

#### Formation de l'image en microscopie optique

#### Aude Jobart-Malfait

Plateforme de recherche « Imagerie des processus dynamiques en Biologie Cellulaire et Biologie du Développement » IFR 117 - Institut Jacques Monod Tel: 01 44 27 57 84 jobart@ijm.jussieu.fr www.ijm.jussieu.fr Quelques rappels...



#### La lumière

Optique géométrique

Formation de l'image

La fluorescence

### La nature de la lumière



#### Aspect ondulatoire

Huygens, Young



Christaan Huygens (1629-1695)



Thomas Young (1773-1829)

Lumière = Onde électromagnétique

#### Aspect corpusculaire

Newton, Planck



Sir Isaac Newton (1642-1727)

Max Planck (1858-1947)

Lumière = Photons



## Onde électromagnétique



Superposition d'un champ magnétique et d'un champ électrique oscillants simultanément dans la même direction de propagation

#### ✓ Longueur d'onde (en m) :

Trajet parcouru par l'onde pendant une période

*C* : célérité de la lumière dans le vide *v*: fréquence (nb pertubations en 1s)

$$\mathsf{E} = \mathsf{h} \times \mathsf{v} \quad \Rightarrow \quad \lambda = (\mathsf{c}, \mathsf{h}) / \mathsf{E}$$



Longueur d'onde et énergie sont inversement proportionnelles

#### ✓ Plan de vibration :

Plan dans lequel le champ électrique se propage

## Spectre électromagnétique



des rayons γ ..... aux ondes radio Fortement énergétiques Faiblement énergétiques



Longueurs d'onde du visible : 400nm - 700nm Du violet ... au rouge

## Polarisation de la lumière









#### Quelques rappels...

La lumière

#### Optique géométrique

Formation de l'image

La fluorescence

## Optique géométrique



On considère l'aspect <u>corpusculaire</u> de la lumière uniquement. Les rayons lumineux sont rectilignes.

Définition d'une lentille convergente :



Les rayons parallèles à l'axe optique coupent celui au point focal F' de la lentille. Les rayons passant par le centre de la lentille ne sont pas déviés.



#### Formation de l'image d'un objet par une lentille convergente

3 cas : objet situé sur F, avant F ou après F

1er cas : objet avant F



Plus l'objet sera proche du foyer objet de la lentille et plus l'image sera grande



#### Formation de l'image d'un objet par une lentille convergente





Plus l'objet sera proche du foyer objet de la lentille et plus l'image sera grande





#### Quelques rappels...

La lumière

Optique géométrique

Formation de l'image

La fluorescence

# Formation de l'image Dualité de la nature de la lumière Approche géométrique Approche ondulatoire Réfraction Interférences Réflexion Diffraction Diffusion Absorption

## Réfraction



Indice de réfraction Mesure de la densité optique d'un milieu

$$n = c/v$$
  $n \ge 1$ 

Vide = 1Air = 1,00029Eau = 1.33Verre = 1.5

Glycérol = 1.47 Huile = 1.512

*C : célérité de la lumière dans le vide V : vitesse de la lumière dans le milieu traversé* 

Déviation de la direction de propagation du rayon lors d'un changement de milieu





### Angle limite et réflexion totale



Angle incidence > angle limite,

Pas de réfraction, phénomène de réflexion totale.



## Interférences



2 ondes se rencontrant dans un même point de l'espace et ayant la même direction de propagation vont pouvoir se composer.

L'onde résultante dépend de la différence de marche  $\delta$ .



Nb pair  $\lambda$ 

Interférences <u>constructives</u> : les amplitudes <u>s'ajoutent</u>

Nb impair  $\lambda/2$ 

Interférences <u>destructives</u> : les amplitudes <u>s'annulent</u>

 $\lambda/2 < \delta < \lambda \rightarrow$  Interférences partiellement destructives

## Diffraction



Lorsque une onde rencontre d'un obstacle ou une ouverture

Principe de Huygens-Fresnel

Chaque point d'une onde peut être considéré comme la source d'une nouvelle petite onde (ondelette)



Fentes d'Young (1802) Interférences entre les ondelettes → pattern de diffraction



## Diffusion



Déviation du faisceau lumineux dans de multiples directions Selon la taille des particules par rapport à la longueur d'onde incidente

Diffusion élastique Pas de changement de fréquence Diffusion Rayleigh, Mie



Diffusion inélastique Changement de fréquence Effet Raman

- Si  $v_{diff} < v_0$ : diffusion Stokes Augmentation de la longueur d'onde
- Si  $v_{diff} > v_0$ : diffusion anti-Stokes Diminution de la longueur d'onde

## Absorption



Due à l'absorption de photons lors de la traversée d'un matériau



Absorbance du milieu définie par la loi de Beer-Lambert :

 $A = DO = \log(I_0/I) = \varepsilon.I.C$ 

ε : coefficient d'extinction molaire (L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)
l : distance (cm)
C : concentration substance (mol.L<sup>-1</sup>)

Propriété d'absorption des matériaux permettent de filtrer certaines longueurs d'onde

Lumière blanche



Filtres de fluorescence



#### Quelques rappels...

La lumière

Optique géométrique

Formation de l'image

La fluorescence

## Qu'est ce que la fluorescence?



Luminescence Émission d'un rayonnement électromagnétique Classement en fonction du mode d'excitation

Chaleur Réaction enzymatique Réaction chimique Champ électrique Thermoluminescence Bioluminescence Chimiluminescence Electroluminescence

Photons Photoluminescence

Fluorescence

État excité : quelques nanosecondes

#### Phosphorescence

État excité : quelques secondes Passage à un état intermédiaire (état triplet)

## Diagramme de Jablonski



#### Représente les différents niveaux d'énergie d'une molécule



- Phénomènes radiatifs
- $\sim\!\!\sim\!\!\sim$  Phénomènes non radiatifs (pas d'émission de photon)
- États vibrationnels





#### Spectres d'émission et d'excitation



Caractéristiques d'une molécule donnée, dans des conditions données.



#### <u>Effet miroir</u> :

image inversée des spectres d'absorption et d'émission

#### <u>Décalage de Stokes</u> :

déplacement du spectre d'émission vers + grandes longueurs d'onde

#### Overlap :

→ nécessité de séparer lumière d'excitation et d'émission par des filtres

$$\lambda_{em} > \lambda_{ex}$$
  
E<sub>em</sub> < E<sub>ex</sub>

## Caractéristiques de la fluorescence

INSTITUT JACQUES MONOD

Rendement quantique :

Nb photons émis Nb photons absorbés

Rend compte de la compétition entre les phénomènes de désexcitation radiatifs et non radiatifs Compris entre 0.1 et 1

<u>Coefficient d'extinction</u> (E): Probabilité d'absorption d'un photon

Plus  $\epsilon$  élevé, plus fluorescence élevée, à intensité incidente et rendement quantique égaux

<u>Durée de vie</u> :

#### Temps moyen qu'une molécule reste à l'état excité



Processus radiatifs (émission d'un photon) Processus non radiatifs (FRET, quenching, conversion interne…etc)

#### Durée de vie de fluorescence



A l'échelle d'une population de molécules :



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





#### Influence du pH sur la fluorescence

Modification du rendement quantique

Modification des spectres

Décalage du maximum d'émission vers les grandes/courtes longueurs d'onde



в

pH 9.0

Développement de sondes sensibles au pH :



Sankaranarayanan et al., Biophys. J., 2000, 79 : 2199-2208



Ex = 514 nm

72

700

750



### Influence des ions sur la fluorescence



 $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $K^+$ , 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^+, ...



## Influence de l'environnement



Polarité État excité + stable avec augmentation de la polarité du milieu Décalage du spectre d'émission vers le rouge



**Température** Augmentation du rendement quantique avec une baisse de température

#### Le microscope optique



#### Les composants du microscope optique

Trajets optiques en lumière blanche

Trajets optiques en fluorescence

Résolution

#### Le microscope optique



- ✓ Produire une image agrandie de l'objet
- ✓ Séparer les détails de l'objet
- ✓ Rendre les détails visibles par l'œil ou le capteur





## Le microscope optique à l'infini



#### Insertion d'éléments optiques :

anneaux de phase, prismes de Wollaston, polariseur, filtres de fluorescence...

... Sans modifier la localisation du plan image intermédiaire

## Les principaux composants du microscope optique





#### Lampe

Condenseur Concentre la lumière sur l'échantillon

#### Échantillon

Objectif Produit une image agrandie de l'échantillon

Oculaires Agrandit l'image produite par l'objectif

#### Modern Microscope Component Configuration



#### Source lumineuse





#### Modern Microscope Component Configuration

Lumière blanche

Lampe halogène, filament de tungstène



## Le diaphragme de champ





Le diaphragme de champ permet d'optimiser la taille de l'illumination à la taille du champ d'observation.

Son ouverture modifie l'intensité lumineuse mais pas la résolution du système.

## Le condenseur et le diaphragme d'ouverture





**Condenser Aperture Size and Image Quality** 



90%, NA 0.81 70%, NA 0.54 20%, NA 0.18

Condenser Illuminating Cones



NA 1.2 NA 0.6 NA 0.3 NA 0.15

L'ouverture du diaphragme de condenseur est responsable de l'angle du cône d'illumination et par conséquent de l'ouverture numérique du condenseur

La résolution est optimale pour une ouverture du diaphragme de condenseur de l'ordre de 70%.

L'ouverture du diaphragme ne doit pas servir à modifier l'intensité lumineuse !!!
# Composant majeur : l'objectif





#### + éventuellement bague réglable

Correction épaisseur lamelle Ouverture numérique variable Type d'immersion



#### Modern Microscope Component Configuration

# L'objectif





✓ Distance de travail

Distance entre objectif et objet

✓ Profondeur de champ

Épaisseur de l'échantillon dans laquelle mise au point réalisable

✓ Ouverture numérique



# Ouverture numérique



NA = LA caractéristique essentielle pour la résolution de l'objectif



NA = n. sin 
$$\alpha$$

 $\alpha$  : demi angle du cône de lumière récupéré par l'objectif n : indice de réfraction du milieu

Profondeur de champ et distance de travail diminuent lorsque NA augmente

# Objectifs à immersion



Diminuer les différences d'indice des milieux traversés pour capter davantage de rayons lumineux



Milieux d'immersion : Eau, Huile, Glycérol (indices proches de celui du verre)

# Aberrations optiques



#### Chromatiques





Sphériques



# Aberrations optiques



#### Coma



#### Courbure de champ



### Correction des aberrations



Quelques définitions..

Type d'objectif	Correction aberration sphérique	Correction aberration chromatique	Correction planéité du champ	
Achromat	1 couleur	2 couleurs	non	
Apochromat	3-4 couleurs 4-5 couleu		non	
Fluorite	2-3 couleurs	2-3 couleurs	non	
Plan			oui	
Plan-Apo	3-4 couleurs	4-5 couleurs	oui	

### Le microscope optique



#### Les différents composants du microscope optique

#### Trajets optiques en lumière blanche

Trajets optiques en fluorescence

Résolution

Les capteurs

# Microscopie en lumière blanche





August Köhler (1866-1948)

### 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

# Trajets optiques dans l'illumination de Köhler



2 séries de plans focaux conjugués

Chaque point de la source illumine tous les points de l'objet

Tous les points de la source illuminent un point de l'objet

Illumination homogène de l'échantillon

Optimisation de la résolution et du contraste



# Pourquoi le contraste est-il mauvais en lumière blanche ?





La lumière diffractée possède un retard de phase d'  $\frac{1}{4}$  de longueur d'onde par rapport à la lumière directe



- D : onde diffractée
- S : onde directe P : onde résultante



L'œil humain est sensible uniquement aux différences d'amplitude (intensité) et pas aux différences de phase.

🛑 Les objets transparents présentent peu ou pas de contraste.

## Augmenter le contraste en microscopie en lumière blanche



En transformant les différences d'indices de réfraction en différences d'intensité, on augmente le contraste des échantillons transparents.

✓ Contraste de phase

Zernike, 1934



Köhler + anneau de phase + diaphragme annulaire ✓ Contraste interférentiel

Nomarski, 1955



Köhler

- + polariseur/analyseur
- + prismes de Wollaston

### Le contraste de phase





Frits Zernike (1888-1966)

Décrit par Fritz Zernike en 1934, prix Nobel en 1953

Technique qui permet d'obtenir des images contrastées à partir d'échantillon transparents.

Original Phase Contrast Photomicrographs of Human Cells



#### Transformer des différences de phase en différences d'intensité

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

# Trajets optiques en contraste de phase





#### Diaphragme annulaire

Dans le plan focal objet du condenseur

Créé un cône creux de lumière qui illumine l'échantillon

#### Anneau de phase

Dans le plan focal arrière de l'objectif

Verre transparent  $\longrightarrow 0$ 

Masque absorbant  $\longrightarrow \lambda/4$ 



Les rayons qui ne traversent pas l'échantillon ne subissent pas de retard de phase

Les rayons qui traversent l'échantillon subissent un retard de phase de  $\lambda/4$ 

Les rayons diffractés au passage dans l'échantillon traverseront le masque absorbant de l'anneau de phase où ils subiront un retard de phase de  $\Lambda/4$ .

# Principe du contraste de phase positif



Le centre de la plaque de phase diminue l'amplitude de la lumière directe de façon à ce qu'elle puisse interférer avec la lumière diffractée et déphasée par l'objet



Création d'interférences destructives. Les objets apparaissent en noir sur fond clair



### Images en contraste de phase





Cellules CHO en culture



Coupe de rein de souris



Sacharomyces cerevisiae

# Le DIC : Differential Interference Contrast





Georges (Jerzy) Nomarski (1919-1997)







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

Image d'un objet transparent apparaît en « pseudo volume »

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

# Principe du contraste interférentiel



Polarizer (Analyzer) Axis

Emerging Waveforms

Phase

Specimen

Figure 7 (a)

(b)

(c)

#### Polariseur

Polarise la lumière provenant de la source

#### Prisme de Wollaston

Sépare la lumière provenant de la source en deux faisceaux orthogonaux et très proches



#### Analyseur

Bloque la lumière provenant de la source

Laisse passer uniquement la lumière déviée par l'échantillon

# Trajets optiques en DIC





# Images en contraste interférentiel







Contraste de phase



DIC



Cellules 3T3 en culture



Cellule Hela en mitose O.Bregerie, Hôpital Necker

## Le microscope optique



Les différents composants du microscope optique

Trajets optiques en lumière blanche

#### Trajets optiques en fluorescence

Résolution

# Microscopie de fluorescence





Nécessité de séparer la lumière excitatrice de la lumière émise



#### Filtre d'émission

Sélection d'une gamme de longueur d'onde d'émission du fluorophore

#### Filtre d'excitation

Sélection d'une gamme de longueur d'onde d'excitation

Miroir dichroïque Réfléchi la lumière d'excitation Transmet la lumière émise par le fluorophore

# Les filtres de fluorescence





# Sources lumineuses en fluorescence

Les lampes à arc



Ampoule contenant un gaz (mercure, xénon) vaporisé par l'arc électrique



# Sources lumineuses en fluorescence Les LASER



#### Light <u>A</u>mplified by <u>S</u>timulated <u>E</u>mission of <u>R</u>adiations



#### Emission stimulée :

Un photon interagissant avec un atome retournant à l'état fondamental produit 2 photons.

#### Pompage :

La lumière ou l'électricité sont utilisés pour exciter le milieu amplificateur

#### Amplification :

Miroirs aux extrémités dont un semi transparent





# Les différents types de LASERs

LASER à gaz

Argon, Krypton, Hélium Néon, Argon ion...



LASER solides

#### Cristal Ti:Sa

Accordables en longueur d'onde (700-1000 nm) Cristal dioxide de silicium (diodes laser) 405 nm, 488 nm, 561 nm...

LASER liquides

Laser à colorant (Rhodamine, ...)

# Images en lumière blanche + fluorescence



Contraste de phase + fluorescence



DIC + fluorescence



# Trajets optiques en lumière blanche



Droit





## Trajets optiques en fluorescence



Droit



# Le microscope optique



Les différents composants du microscope optique

Trajets optiques en lumière blanche

Trajets optiques en fluorescence

Résolution



## La Point Spread Function (PSF) Image d'un point à travers un système optique

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



Diffraction + interférences  $\rightarrow$  Tâche d'Airy





Dans chaque plan :

Tâche centrale des points du plan

+ anneaux de diffraction des points situés dans plans supérieurs et inférieurs..



 $\rightarrow$  Flou, diminution du contraste..

Cellule HeLa, Marquage Tau-GFP + DAPI

# Résolution optique



Plus petite distance entre deux points de même intensité permettant de les discriminer

#### Critère de Rayleigh :

Tâche d'Airy d'un point coïncide avec la 1<sup>ère</sup> frange sombre du point adjacent.

~	M	A		
Poir	nts résolus C	Points résolus ritère de Rayleig	Points non résolus h	
	Wide	field	Confocal	
Résolution latérale	d <sub>×y</sub> = 0,63	1 λ /ΝΑ	d <sub>×y</sub> = 0.46 λ /NA	+ 25 %
Résolution axiale	d <sub>z</sub> = 2 λ	n/NA <sup>2</sup>	$d_z = 1.4 n \lambda / NA^2$	+ 30%



# Résolution et ouverture numérique



NA=0.7 NA=1.25 NA=1.4

Plus NA importante, plus la tâche d'Airy sera étroite et meilleure sera la résolution

# Utilité de la PSF



#### ✓ Connaître les déformations optiques du système pour corriger les images

→ Déconvolution



Image brute





Image déconvoluée

#### ✓ Mesure de la résolution du système





Résolution du système = largeur à mi-hauteur

✓ Évaluation de la qualité du système





Défaut d'alignement des optiques
## Mesure de la PSF



Utilisation de billes fluorescentes de diamètre inférieur à la résolution optique (170nm). (PS-Speck, Molecular Probes-Invitrogen)

Acquisition d'un stack aux résolutions axiale et latérale de l'objectif

Reconstruction des sections  $\mathsf{XZ}$ 



Si déconvolution : Mesure à faire dans les mêmes conditions que l'acquisition des images.

## Capteurs



2 types de capteurs utilisés en microscopie :

Point par point Balayage de l'échantillon Photomultiplicateur

Capteurs plans Matrice de capteurs élémentaires : pixels Caméras CCD (Charge Coupled Device)

## Structure d'un photomultiplicateur (PMT)





Aucune résolution spatiale

Détecte des intensités lumineuses

La position spatiale est déterminée par la position des galvanomètres



## Structure d'un CCD



Capteur CCD = matrice de cellules photosensibles 1392\*1040 pixels



3 types de capteurs selon mode de lecture des charges