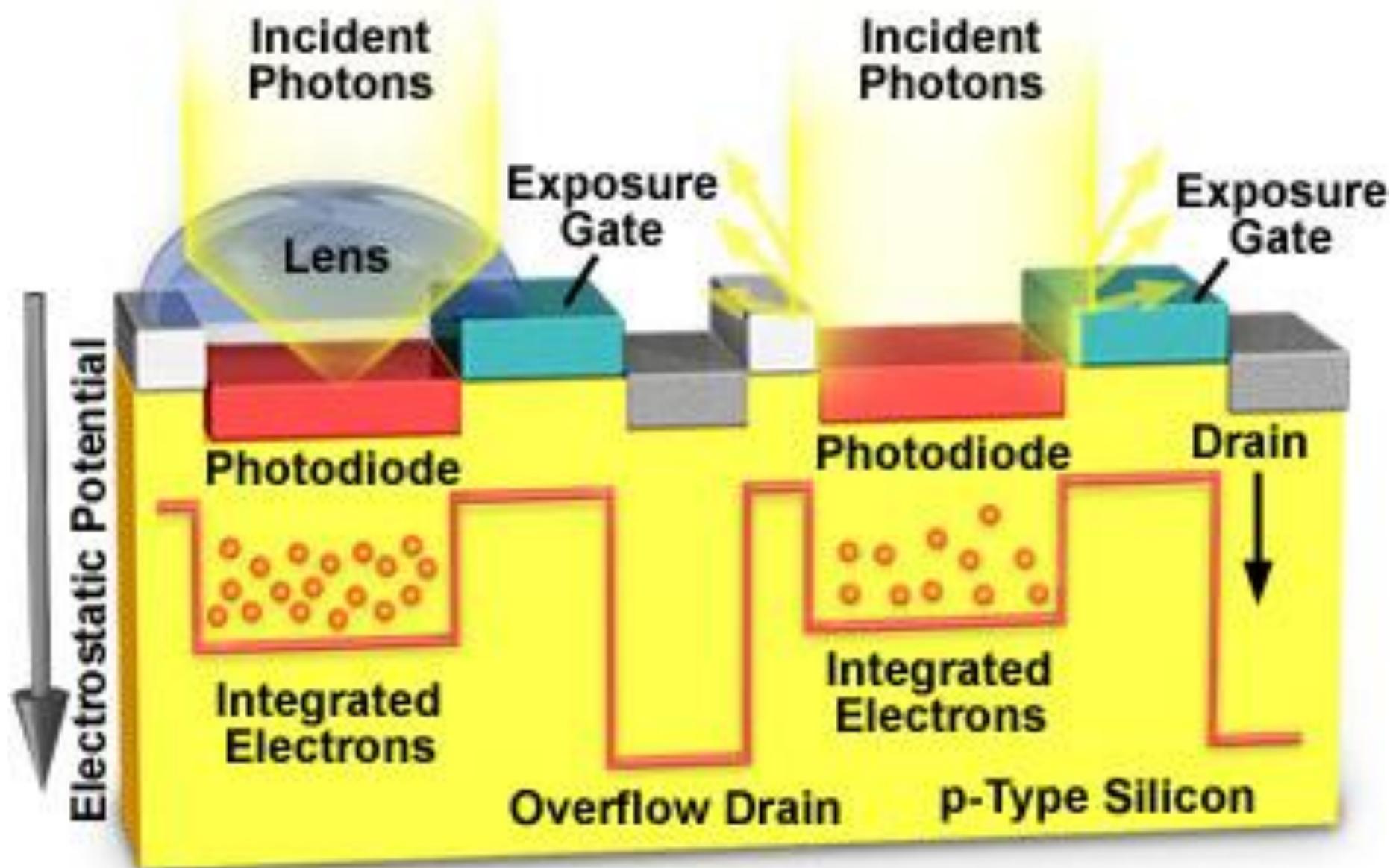


Figure 2

# Microlens Array on Photodiodes

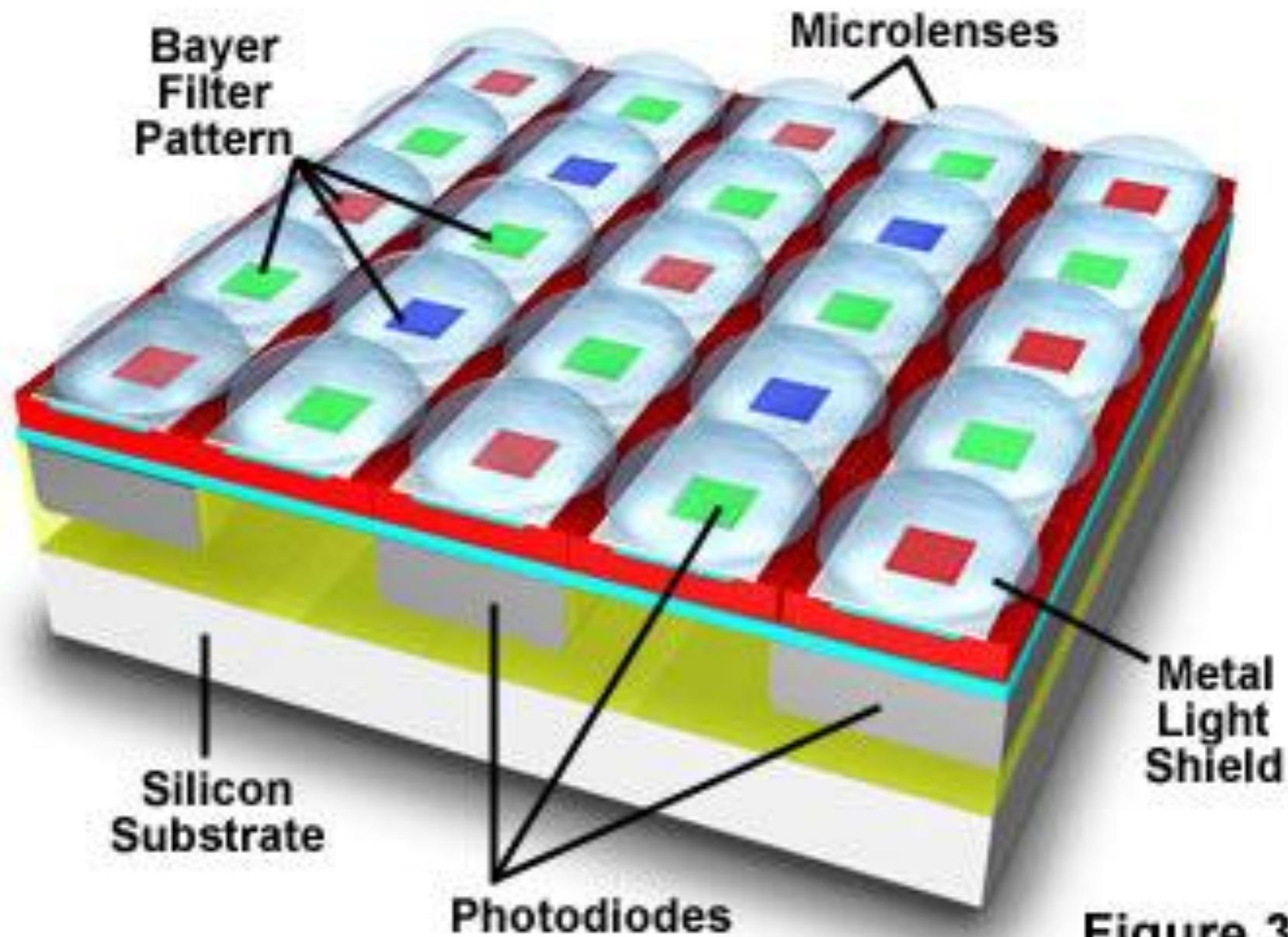
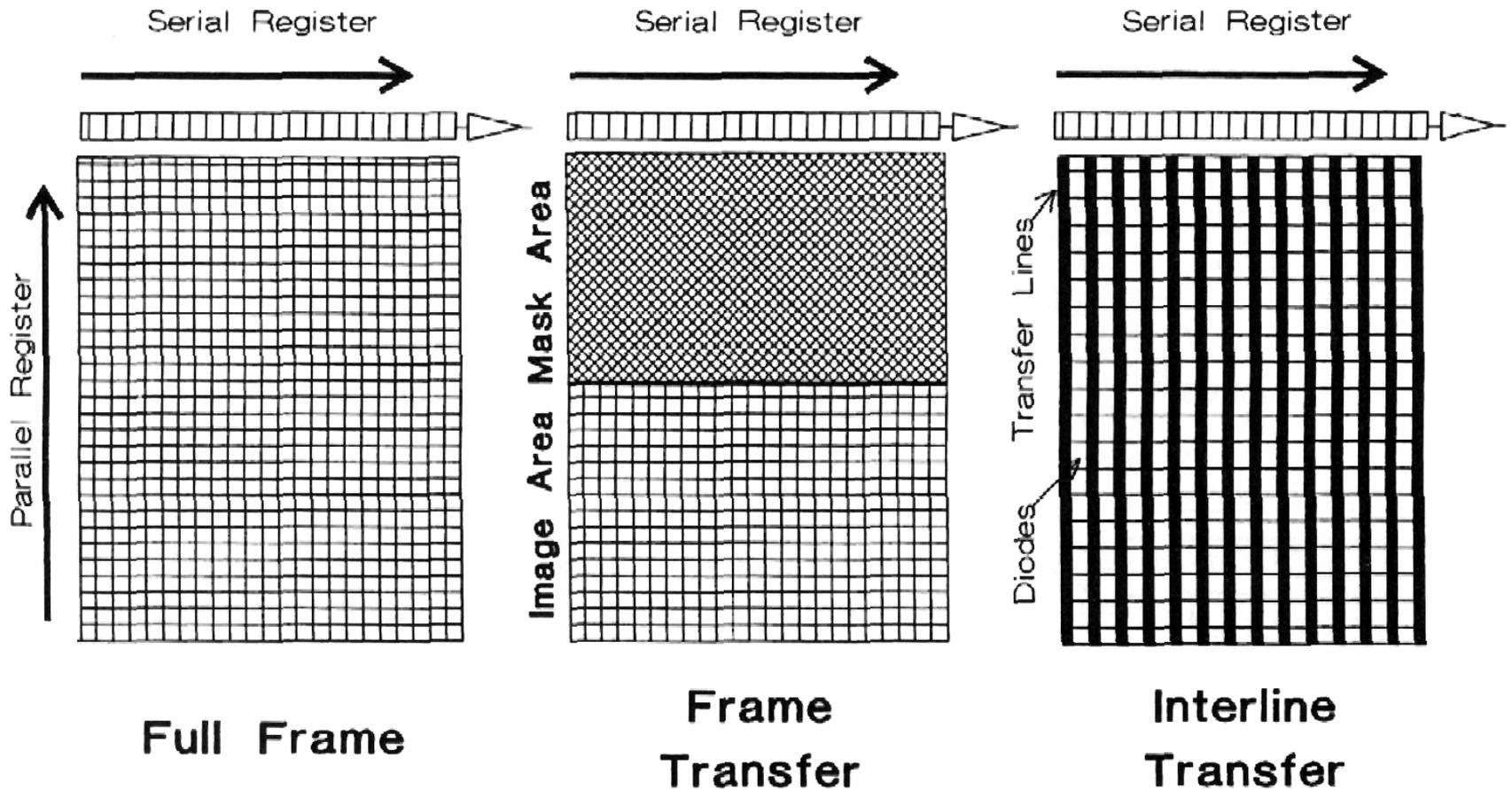


Figure 3

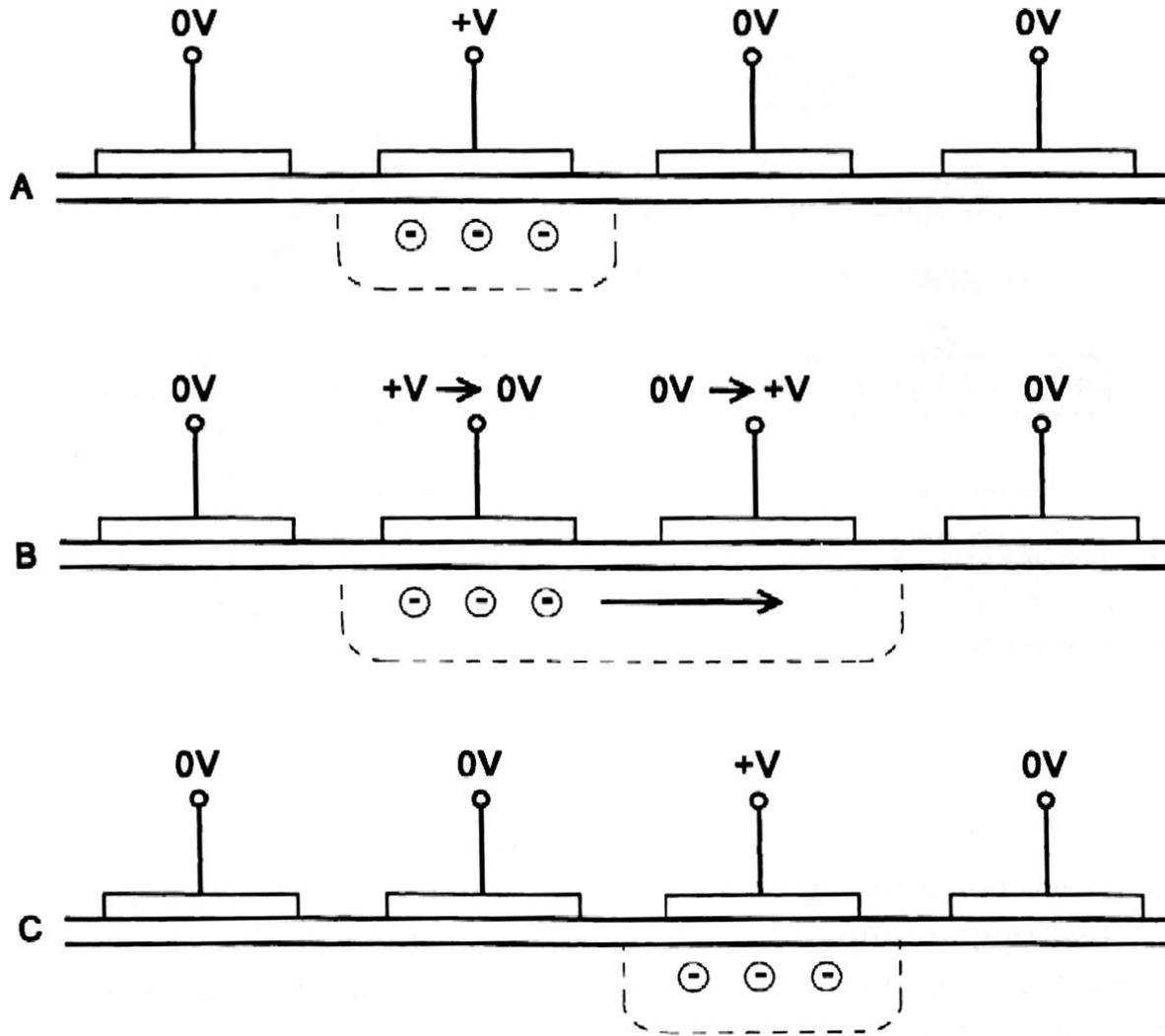
# Les différents types de transfert



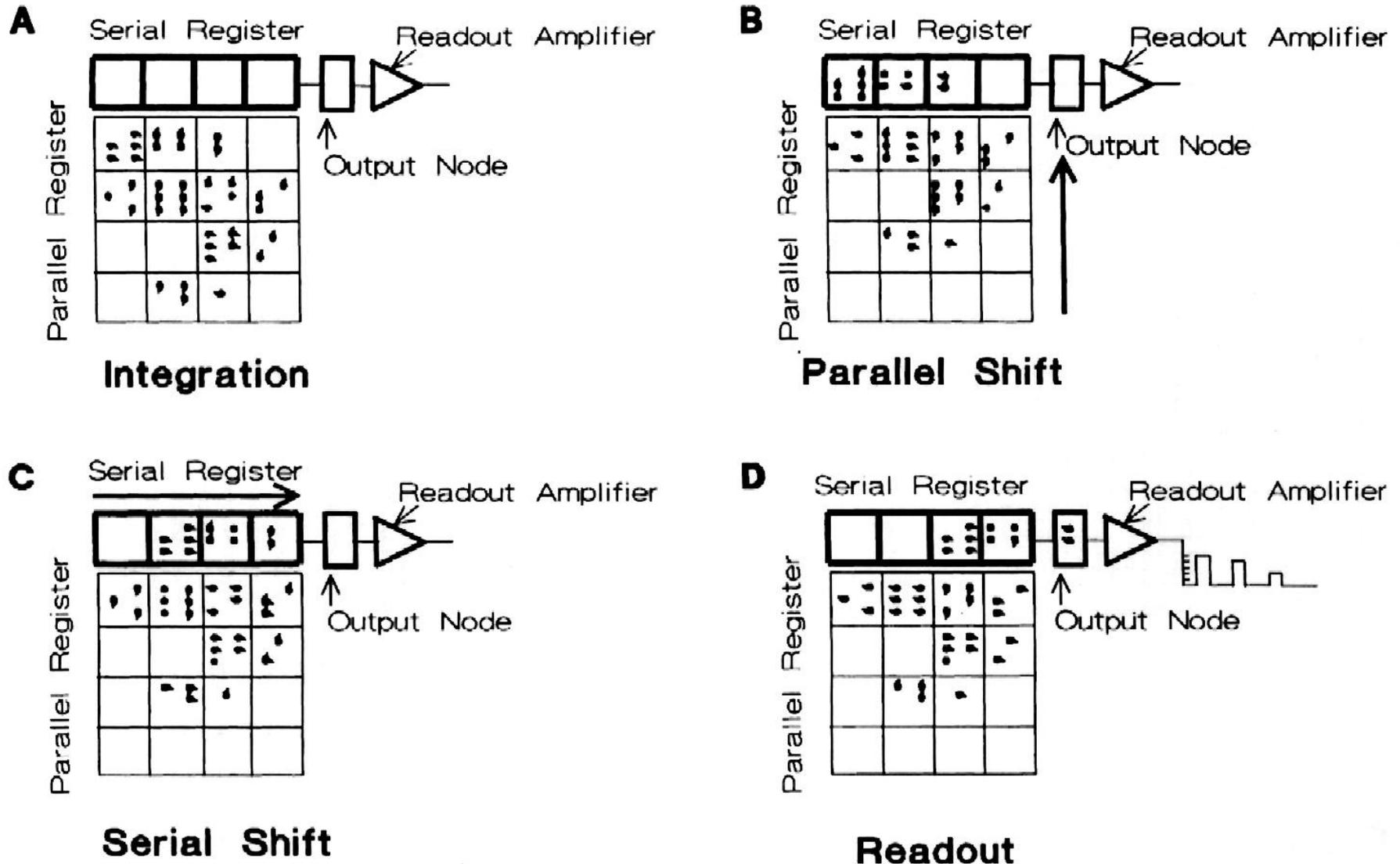
# *Transferts des charges*

- Le transfert des charges est réalisé par
  - un **décalage des registres en parallèle**
  - suivi d'une **lecture en série** par un amplificateur
    - Au niveau de la lecture il existe une possibilité de lire plusieurs pixels comme un seul (**mode binning**) ce qui permet d'augmenter la sensibilité et donc de diminuer le temps de lecture au pris d'une perte de résolution.

# Transfert des charges



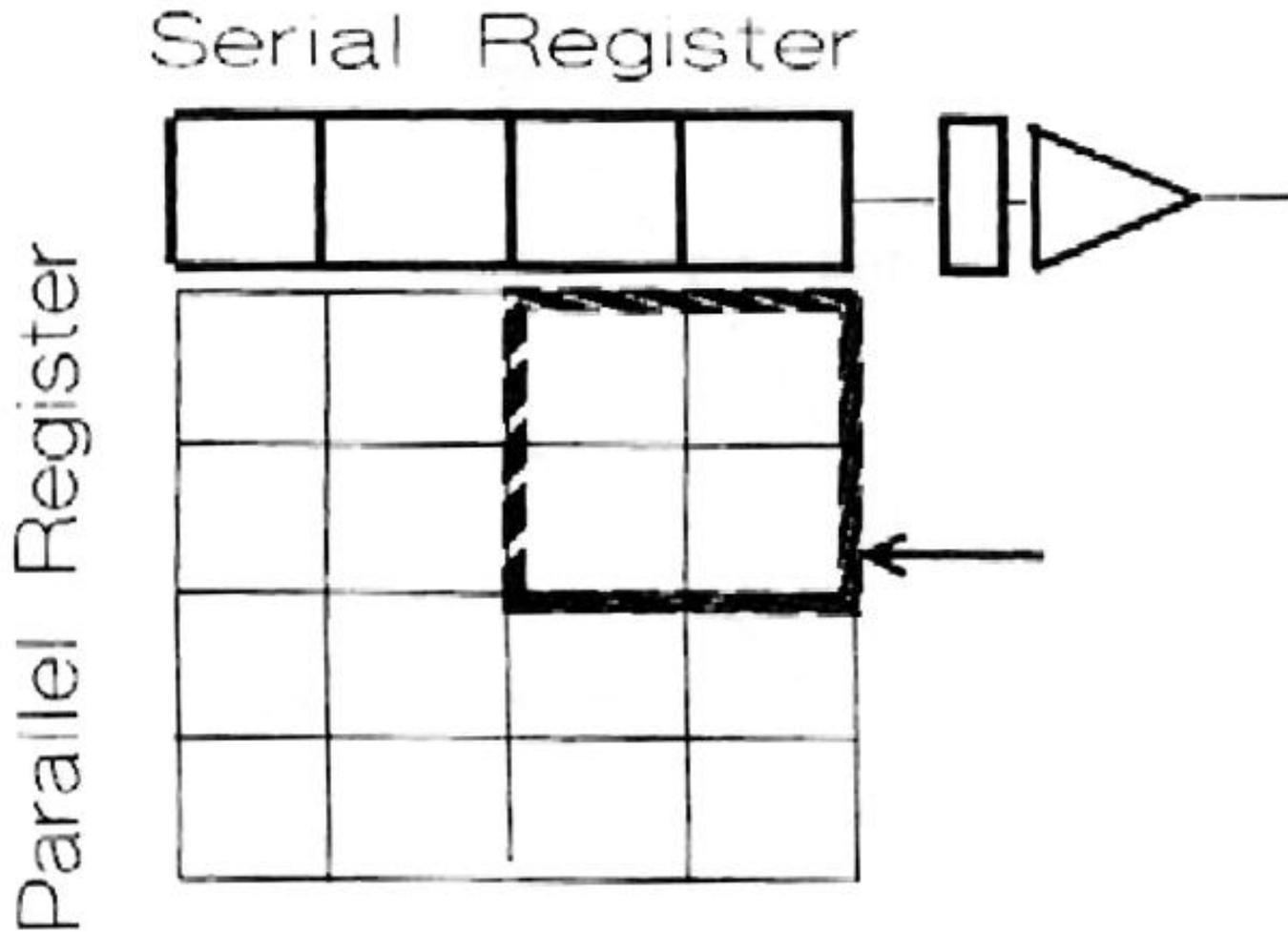
# Transfert des charges



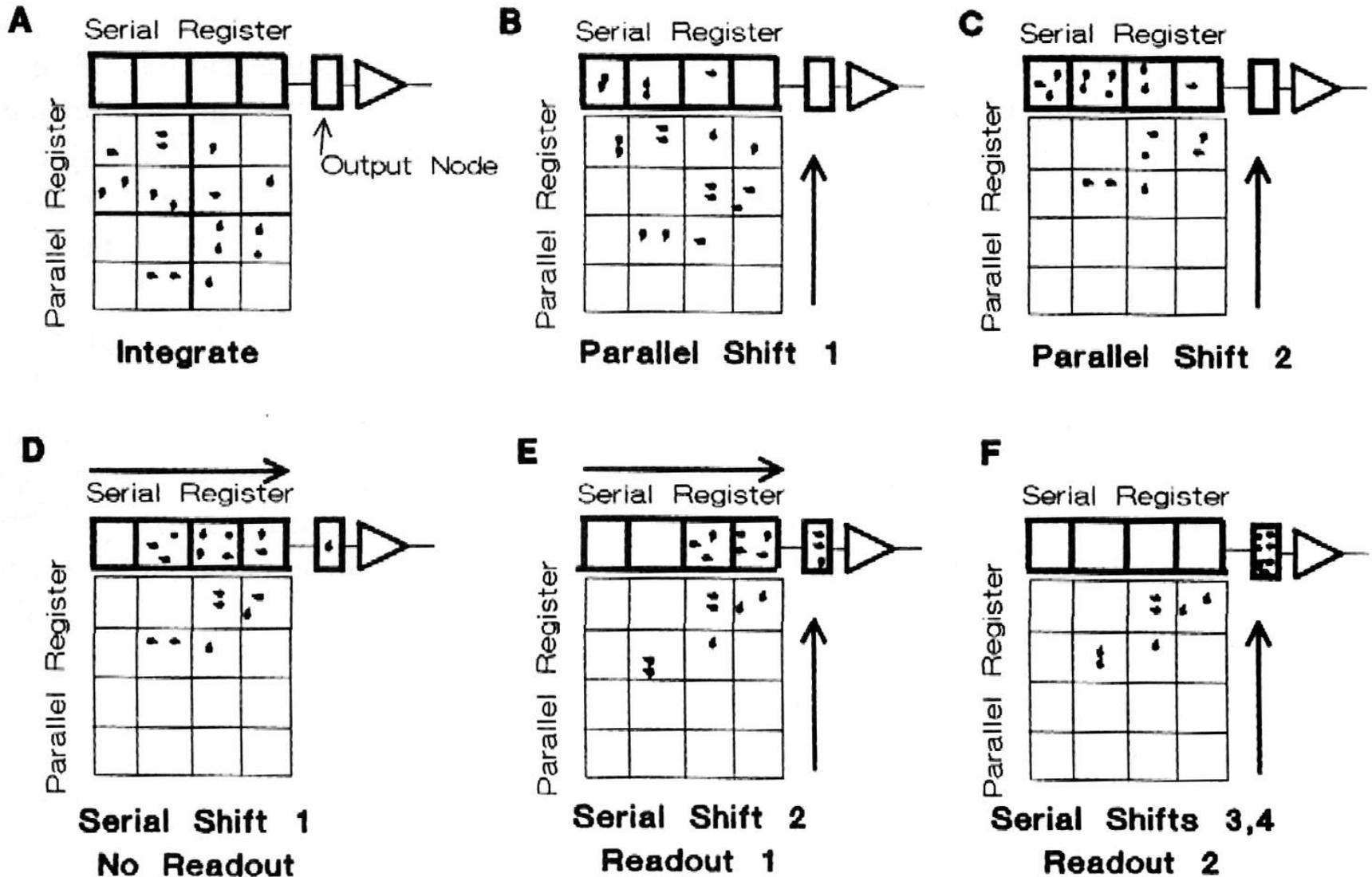
# Transfert des charges

- Au niveau de la **broche de sortie**, on a un **signal analogique** (tension généralement comprise entre 0 et 10 V) qui sera **numérisé par le circuit Convertisseur Analogique Numérique (CAN)**
- Le **pas de numérisation** du signal dépend du nombre de bits utilisés par le convertisseur

# Principe du binning



# Principe du binning



## 2 x 2 Pixel Binning Read-Out Stages

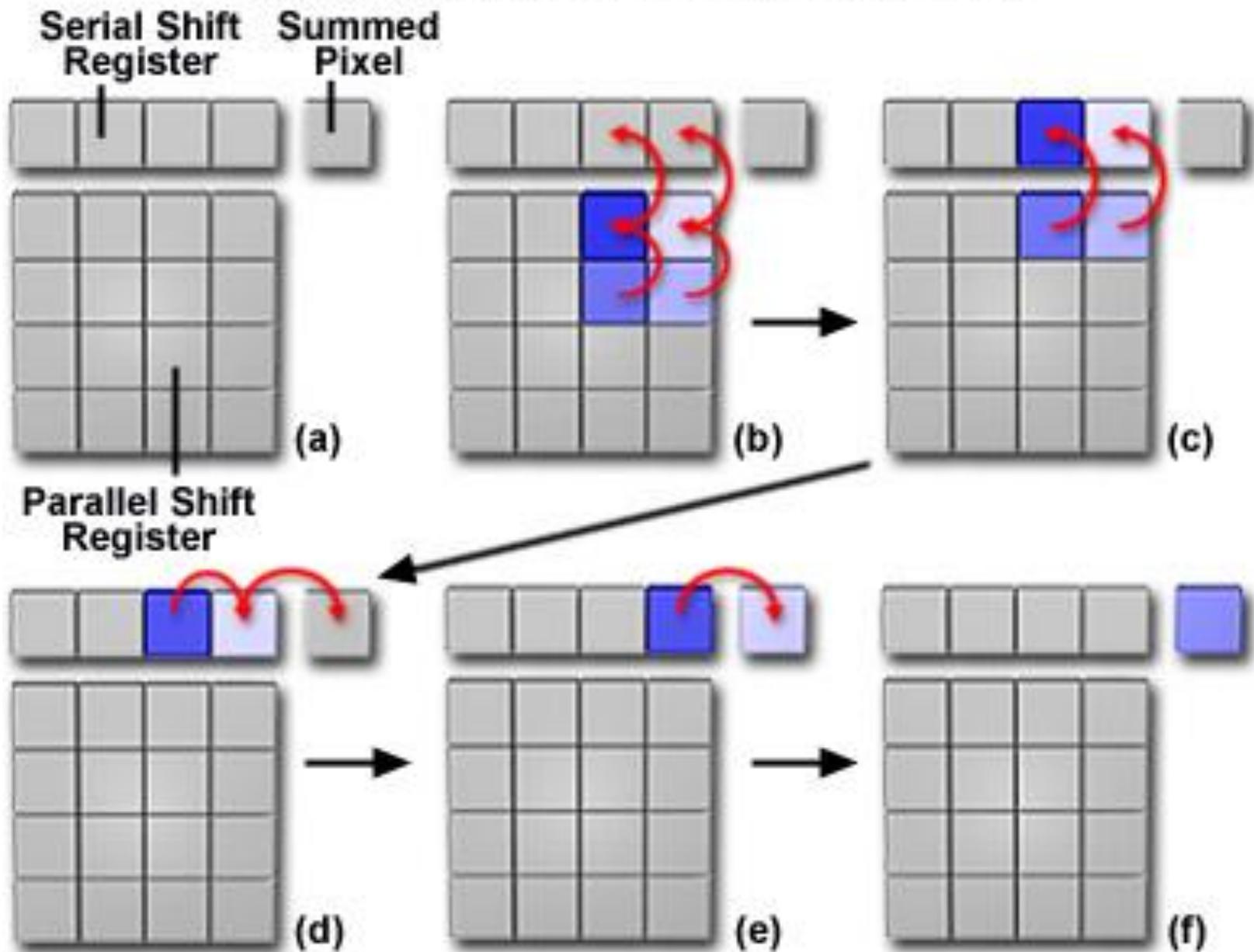


Figure 1

## CCD Resolution and Pixel Binning

Camera Sensor CCD Pixel Array

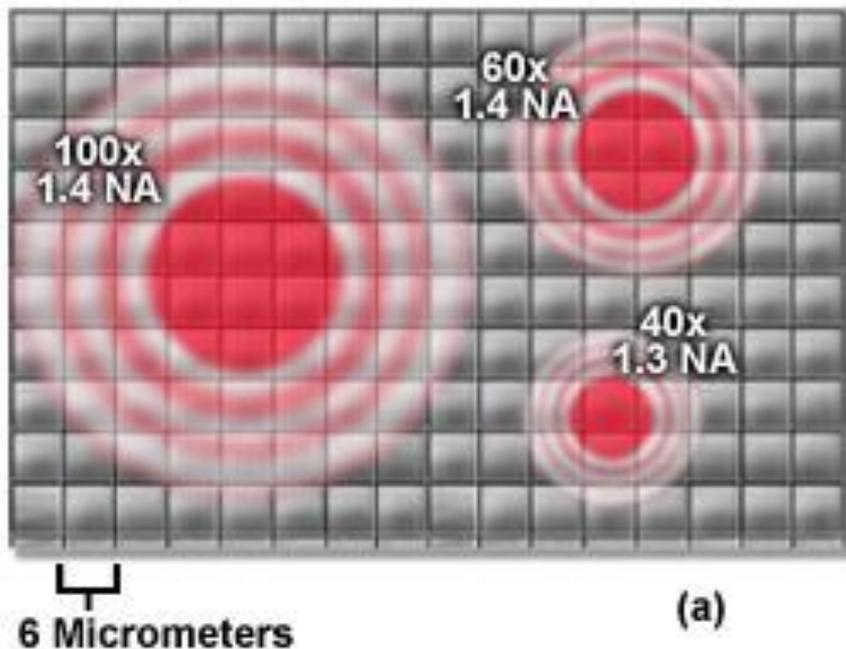
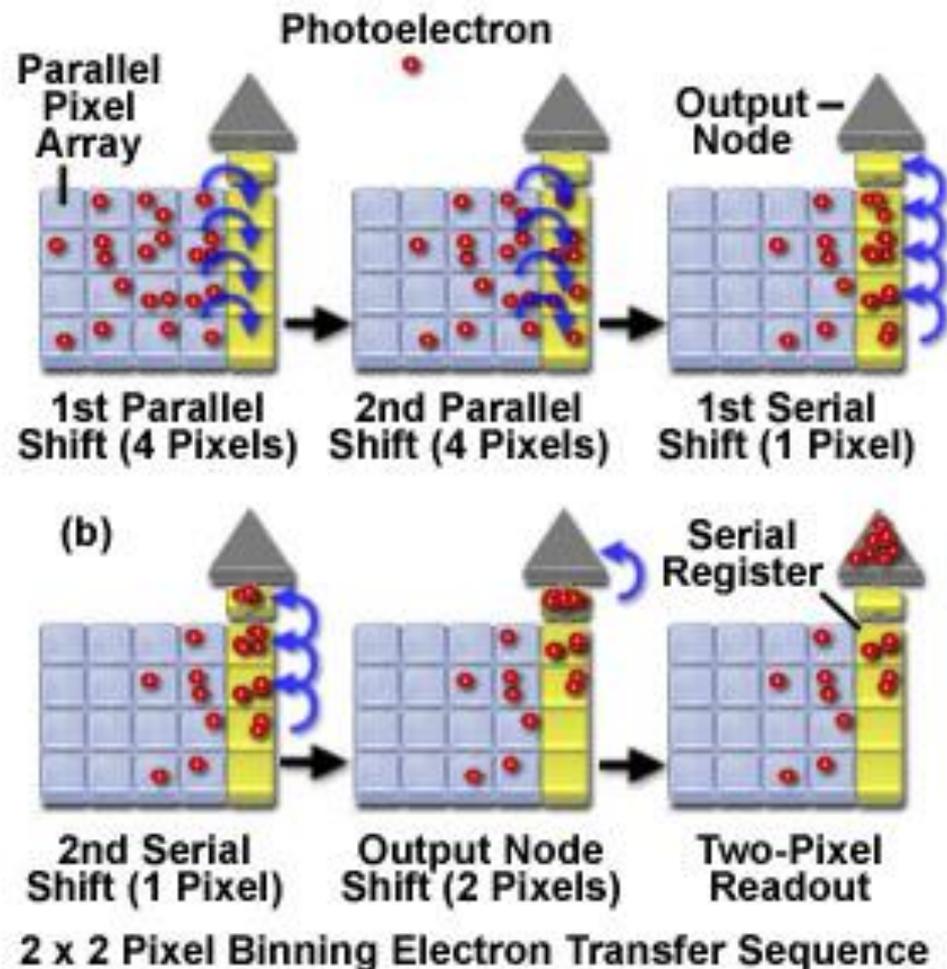


Figure 8



# Conversion Analogique/Numérique

- Réalisée par un circuit Convertisseur Analogique Numérique (CAN)
  - soit dans la camera
  - soit dans une carte de numérisation qui reçoit le signal vidéo en entrée
  - N bits permettent de représenter  $2^N$  valeurs.

*Exemples de valeurs du pas de numérisation en fonction du nombre de bits utilisés pour la conversion analogique-numérique (pour un signal analogique maximum de 10 V en sortie)*

<b>Nombre de bits</b>	<b>Nombre d'octets</b>	<b>Nombre de valeurs possibles</b>	<b>Pas de numérisation (V)</b>
<b>1</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>5</b>
<b>8*</b>	<b>1</b>	<b>256</b>	<b>0,0390625</b>
<b>10*</b>	<b>-</b>	<b>1024</b>	<b>0,009765625</b>
<b>12*</b>	<b>-</b>	<b>4096</b>	<b>0,00244140625</b>
<b>16*</b>	<b>2</b>	<b>65536</b>	<b>0,000152587890625</b>
<b>24</b>	<b>3</b>	<b>16777216</b>	<b>-</b>
<b>32</b>	<b>4</b>	<b>4294967296</b>	<b>-</b>
<b>36</b>	<b>-</b>	<b>68719476736</b>	<b>-</b>
<b>48</b>	<b>6</b>	<b>281474976710656</b>	<b>-</b>
<b>64</b>	<b>8</b>	<b>18446744073709551616</b>	<b>-</b>
<b>128</b>	<b>16</b>	<b>3,4028236692093846346337460743177.10<sup>38</sup></b>	<b>-</b>

\*Valeurs couramment rencontrées sur les caméras CCD

# Numérisation

- La numérisation d'une variable analogique comprise entre 0 et  $V_{max}$  volts par un CAN utilisant  $N$  bits donne un pas de numérisation (ou pas de quantification, ou résolution) de :
  - Largeur du pas de numérisation (Volt) =  $V_{max} / 2^N$  (Volt)
    - avec  $N$  = nombre de bits utilisés par le convertisseur analogique-numérique
- La dynamique du CAN est égale à  $2^N$
- L'augmentation du nombre de bits améliore grandement le rapport signal sur bruit

# Bruits

- La numérisation d'une image par un capteur CCD est entachée de **bruits provenant de plusieurs origines**
  - Le **bruit de photons** (bruit de signal ou bruit quantique)
  - Le bruit de conversion photons-électrons ou **bruit thermique** (effet photoélectrique indésirable ; dark current)
    - Éliminé par un **refroidissement du capteur** (généralement  $-20$  à  $-40$  °C)
    - Ce bruit se traduit généralement par l'apparition de points blancs sur l'image (points chauds ou hot pixels)
  - Le **bruit de transfert** des charges
    - Passage de la zone image à la zone mémoire
    - Passage du registre de lecture à la borne de sortie
  - Le **bruit d'amplification**
  - Le **bruit de numérisation** (généré par le convertisseur analogique-numérique)

# Caractéristiques des capteurs CCD

- **Le grade commercial**
  - 0 : pour zéro défaut
  - 1 : petit nombre de défauts ponctuels (pas de défaut de colonne)
  - 2 : peut avoir 2 ou plus colonnes défectueuses et un nombre important de défauts ponctuels (les moins chers)
- **Signification des types de défauts**
  - **Défaut ponctuel**
    - Correspond à des pixels qui ne répondent pas correctement (points chauds causés par une réponse trop forte, points sombres causés par une réponse trop faible, pixels morts qui ne répondent pas du tout)
  - **Défaut de colonne**
    - Les mêmes que précédemment mais s'applique à une colonne entière (également trous ou pixel traps et amas ou clusters)

# Caractéristiques des capteurs CCD

- **Type du CCD**
  - Pleine trame, transfert de trame, transfert de ligne
- **Taux de remplissage**
  - Pourcentage de la surface du capteur qui est sensible à la lumière
  - Dépend du type de CCD
- **Taille du CCD**
  - Nombre de pixels en X et en Y
- **Forme des pixels**
  - Généralement carrés
- **Taille des pixels**
  - Généralement proche de  $10 \mu\text{m}^2$
- **Sensibilité spectrale**
- **Capacité d'un pixel (well capacity)**
  - Le nombre d'électrons libérables par un élément CCD est limité
  - Dépend des dimensions de l'élément
  - Généralement de 10 000 à 1 million d'électrons sont libérables par pixel

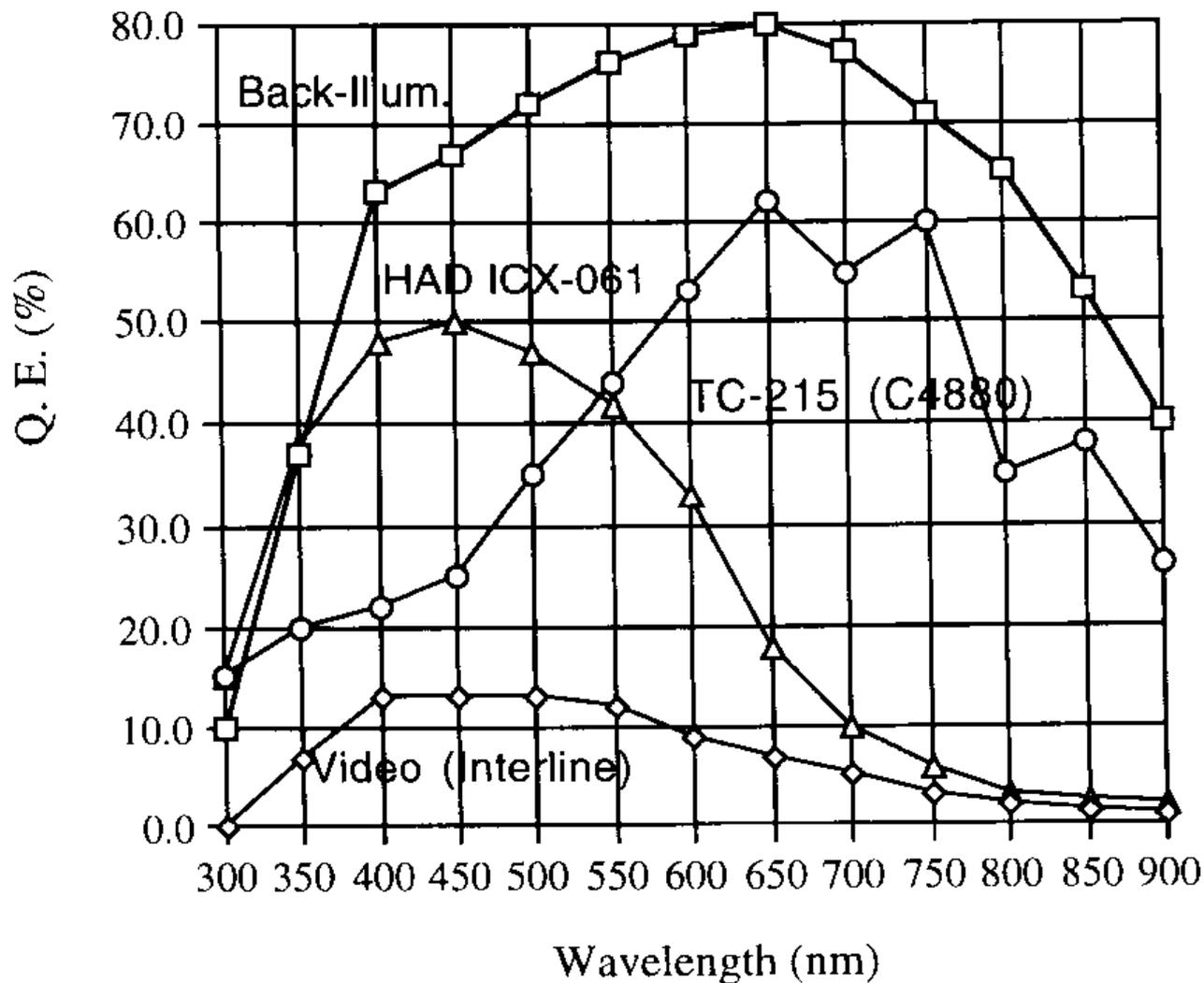
# Caractéristiques des capteurs CCD

- **Le rapport signal sur bruit** (Signal Noise Ratio; SNR)
  - $SNR = S/N$ 
    - avec S = signal détecté (en électrons) et N = bruit total (en électrons)
- Le signal détecté S est calculé de la manière suivante :
  - $S = I \cdot QE \cdot T$ 
    - avec I = niveau d'entrée (en photon/seconde)
    - QE = rendement quantique (Quantic Efficiency) (en électron/photon)
    - T = temps d'intégration (en seconde)
- Le bruit total est calculé de la manière suivante :
  - $N = \text{SQR}(N_{\text{shot}}^2 + N_{\text{camera}}^2)$ 
    - avec  $N_{\text{shot}} = \text{SQR}(S)$  (bruit de signal ou bruit quantique)
    - Et  $N_{\text{camera}} = \text{SQR}(N_{\text{read}}^2 + N_{\text{dark}}^2)$
    - avec  $N_{\text{dark}} = \text{SQR}(D \cdot T)$
    - avec D = courant noir ou bruit thermique (en électron/s) et T = temps d'intégration
- Remarque 1 : pour convertir le rapport signal sur bruit en décibels on utilise :
  - $(S/N)_{\text{db}} = 20 \log(S/N)$
- Remarque 2 : pour avoir le rapport en bits soit calculer le logarithme de base 2 de S/N soit diviser le rapport S/N en décibels par 6 (1 bit est équivalent à 6 db) :
  - $(S/N)_{\text{bits}} = (S/N)_{\text{db}} / 6$

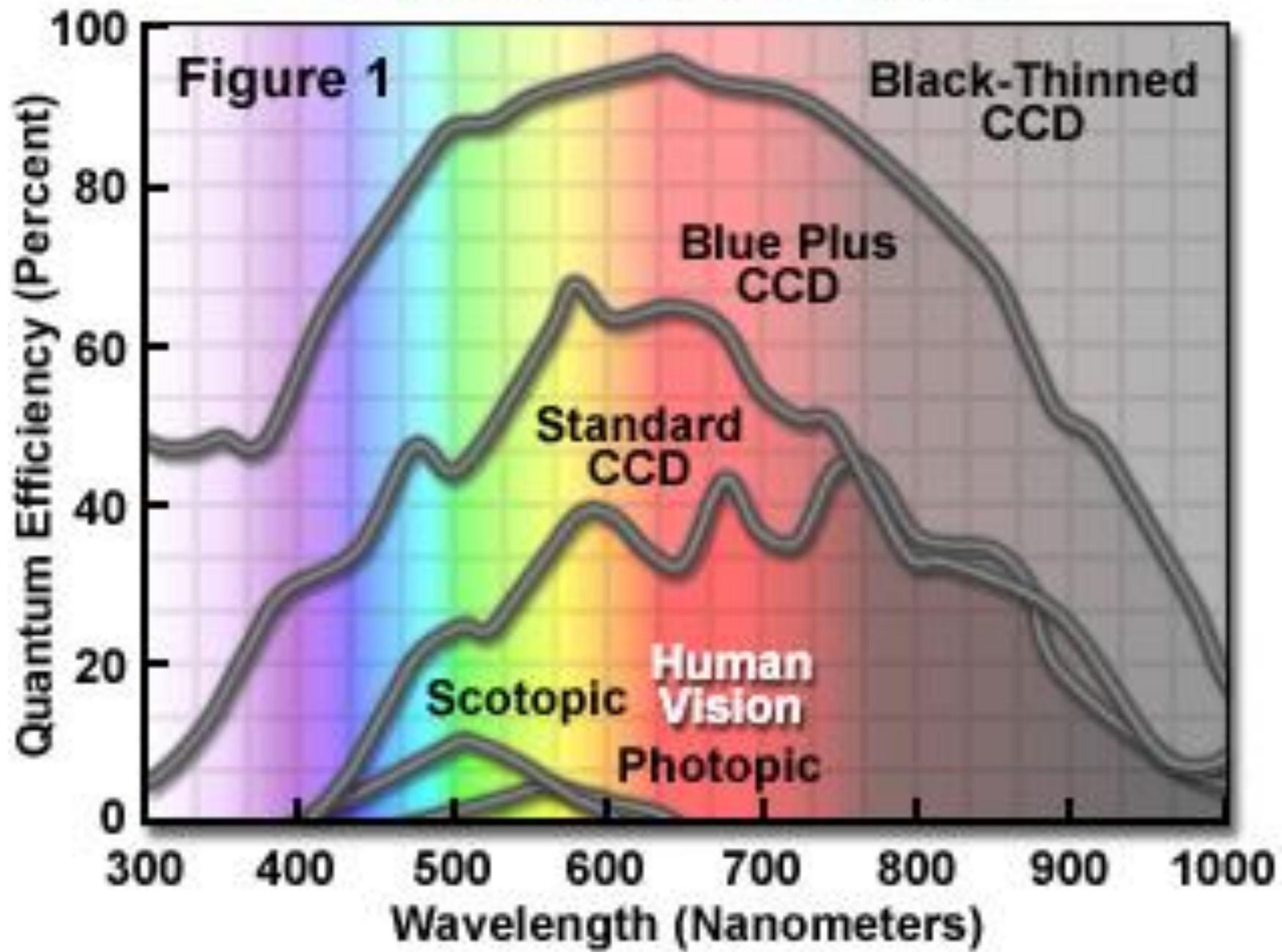
# Caractéristiques des capteurs CCD

- **Dynamique** du capteur (dynamic range)
  - Liée à la capacité en électrons des éléments photosensibles
  - On s'arrange généralement pour adapter la dynamique du capteur à celle du convertisseur analogique numérique
- **Linéarité**
  - Le nombre d'électrons émis doit être en relation linéaire avec le nombre de photons reçus (notion de gamma du capteur)
- **Rendement quantique**
  - Nombre d'électrons libérés par rapport au nombre de photons reçus (toujours inférieur à 1)
  - Le rendement quantique est dépendant de la longueur d'onde (notion de sensibilité ou réponse spectrale)
  - Généralement le pic de la réponse spectrale se situe dans le domaine visible
  - La majorité des capteurs CCD sont beaucoup plus sensibles dans le rouge et l'infrarouge que dans le bleu et l'ultra-violet
    - Des revêtements spéciaux (filtres), déposés à la surface du capteur, permettent de modifier la sensibilité des capteurs CCD aux diverses longueurs d'ondes (filtre anti-infrarouge par exemple)
  - Il convient de s'assurer que le capteur a un bon rendement quantique dans la longueur d'onde qui correspond au pic d'émission de ce qu'on désire étudier

# Rendements quantiques de quelques détecteurs CCD



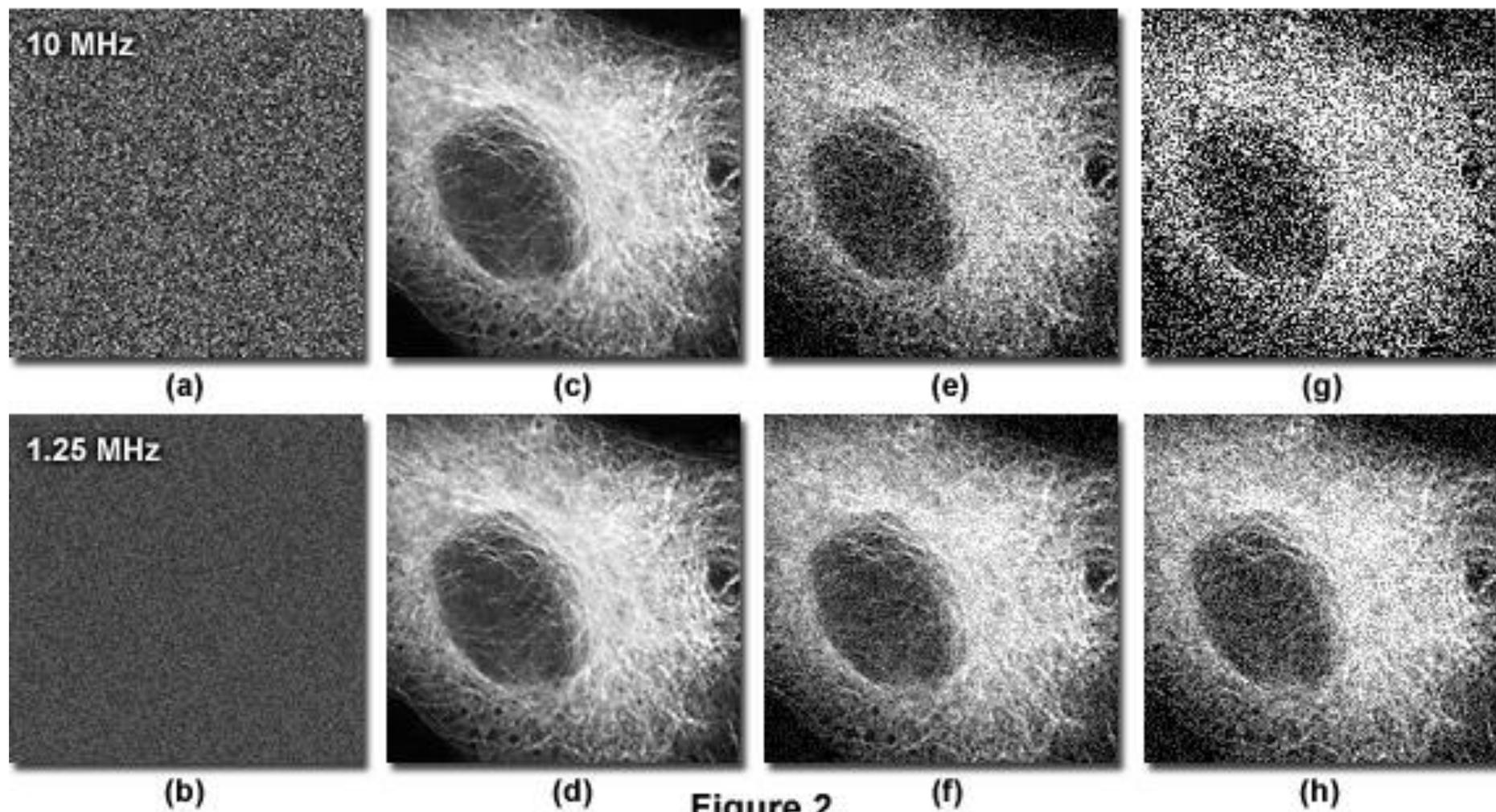
# CCD Spectral Sensitivities



# Caractéristiques des capteurs CCD

- **Fréquence de lecture** (en MHz)
  - Une fréquence de lecture de 10 MHz correspond à la lecture de 10 millions de pixels par seconde.
- **Fréquence maximum de saisie** (généralement exprimée en image/s)
- Déterminer quels sont les paramètres les plus importants en fonction de l'utilisation souhaitée (acquisition rapide, quantification, mesures de distances, photographie, etc...)
- Les **trois questions** à poser principalement sont
  - Quelle est la **résolution temporelle** (fréquence de saisie) requise ?
  - Quelle est la **résolution spatiale** requise ?
  - Quelle est **l'intensité lumineuse moyenne** des échantillons à analyser ?

## Effects of Digital Camera Sensitivity and Readout Speed on Image Quality

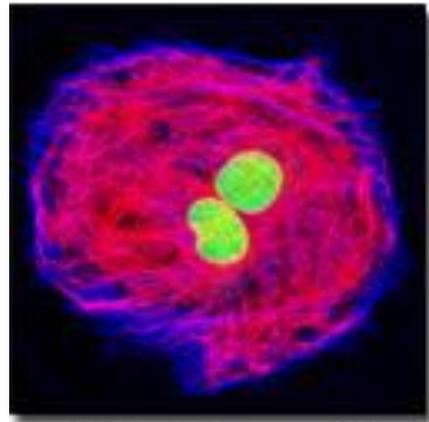


# Différents types de caméra CCD

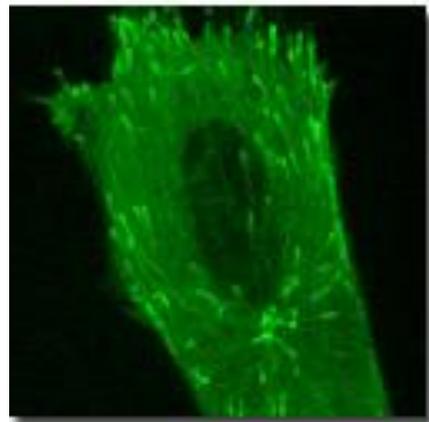
- Caméras CCD Vidéo
- Caméras CCD lentes (Slow-scan CCD)
- Caméras CCD rapides (Fast-scan CCD)
- Caméras CCD Intensifiées
- Caméras CCD couleur

# Live-Cell Microscopy

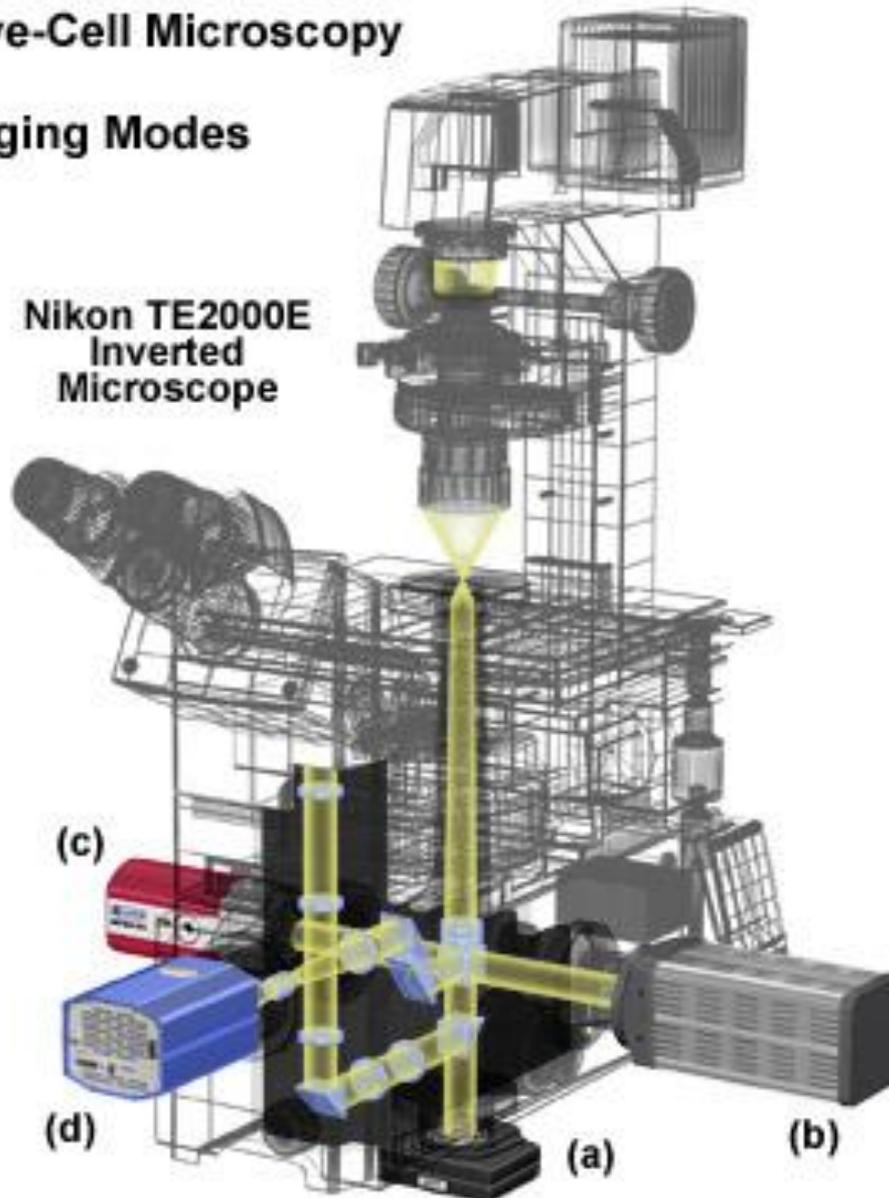
## Multiple Imaging Modes



Color Camera (a)

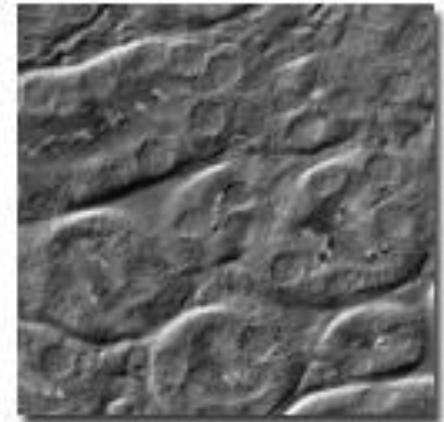


EMCCD Camera (b)

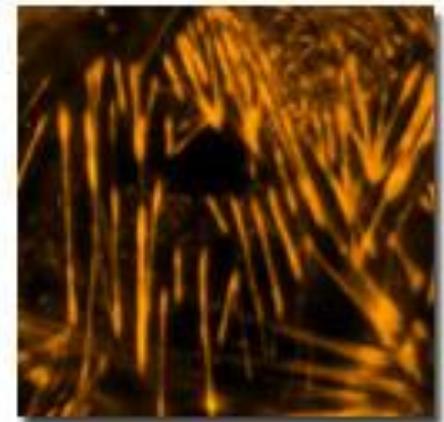


Nikon TE2000E  
Inverted  
Microscope

Figure 1



Infrared Camera (c)

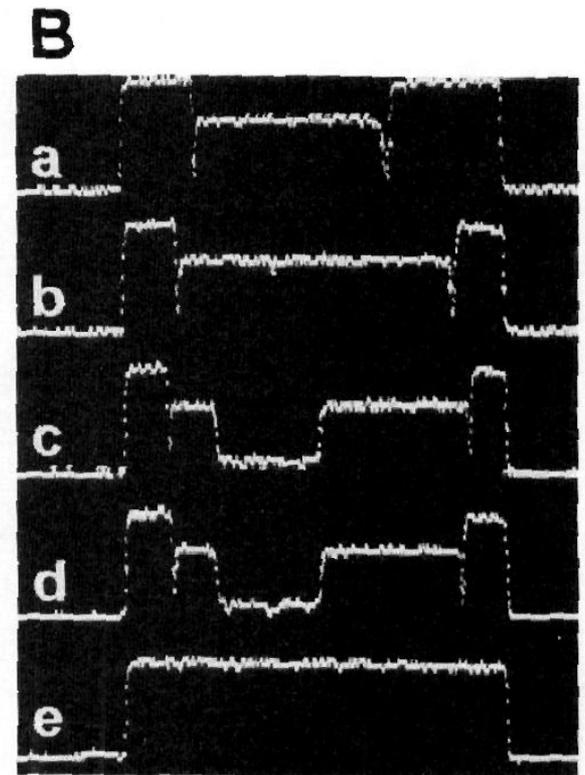
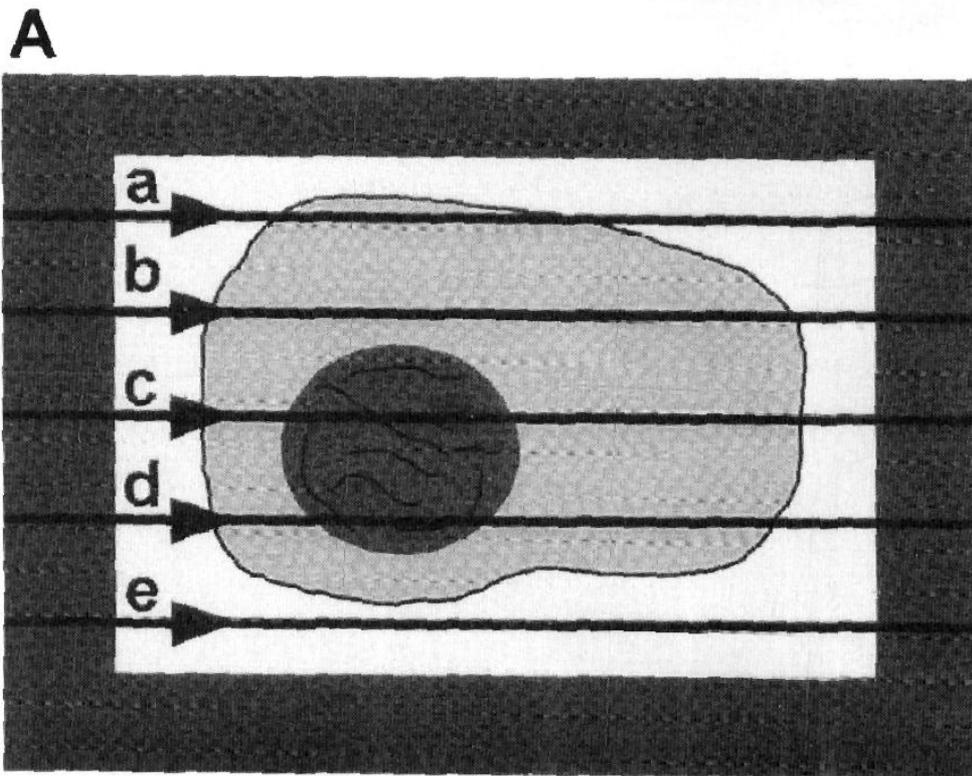


Hi-Res Camera (d)

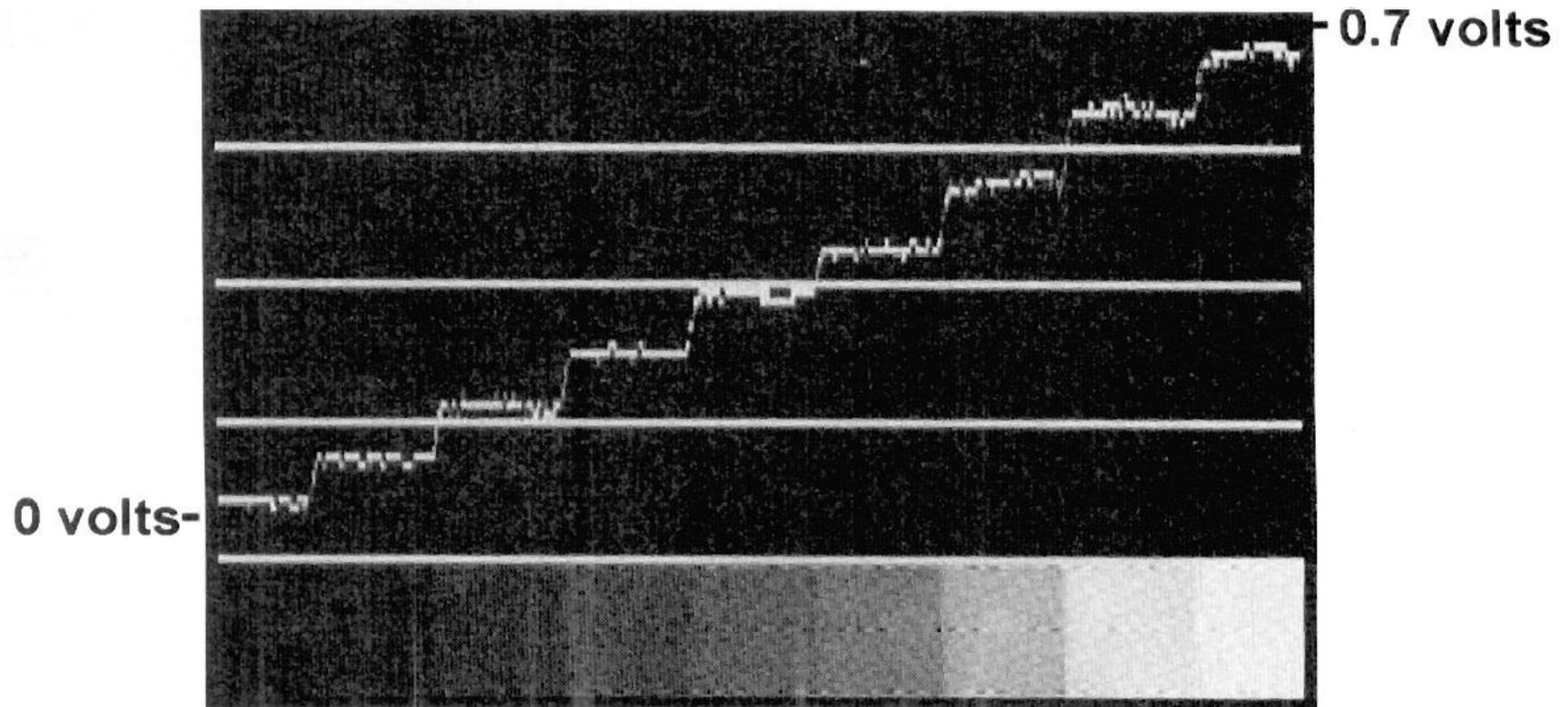
# Camera CCD Video

- La caméra converti l'image en une séquence de signaux électriques
- Différents standards sont utilisés
  - NTSC (USA et Japon)
  - CCIR (Europe; PAL et SECAM)
  - RS-170
- Ces caméras ne sont pas considérées comme étant des caméras bas niveau de lumière car elles ont un **faible rendement quantique** (10 à 20%)
- Leur dynamique est généralement de 8 bits (leur dynamique réelle étant plutôt proche de 6 bits de part leur bruit de lecture assez élevé)
- Le nombre de pixels de ces capteurs se situe approximativement vers 700 par 500
- La fréquence de saisie est fixée à 30 Hz
- Ces caméras ont l'avantage d'être connectables à tous les équipements vidéo standards. Il en existe des modèles spécialisés dédiés, par exemple, à la vidéomicroscopie et permettant de définir le temps d'intégration (de 100 µsecondes à plusieurs dizaines de secondes)
- Les capteurs CCD de ces caméras sont de type transfert de ligne.

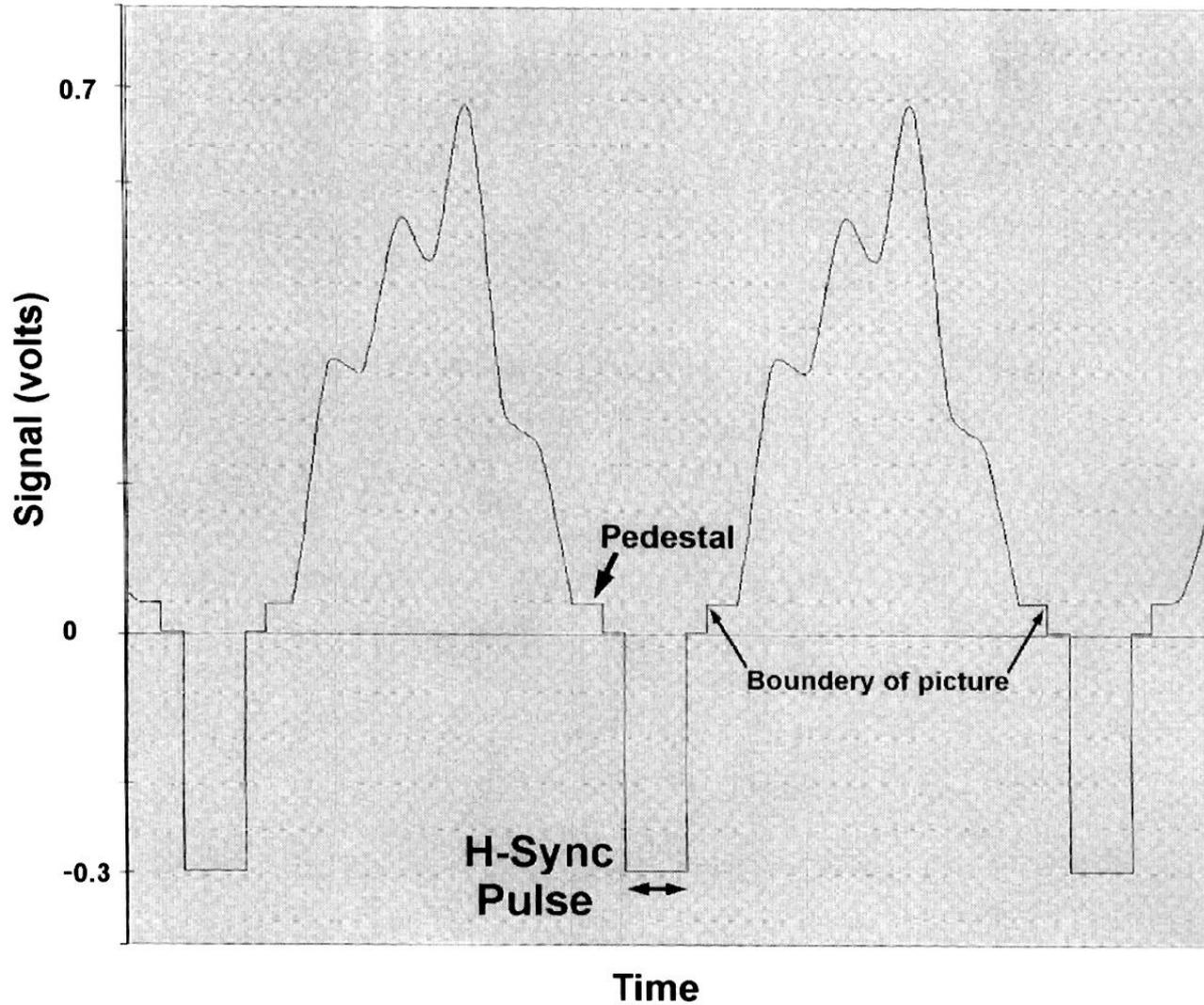
# Fonctionnement CCD Video



# Gain et dynamique CCD Video



# Signal Video



# Scan Line and Video Signal Relationship

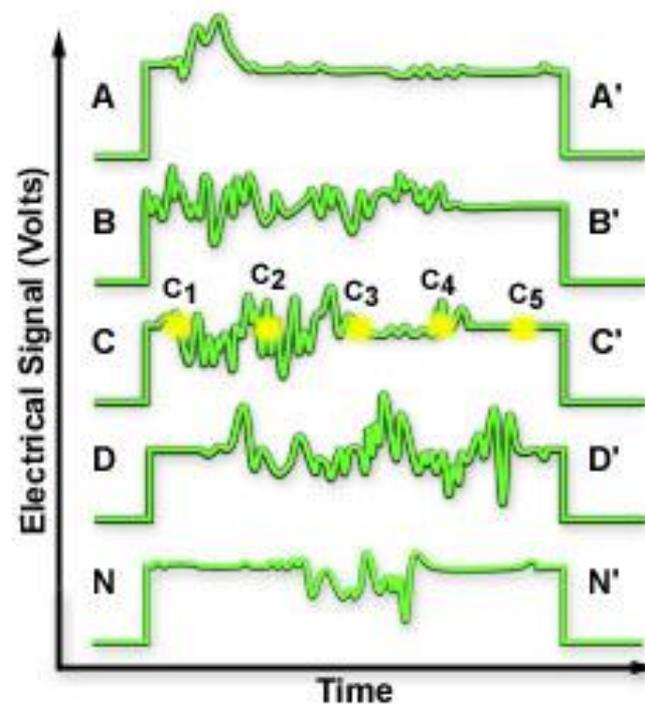


Figure 2

# Horizontal and Vertical Scan Lines

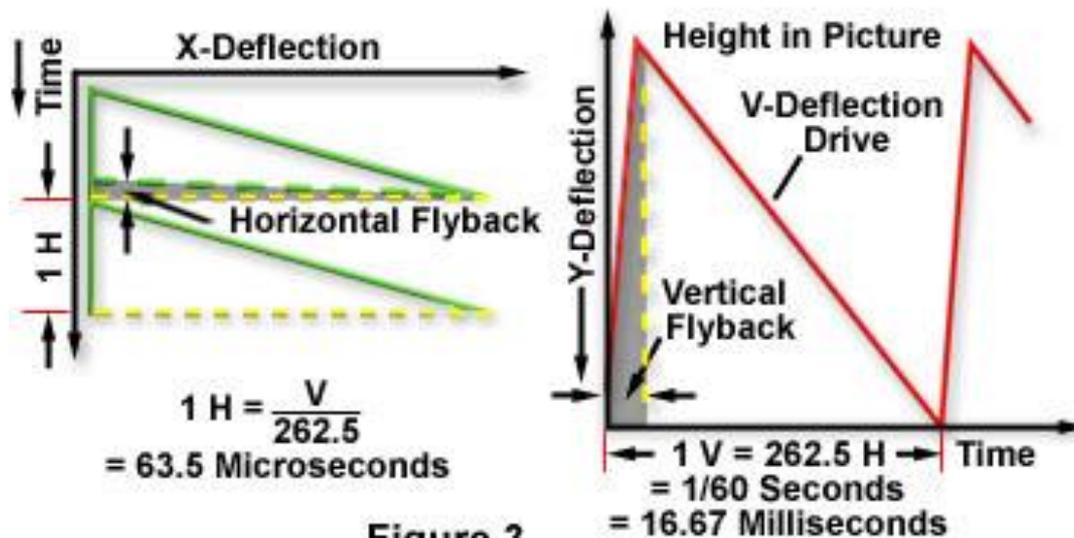
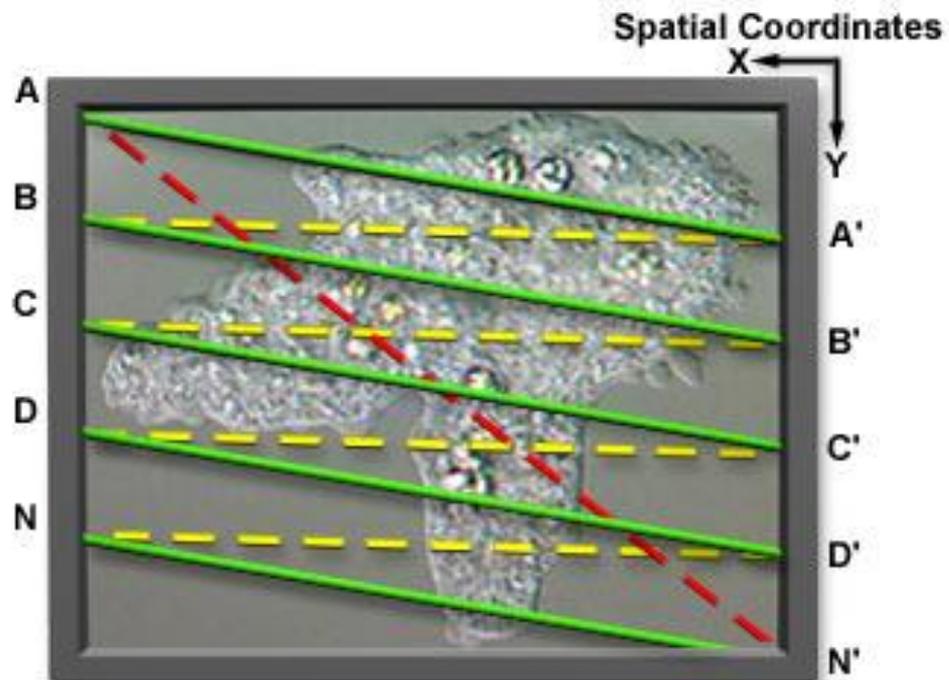


Figure 3

# Video Blanking Pulses

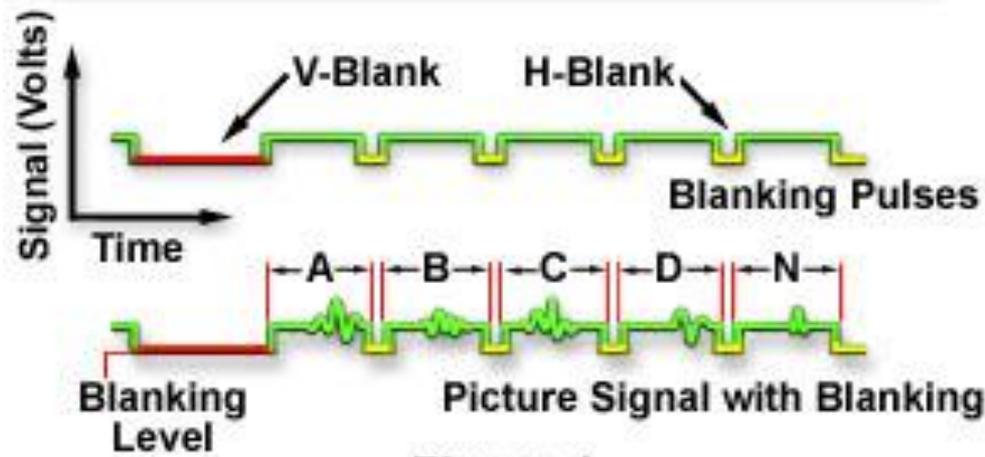
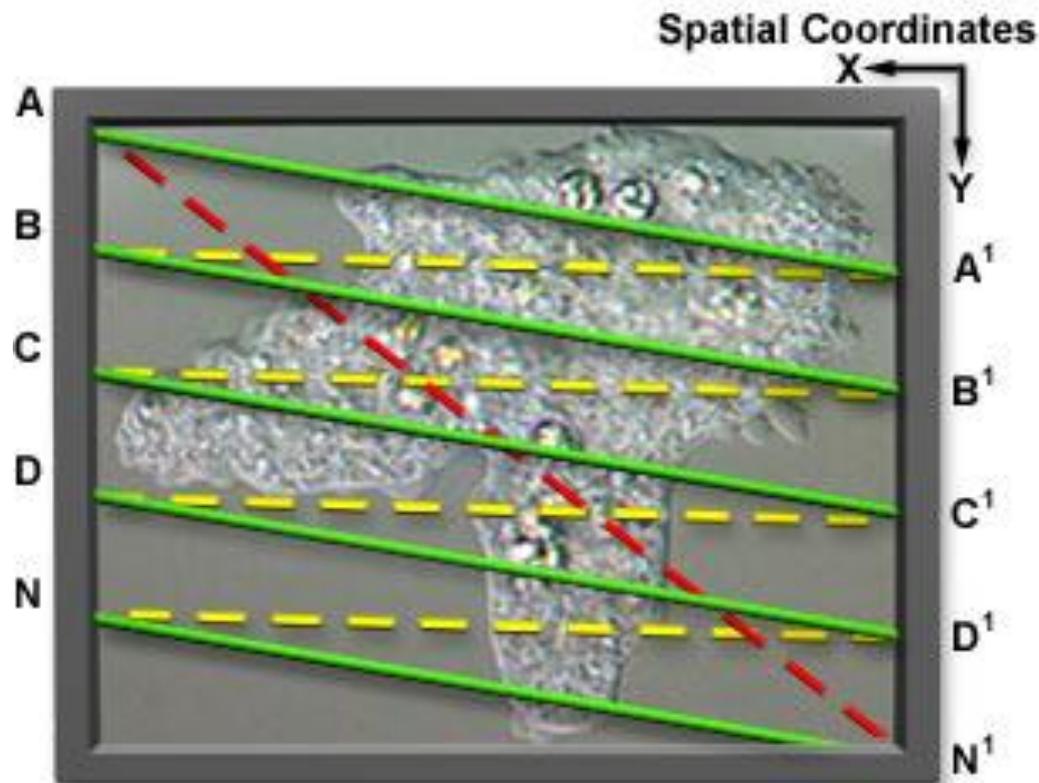


Figure 4

# Interlaced Raster Scan

Even  
Scan Lines  
(Teal)

Scan Line 0

Odd  
Scan Lines  
(Green)

2  
4  
6

1  
3  
5

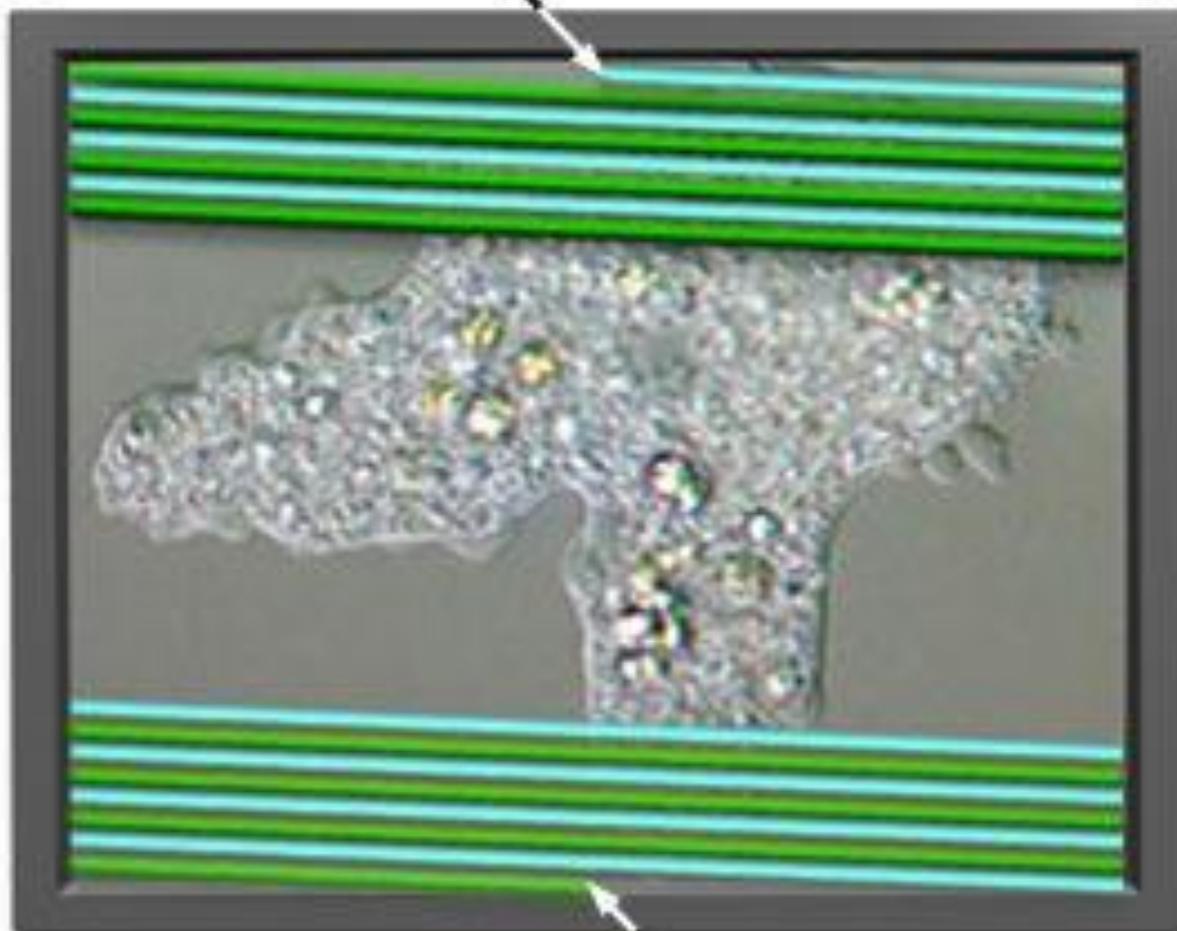
476  
478  
480

475  
477  
479

Scan Line 481

Field 1  
Field 2

Figure 5



# Standards Video

	STANDARD		
PROPRIETES	NTSC	PAL	SECAM
images / s	29,97	25	25
ms / image	33,37	40,00	40,00
lignes / image	525	625	625
ratio (horiz. / vert.)	4:3	4:3	4:3
entrelacement	2:1	2:1	2:1
$\mu$ s / ligne	63,56	64,00	64,00

# Caméras CCD lentes

- Actuellement les meilleures caméras pour ce qui concerne les bas niveaux de lumière
- Leur rendement quantique varie de 20 à 80%
- Leur résolution spatiale s'étend jusqu'à 6000 par 6000 pixels (ou plus)
- Leur faible vitesse de lecture leur permet d'être très peu bruyantes
  - bruit de lecture d'environ 5 électrons par pixel
  - bruit thermique de quelques électrons par pixel et par heure
  - très fort rapport signal sur bruit
- La dynamique de ces caméras est généralement de 10 à 16 bits.

# Caméras CCD rapides

- Utilisé pour des analyses sur des signaux assez faibles et nécessitant une résolution temporelle élevée
- Se sont des caméras à temps d'intégration mais leur fréquence de lecture élevée leur permet d'égaliser ou d'approcher la fréquence vidéo
- Elles sont plus bruyantes que les précédentes mais ont malgré tout une bonne résolution spatiale
- Leur dynamique est comprise entre 8 et 12 bits

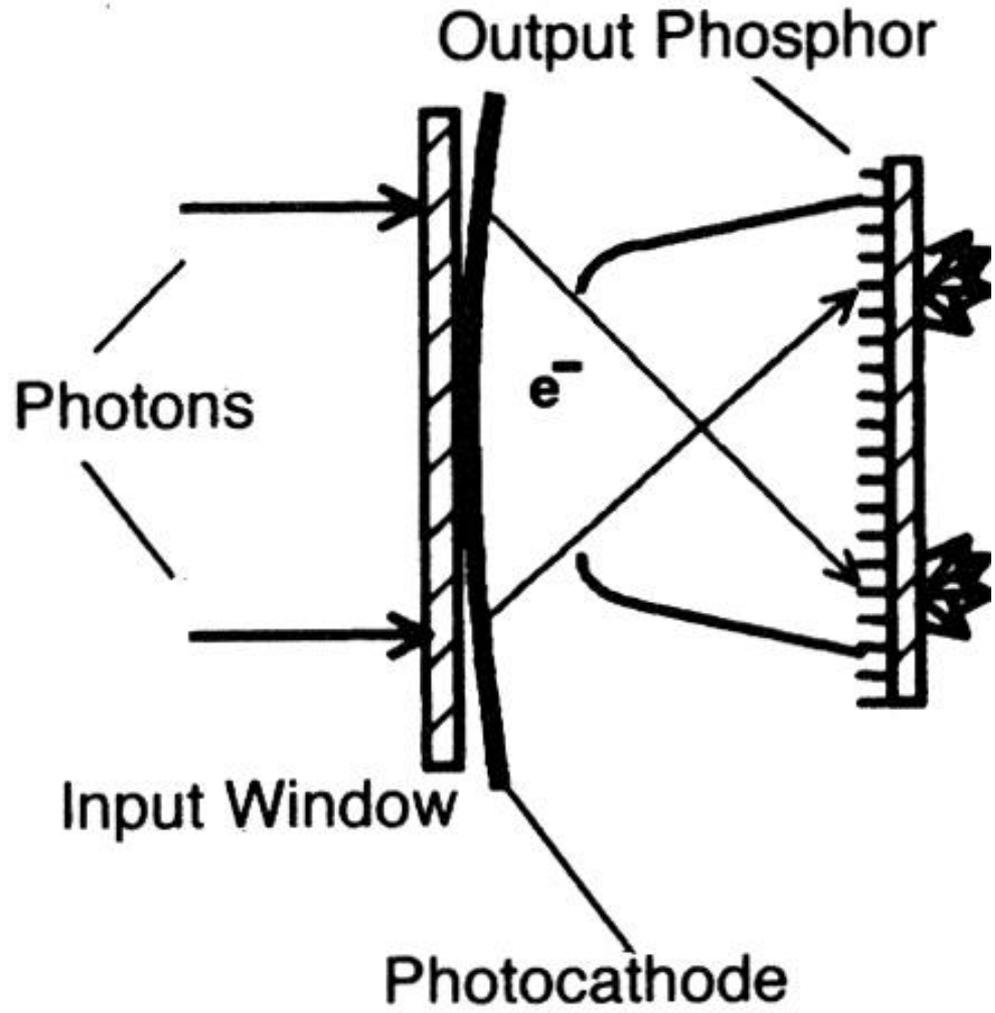
# Caméras CCD Intensifiées

- Utilisé pour des **applications en très basse lumière** qui nécessitent de plus une assez bonne résolution temporelle
  - cinétique du calcium en vidéomicroscopie par exemple)
- Des **intensificateurs d'image**, basés sur un écran phosphorescent, sont utilisés et placés avant le détecteur
- Des lentilles (taux de transfert de 10%) ou des fibres optiques (taux de transfert jusqu'à 60%) servent de **relais entre l'intensificateur et le capteur CCD**
- Tous les types de caméras peuvent être couplés à un intensificateur d'image (il est rare toutefois que des caméras de type Slow-scan soient utilisées)
- Ces caméras ont une dynamique de 8 bits (couplage avec une caméra vidéo standard) ou jusqu'à 12 bits (couplage avec une caméra de type Fast-scan)
- **Différents types d'intensificateurs** peuvent être utilisés

# Intensificateurs de première génération

- Ces intensificateurs sont des **tubes à vide** comparables aux tubes des caméras non CCD
- Des électrons générés par une photocathode (par l'arrivée d'un photon) sont accélérés et dirigés sur un écran fluorescent
- Les électrons frappant l'écran produisent une émission de photons dont le nombre est proportionnel à l'énergie des électrons accélérés
- **L'image amplifiée, produite sur l'écran de phosphore, est ensuite dirigée sur le capteur CCD**
- De tels systèmes peuvent réaliser une **amplification de plusieurs centaines de fois**

# Intensificateurs de première génération



## Silicon Intensifier Target Tube

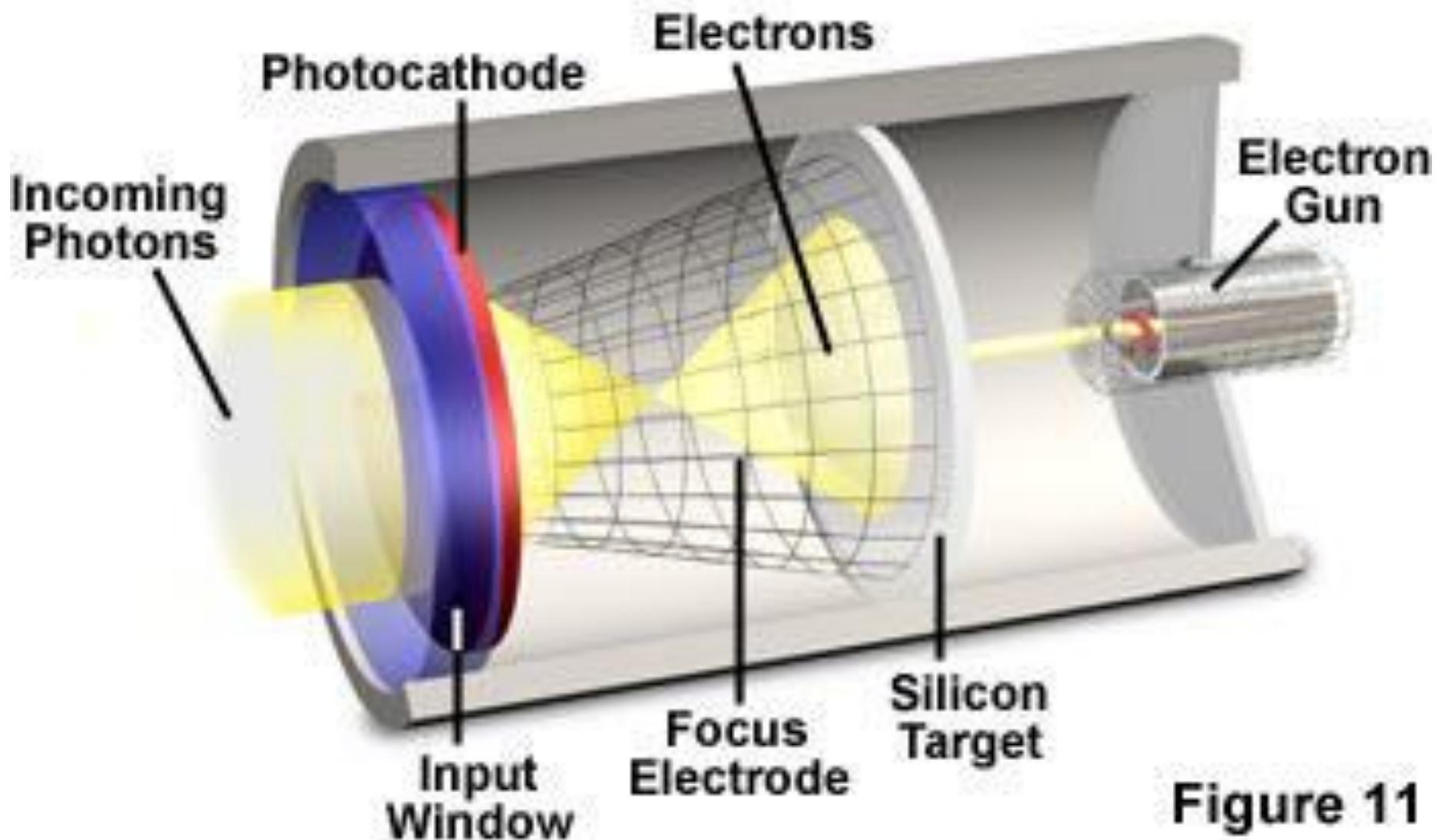
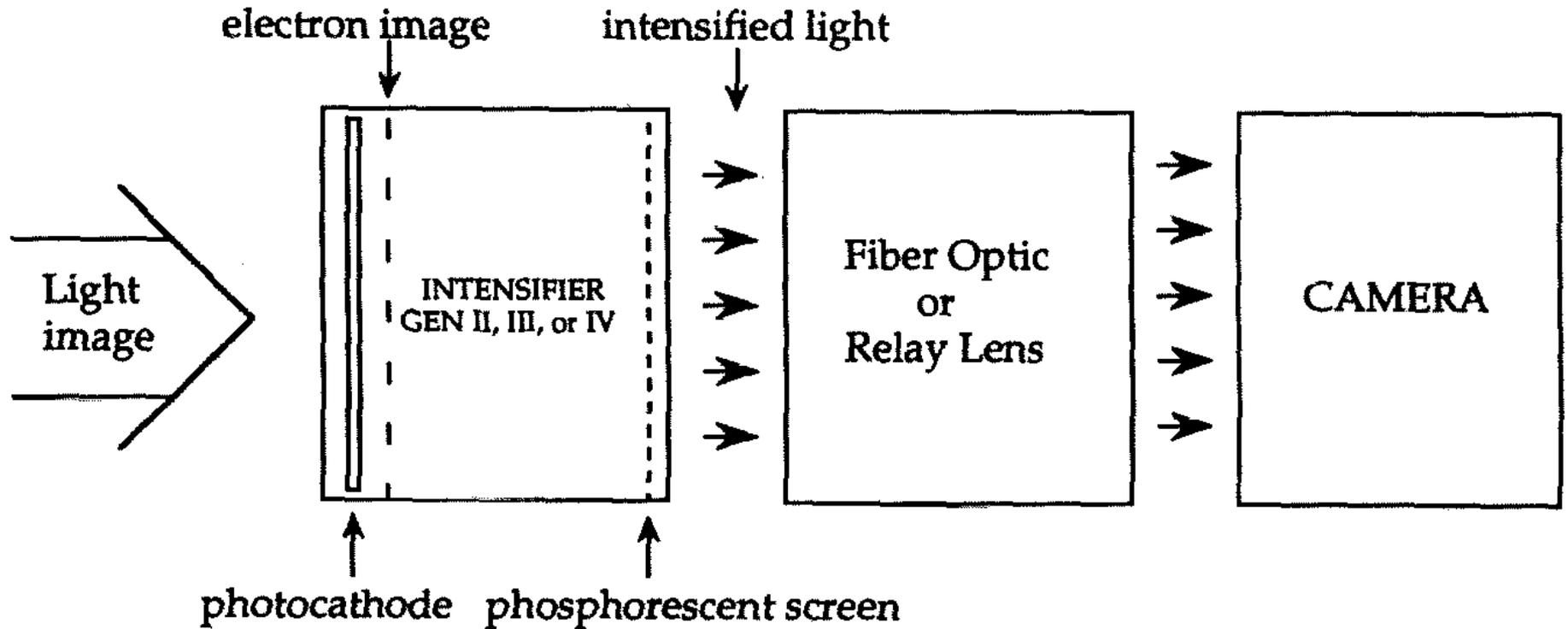


Figure 11

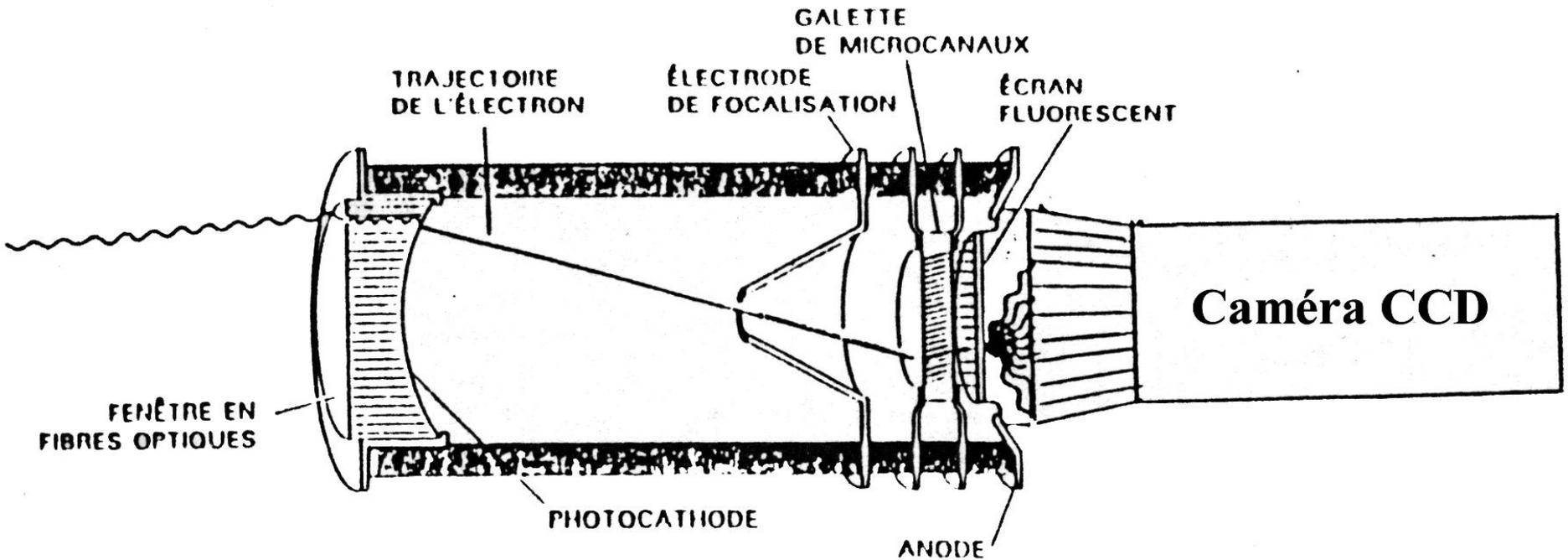
# Intensificateurs de deuxième, troisième et quatrième génération

- Ces intensificateurs sont basés des **plaques (galettes) de microcanaux** qui sont en fait l'association de grand nombre de tubes de verre recouverts de métal sur leur partie interne
- Les électrons de la photocathode sont accélérés et entrent en collision avec les parois internes de ces tubes produisant en finale, par une **cascade d'amplifications**, un grand nombre d'électrons qui viennent frapper un écran de phosphore
- L'image produite sur cet écran de phosphore est envoyée sur le capteur CCD
- Ce type d'intensificateur peut **amplifier le signal jusqu'à un million de fois**
- Les générations II, III et IV diffèrent principalement par leur type de cathode et leur mode de construction
- L'amplification très importante obtenue va souvent de paire avec une résolution spatiale moins bonne (fonction de la taille et du nombre de capillaires de la plaque intensificatrice)

# Caméra CCD intensifiée



# *Intensificateur basé sur une plaque de micro-canaux*



# Proximity-Focused Image Intensifier

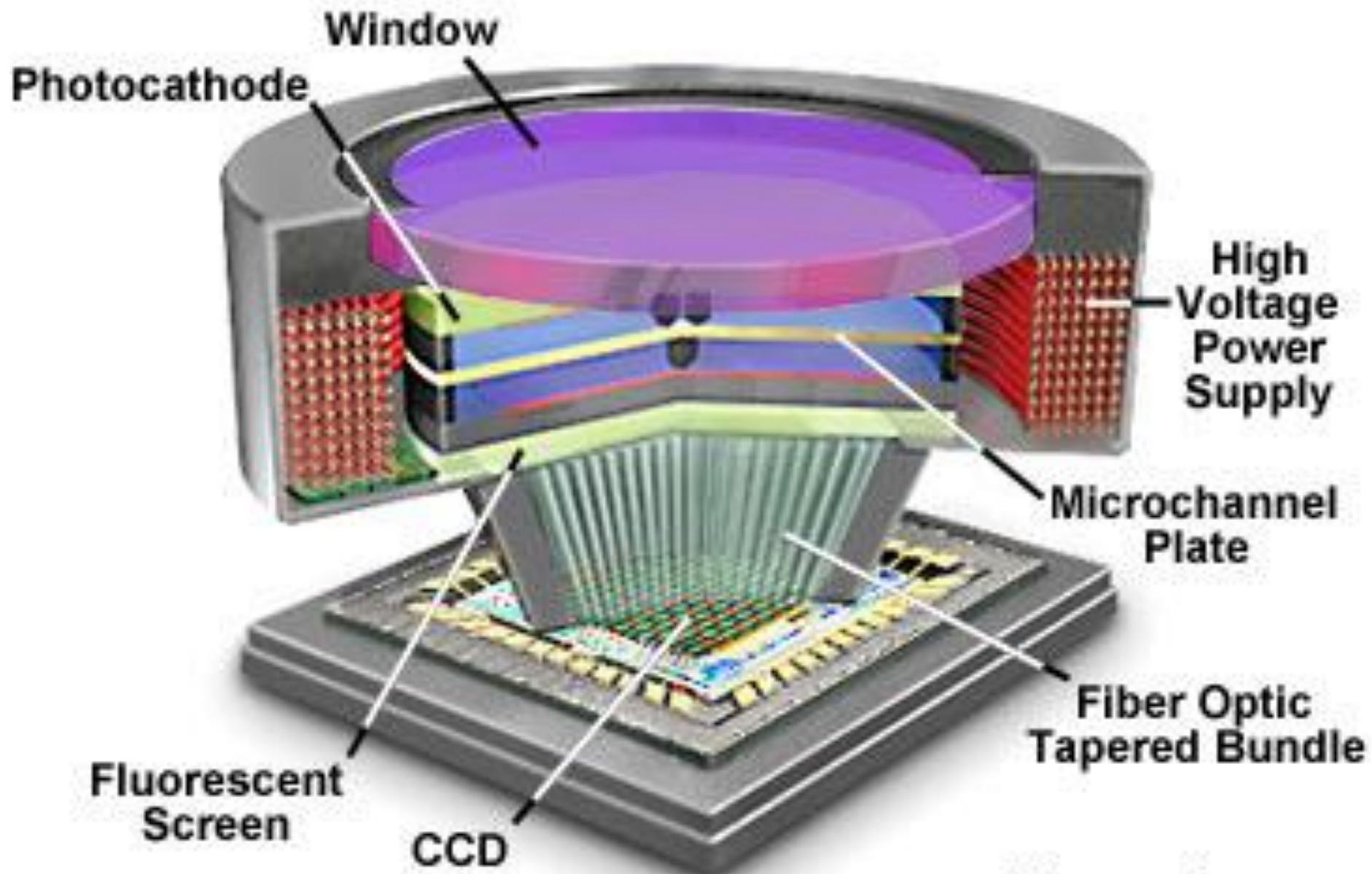
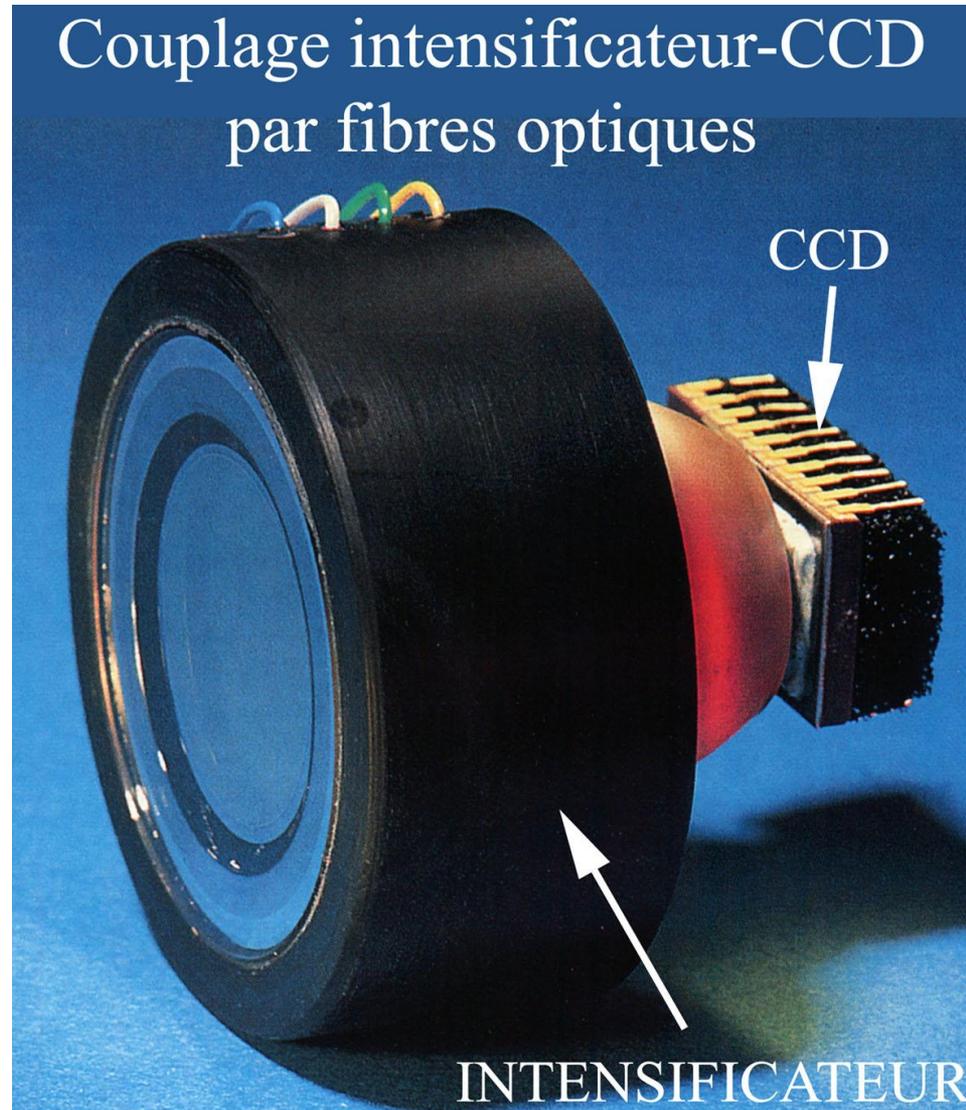
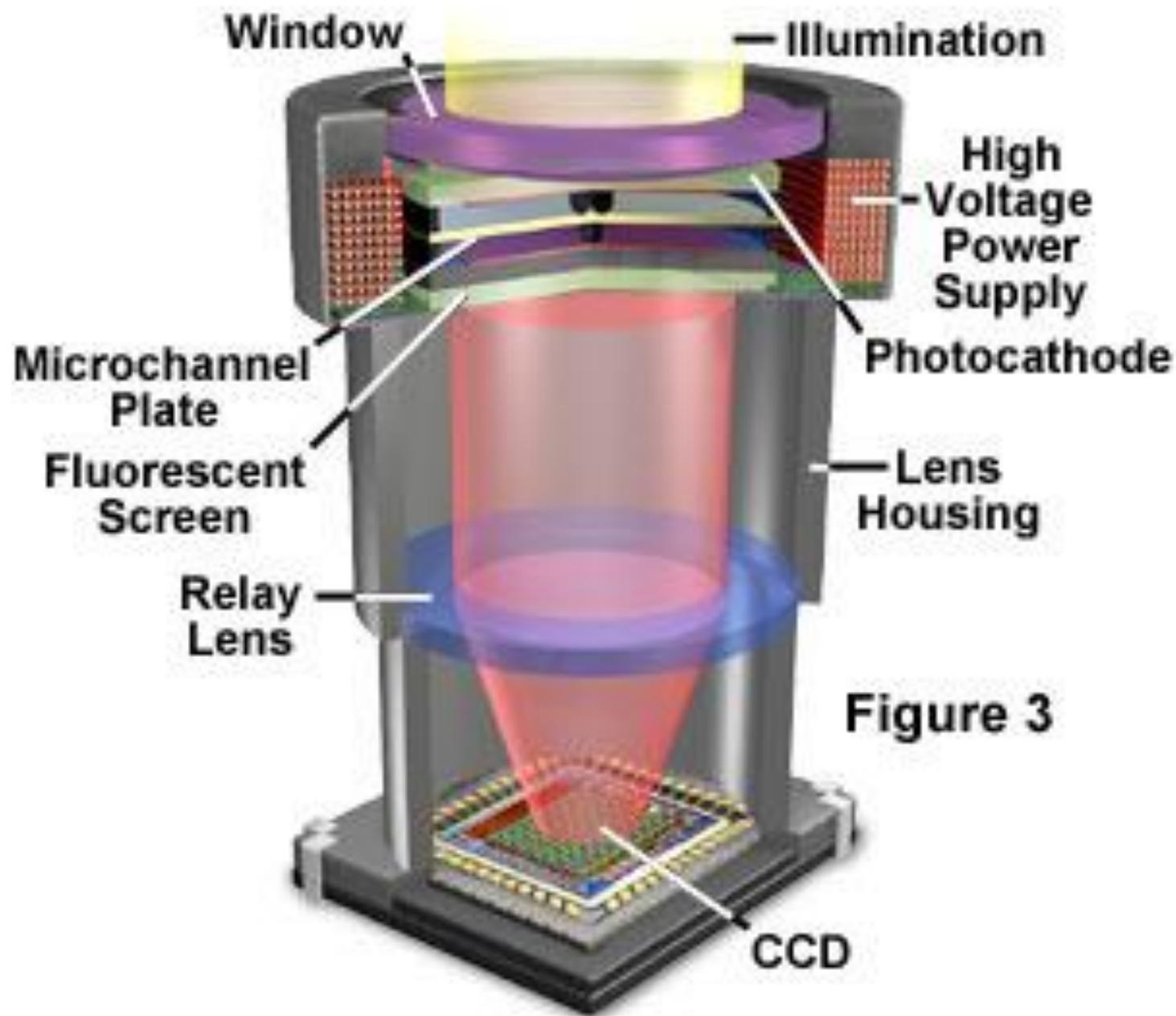


Figure 1

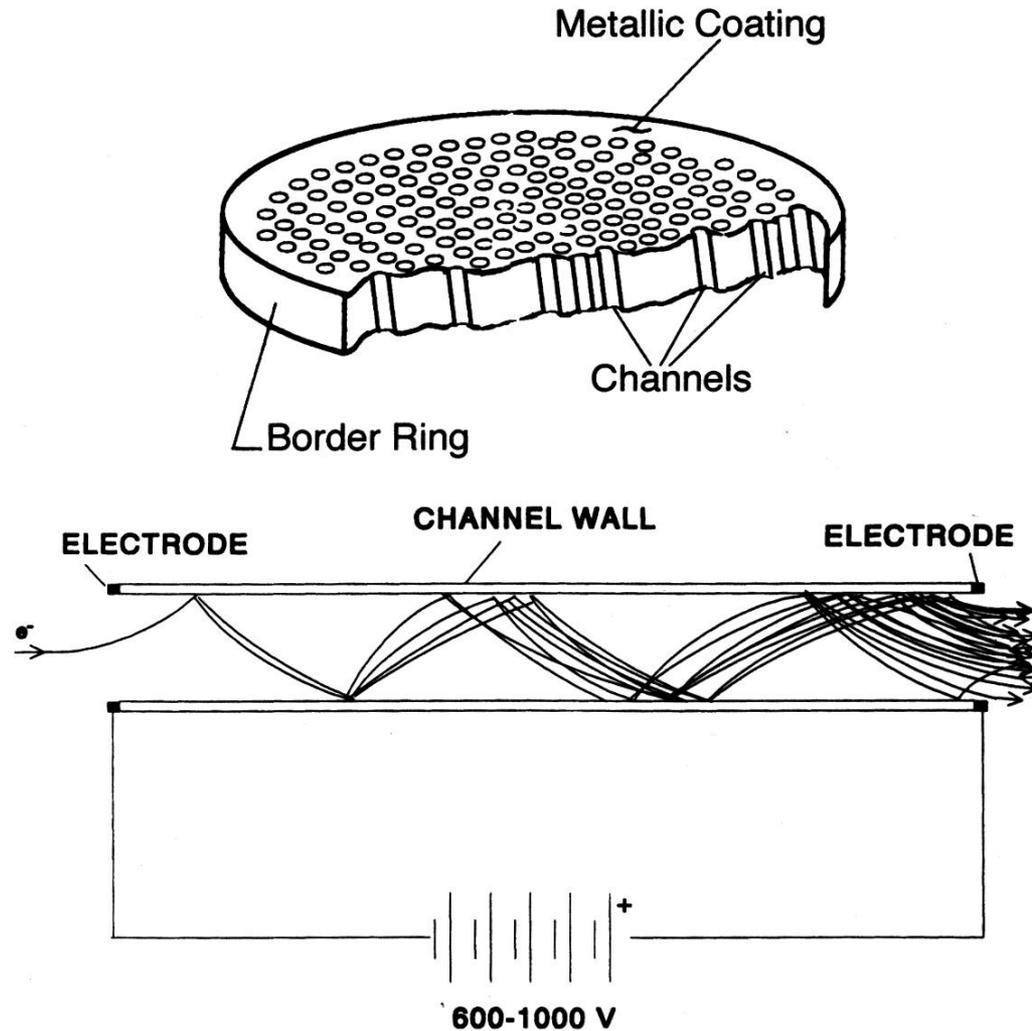
# Caméra CCD intensifiée



# Image Intensifier with Relay Lens



# *Plaque de micro-canaux utilisée dans les caméras de type ICCD*



# Photomultiplier Tube

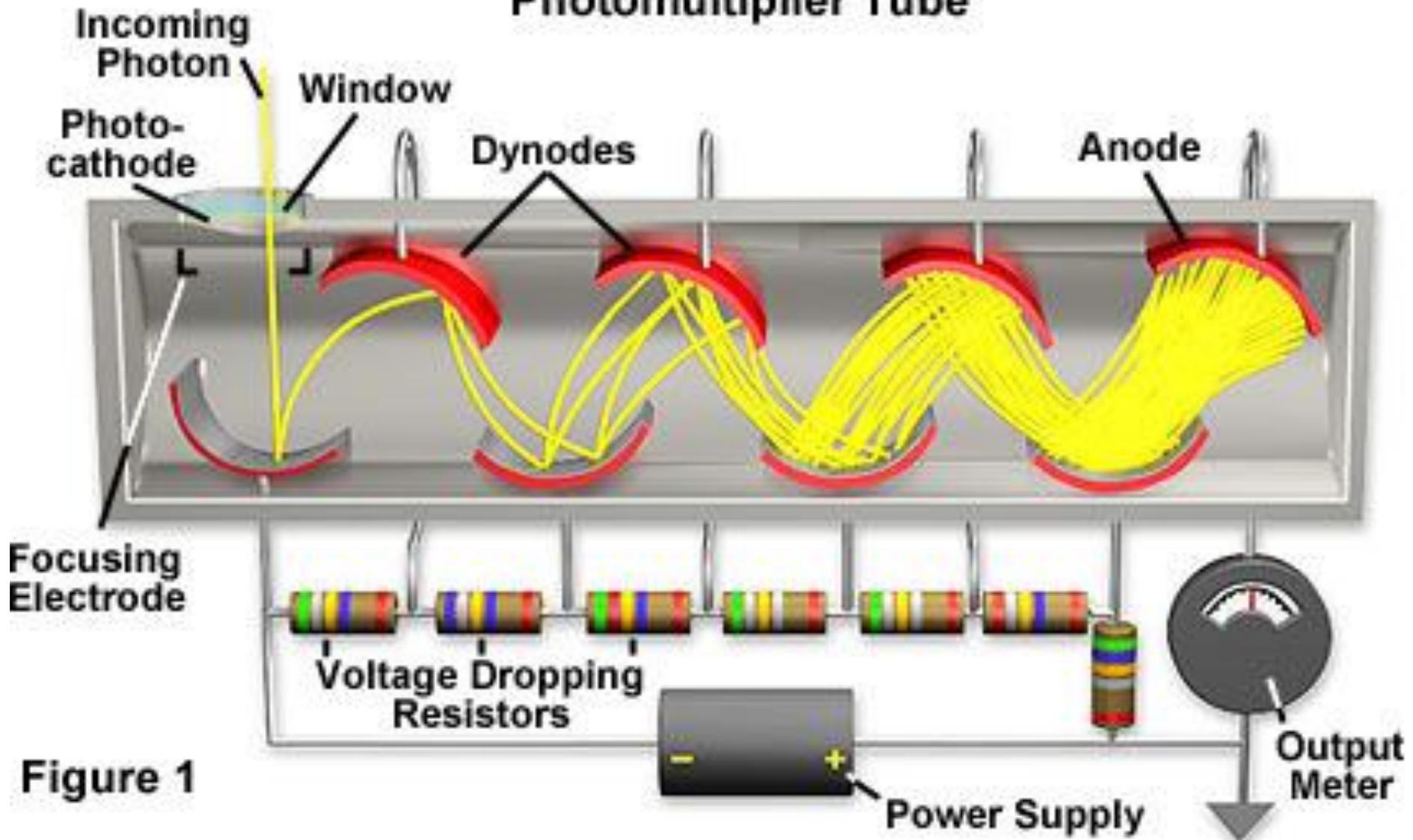
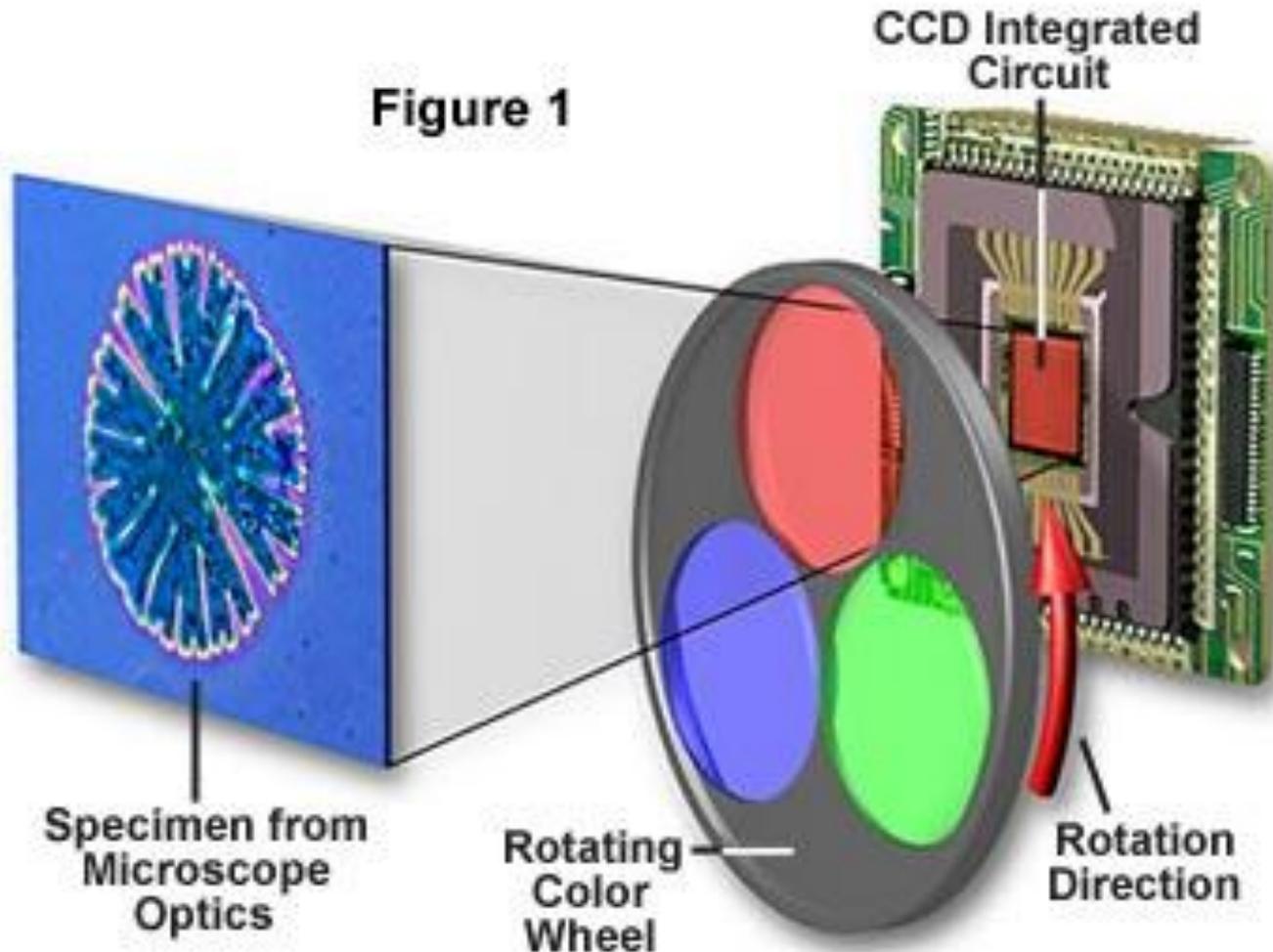


Figure 1

# Caméra CCD couleur

## Sequential Color Three-Pass CCD Imaging System

Figure 1



# Caméras CCD couleur

- Se sont les caméscopes grand public
- Elles sont moins sensibles que les caméras monochromes à cause de l'optique supplémentaire destinée à séparer les couleurs (filtres rouge, vert, bleu ou prisme)
- Chaque couleur est envoyée sur une région précise du capteur (**mono-CCD**) ou sur trois différents capteurs (**tri-CCD**)
- Bien que moins sensibles ces caméras peuvent être utilisées en microscopie de fluorescence avec des signaux forts
- Des modèles refroidis existent et permettent maintenant une utilisation avec des signaux modérément faibles



## Bayer Color Filter Mosaic Array and Underlying Photodiodes

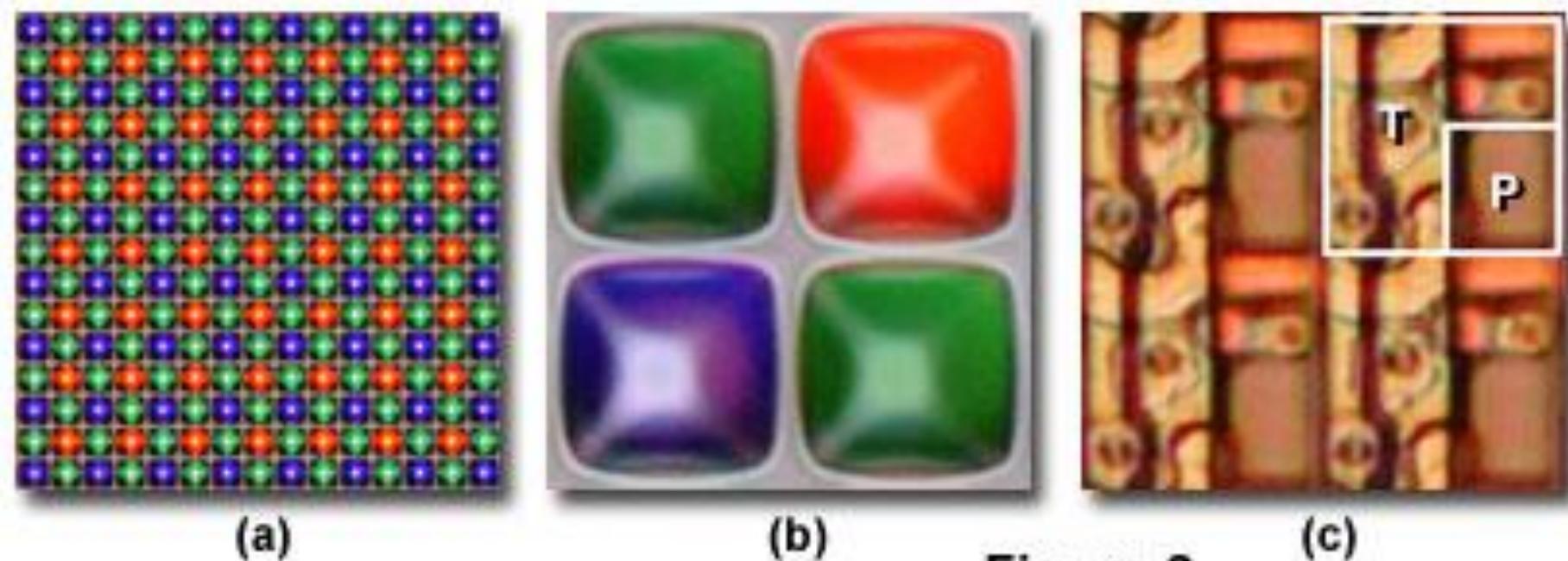
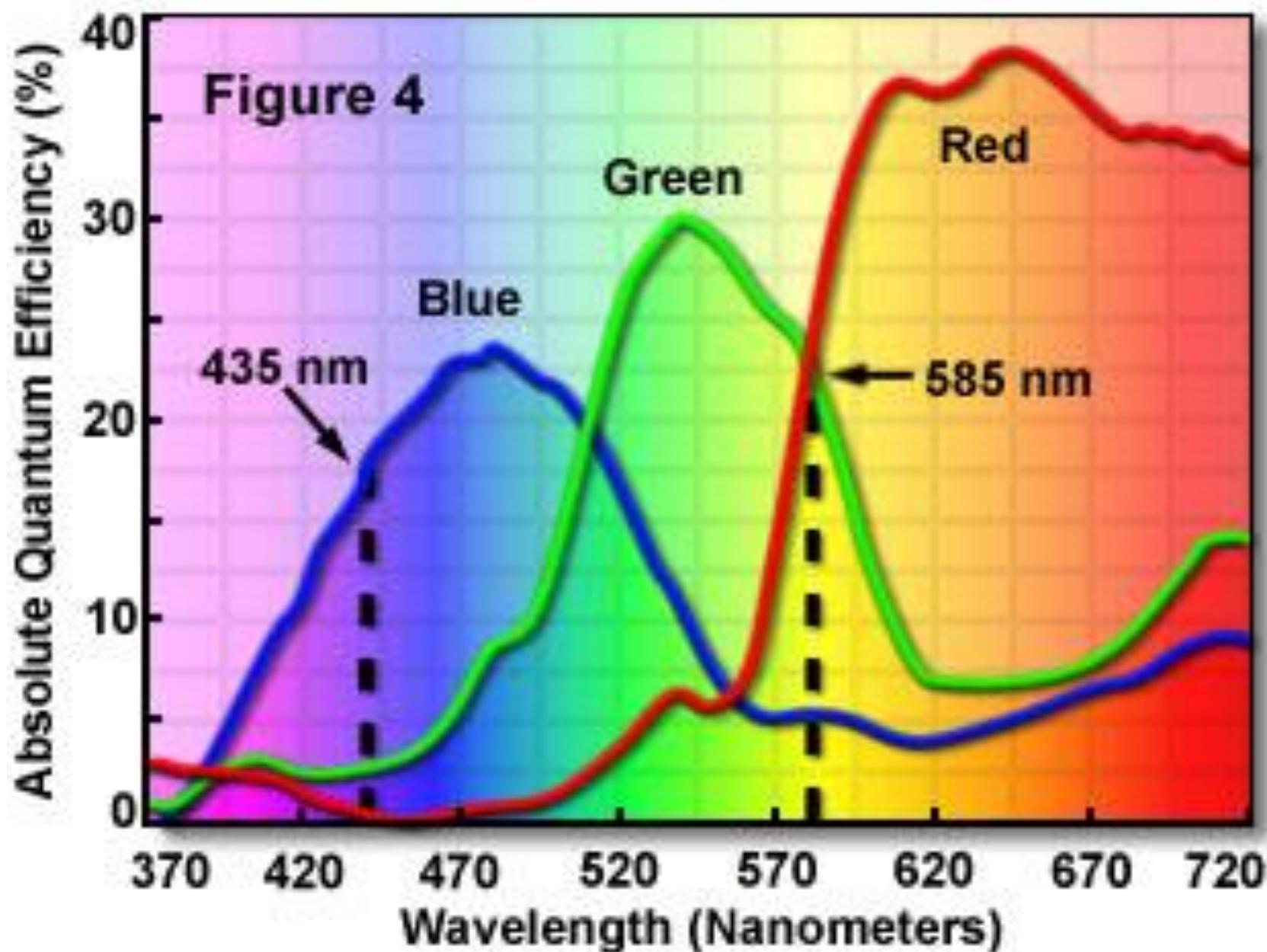


Figure 2

# Bayer Filter Transmission Spectral Profiles



# Olympus DP70 Digital Camera System

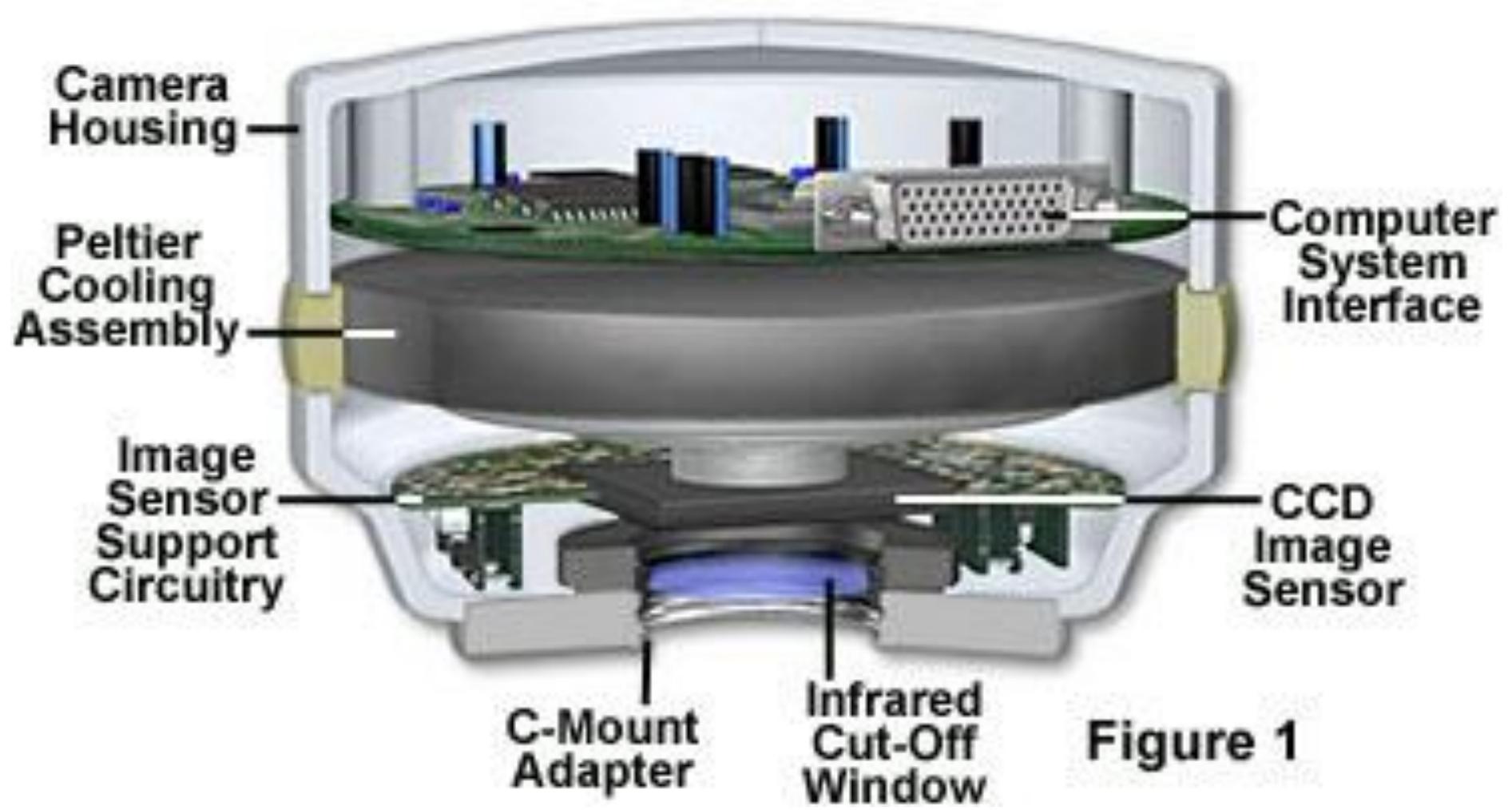


Figure 1

# Microscope Optical System and Digital Camera Limitations on Imaging

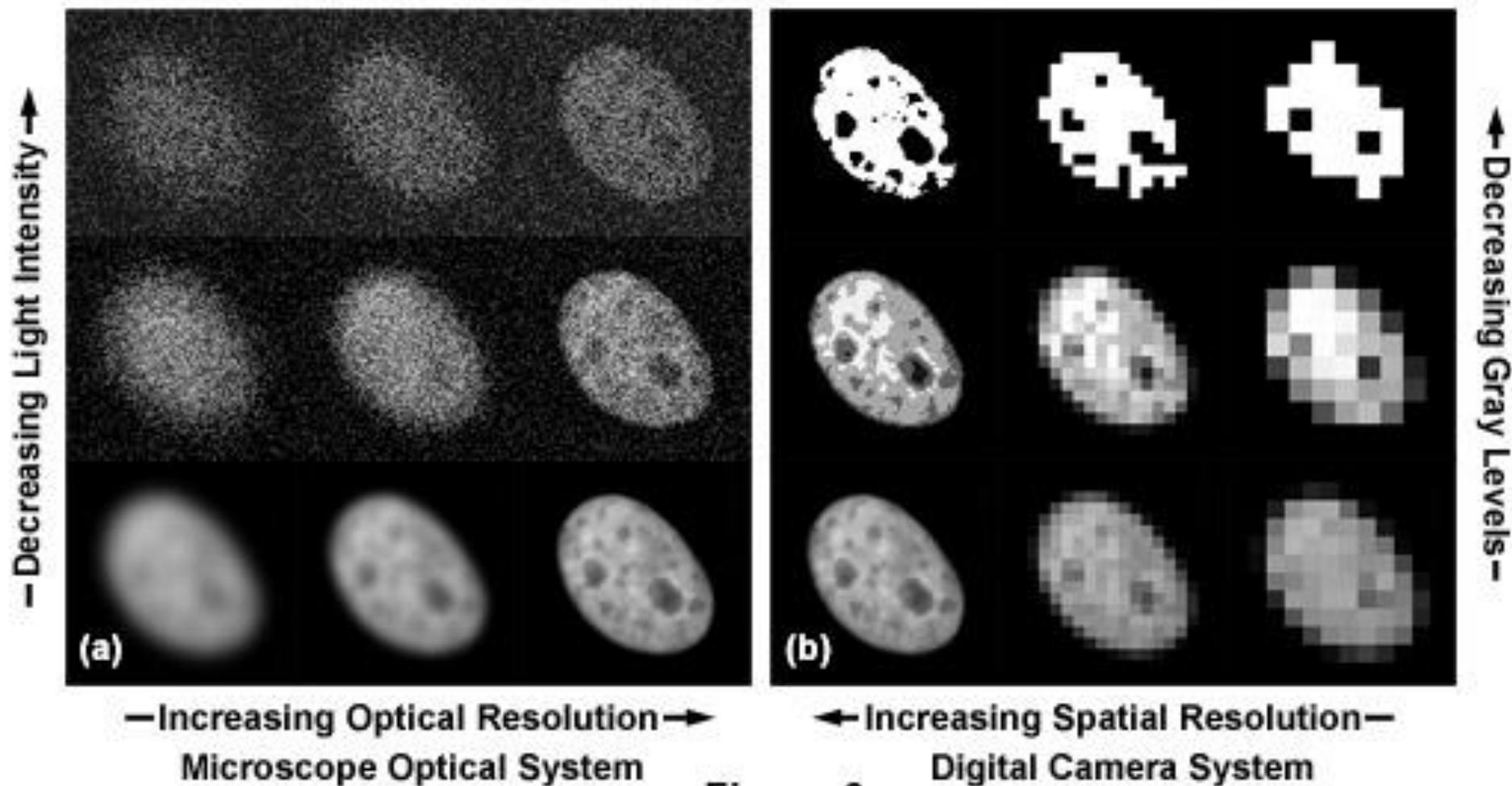
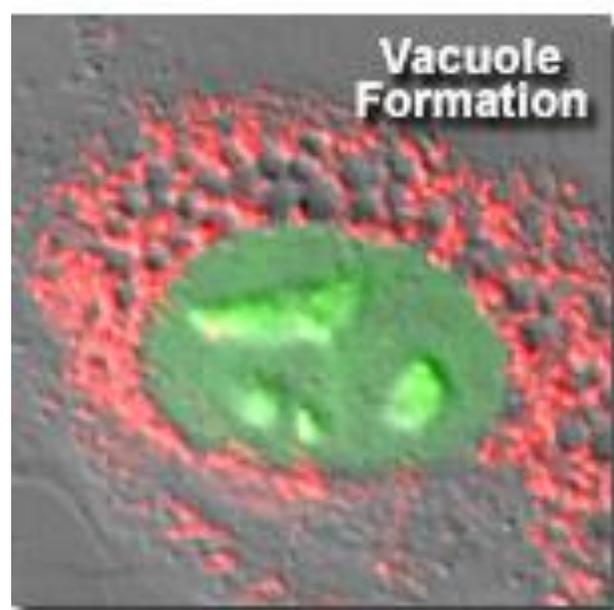


Figure 6

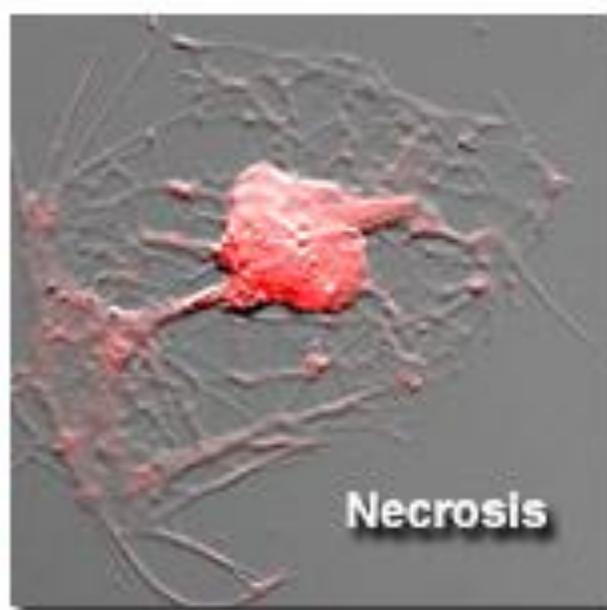
# Préservation du matériel biologique

- Contamination
  - Matériaux utilisés
  - Contaminants extérieurs (bactérie, molécules toxiques)
- Cytotoxicité
  - Des fluorochromes
  - De la lumière (UV)
- Température, pH, CO<sub>2</sub>
  - Régulation des réaction enzymatiques

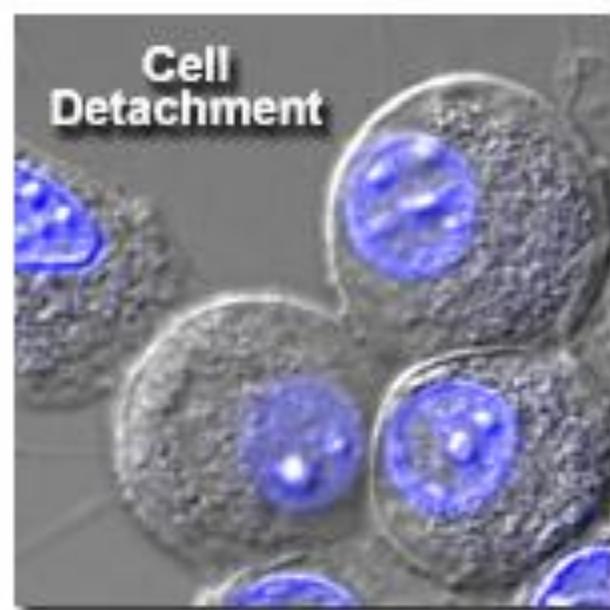
## Cellular Phototoxic Effects from Synthetic and Genetic Fluorophores



(a)



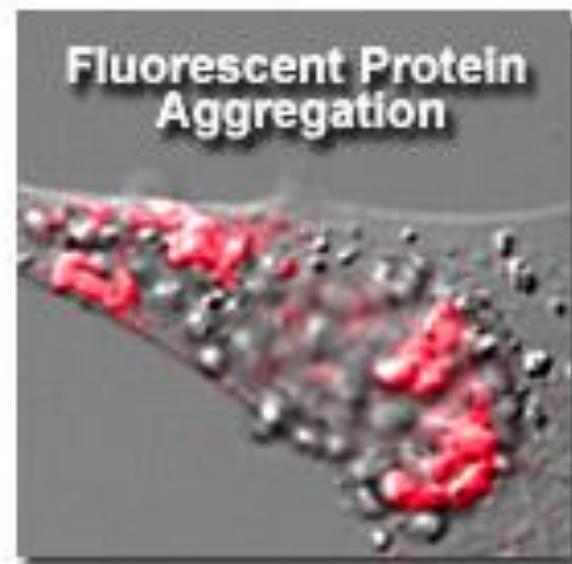
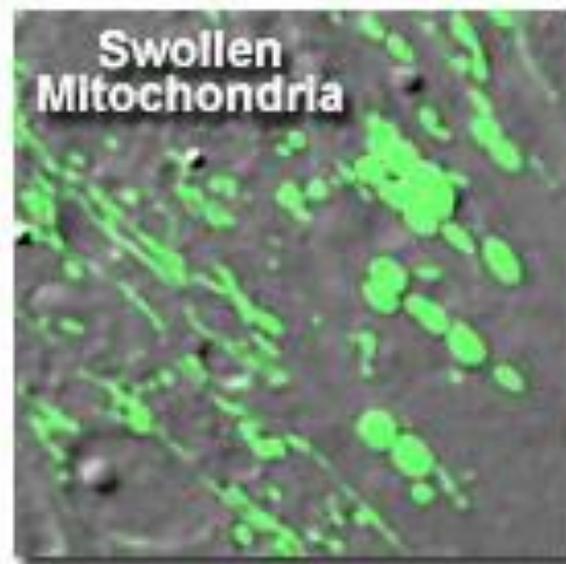
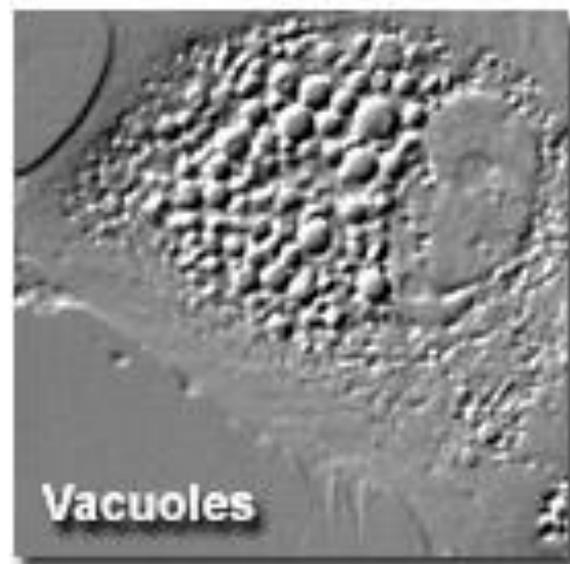
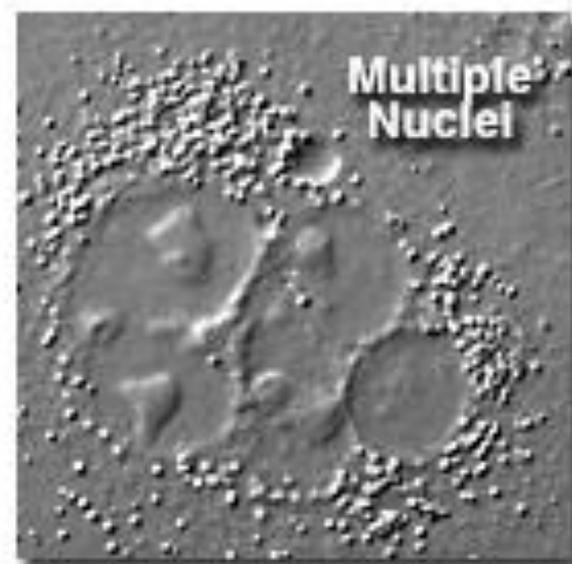
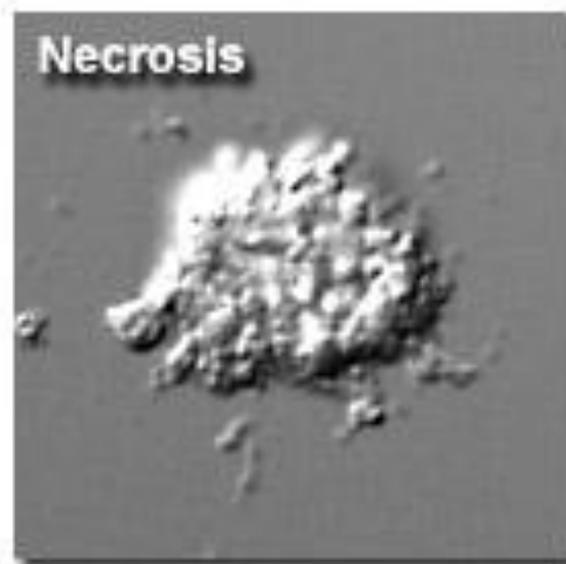
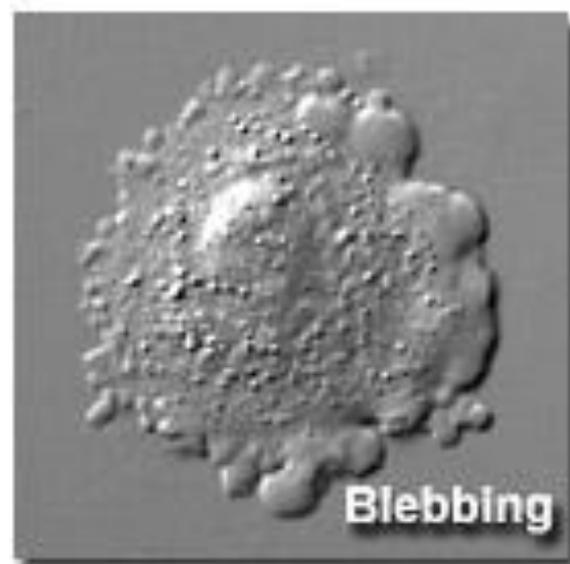
(b)



(c)

Figure 6

## Visual Symptoms of Morphological Variation in Unhealthy Cells



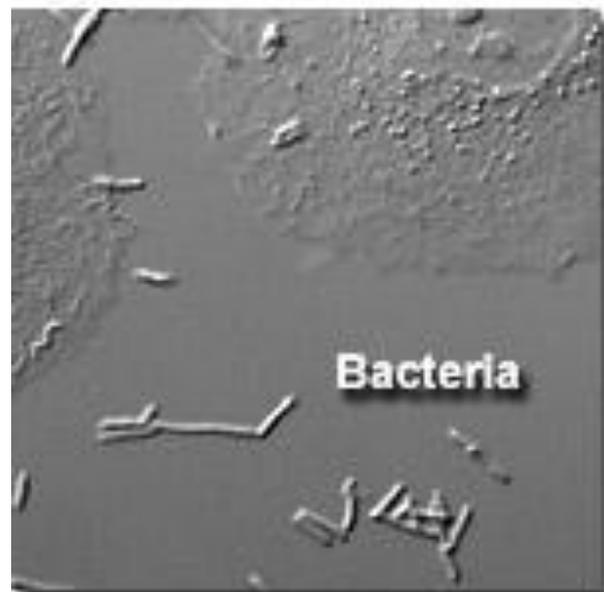
(d)

(e)

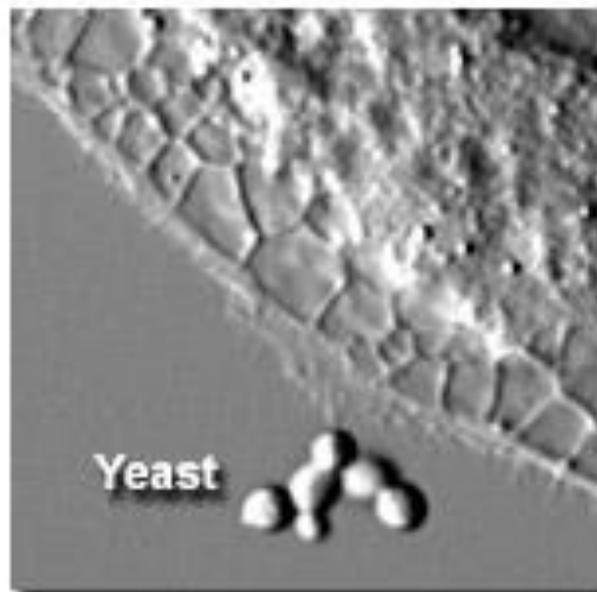
Figure 7

(f)

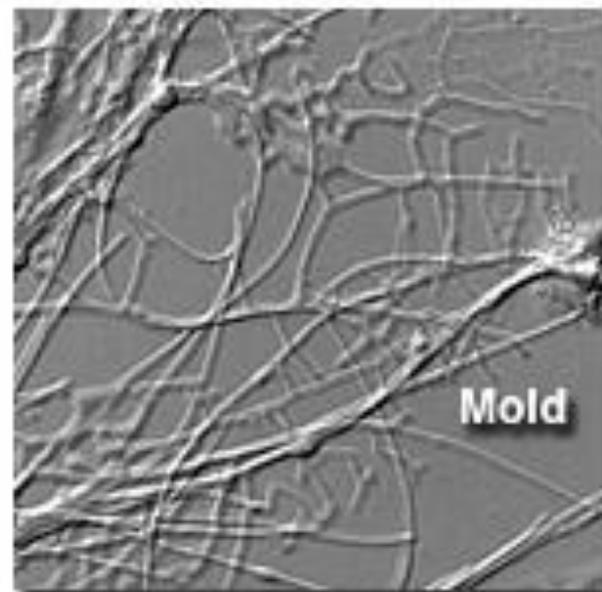
## Microbial Contamination in Mammalian Cell Cultures



(a)



(b)



(c)

Figure 8

# Couplage fluorescence et DIC

- Suivre une protéine au cours du temps dans des cellules vivantes

# Time-Lapse DIC and Fluorescence Live-Cell Imaging

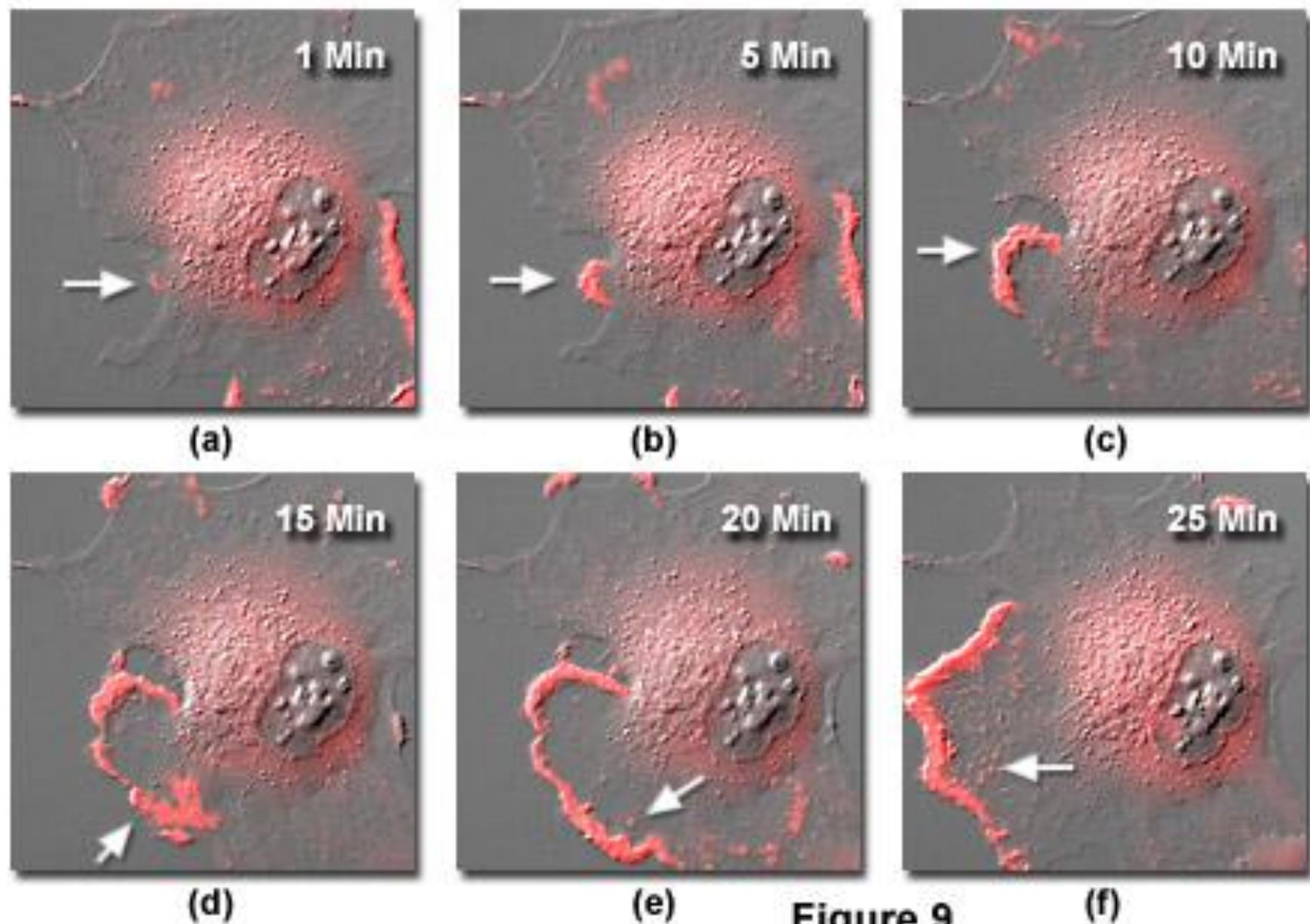


Figure 9

(f)

# Quantification de marqueurs cellulaires

- Acquisition
  - Réglage de l'optique (alignement du microscope)
  - Réglage du capteur (gain, sensibilité)
- Pré-traitement (facultatif)
  - Soustraction du bruit
  - Correction de la non-uniformité de l'éclairage
- Segmentation
  - Manuelle, semi-automatique, automatique
  - Correction d'erreurs
- Etiquetage
- Paramétrisation
  - Surface, densité optique intégrée, densité optique moyenne, forme, granularité...
- Traitement statistique des données
  - Histogramme d'ADN par exemple
  - ACP, AFD, clustering etc...

# Amélioration de l'image – pré-traitements

- Soustraction du bruit
  - Fluorescence du fond de la préparation
  - Soustraction (PosDiff)
- Uniformisation du fond
  - Acquisition d'une référence d'homogénéité pour la fluorescence (moyennage de plusieurs images)
  - Acquisition d'une image d'un champ vide en lumière transmise
  - Quotient
- Augmentation du contraste
  - Histogramme des NG
- Filtrage
  - Unsharp masking
  - Autres...

## Flat-Field Correction of a Digital Image

Raw Image

Flat Field Frame

Dark Frame

Corrected Image

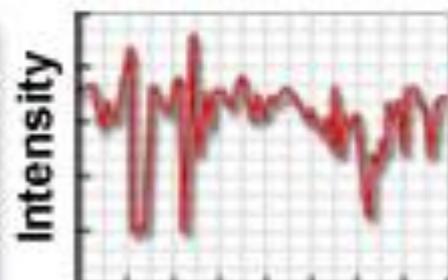
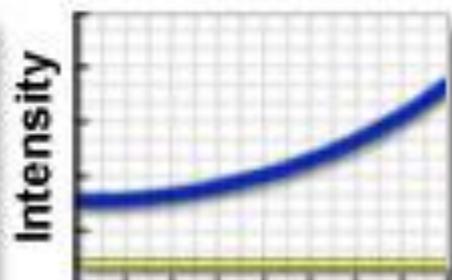
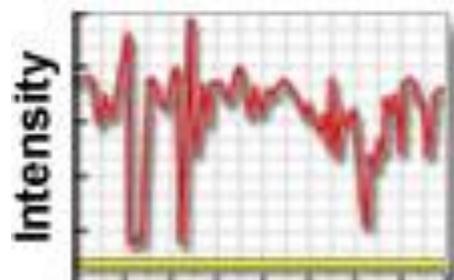


(a)

(b)

(c)

(d)



Pixel Number

Pixel Number

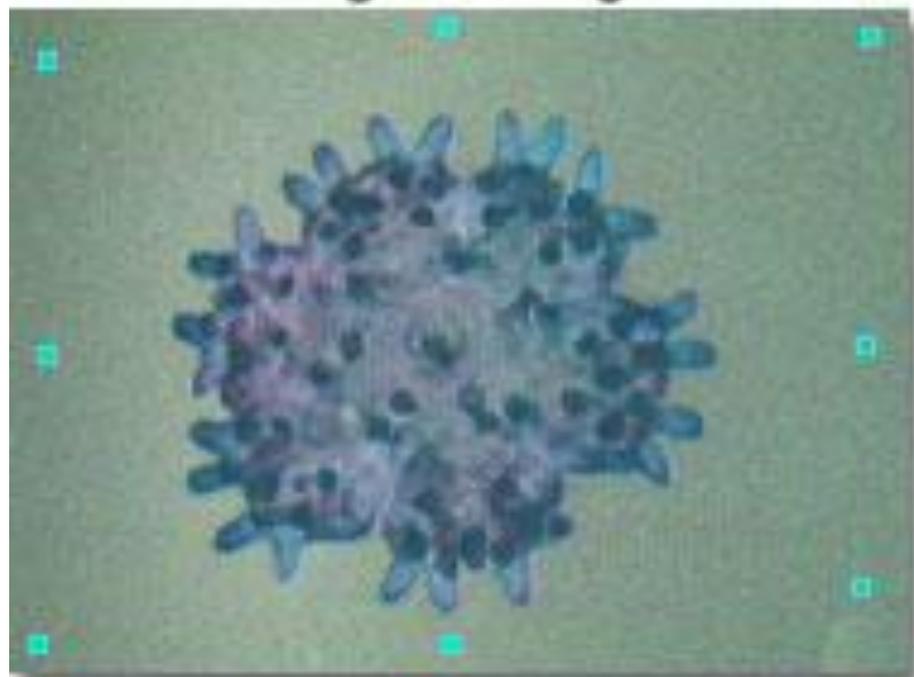
Pixel Number

Pixel Number

Figure 3

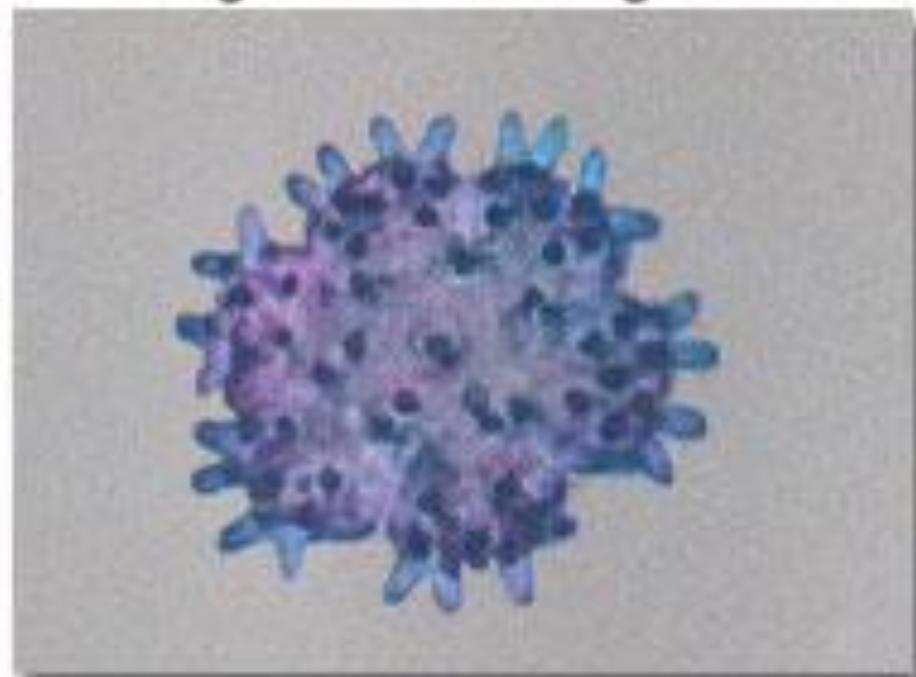
## Surface Function Background Subtraction Technique

Original Image



(a)

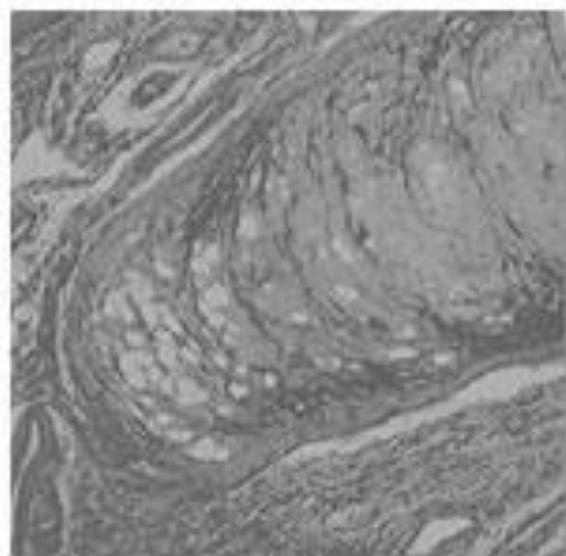
Image Minus Background



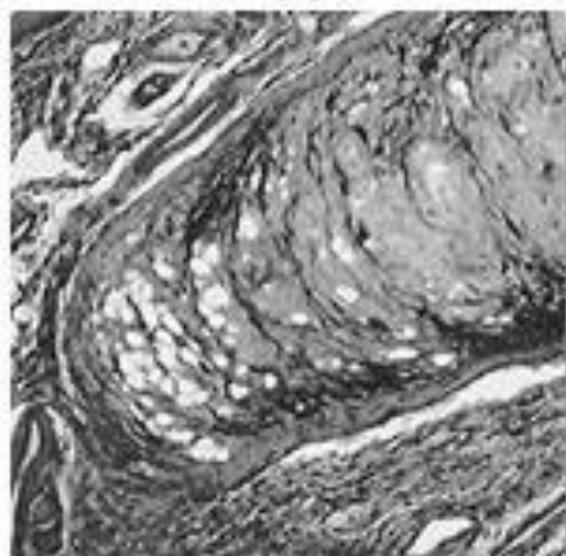
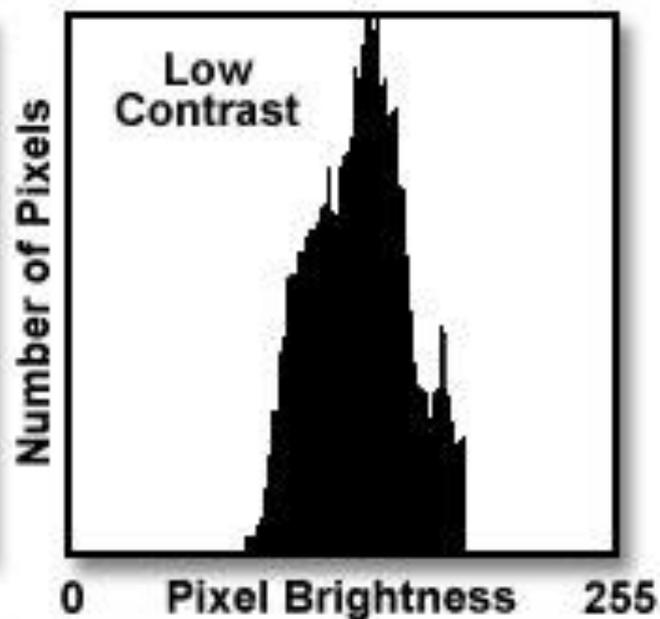
(b)

Figure 4

## Contrast Enhancement by Histogram Stretching



(a)



(b)

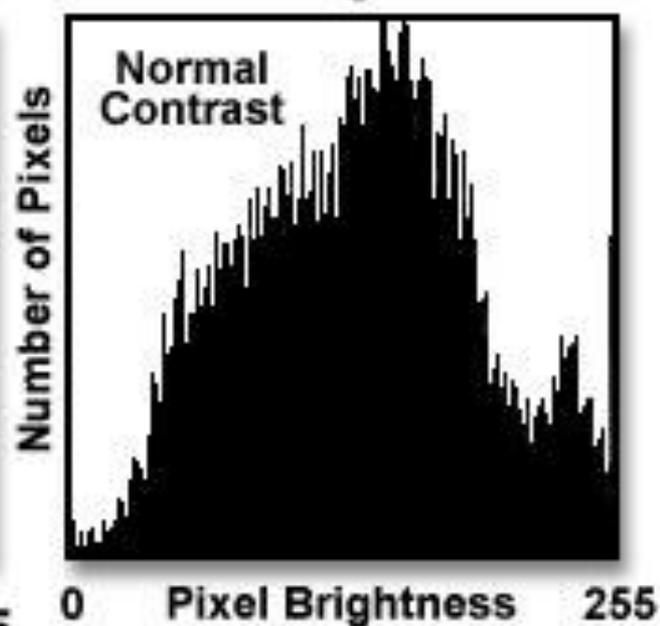
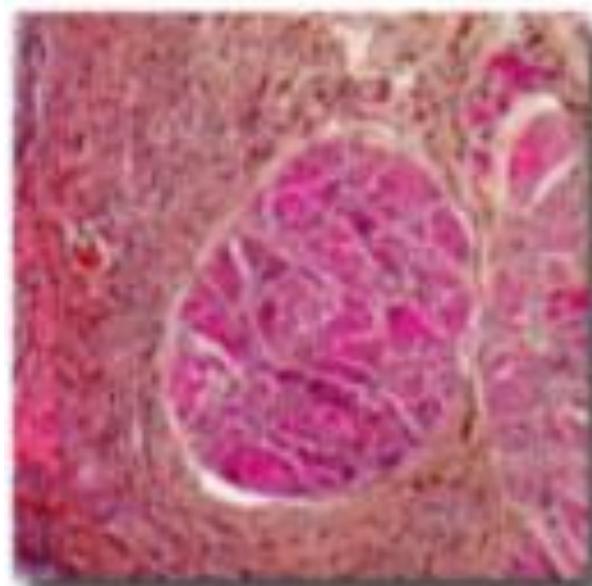


Figure 5

## Smoothing and Sharpening Convolution Kernels

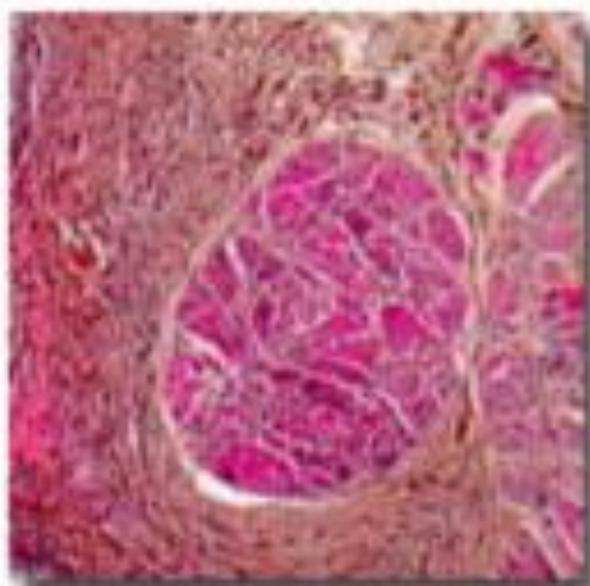


(a)

1	1	1
1	1	1
1	1	1

x 1/9

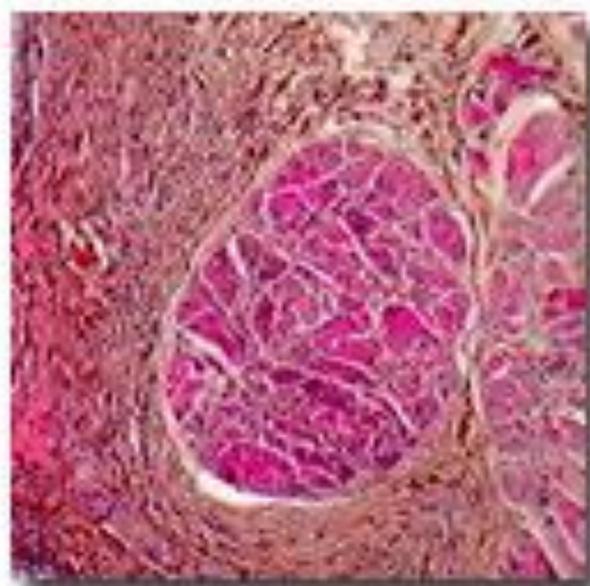
Smoothing Kernel



(b)

Original  
Image

Figure 7



(c)

-1	-1	-1
-1	9	-1
-1	-1	-1

Sharpening Kernel

# U.S.M. (UnSharp Masking)

- Augmente les contrastes (diminue les basses fréquences)
- Des facteurs correctifs sont utilisés :
  - **Facteur d'échelle** "Scaling factor" et **Facteur d'échelle de sortie** "Result Scale Factor"
  - Pour de bons résultats il faut avoir :
    - **Result Factor =  $1 / (1 - \text{Scaling Factor})$**
    - (Exemple : si Scaling Factor = 0.75 alors Result Factor = 4).

# U.S.M. (UnSharp Masking)

- Le filtrage USM se décompose en **trois étapes** :
  - **Passage d'un filtre passe-bas** sur tous les pixels de l'image

1	1	1
1	1	1
1	1	1

- on obtient une **image filtrée** (Low-pass image). Cette image filtrée est multipliée par le facteur d'échelle (0.75); on obtient une **image filtrée recalée** (Scaled low-pass image)
- **Soustraction** de l'image filtrée recalée de l'image originale : on obtient une image résultante dont l'intensité n'est que 25% de l'image originale.
- **Application du facteur d'échelle de sortie (4)** : on obtient une image plus contrastée (Unsharp Masked image) dont l'étendue des niveaux de gris est rétablie.

# Exemples d'applications de la vidéomicroscopie

- Analyse du cycle cellulaire
  - Quantification de l'ADN
- Suivi et interactions d'une ou plusieurs protéines in vivo au cours du temps
  - Colocalisation
  - FRAP, FRET
- Aide au diagnostique et détermination de facteurs pronostiques
  - Quantification des récepteurs hormonaux dans les tumeurs du sein
  - Quantification de marqueurs de la prolifération

## ***Exemple d'utilisation des techniques modernes de biologie cellulaire***

On s'intéresse à une protéine de la membrane plasmique, la desmocolline (dsc, famille des cadhérines), constitutive de certaines jonctions intercellulaires : les desmosomes.

Pour cette étude, une culture de cellules épithéliales est transfectée de façon à exprimer la protéine chimérique desmocolline-YFP (Yellow Fluorescent Protein)

### **1- transfection**

**Introduction d'une construction (ou ADN chimérique) associant un ADN codant pour la protéine à étudier (desmocolline) à un ADN codant pour une protéine naturellement fluorescente (YFP)**

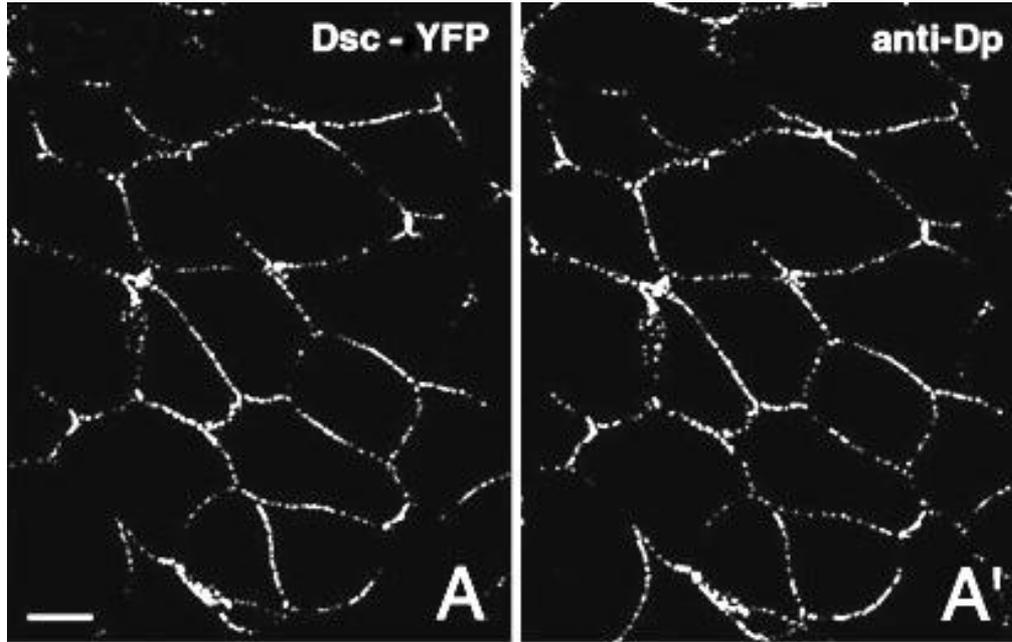
### **2- Intérêt d'utiliser une protéine chimérique**

**La protéine YFP confère à la desmocolline qui lui est associée des propriétés de fluorescence qui la rendent facile à détecter. Les observations peuvent se faire dans la cellule vivante.**

### **3- Microscopes utilisables**

**Microscope à fluorescence ou microscope confocal**

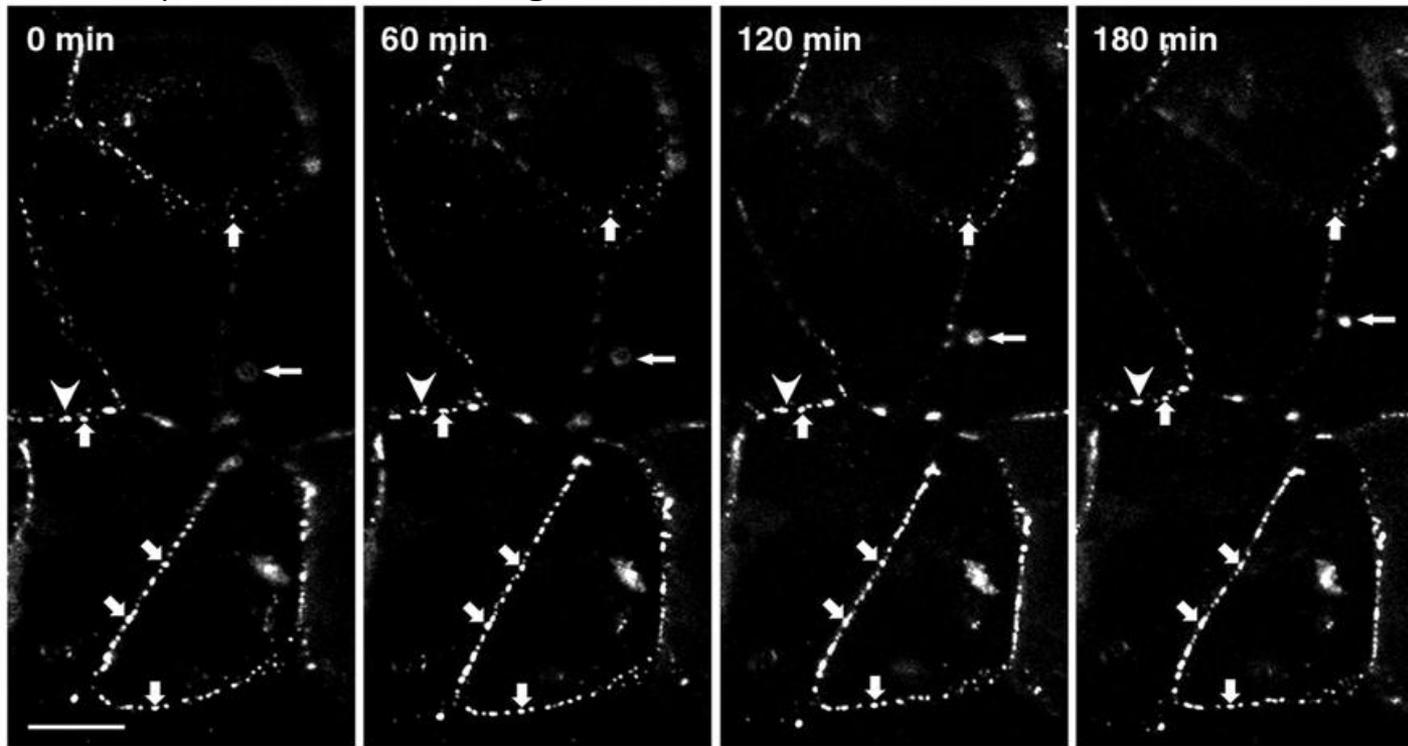
Dans un premier temps, sur un lot de cellules transfectées (Dsc-YFP, figure 1A), le marquage immunocytochimique d'un autre type de protéine intervenant dans la formation des desmosomes, les desmoplakines, est réalisé (Dp, figure 1A'). La figure suivante a été réalisée sur une section optique.



#### 4- Résultat de ce double marquage

**Même localisation de la fluorescence en A et A' : on vérifie donc que la protéine chimérique Dsc-YFP s'exprime bien au niveau des desmosomes**

Les cellules transfectées sont ensuite analysées en vidéomicroscopie pendant 3 heures. Les résultats sont présentés sur la figure ci-dessous :



5- Information apportée la vidéomicroscopie

Elle permet de suivre directement au cours du temps le mouvement d'un objet dans une cellule vivante

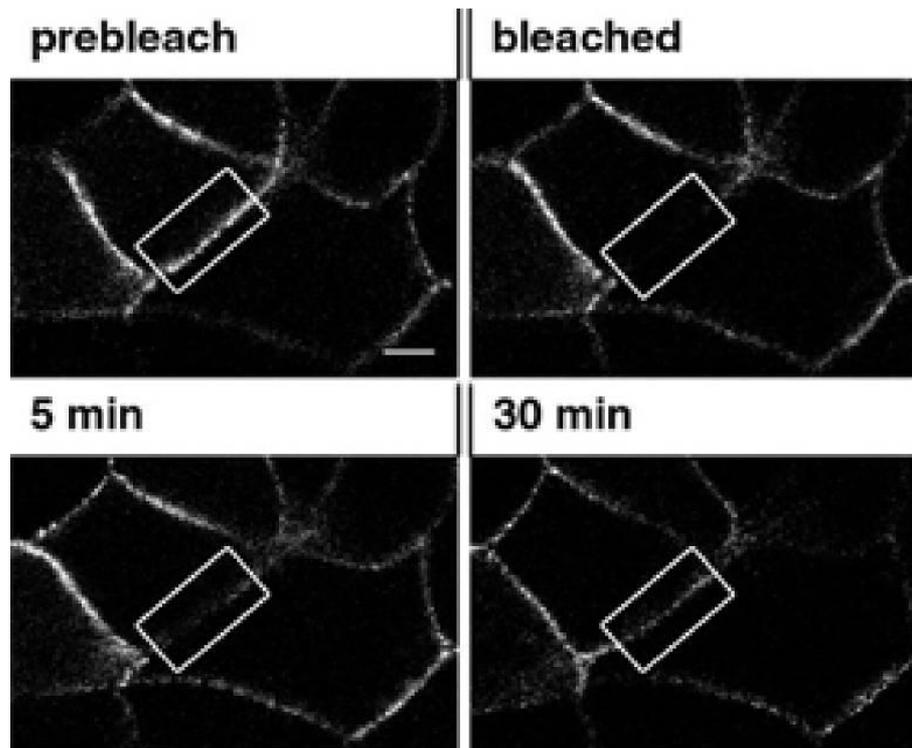
6- Localisation de la desmocolline pendant les 3 heures d'enregistrement?

Aucune modification de la fluorescence n'est visible pendant les 3 heures d'enregistrement

7- Hypothèse concernant la dynamique des desmosomes ?

Les desmosomes semblent être des structures stables

Afin d'étudier la dynamique des desmocollines, les cellules transfectées sont soumises à une FRAP (Fluorescent Recovery After Photobleaching ou analyse de la redistribution de la fluorescence après photoblanchiment). Cette technique consiste à illuminer temporairement une portion de l'échantillon avec une forte intensité de lumière, de manière à provoquer une extinction localisée et irréversible de la fluorescence (photobleaching ou photoblanchiment), puis à mesurer la réapparition de la fluorescence dans la zone concernée. Les résultats sont présentés sur la ci-dessous.



*FRAP réalisée sur les cellules transfectées. Le rectangle blanc indique la zone de blanchiment. Prebleached : avant blanchiment, Bleached : après 0, 5 et 30 minutes de blanchiment.*

8- Localisation de la protéine chimérique, pendant et après le blanchiment ?

Le blanchiment éteint la fluorescence de la protéine chimérique qui est toujours en place dans la membrane au niveau des desmosomes

9- Réapparition de la fluorescence dans la zone blanchie ?

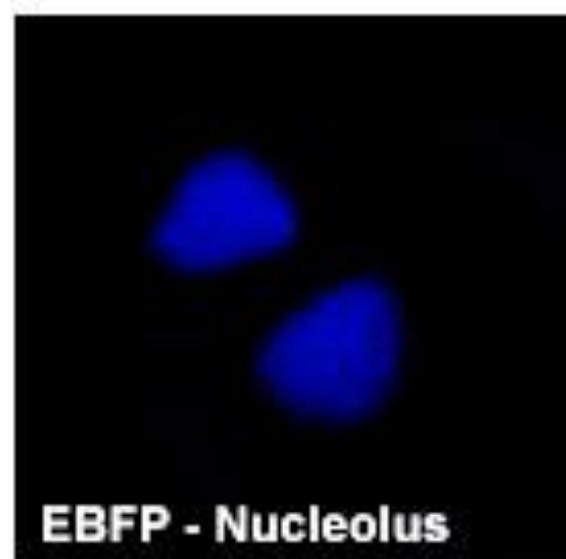
La réapparition de la fluorescence est donc attribuée à un échange de molécules fluorescentes et éteintes entre les zones blanchies et non blanchies.

10- Conclusion quant à la dynamique des desmocollines ?

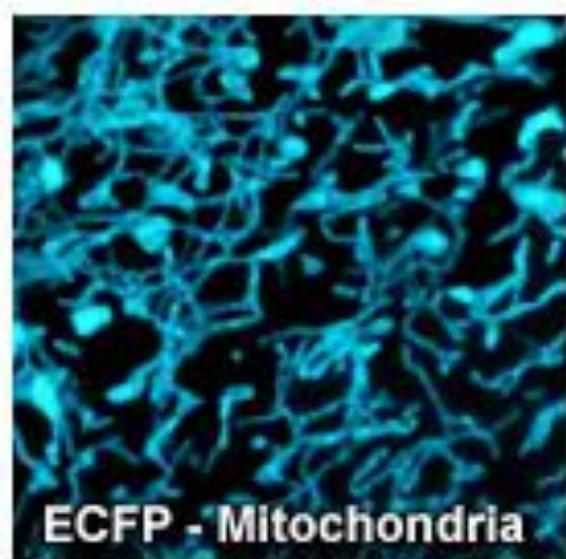
On peut conclure :

- soit à un renouvellement rapide des desmocollines de la membrane plasmique (30 minutes)
- soit à la possibilité de diffusion latérale de ces molécules dans la membrane

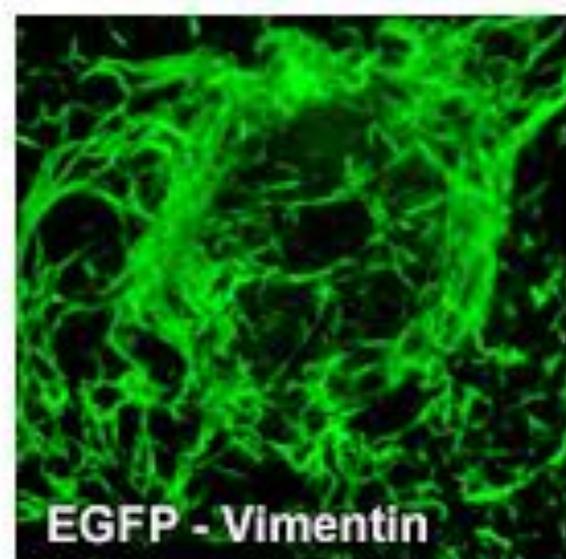
# Digital Imaging of Localized Fluorescent Protein Chimeras



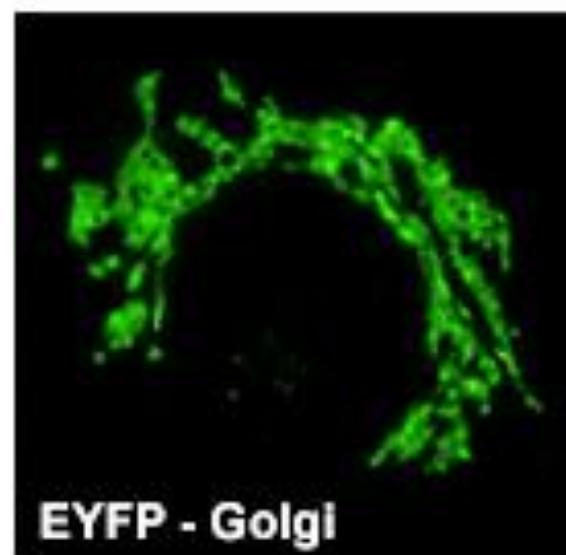
(a)



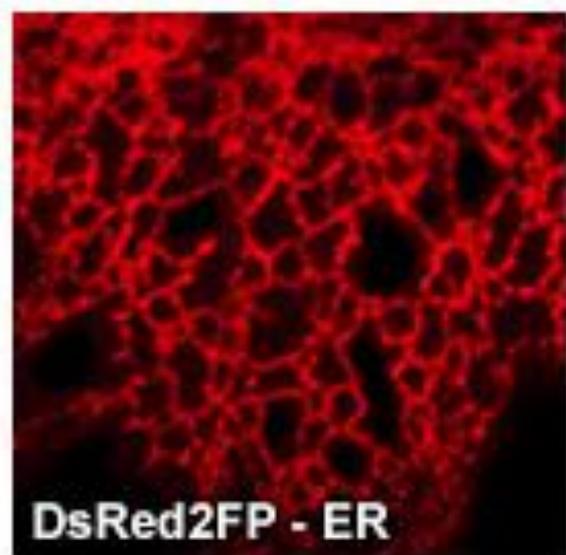
(b)



(c)



(d)



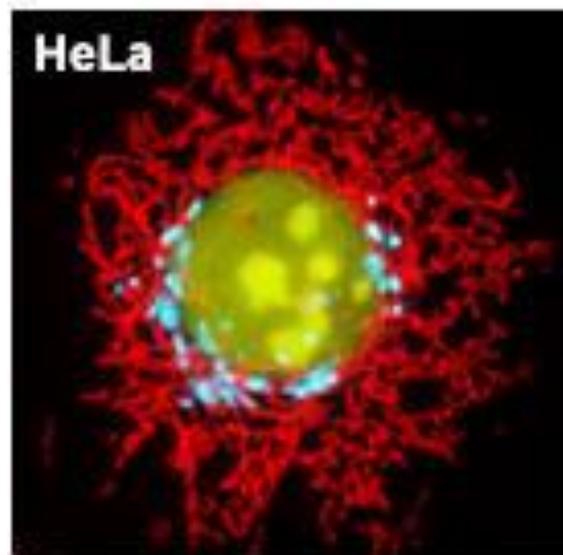
(e)



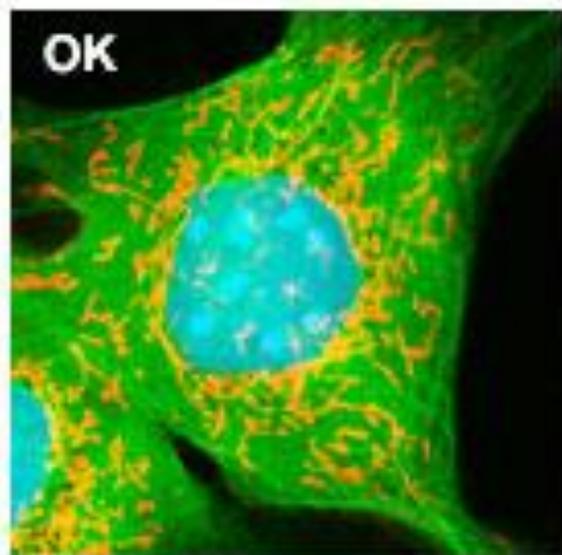
(f)

Figure 1

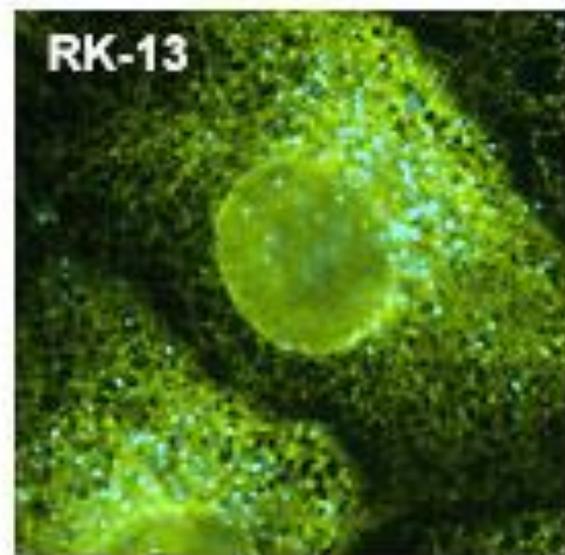
# Multicolor Imaging with Fluorescent Proteins



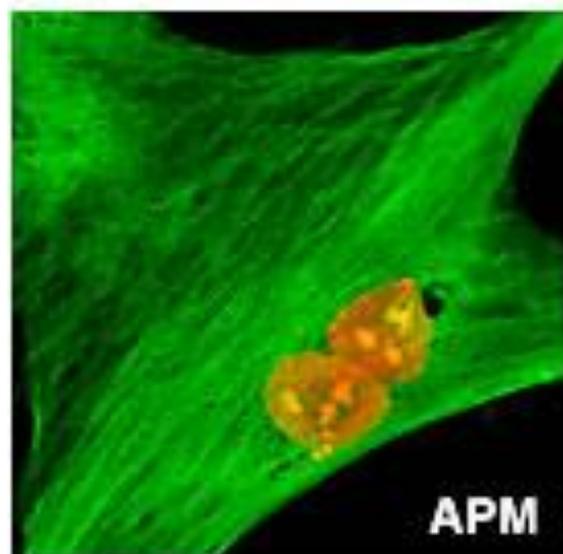
(a)



(b)



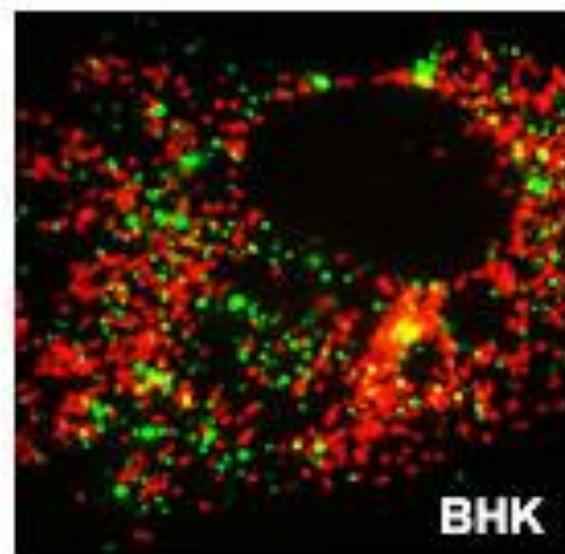
(c)



(d)



(e)



(f)

Figure 5

## Fluorescent Protein Labels in Living Cells

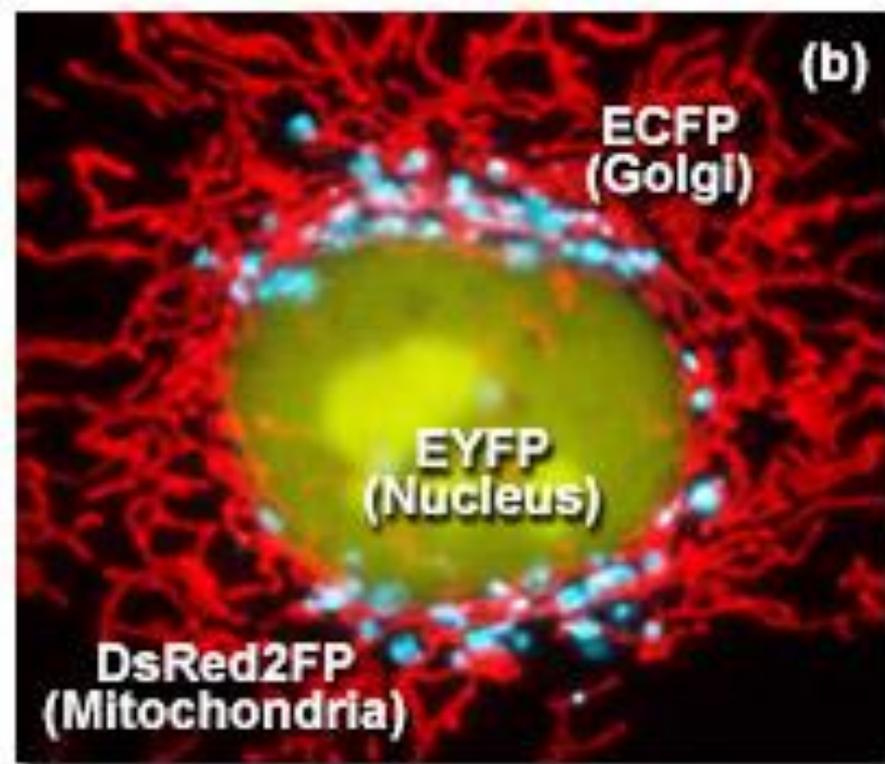
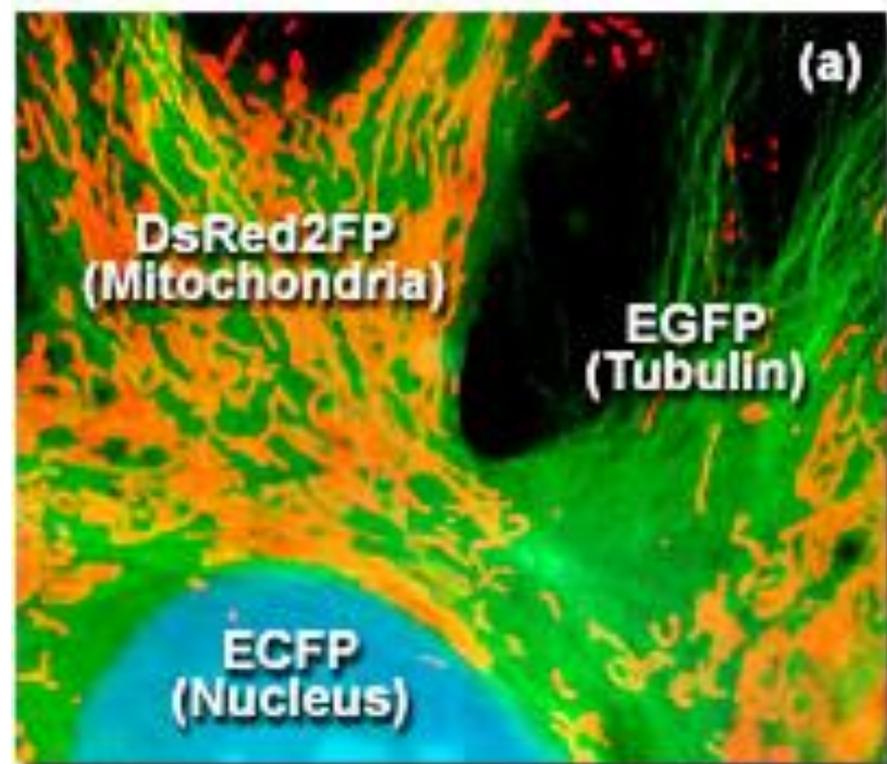


Figure 1

# Colocalisation

Colocalization of Actin and Vinculin in Normal Tahr Ovary Cells

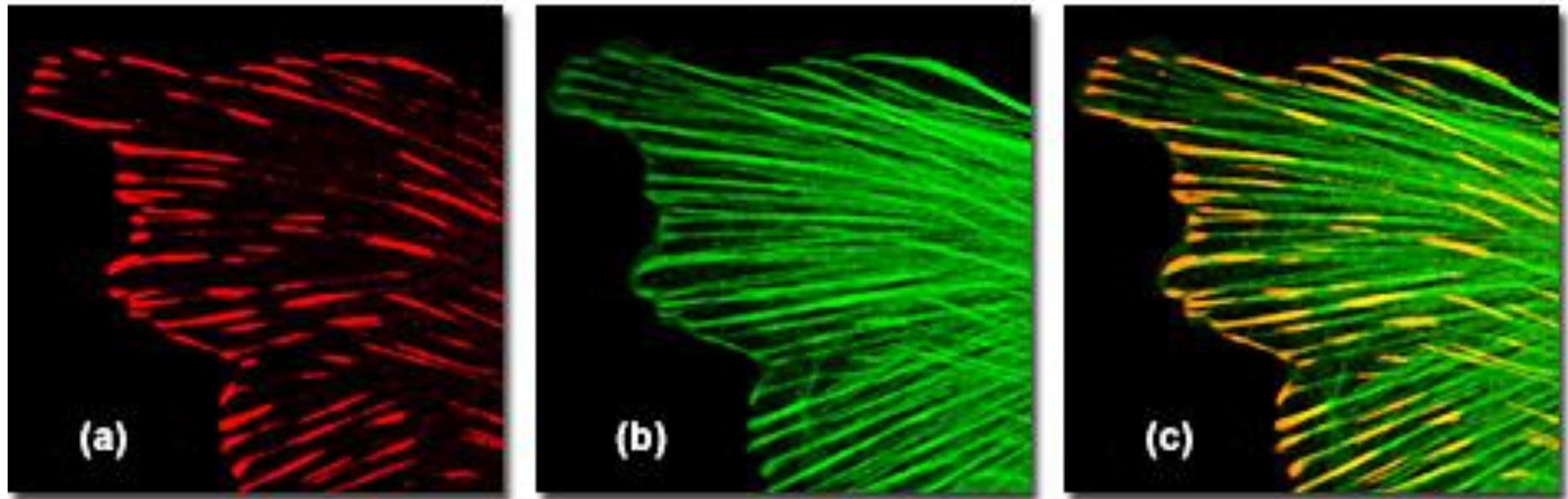
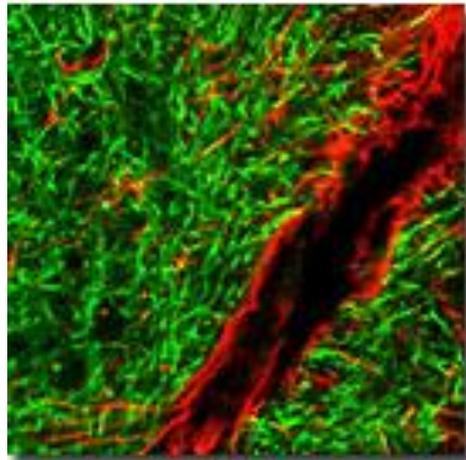


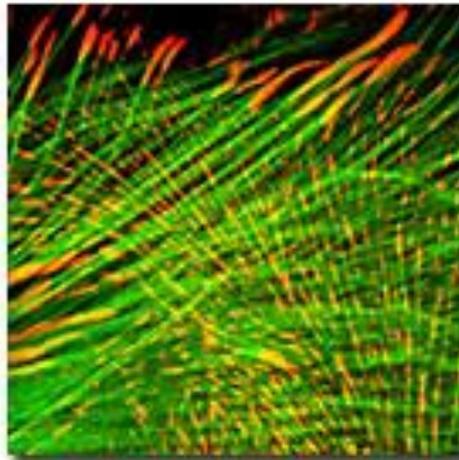
Figure 1

# Colocalisation

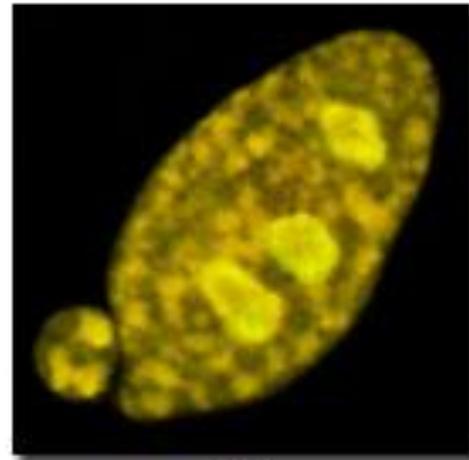
Various Degrees of Colocalization in Confocal Microscopy



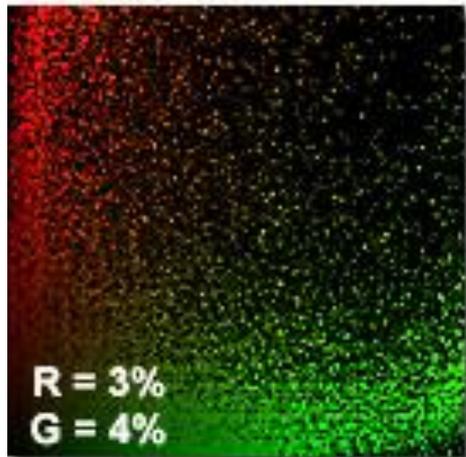
(a)



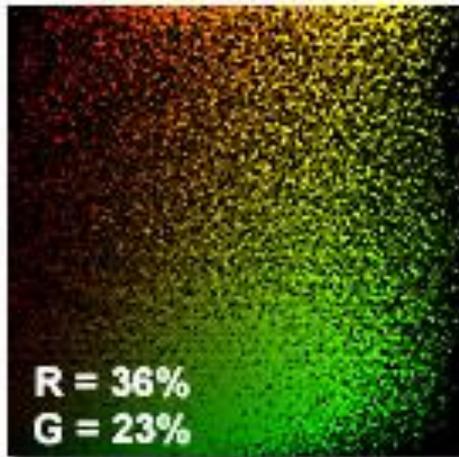
(b)



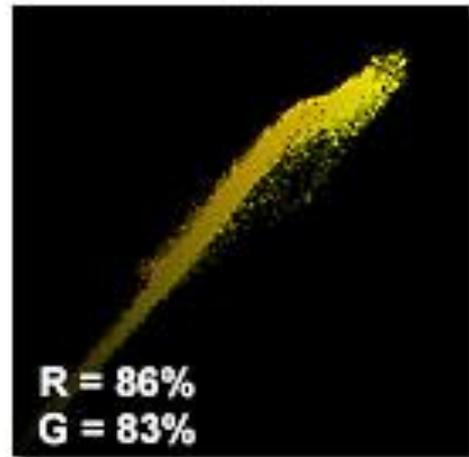
(c)



(d)



(e)

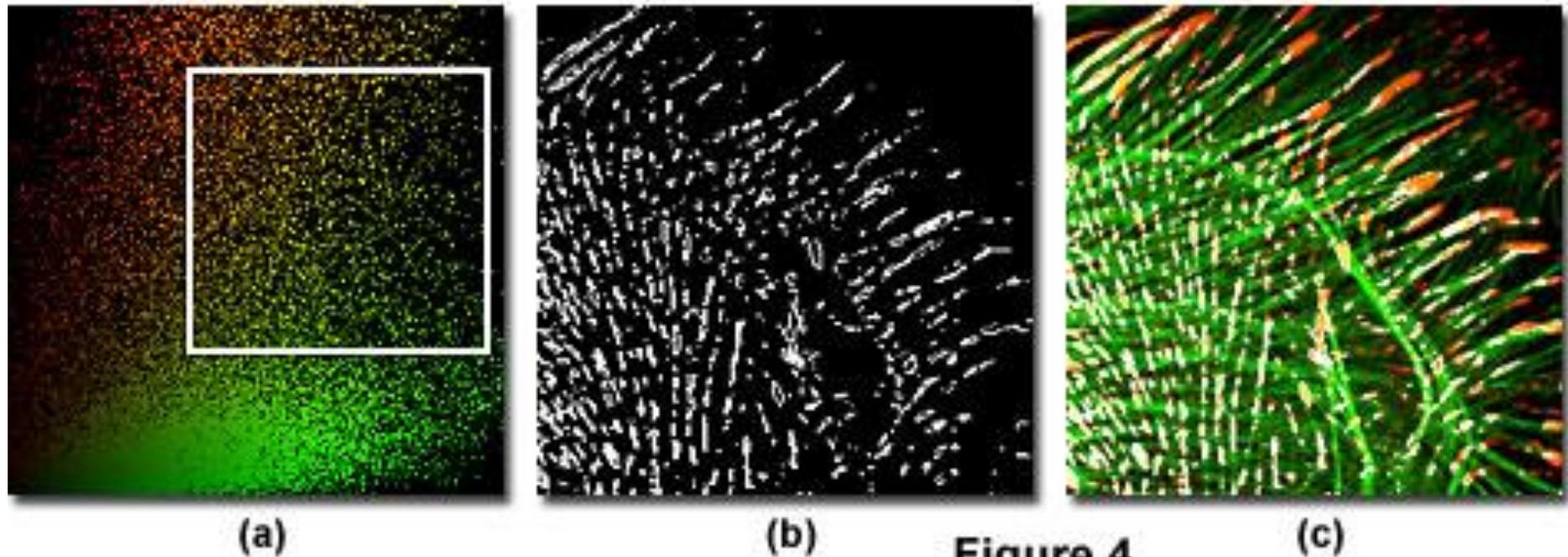


(f)

Figure 3

# Colocalisation

## Mask Generation in Scatterplot Colocalization Analysis



# Colocalisation

## Spectral Bleed-Through Artifacts in Colocalization Analysis

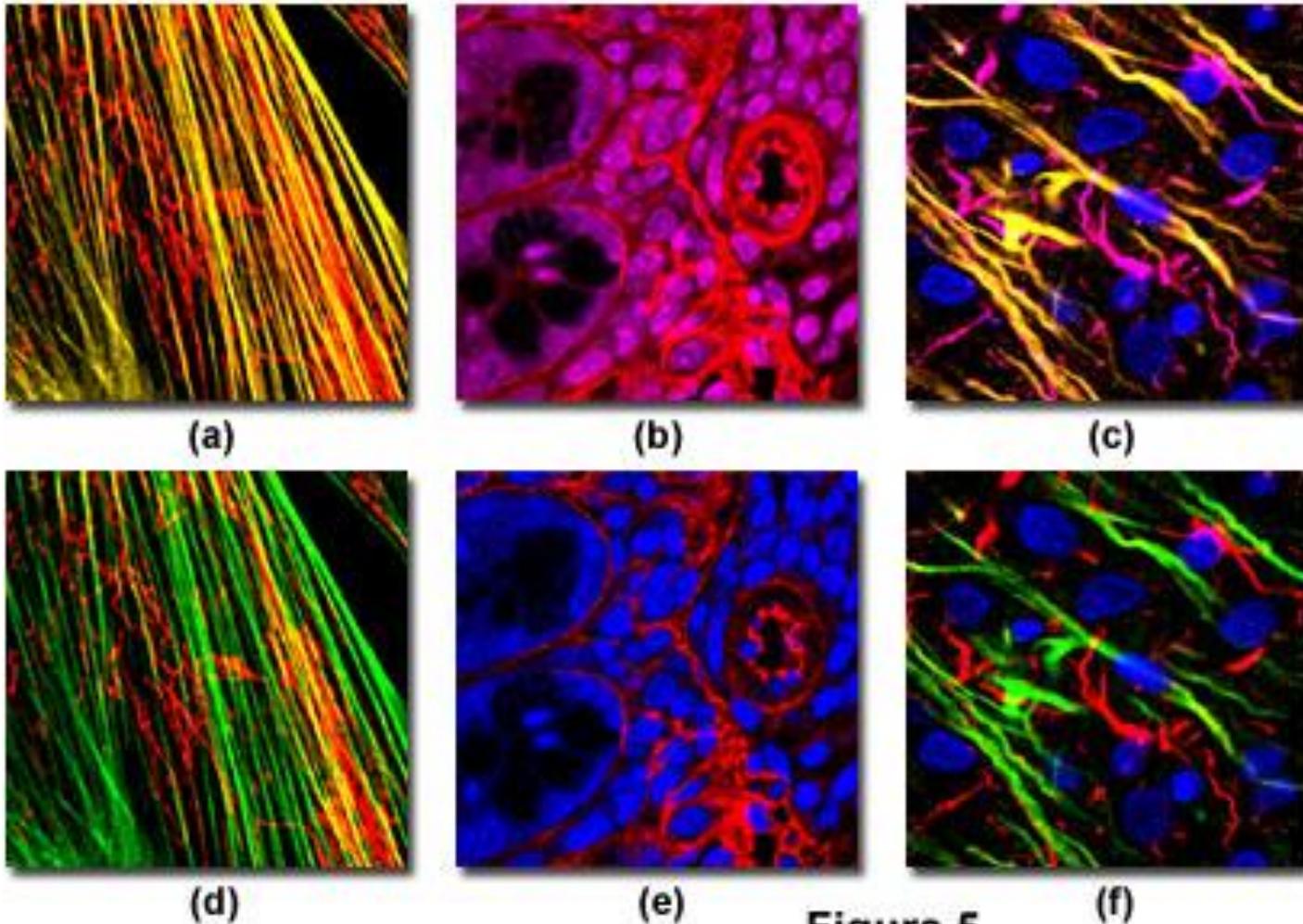
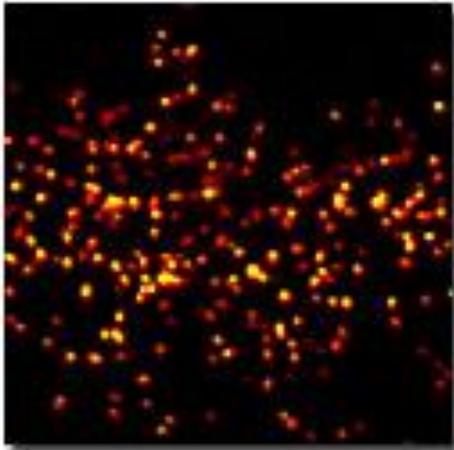


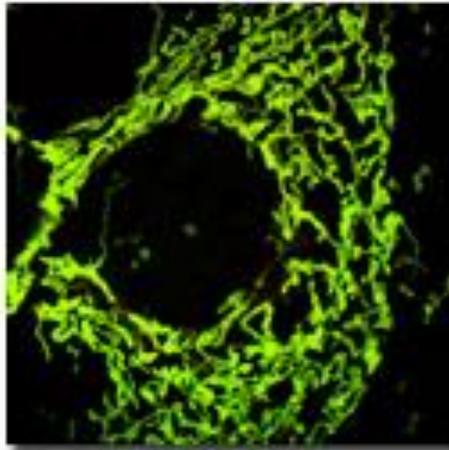
Figure 5

# Colocalisation

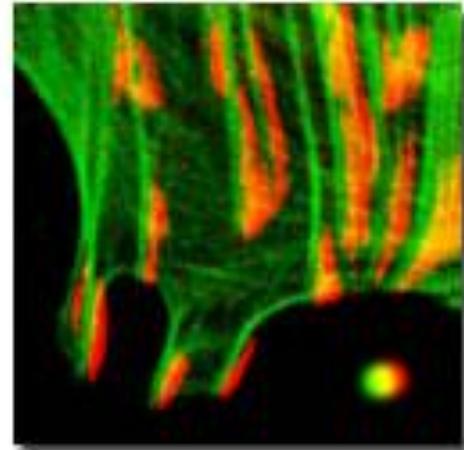
## Recognizing Artifacts in Colocalization Analysis



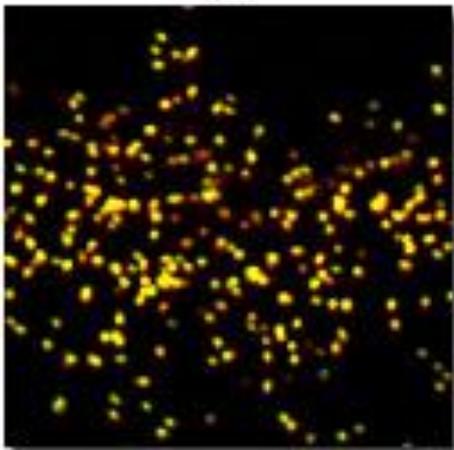
(a)



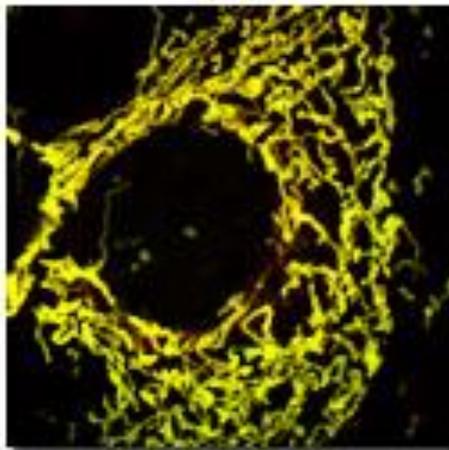
(b)



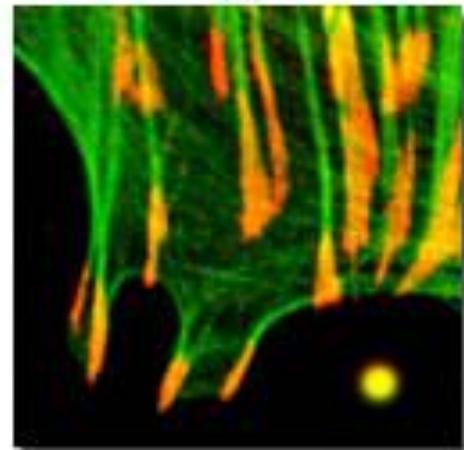
(c)



(d)



(e)



(f)

Figure 6

