

Microscopies optiques appliquées à la biologie

Maxime Dahan
Laboratoire Kastler Brossel
Département de physique
Ecole normale supérieure

Plan du cours

- 1. Introduction**
- 2. Le microscope comme instrument optique**
- 3. Méthodes de contraste en transmission**
 - **Fond clair**
 - **Contraste de Phase**
 - **Contraste interférentiel**
- 4. Microscopie de fluorescence**
- 5. Microscopie non-linéaire**

Microscopie : Introduction

Qu'est ce qu'un microscope?

- Instrument qui:
- donne une image grossie d'un petit objet (grossissement)
 - sépare les détails de celui-ci sur l'image (résolution)
 - rend les détails visibles à l'œil ou avec une caméra

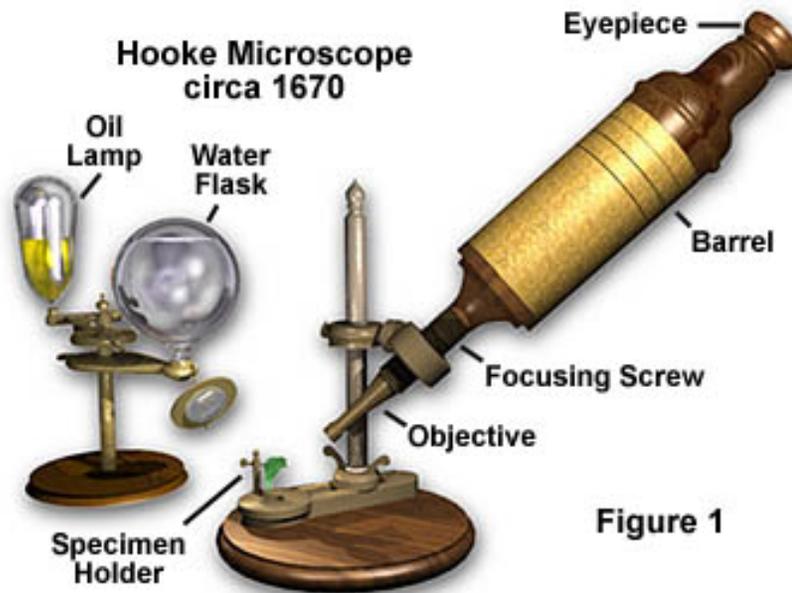
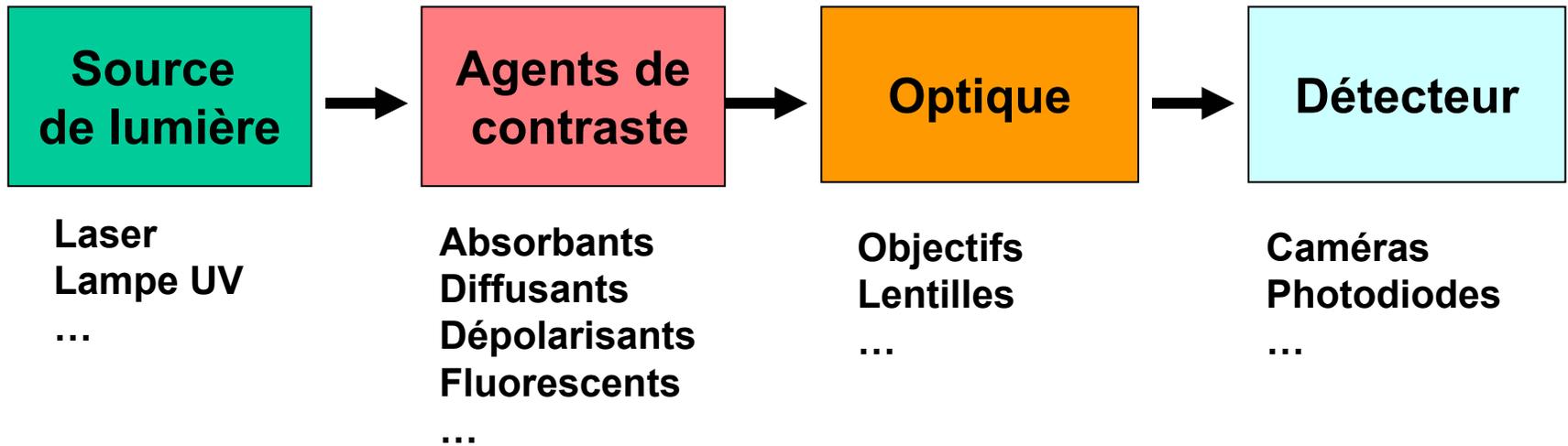


Figure 1



Formation des images dans un microscope avec objectif corrigé à l'infini

Schéma simplifié

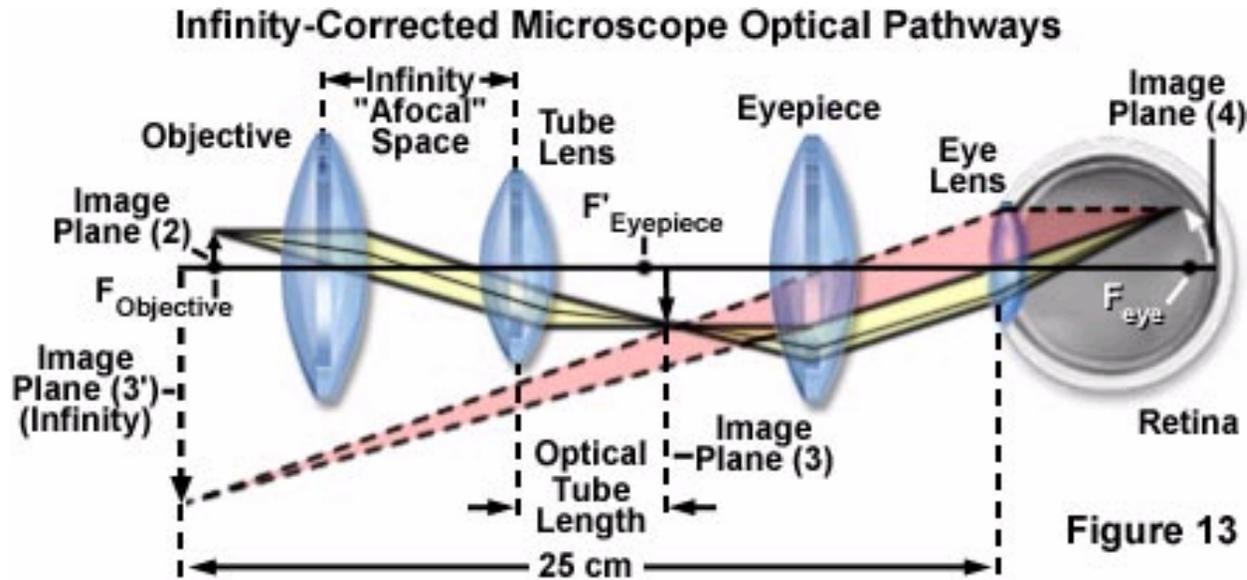


Figure 13

L'objectif et une lentille de tube forment un système afocal \Rightarrow grossissement $g_1 = f_{\text{tube}}/f_{\text{obj}}$
L'image intermédiaire est au voisinage du plan focal objet de l'oculaire

L'oculaire travaille sur cette image comme le ferait une loupe : grossissement $g_2 = D/f_{\text{oculaire}}$

D : Distance conventionnelle (25cm, distance minimale de vision distincte)

f_{tube} : en général 160 mm

B. Grossissements

Objectifs. Grandissements g_1 faibles (2,5 à 10), moyen (15 à 25), ou fort (>40), en général les objectifs 60x et 100x sont à immersion.

Oculaires. Grossissements normalisés g_2 : 6.3x, 10x, 16x, 25x

Grossissement du microscope $G = g_1 \cdot g_2$

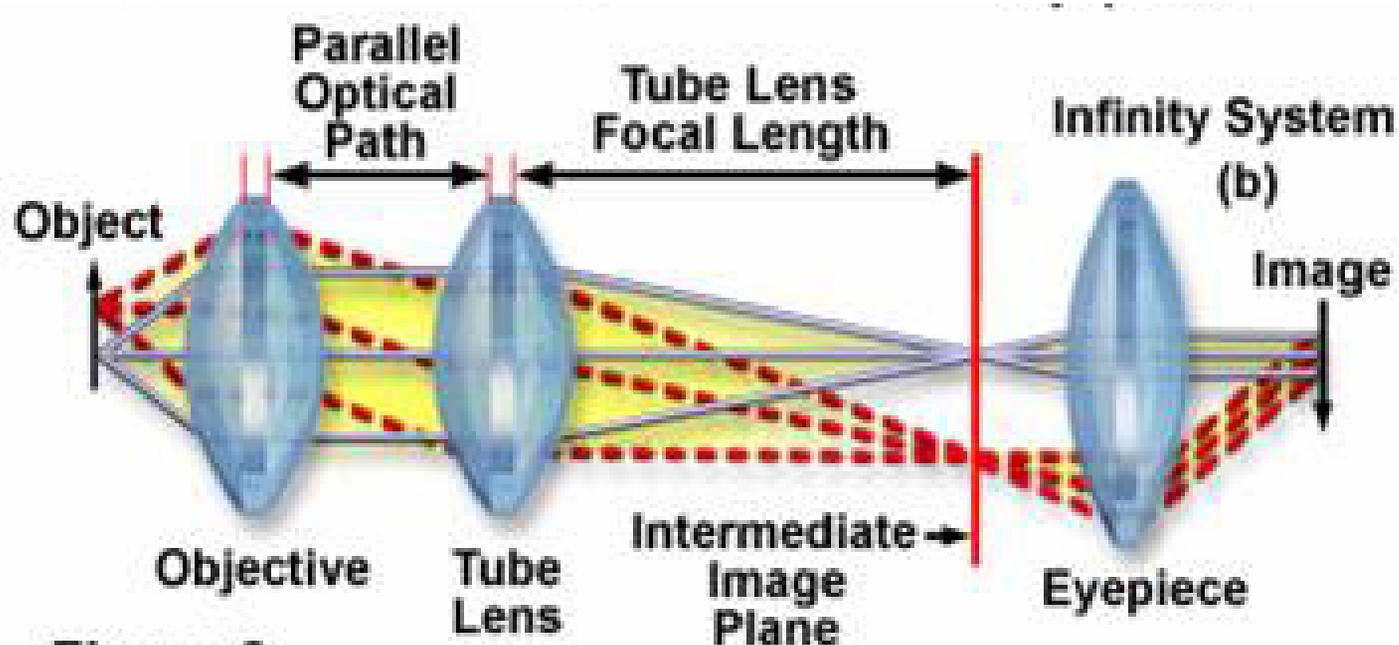
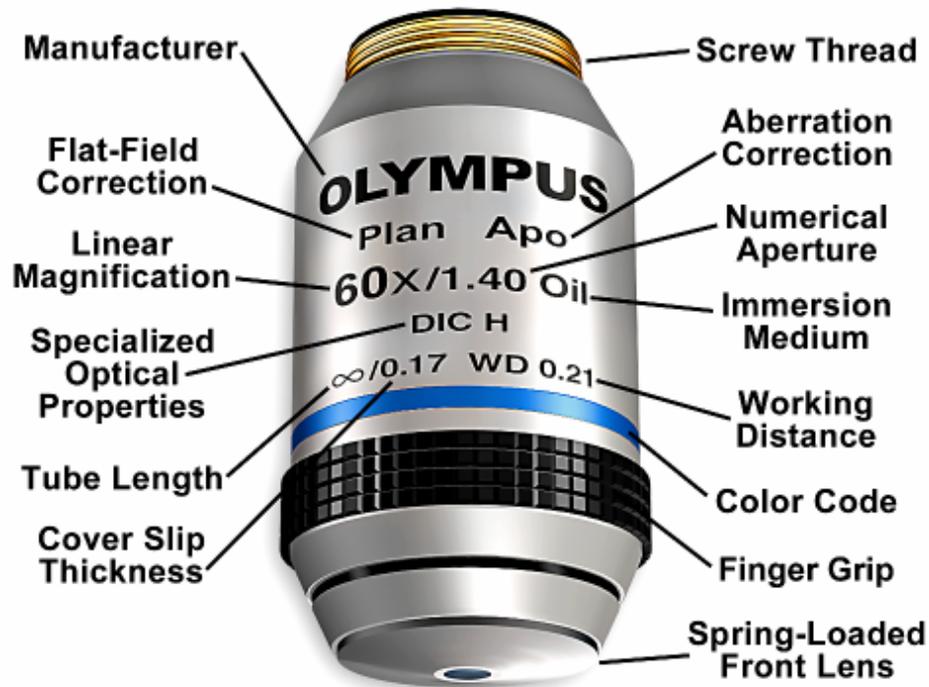


Figure 2

Les Objectifs de Microscope

Élément le plus important du microscope, détermine la qualité de l'image qu'on peut obtenir (forme l'image primaire)

Objective Specifications



Aberrations optiques

- **aberrations chromatiques**
- **aberrations sphériques**
- **aberration de coma**
- **astigmatismes**
- **courbure de champ**

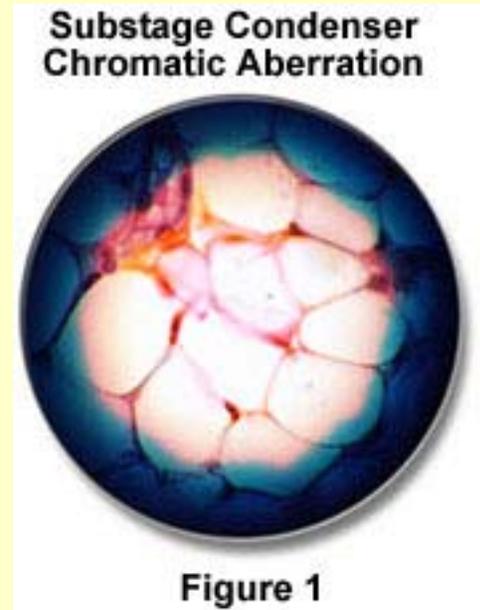
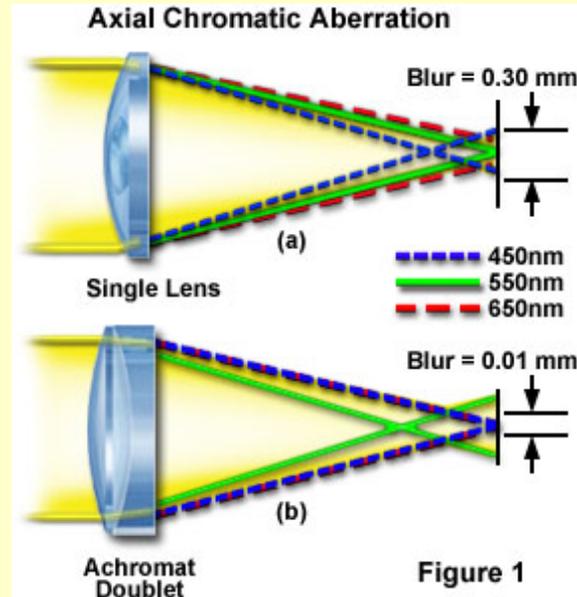
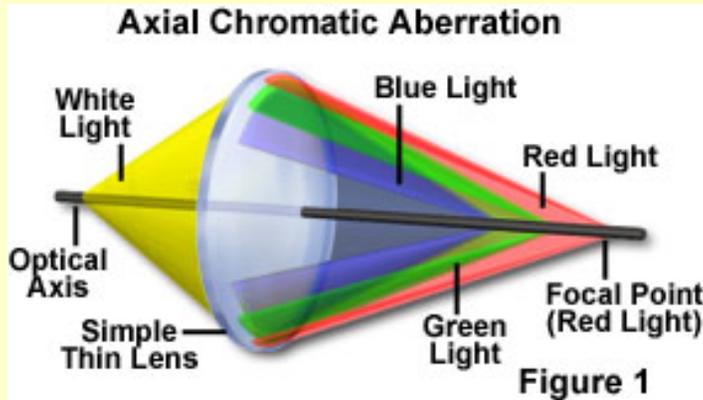
III. Aberrations des lentilles

A. Aberration chromatique

Focale f' vérifie $1/f' = (n-1)(1/R_1 - 1/R_2)$

l'indice n dépend de la longueur d'onde λ de la lumière qui traverse le verre
 $\Rightarrow f'$ dépend de λ !

Pour une lentille convergente :



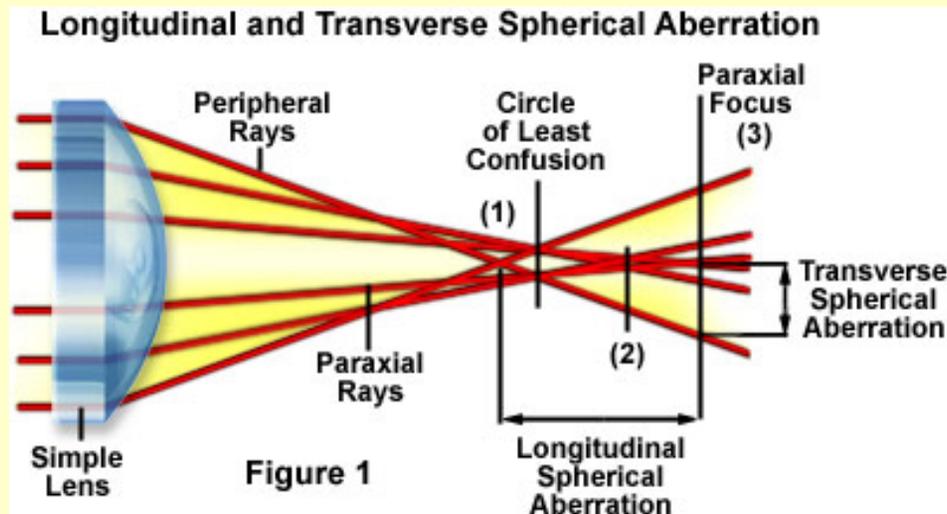
Pour une lentille divergente, foyer bleu et rouge inversés...

Correction : association de deux lentilles, une lentille convergente (Crown) et une lentille divergente (Flint) : achromat, ou **doublet achromatique**.

B. Aberration sphérique

Lentilles simples : un ou plusieurs dioptres sphériques. Les rayons lumineux qui passent à la périphérie **ne convergent pas au même endroit que les rayons qui passent au voisinage de l'axe**

⇒ l'image d'un point source n'est pas un point, mais une tâche définie comme le « cercle de moindre confusion ».



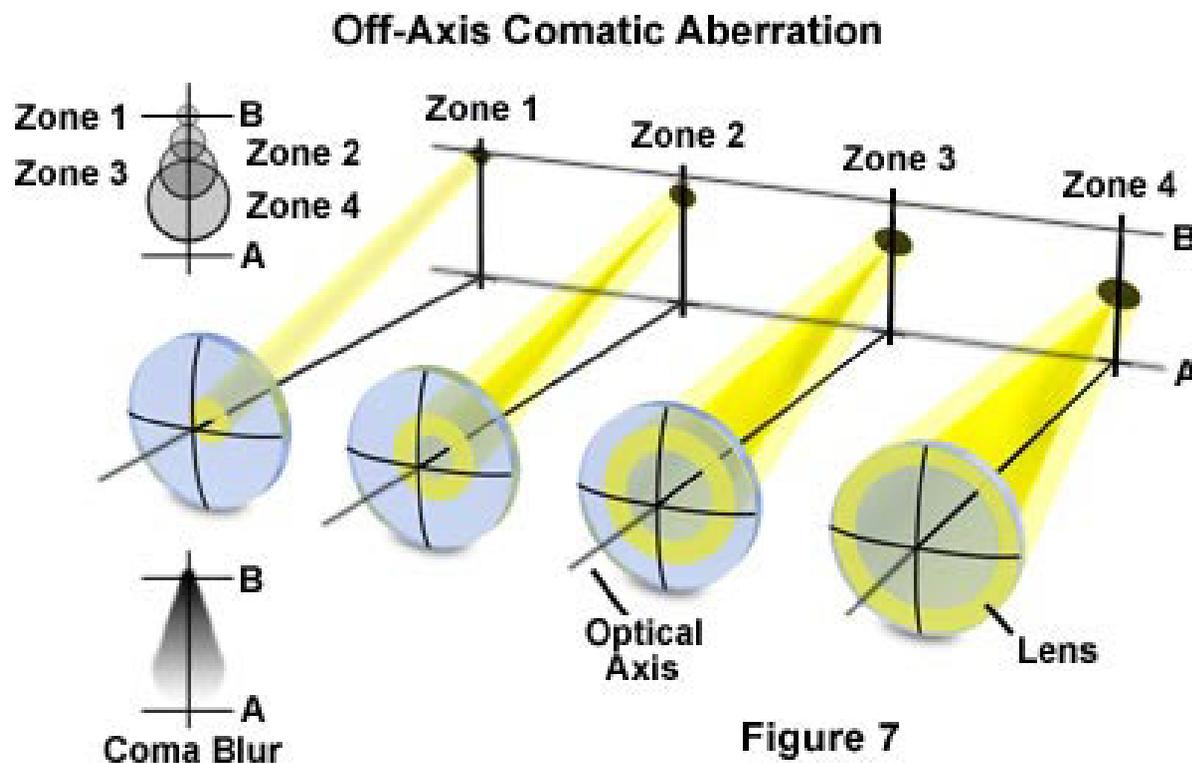
Conséquences : diminution du contraste et de la résolution (image floue)

Correction des aberrations sphériques :

- limitation des bords des lentilles (diaphragme d'ouverture),
- lentilles non sphériques (difficiles à usiner, peu usitées)
- association de lentilles de courbures différentes (doublet, triplet).

C. Aberration de coma

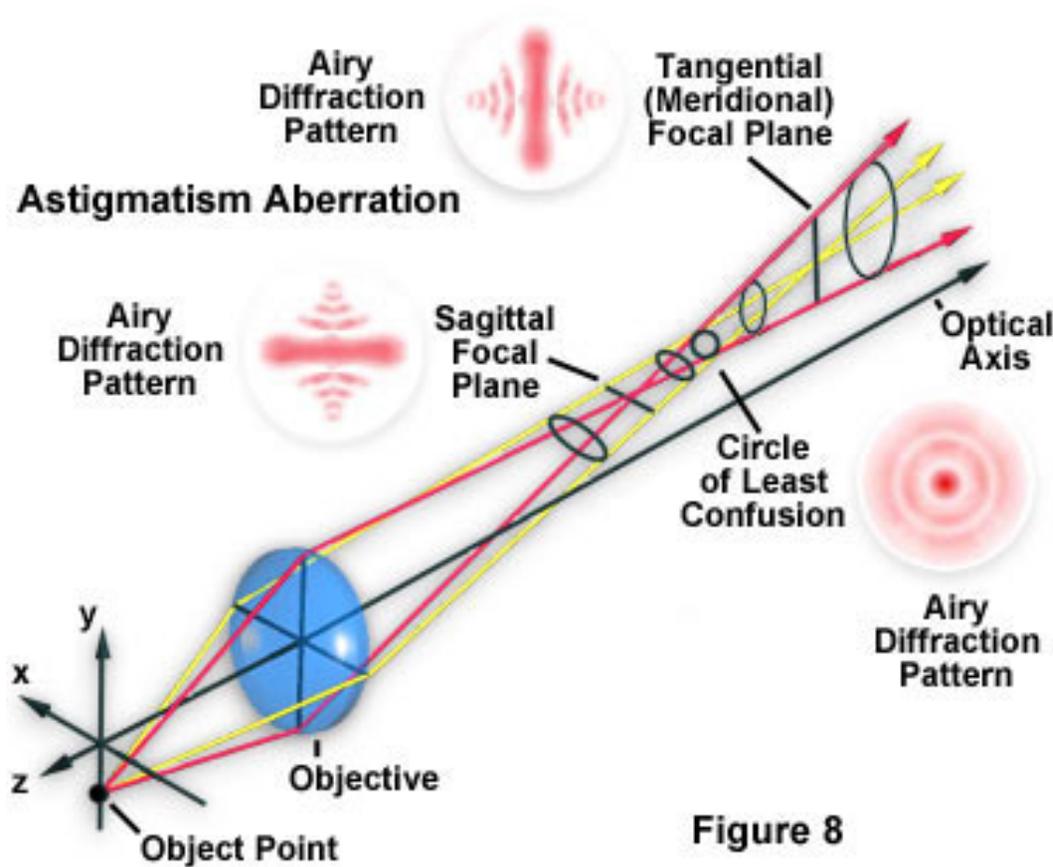
Image d'un point hors axe optique apparaît comme une comète.
S'observe lorsque la lentille n'est pas perpendiculaire à l'axe optique.



Corrections : lentille perpendiculaire à l'axe, lentille diaphragmée, association de lentilles.

D. Astigmatisme

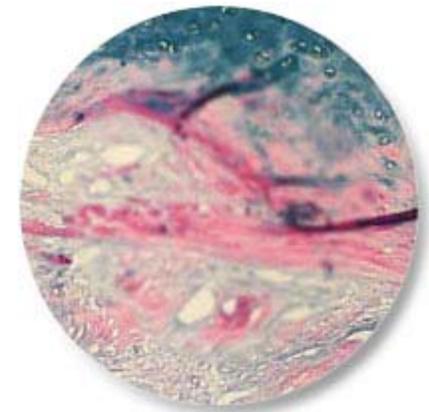
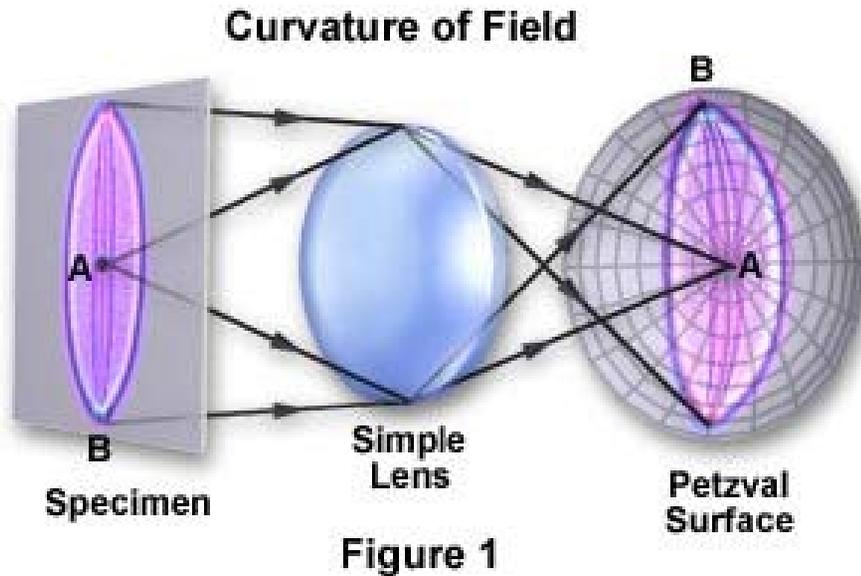
Image d'un point hors axe apparaît comme un bâtonnet; deux foyers dus à l'asymétrie du montage.



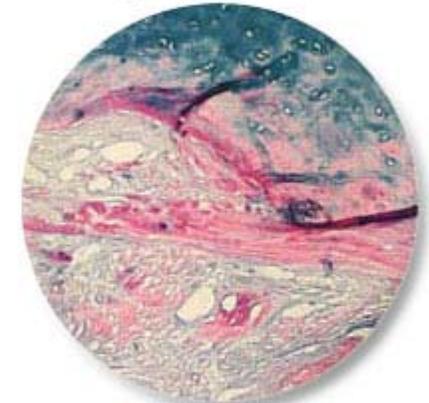
Corrections : lentille diaphragmée, association de lentilles.

E. Courbure de champ

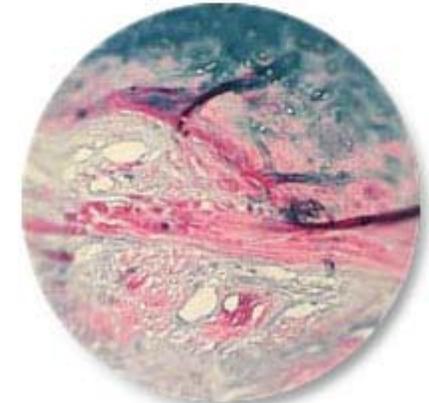
L'image d'un plan n'est pas un plan, mais une surface sphérique concave (lentille convergente) ou convexe (lentille divergente).



(a) Edges in Focus



(b) Entire Viewfield in Focus



(c) Center in Focus

Figure 2

Correction : association de deux lentilles.

Conclusion. Toutes ces aberrations peuvent être corrigées par association de lentilles et/ou traitement des surfaces : objectifs de microscope compliqués, fragiles et coûteux.

Common Objective Optical Correction Factors

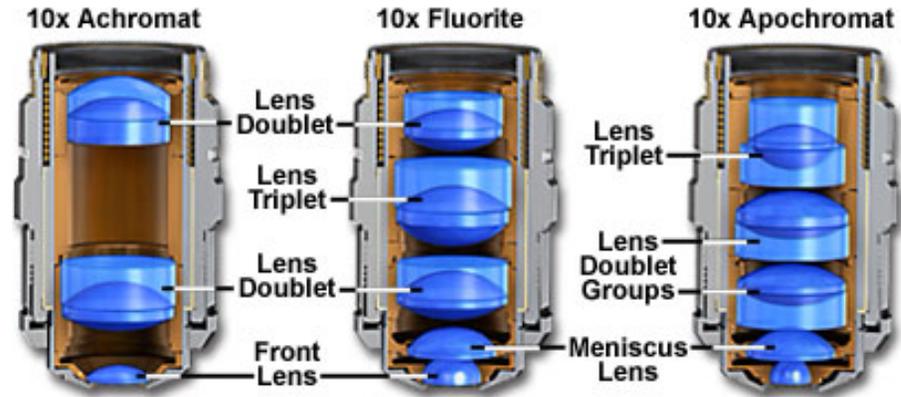


Figure 2

Objective Type	Spherical Aberration	Chromatic Aberration	Field Curvature
Achromat	1 Color 546nm	2 Colors 486&656 nm	No
Plan Achromat	1 Color	2 Colors	Yes
Fluorite Semi-apochromat	2-3 Colors	2-3 Colors	No
Plan Fluorite	3-4 Colors	2-4 Colors	Yes
Plan Apochromat	3-4 Colors	4-5 Colors	Yes

Résolution latérale et axiale

Résolution latérale

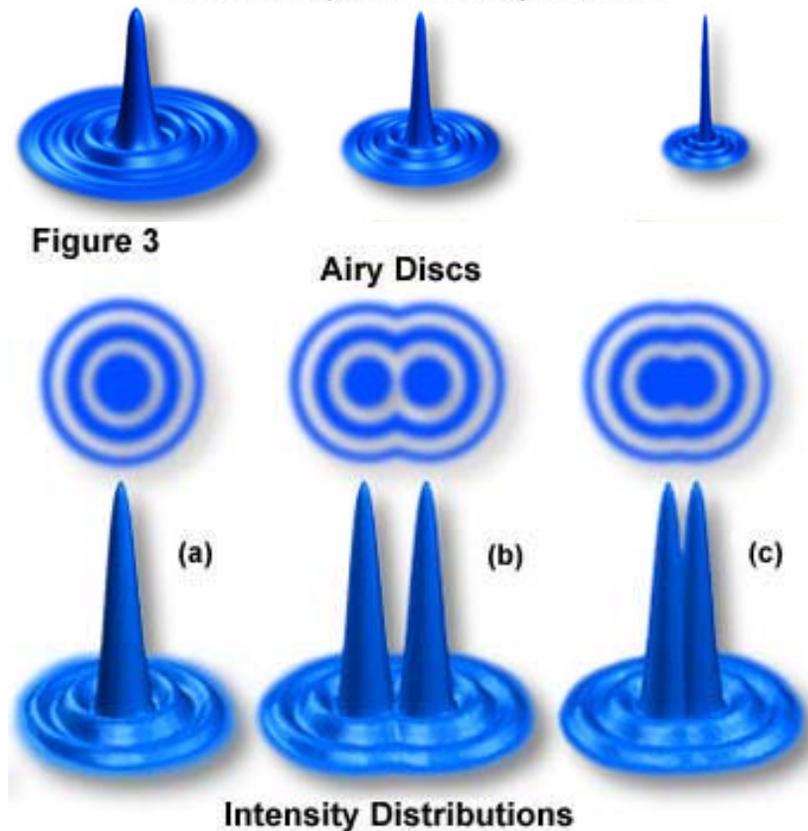
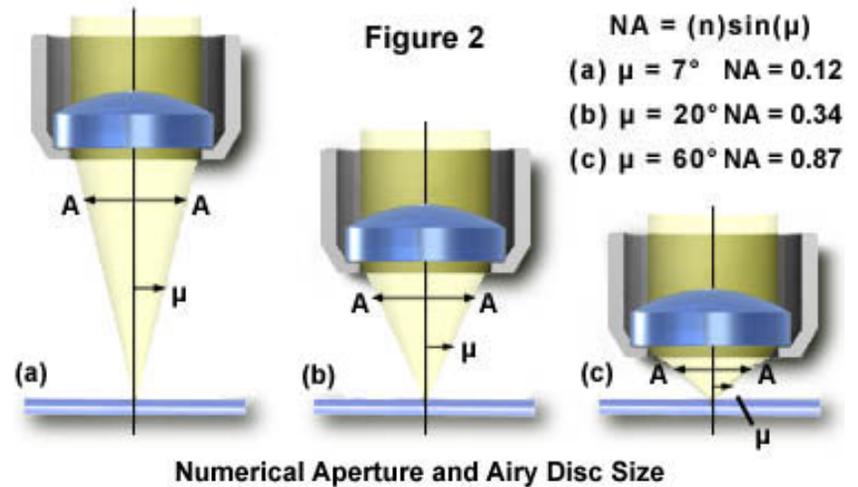
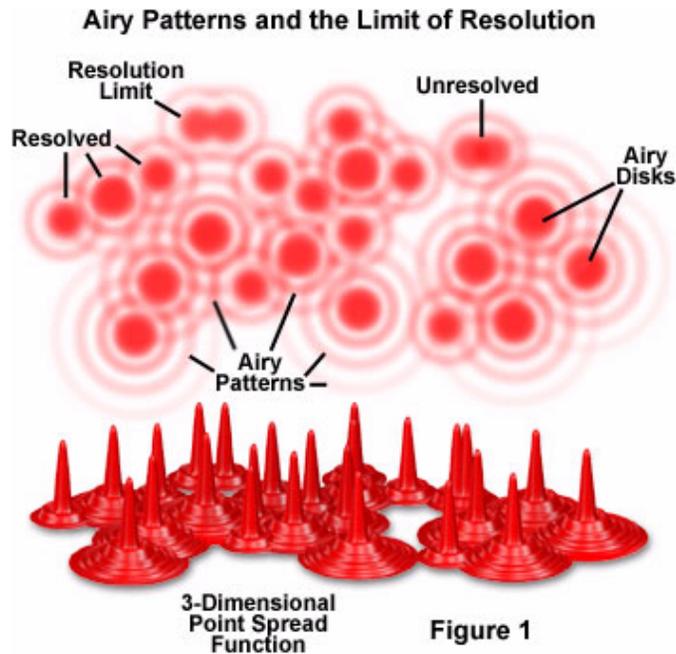
A. Ouverture numérique, résolution

Définition : $O.N. = n \sin \alpha$

Tache de diffraction $r = 1.22 f \lambda / D$

Puisque $\sin \alpha = D/2f$,

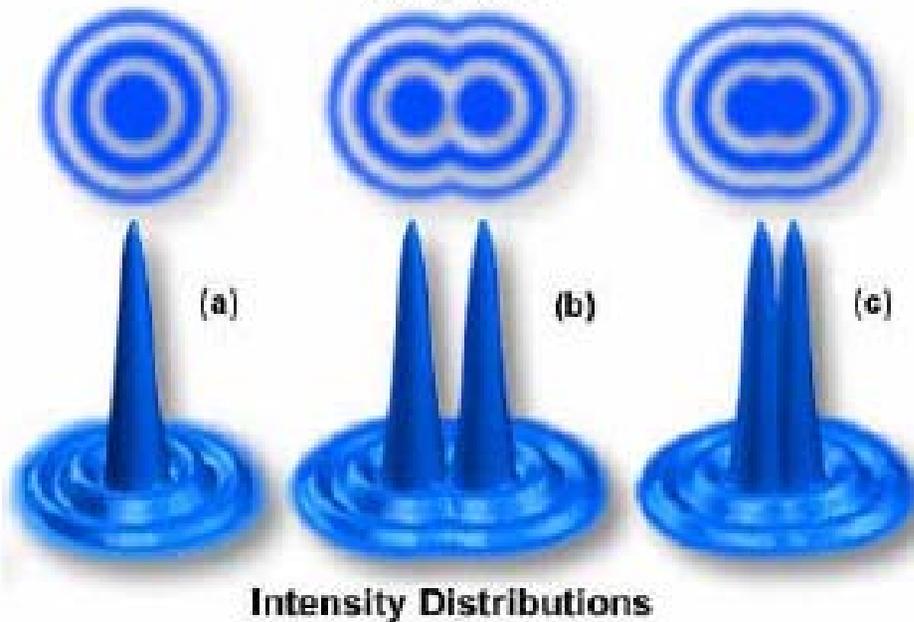
$$r = 0.61 \lambda / O.N.$$



Résolution spatiale

Figure 3

Airy Discs

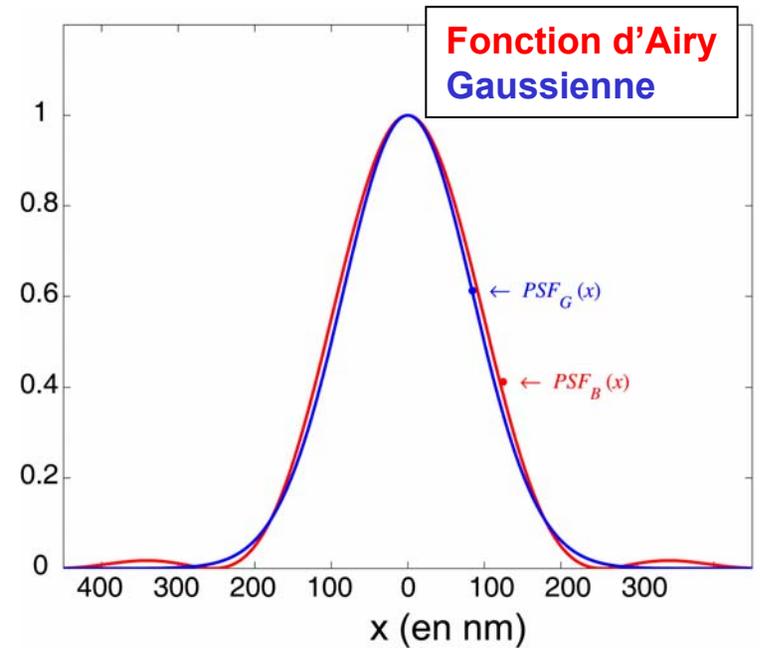
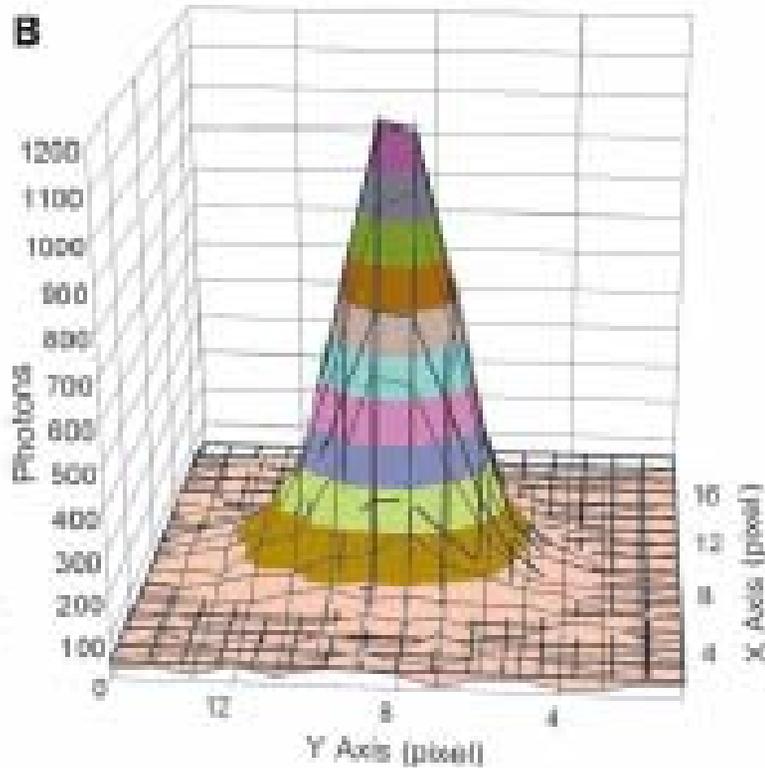


Tache de diffractions ou d'Airy:
 $I(P) = I_{\max} \left(\frac{J_1(ka \sin\theta)}{ka \sin\theta} \right)^2$

Résolution:
 $R = 1.22 \lambda / 2 NA$

Pour un bon objectif: $NA = 1.4$, $R = 250 \text{ nm}$

PSF expérimentale



Augmenter la résolution :

- augmenter l'indice n : objectifs à immersion (eau $n=1.33$, huile $n=1.55$)
- augmenter α , en construisant des objectifs à focale très courte, que l'on approche très près

Ouverture maximale : $N.A. = 1.4$, grossissement $\times 100$, objectif immersion huile
Pour une longueur d'onde de 500 nm, $r = 214$ nm.

Limite de séparation de l'œil humain : 100 μm , soit un gain de 500.

Récemment, $N.A. = 1.45$ (grossissement $\times 60$, immersion huile)
Pour la microscopie de fluorescence en onde évanescente :

$$N.A. = 1.4, \quad n=1.55, \quad \alpha = 64.6^\circ$$

$$N.A. = 1.45, \quad n=1.55, \quad \alpha = 69.3^\circ$$

Réflexion totale interface verre/eau $\theta = 62.5^\circ$

Magnification	Objective Type					
	Plan Achromat		Plan Fluorite		Plan Apochromat	
	N.A	Resolution (μm)	N.A	Resolution (μm)	N.A	Resolution (μm)
4x	0.10	2.75	0.13	2.12	0.20	1.375
10x	0.25	1.10	0.30	0.92	0.45	0.61
20x	0.40	0.69	0.50	0.55	0.75	0.37
40x	0.65	0.42	0.75	0.37	0.95	0.29
60x	0.75	0.37	0.85	0.32	0.95	0.29
100x	1.25	0.22	1.30	0.21	1.40	0.20

N.A. = Numerical Aperture

B. Profondeur de champ

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.**

Exemples : 25 μm à l'objectif x10

1 μm à l'objectif x100 à immersion

$$q_{\min} \approx \frac{0.66 \lambda}{ON}$$

axial resolution

- width changes with z

$$q(z) = q_{\min} \sqrt{1 + \left(\frac{z \lambda}{\pi q_{\min}^2} \right)^2}$$

- depth of focus
 - distance that the size of the image increases by 2

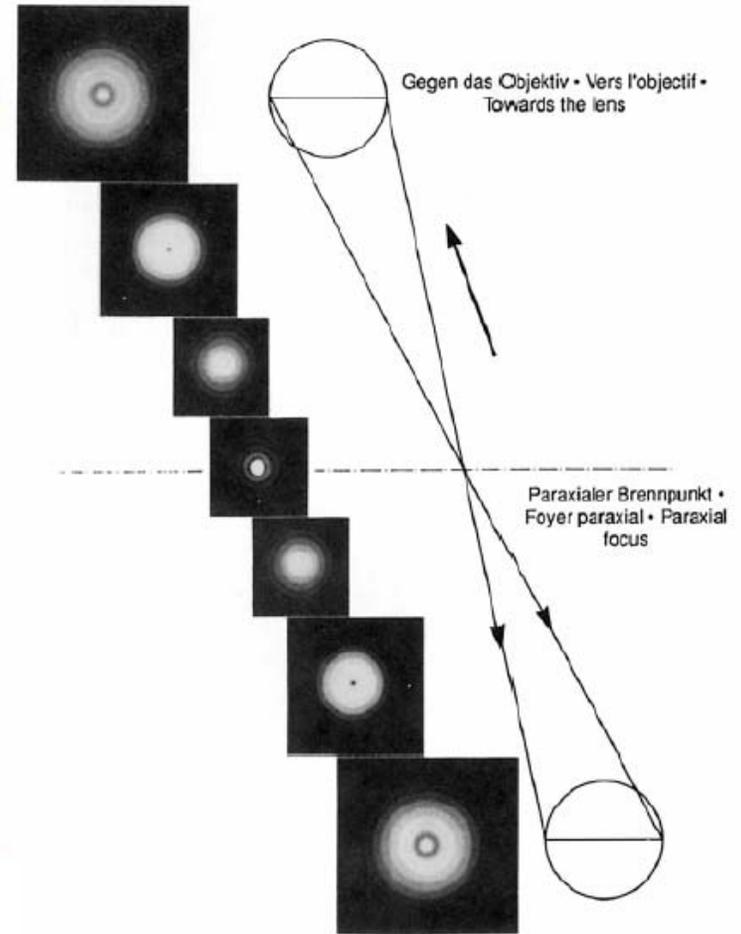
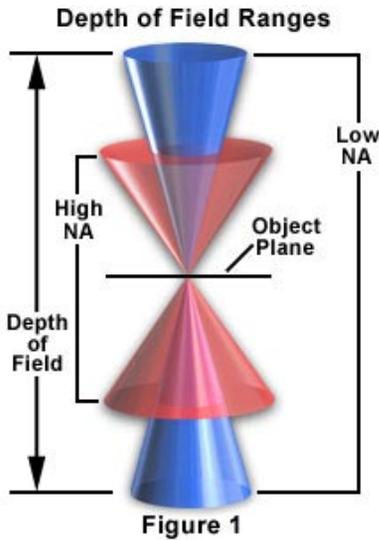


FIGURE 8 The evolution of the diffraction image of a circular aperture with differing distances of focus in an aberration-free system.

$$DOF \approx 4 \frac{\lambda}{ON^2}$$

Méthodes de contraste optique

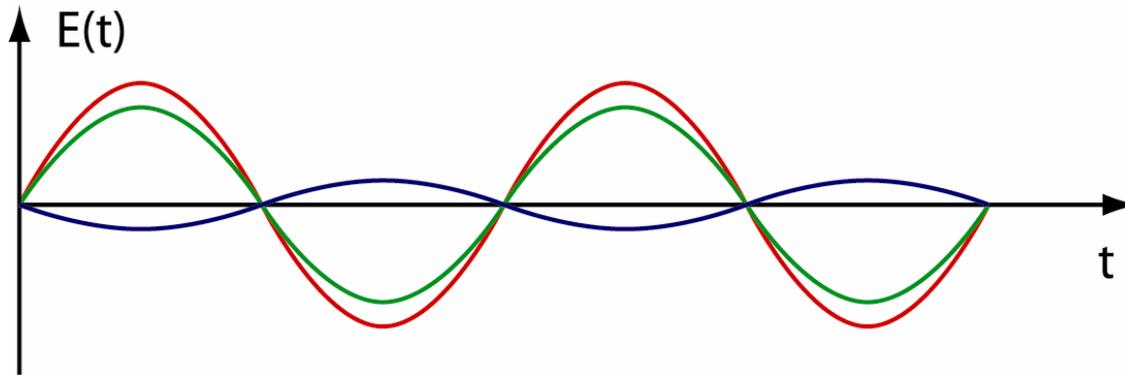
- **fond clair**
- **contraste de phase**
- **contraste interférentiel (aussi appelé Nomarski)**

A. Formation des images en fond clair :

Interprétation en termes d'interférences

Un objet atténue la lumière le traversant :

$E = t E_0 \cos(\omega t - kz)$ avec $0 < t < 1$ donc $I = t^2 I_0$ et l'objet apparaît plus sombre

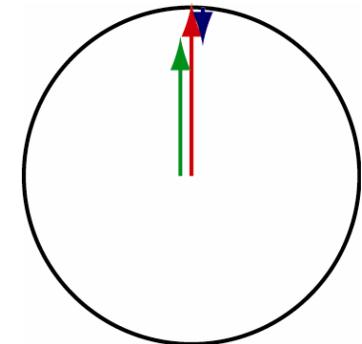


En rouge : E_0
En vert : $E = tE_0$
En bleu : $-(1-t)E_0$

Interprétation en termes d'interférences :

On peut interpréter cette atténuation comme due à la somme de l'onde incidente non perturbée et d'une onde en opposition de phase (déphasage π) :

$$E = t E_0 \cos(\omega t - kz) = E_0 \cos(\omega t - kz) - E_0 (1-t) \cos(\omega t - kz) \\ E_0 \cos(\omega t - kz) + E_0 (1-t) \cos(\omega t - kz + \pi)$$

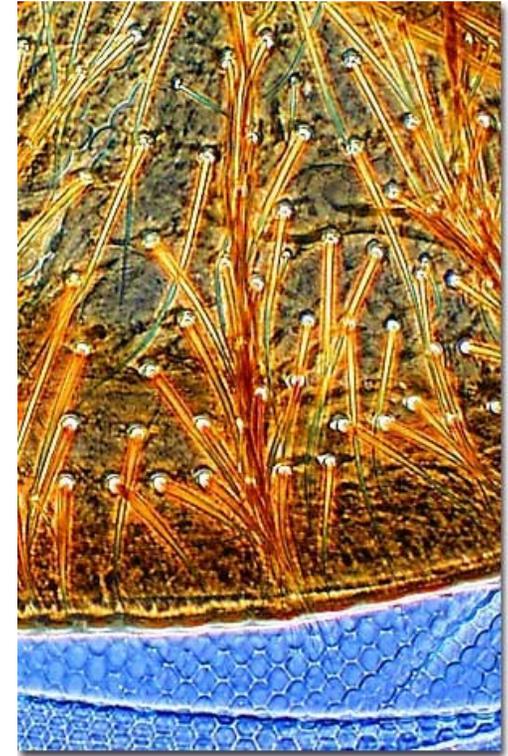
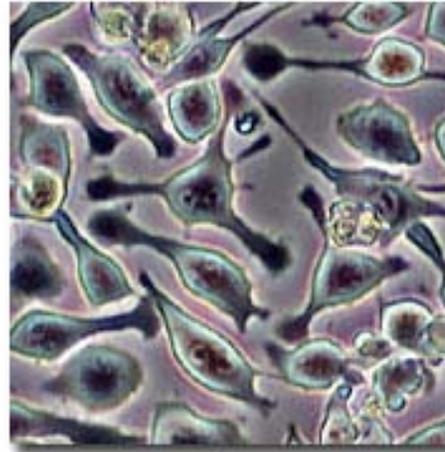
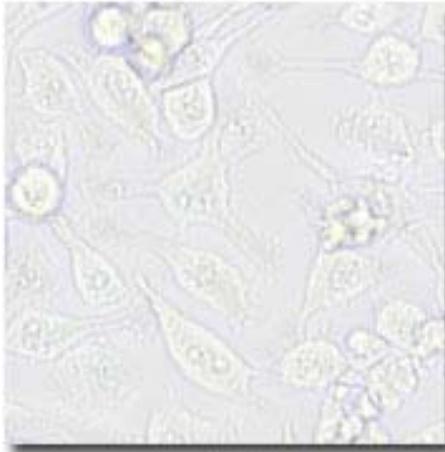


II. Microscopie à contraste de phase

Imagerie d'objets de phase (objets transparents: cellules et microorganismes)

Transforme des petits déphasages en variation d'amplitude

Living Cells in Brightfield and Phase Contrast



Échantillons minces non colorés sont transparents en fond clair.

Pourtant : suivant structure traversée par la lumière, **différence de phase différentes...**

MAIS l'œil et les détecteurs ne sont sensibles qu'aux changements d'intensité ou de couleur...

Pendant longtemps : fixations-colorations abîment les cellules, contraste de phase les respecte

A. Formation des images en contraste de phase :

Les objets transparents (cellules et microorganismes, ..) induisent un déphasage δ du champ électrique (en première approximation : pas d'absorption)

$$\delta = 2\pi (n_o - n_e) e / \lambda \quad e \text{ épaisseur, } (n_o - n_e) \text{ différence d'indice}$$

δ faible : $n_e = 1.36$, $n_o = 1.335$, $e = 1\mu\text{m}$, $\delta = \pi/10$

Après l'objet : $E = E_0 \cos(\omega t - kz + \delta)$

Interprétation en termes d'interférences : $E = E_0 \cos(\omega t - kz) \cos \delta - E_0 \sin(\omega t - kz) \sin \delta$
 $\sim E_0 \cos(\omega t - kz) - E_0 \sin(\omega t - kz) \sin \delta$

Brightfield Microscopy Wave Phase Relationships

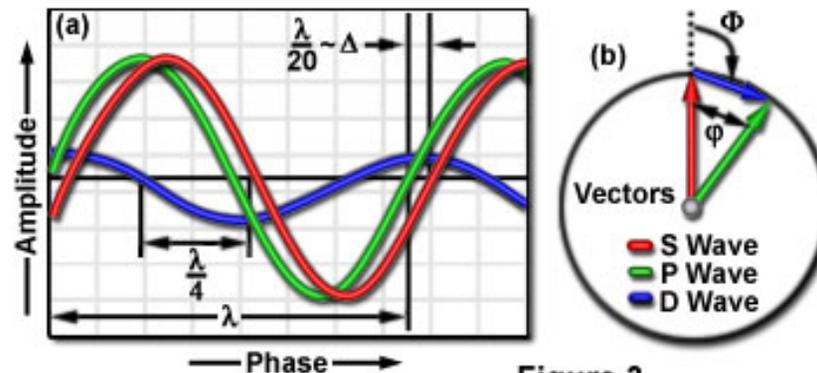


Figure 3

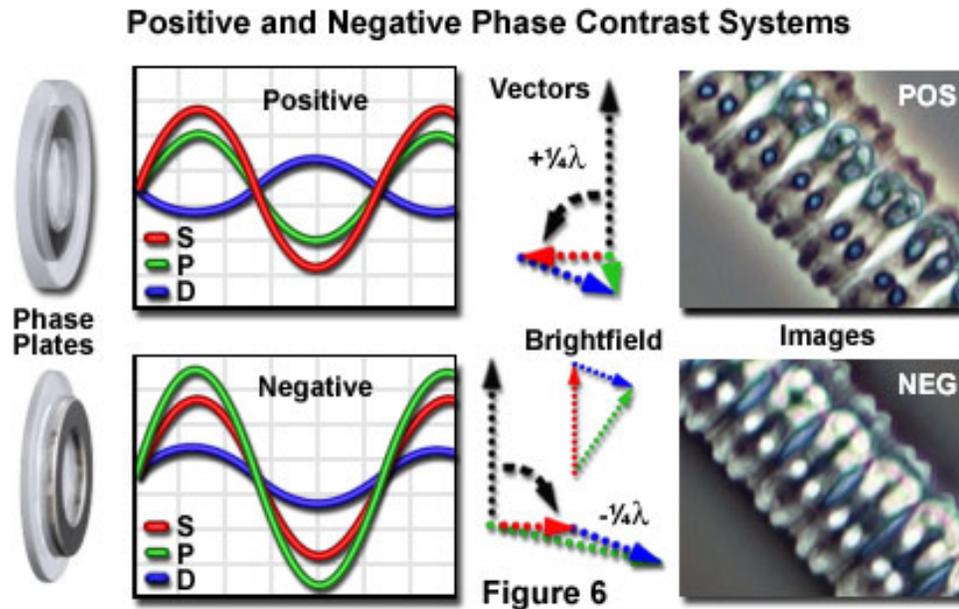
L'amplitude ne varie pas...

comment transformer cette variation de phase en variation d'amplitude ?

Ajouter un déphasage de $\pi/2$ (ou $-\pi/2$) au champ non perturbé :

$$E = E_0 \sin(\omega t - kz) - E_0 \sin(\omega t - kz) \sin \delta = (1 - \sin \delta) \sin(\omega t - kz)$$

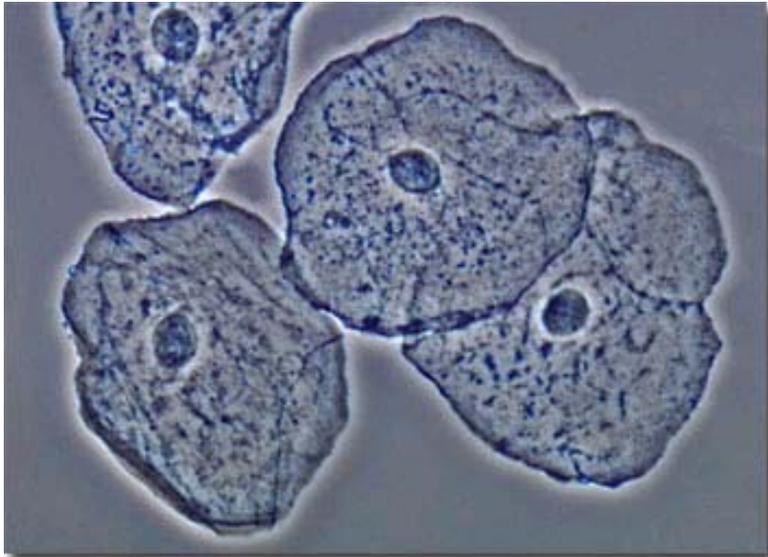
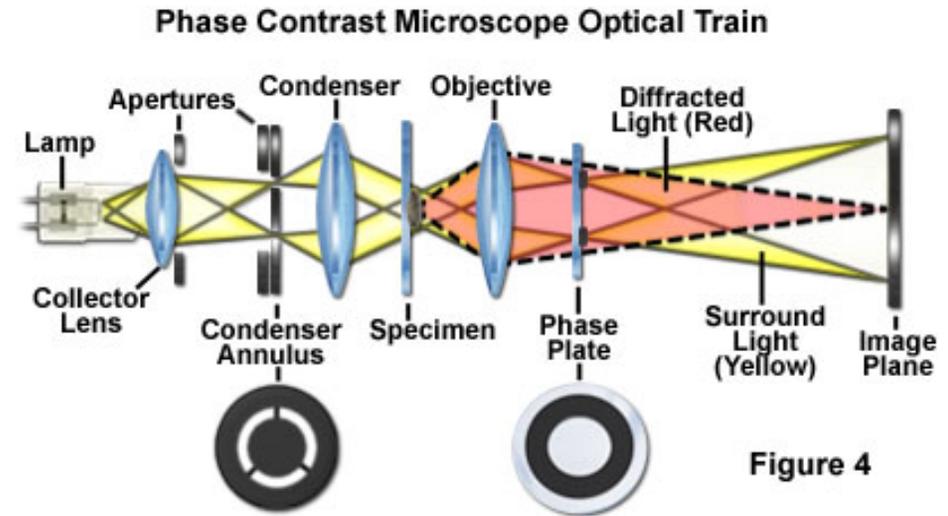
$$E = -E_0 \sin(\omega t - kz) - E_0 \sin(\omega t - kz) \sin \delta = -(1 + \sin \delta) \sin(\omega t - kz)$$



Application : observation de cellules vivantes en culture, sans traitement de fixation/coloration

En pratique :

condenseur à diaphragme annulaire : cône de lumière « directe » qui passe ensuite à travers un **objectif à anneau de phase** (déphasage $\pi/2$ et atténuation de 60 à 90%)



Existence d'un halo clair autour des détails sombres, sombre autour des détails clairs... observation des contours gênée et précision des mesures faible

Fond noir : contours OK, mais structure interne peu révélée.

Passage de l'un à l'autre très utilisé.

Phase Contrast Microscope Optical Train

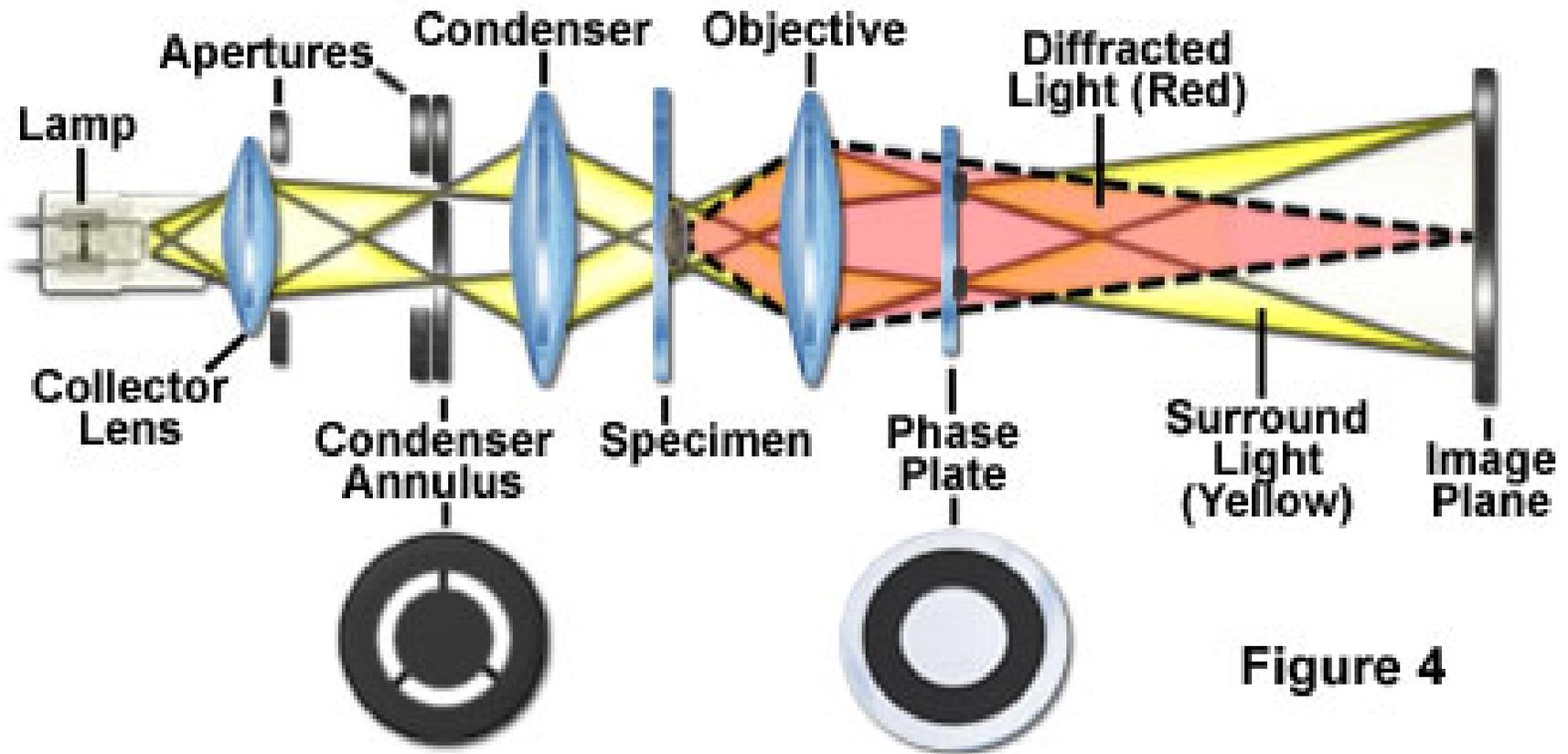
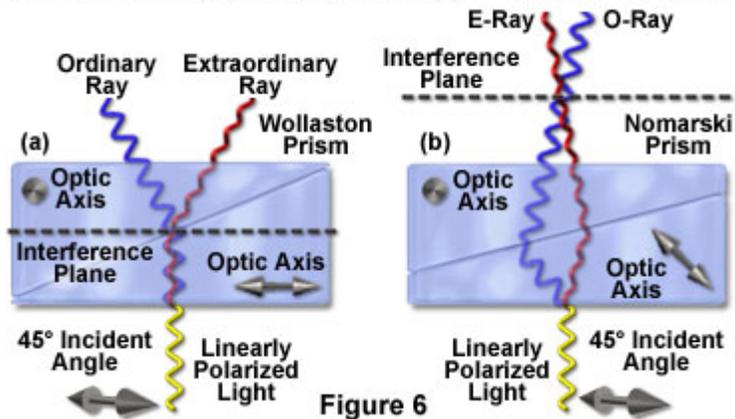


Figure 4

Microscopie à Contraste Interférentiel Différentiel:

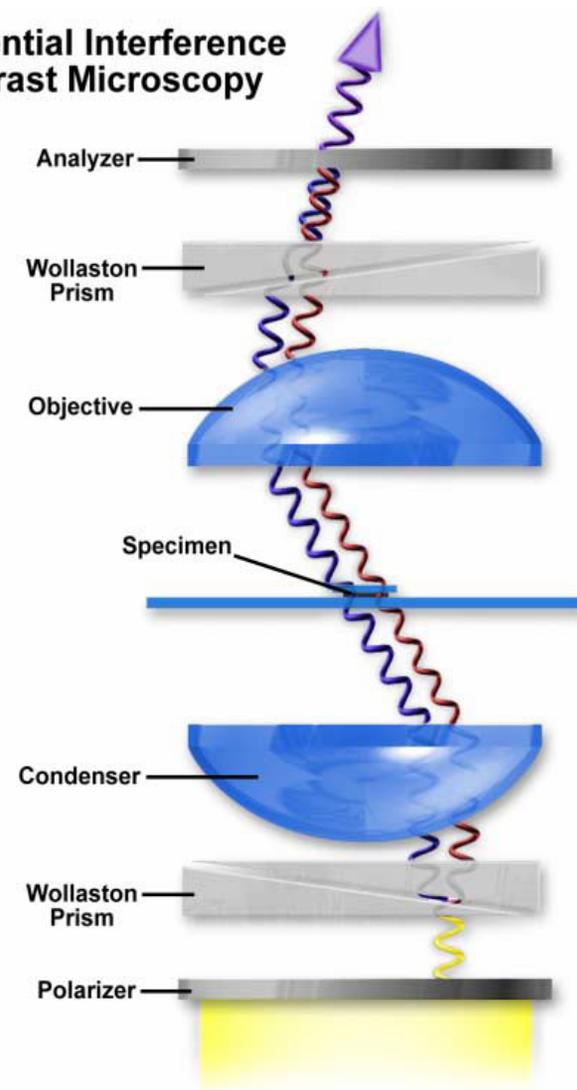
Méthode pour détecter des gradients de phase pour les convertir en variations d'intensité

Interference Planes in Wollaston and Nomarski Prisms

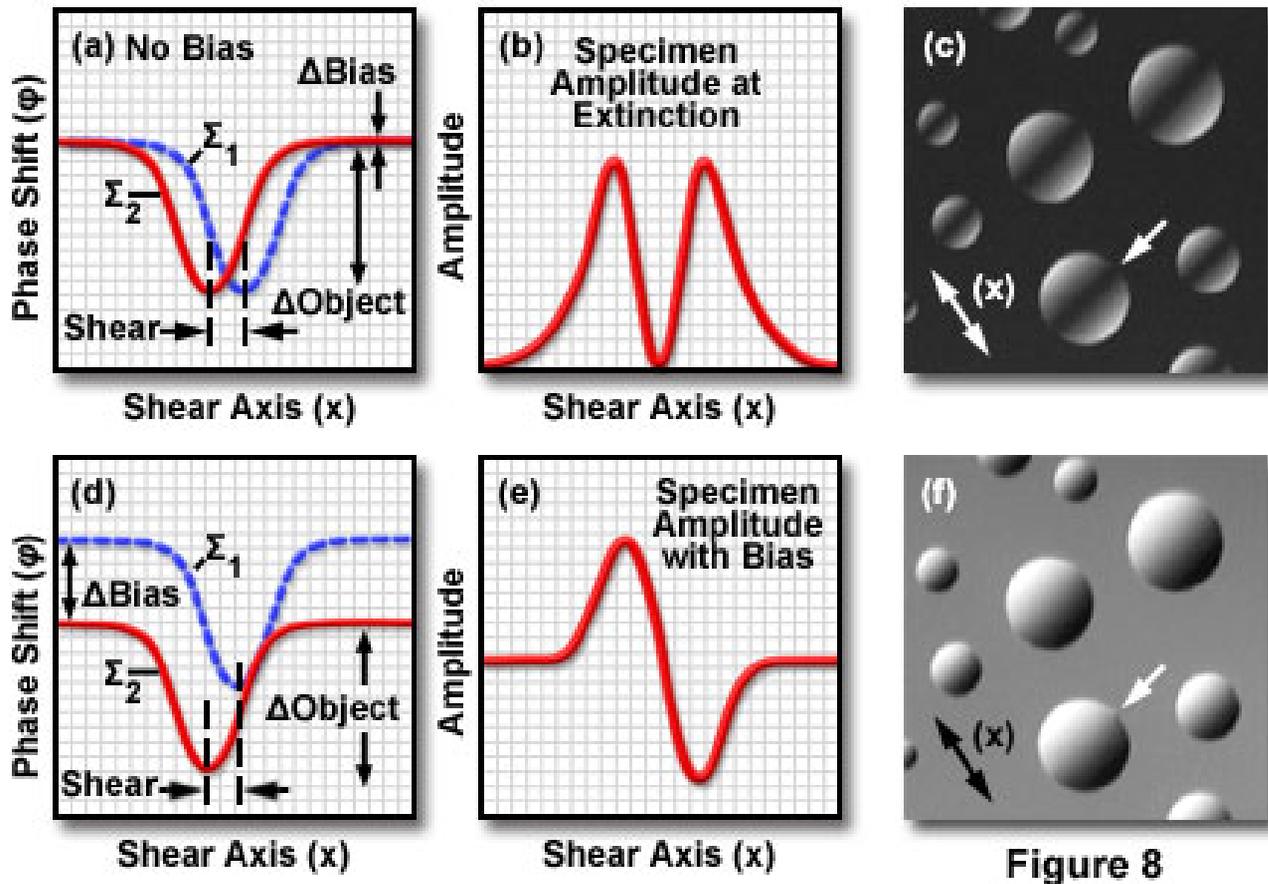


Déplacement entre les deux faisceaux inférieur inférieur au disque d'Airy

Differential Interference Contrast Microscopy



DIC Image Plane Wavefront Interference



DIC contrast

3) recombine

2) add an additional phase shift

1) split into perpendicular components

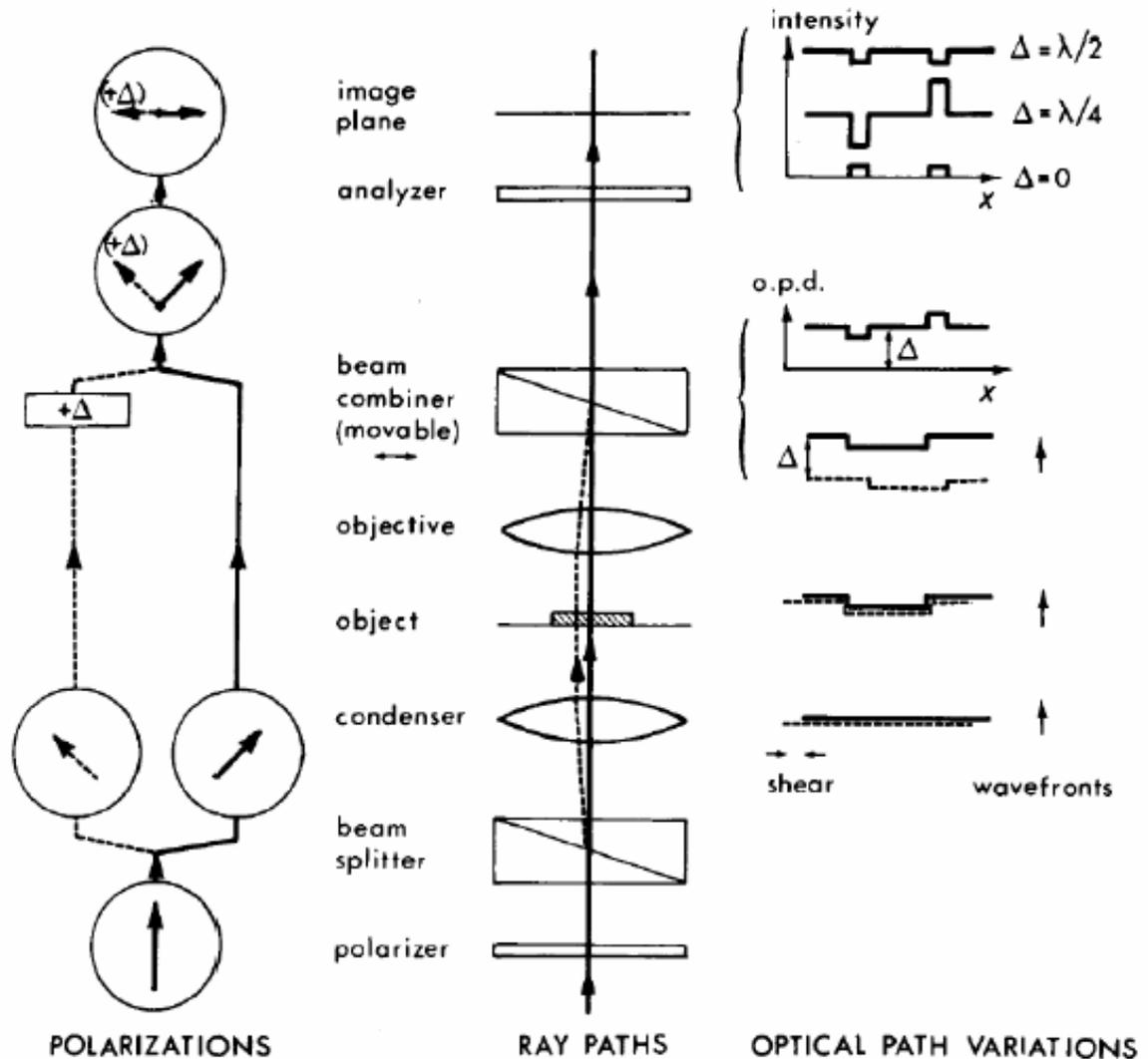
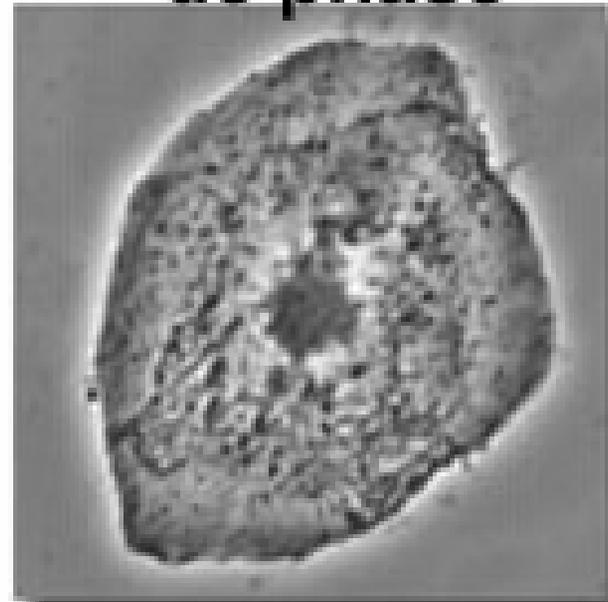


FIGURE 27 The optical system for differential interference contrast (DIC, see text).⁶⁵

DIC



**Contraste
de phase**



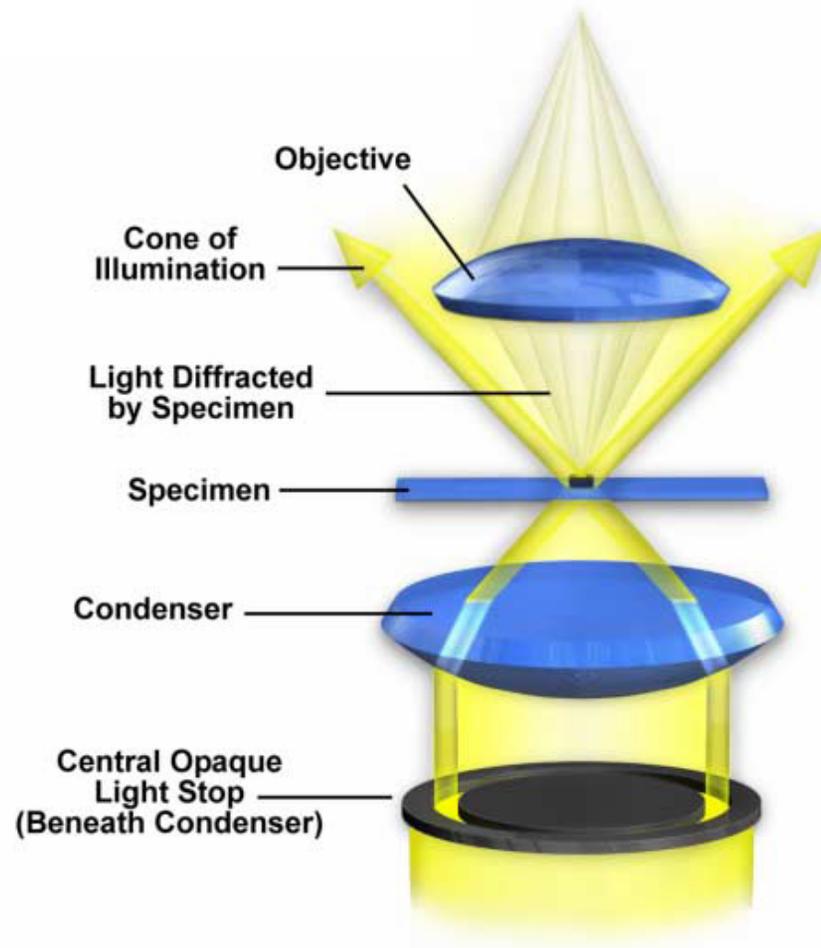
Microscopie en fond noir

Les rayons provenant du condenseur ne pénètrent pas dans l'objectif.
N'apparaissent que les zones qui diffusent la lumière :

- contours des objets opaques
- variations brusques d'indice optique

Utilisée surtout pour l'observation d'objets dont les structures présentent d'importantes variations d'indice et qui, faute de contraste, présentent ne sont pas visibles en fond clair.

Élément d'optique : condenseur avec diaphragme annulaire : cône de lumière.



Microscopie en fond noir

Radiolarian in Brightfield and Darkfield Illumination

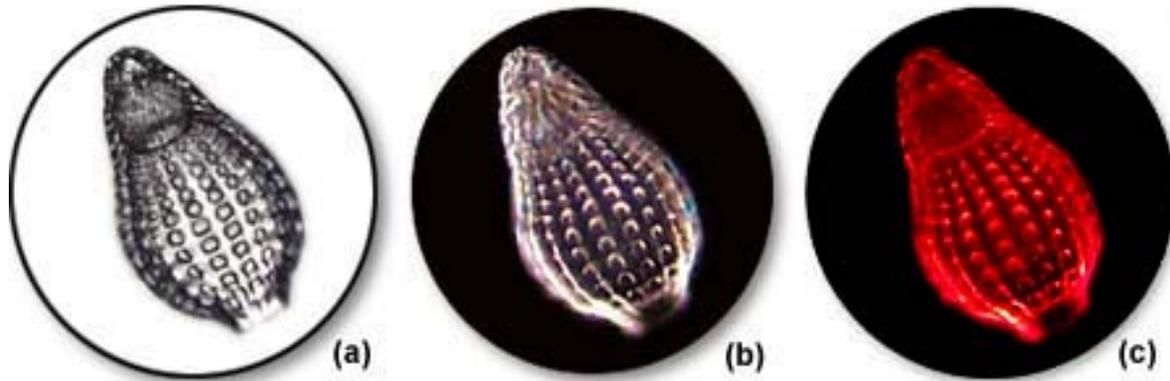


Figure 2

Stained and Unstained Specimens in Darkfield Illumination

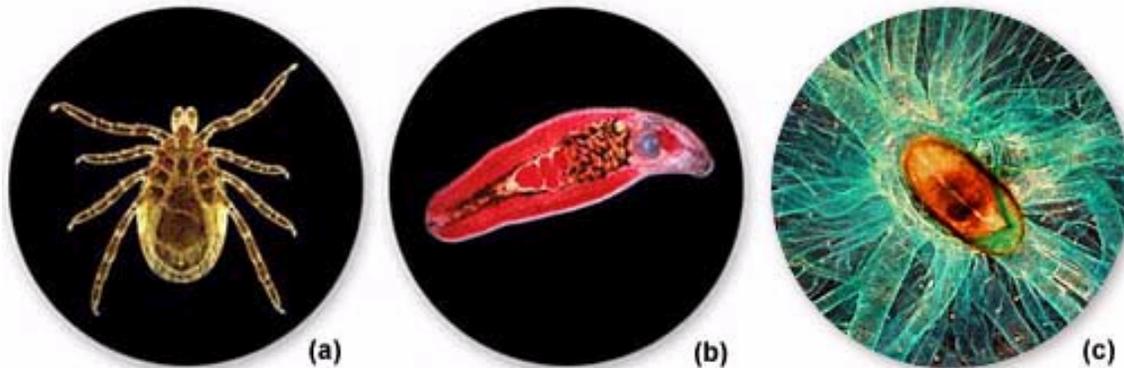


Figure 7



- Objets plats à structures régulières (diatomées, radiolaires)
- Formations linéaires (flagelles, fibres, bactéries)
- Objets punctiformes ou linéaires dont la tailles est $<$ à la limite de séparation détrôné par contraste de phase (sauf quelques cas)

V. Éclairage de Köhler

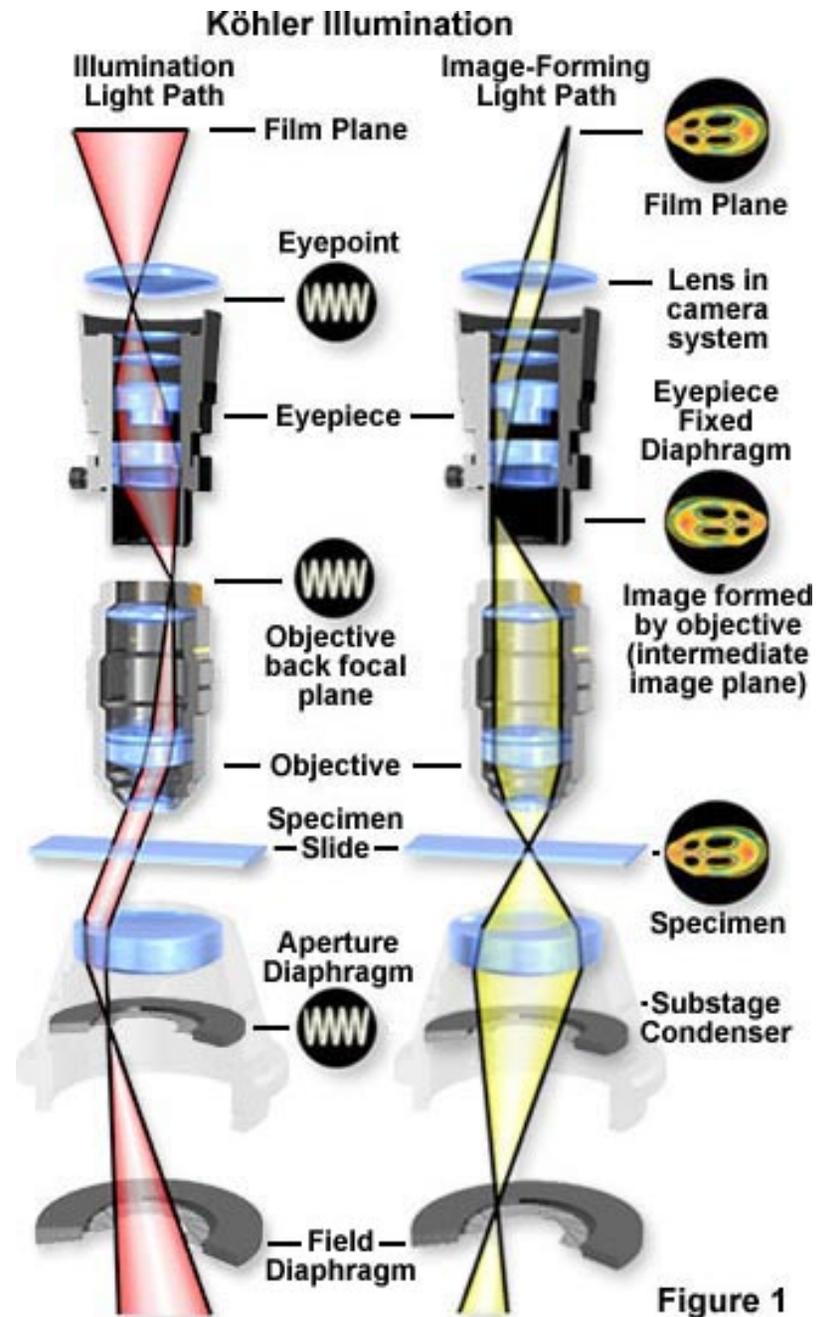
Plans conjugués dans le chemin d'éclairage:

- Filament de la lampe
- Diaphragme d'ouverture du condenseur*
- Plan focal arrière de l'objectif*
- plan du point de l'œil

Plans conjugués dans le chemin de la formation de l'image:

- Diaphragme de champ
- Plan objet (au foyer)
- Plan image intermédiaire
- Rétine de l'œil, ou CCD

*Plan où des éléments optiques sont insérés dans les divers techniques de microscopie



Condenseur :

L'éclairage de Köhler permet d'obtenir des images de très bonne qualité

Éclairage optimisé: - illumination suffisamment intense de l'objet
- uniforme sur le champ de vision

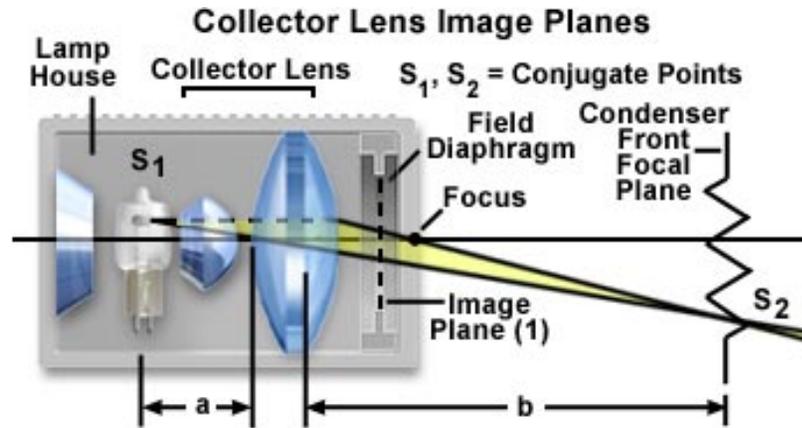


Figure 6

Image Planes of the Condenser Lens

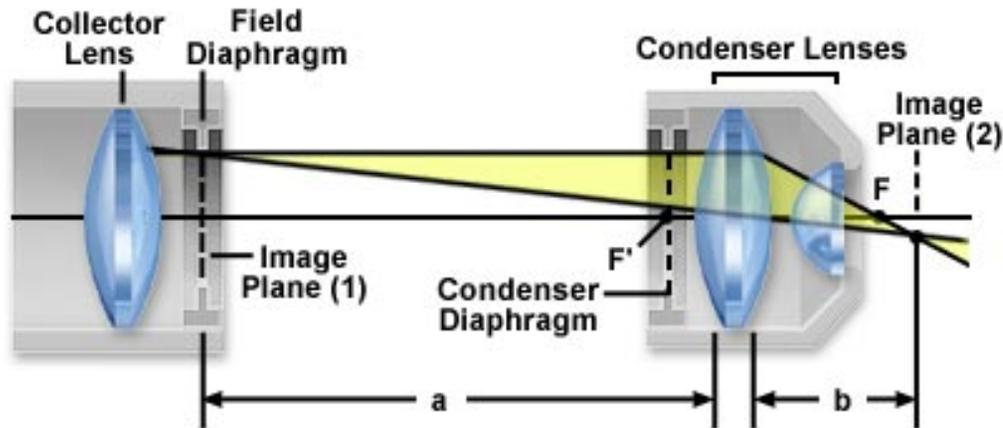
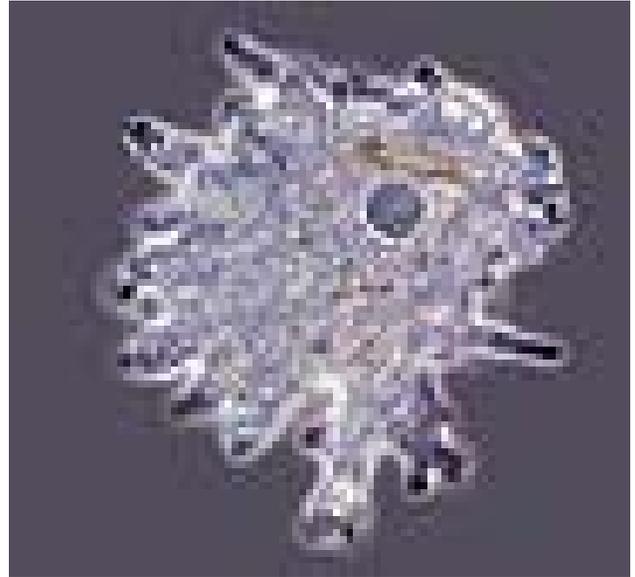
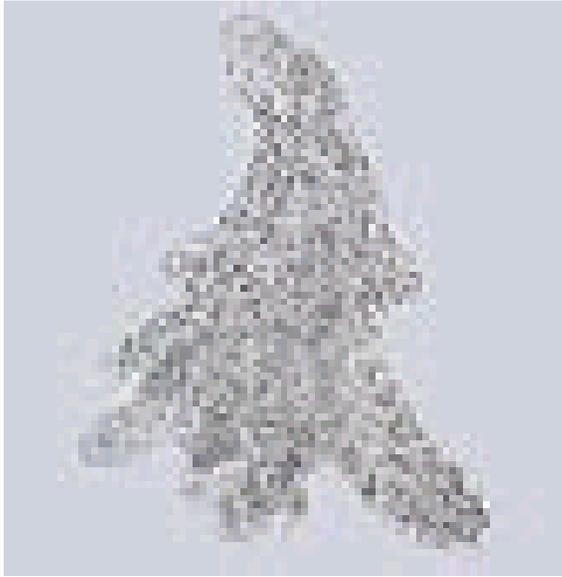


Figure 7

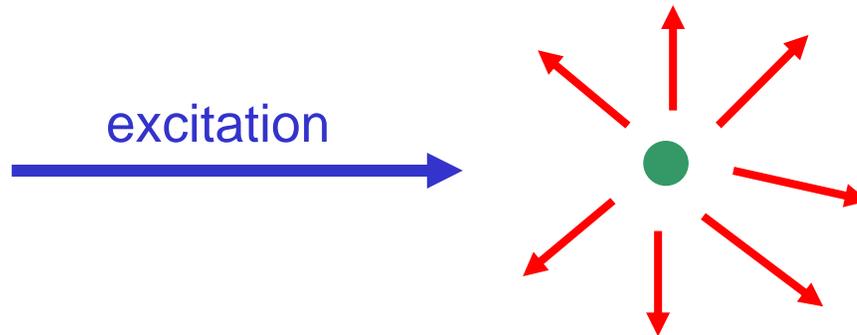
Une amibe vue sous différentes techniques (à vous de reconnaître)



Microscopie de fluorescence

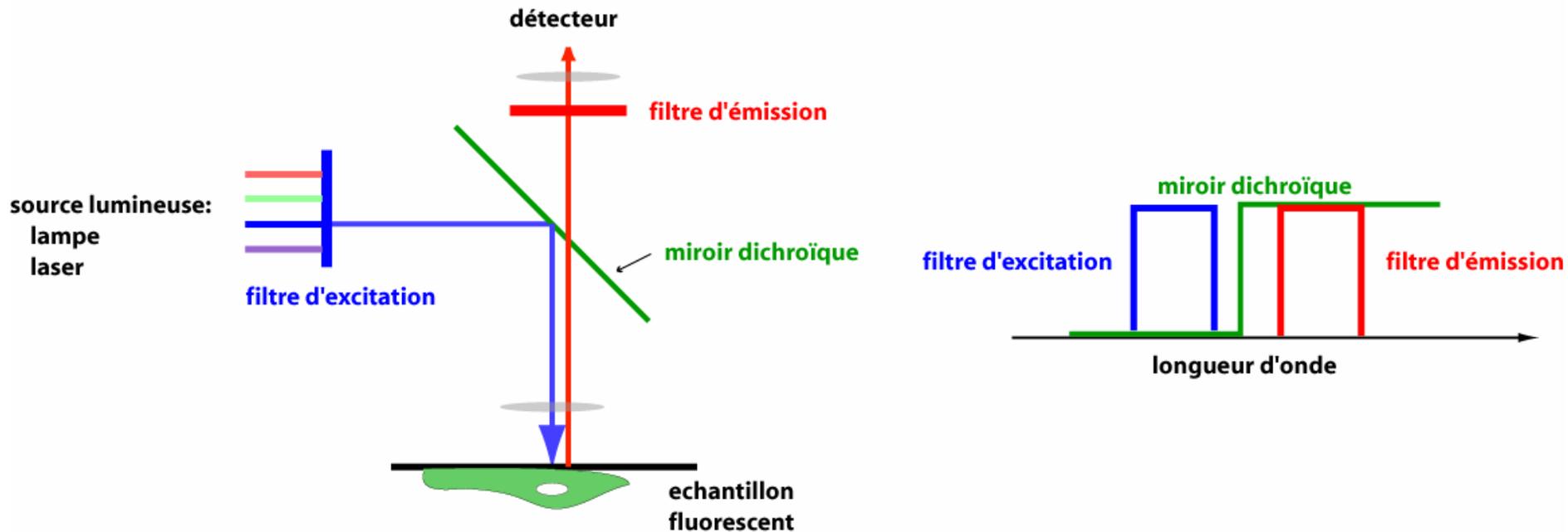
Fluorescence

Lorsqu'ils sont dans un niveau excité, certains systèmes (atomes, molécules, cristaux,...) peuvent se désexciter en émettant des photons.



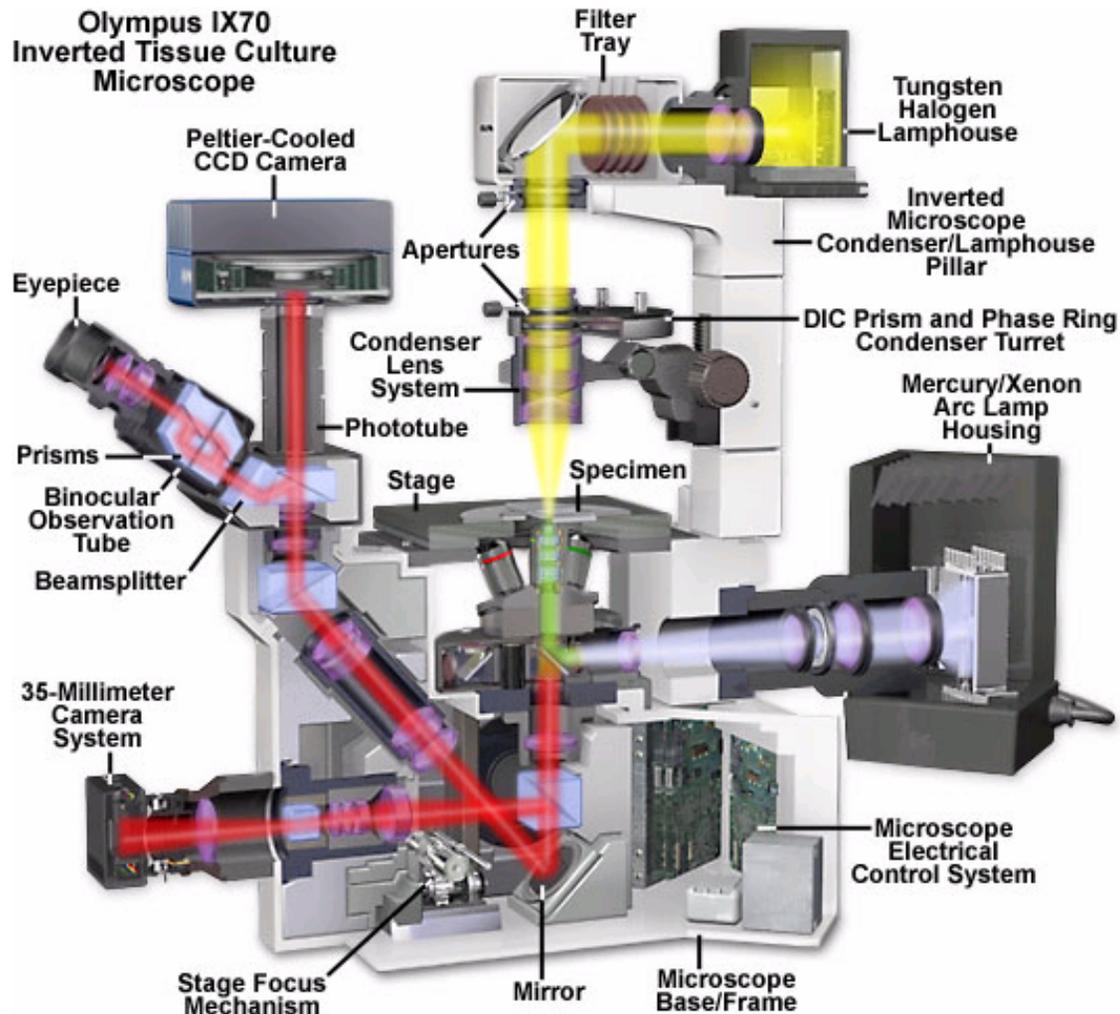
La longueur d'onde d'émission est (souvent) plus grande que celle d'absorption et il est possible de sélectionner spectralement la lumière émise → **microscopie de fluorescence**

Microscopie de fluorescence



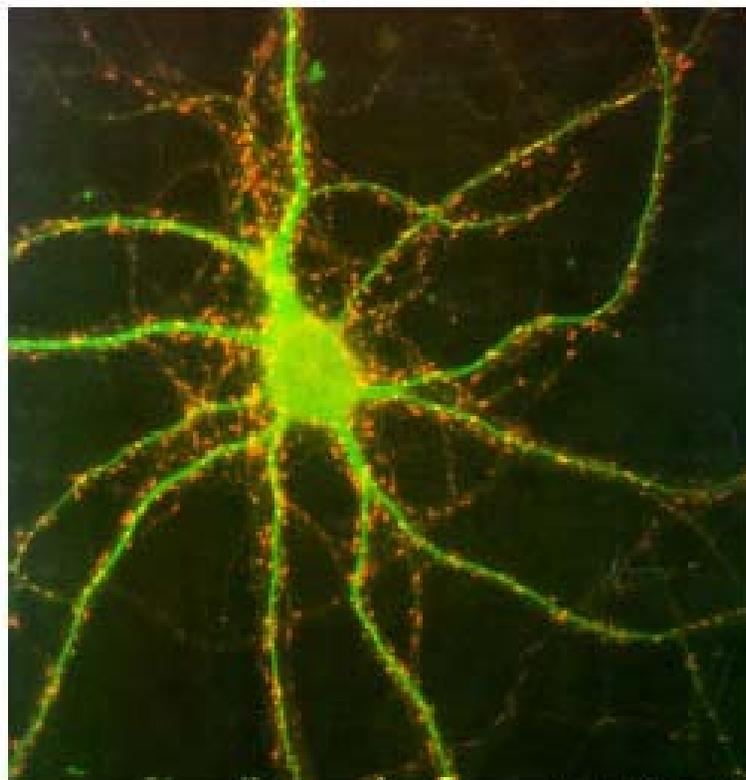
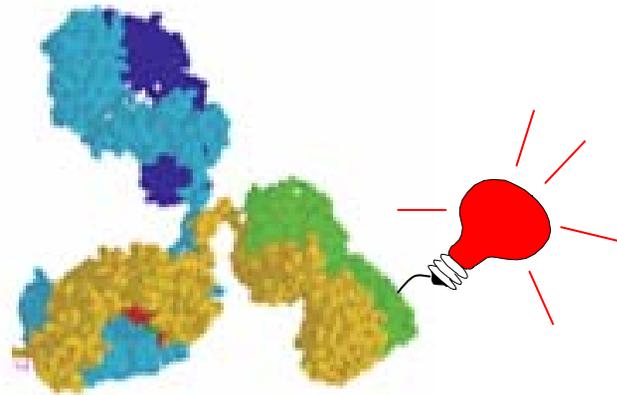
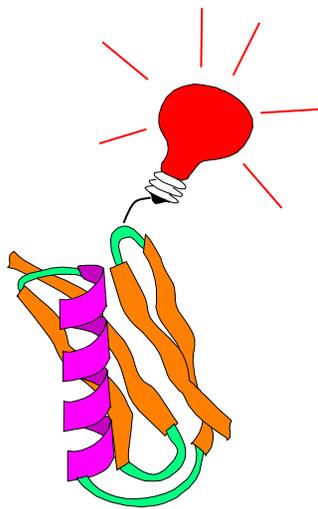
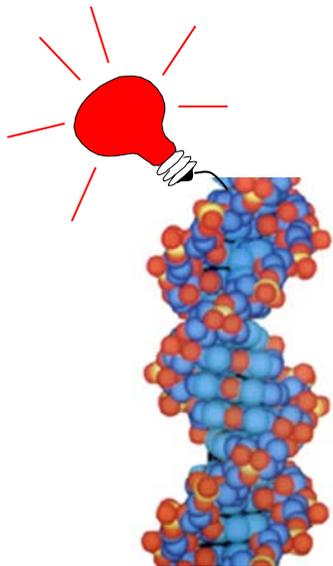
Il s'agit donc d'une détection sur fond noir

Systeme commercial



Voir des biomolécules en fluorescence

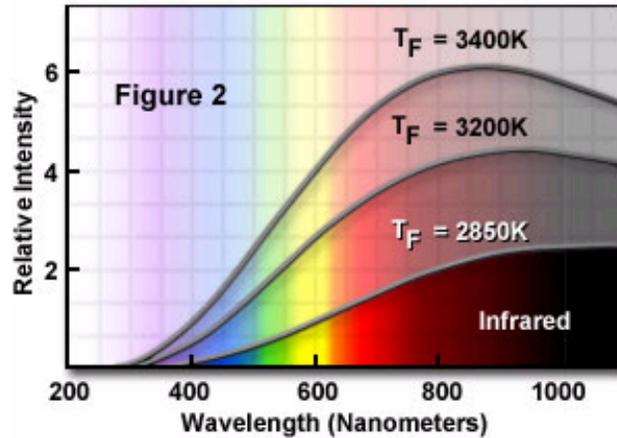
- En général, les molécules biologiques (protéines, acides ne sont pas fluorescentes dans le visible (quelques exceptions: flavines, NADH, protéines fluorescentes,...). Certains acides aminés ont néanmoins des propriétés de fluorescence dans l'UV (tryptophane).
- On attache spécifiquement des marqueurs fluorescents :
 - couplage covalent (liaison chimique)
 - marquage d'affinité: on utilise une molécule fluorescente qui vient s'attacher spécifiquement (anticorps, toxines,...)
 - clonage d'une protéine fluorescente



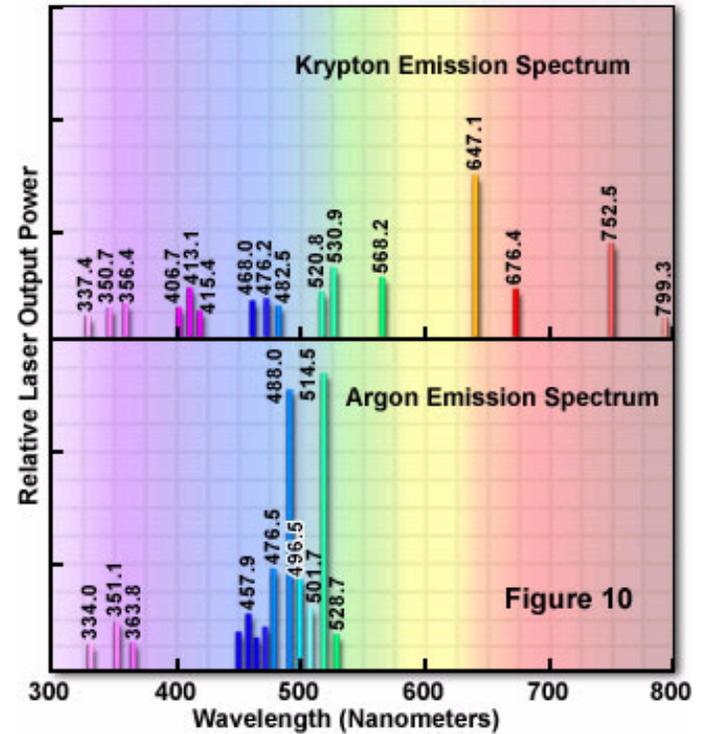
Sources lumineuses

Sources lumineuses pour la microscopie de fluorescence

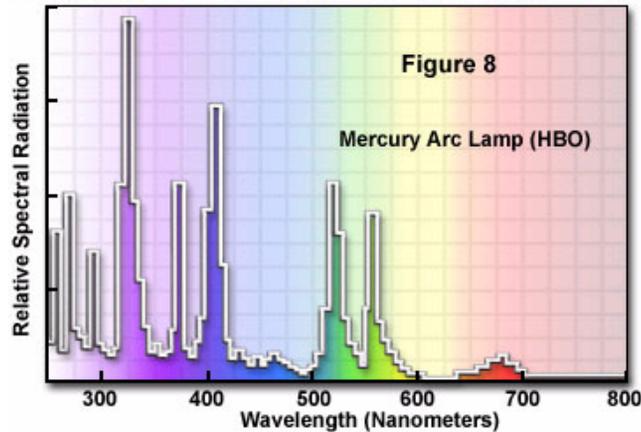
Tungsten Lamp Emission Spectrum



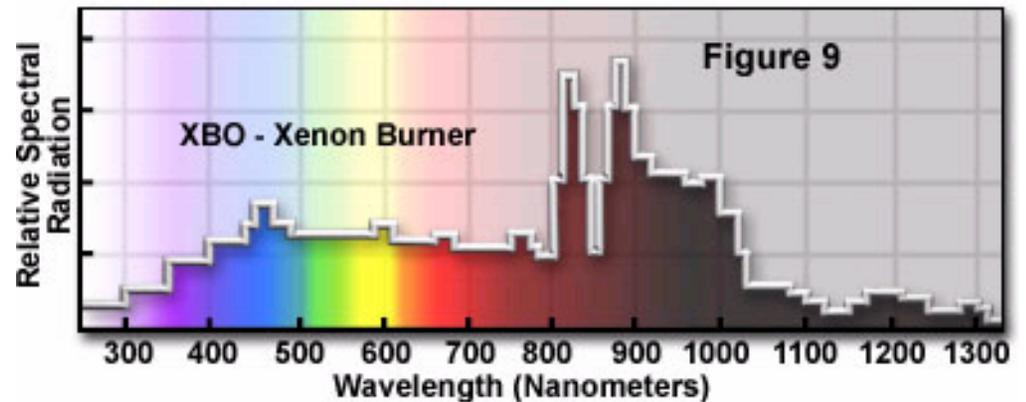
Laser Illumination Source Emission Spectra



Mercury Arc Lamp UV and Visible Emission Spectrum



Xenon Arc Lamp Emission Spectrum

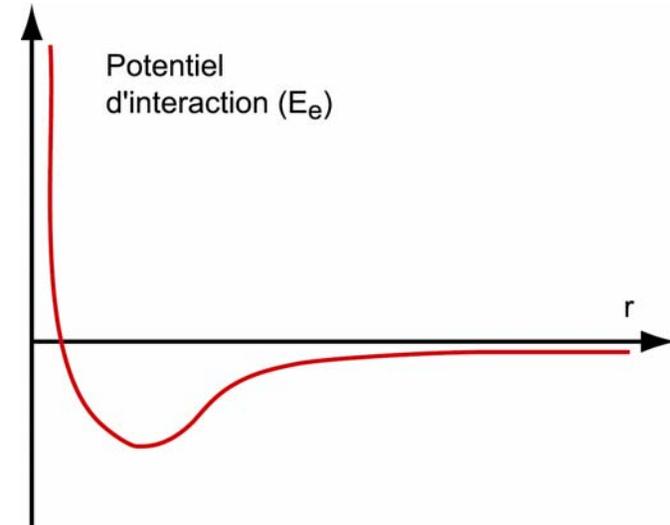


**Marqueurs fluorescents:
molécules, protéines, nanocristaux**

Spectres moléculaires : quantification des énergies

A. Formation d'une molécule diatomique

Molécule stable : il existe un minimum du potentiel d'interaction entre deux atomes



B. Niveaux électroniques, vibration et rotation

Énergie totale $E = E_e + E_v + E_r$, ces trois énergies sont quantifiées.

1) Niveaux électroniques:

Niveaux électroniques : niveau fondamental, niveaux excités, transitions entre niveaux (comme dans l'atome d'hydrogène).

Transitions possibles dans le **visible ou l'UV** (1 à 10 eV) entre deux niveaux

2) Énergie de vibration :

Fond du puits de potentiel : approximation harmonique

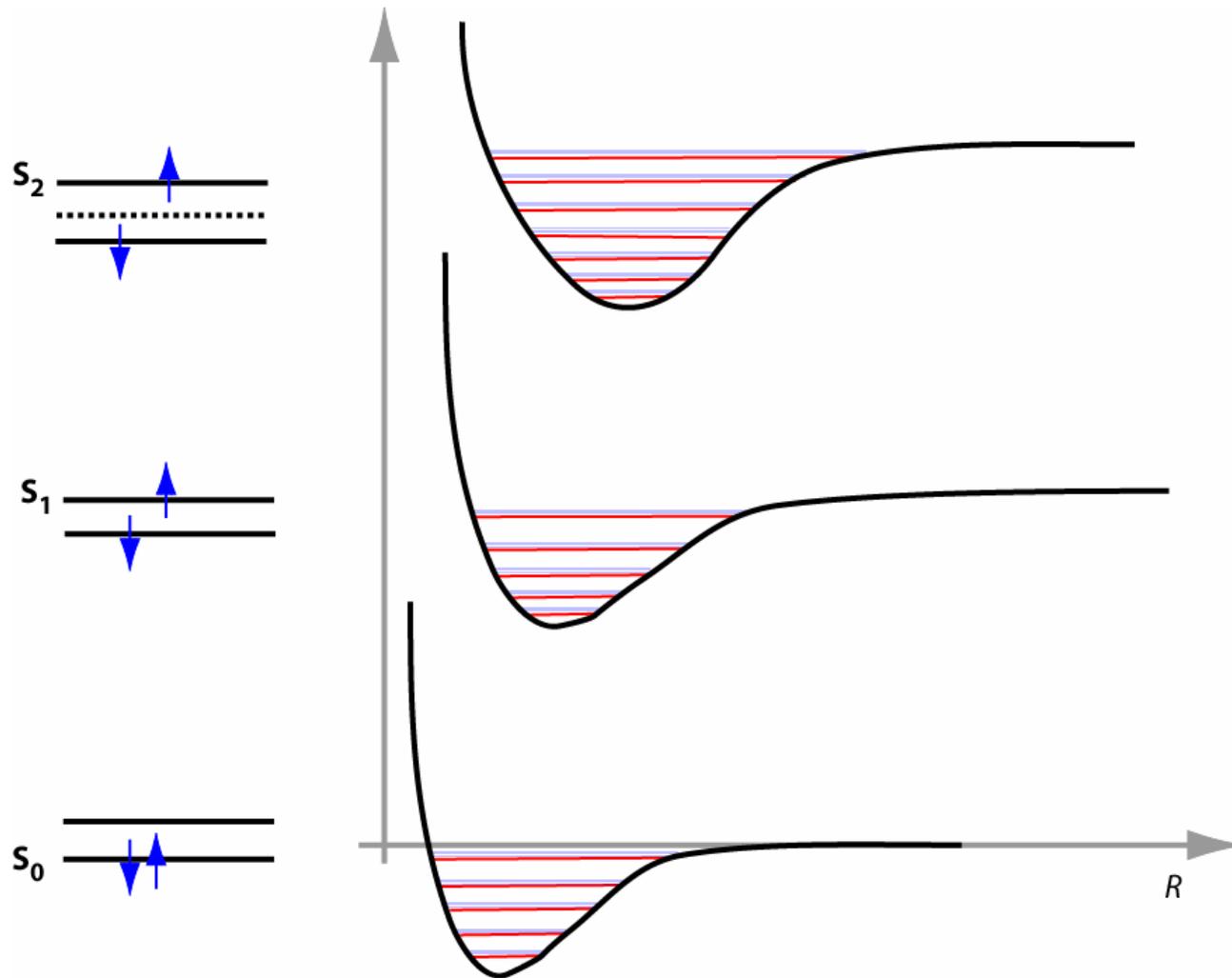
$$E_n = h\nu(n+1/2) \text{ avec } \nu^2 = k/m$$

Transitions possibles dans **l'IR** (0.1 eV) entre deux niveaux.

3) Énergie de rotation

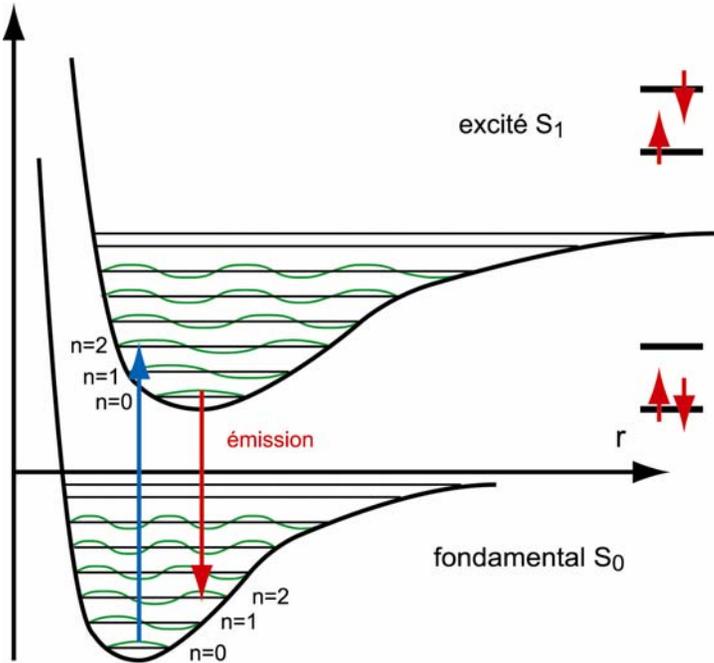
Spectre de rotation $E_r = J(J+1) \frac{h^2}{8\pi^2 I}$: moment d'inertie de la molécule

Transitions possibles dans le **domaine μ -ondes** (0.001 eV) entre deux niveaux



$kT = 0,025 \text{ eV}$: niveaux rotationnels peuplés, mais **seul le niveau fondamental électronique et vibrationnel est peuplé.**

Transitions optiques dans les molécules



Opérateur dipolaire: $\hat{V} = -\vec{d} \cdot \vec{E}$

$$\begin{aligned} \langle f | \hat{V} | i \rangle &= \langle \mathbf{n}_f \otimes \mathbf{e}_f | \hat{V} | \mathbf{n}_i \otimes \mathbf{e}_i \rangle \\ &= \langle \mathbf{n}_f | \mathbf{n}_i \rangle \langle \mathbf{e}_f | \hat{V} | \mathbf{e}_i \rangle \end{aligned}$$

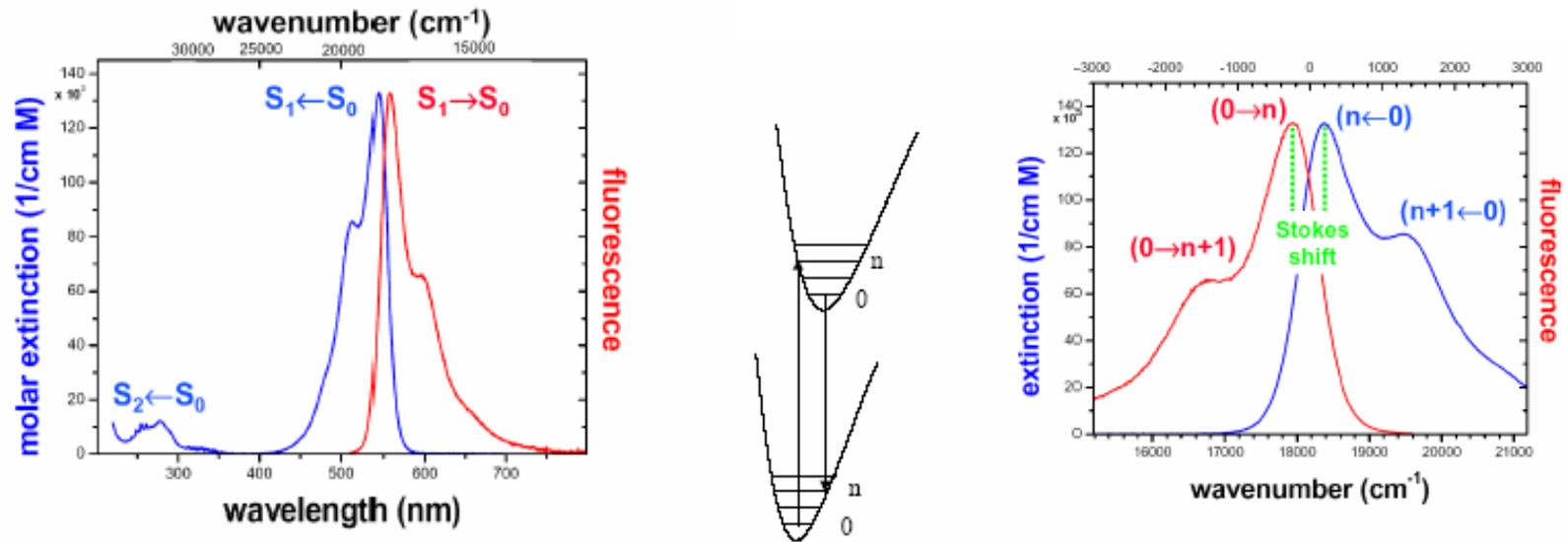
Recouvrement des
fonction d'ondes des
noyaux

Déterminé par la
symétrie des états
électroniques

Facteur de Franck-Condon : $\left| \langle \mathbf{n}_f | \mathbf{n}_i \rangle \right|^2$

Spectres d'absorption et d'émission

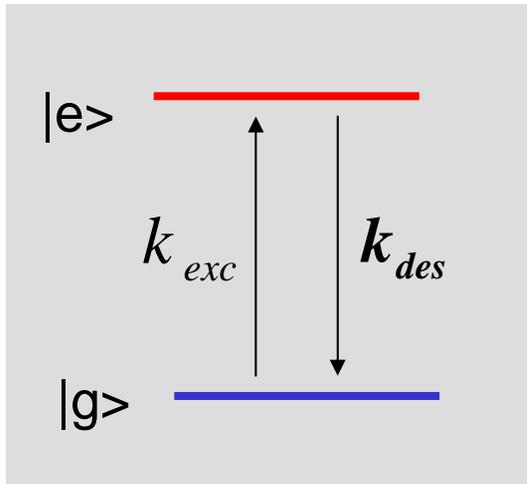
absorption & emission of Cy3



Absorption et émission sont (à peu près) symétriques

Il existe un décalage entre les pic d'absorption et d'émission
(décalage de Stokes)

Description d'un système fluorescent à 2 niveaux



La molécule peut se désexciter de deux manières différentes : en émettant un photon ou non radiativement.

$$k_{des} = k_r + k_{nr}$$

$$k_r = \frac{1}{T_{fluo}}$$

$$k_{exc} = \sigma \frac{\lambda}{hc} I$$

T_{fluo} est la durée de vie **radiative**

σ est la section efficace d'absorption

ε est le coefficient d'extinction $\sigma(\text{cm}^2) = \frac{2303\varepsilon}{N_A}$

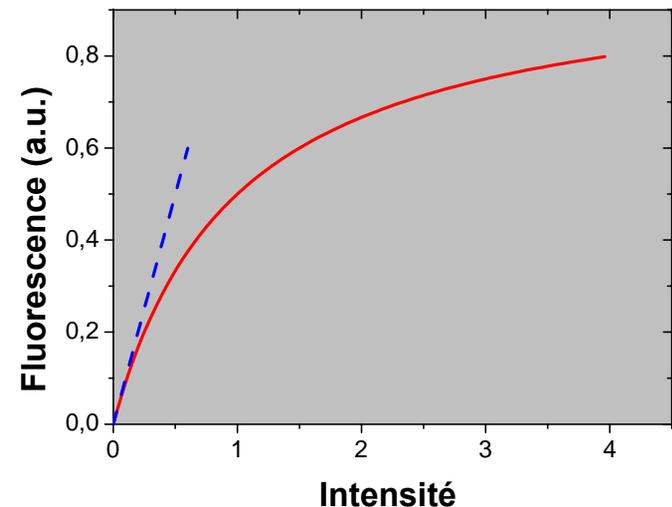
Taux de fluorescence

$$\frac{dP_e}{dt} = -k_{des} P_e + k_{exc} P_g$$
$$P_e + P_g = 1$$

Solution à l'état stationnaire:

$$\Gamma = k_r P_e = \frac{1}{T_{fluo}} \frac{I/I_s}{1 + I/I_s}$$

$$I_s = (k_{nr} + k_r) \frac{hc}{\sigma \lambda} \quad (\text{intensité de saturation})$$



Cas limites

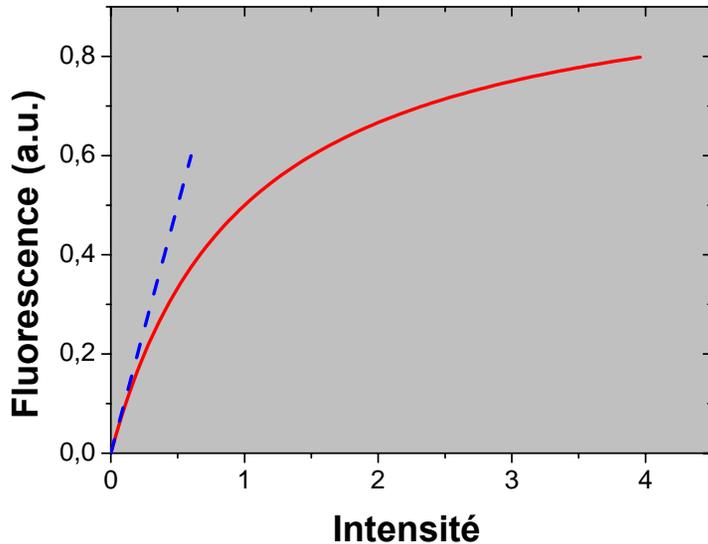
A faible intensité, régime linéaire :

$$\text{Pour } I \ll I_s, \quad \Gamma = Q \frac{\sigma \lambda}{hc} I$$

$$Q = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

**Efficacité quantique
radiative**

probabilité qu'un photon absorbé soit réémis



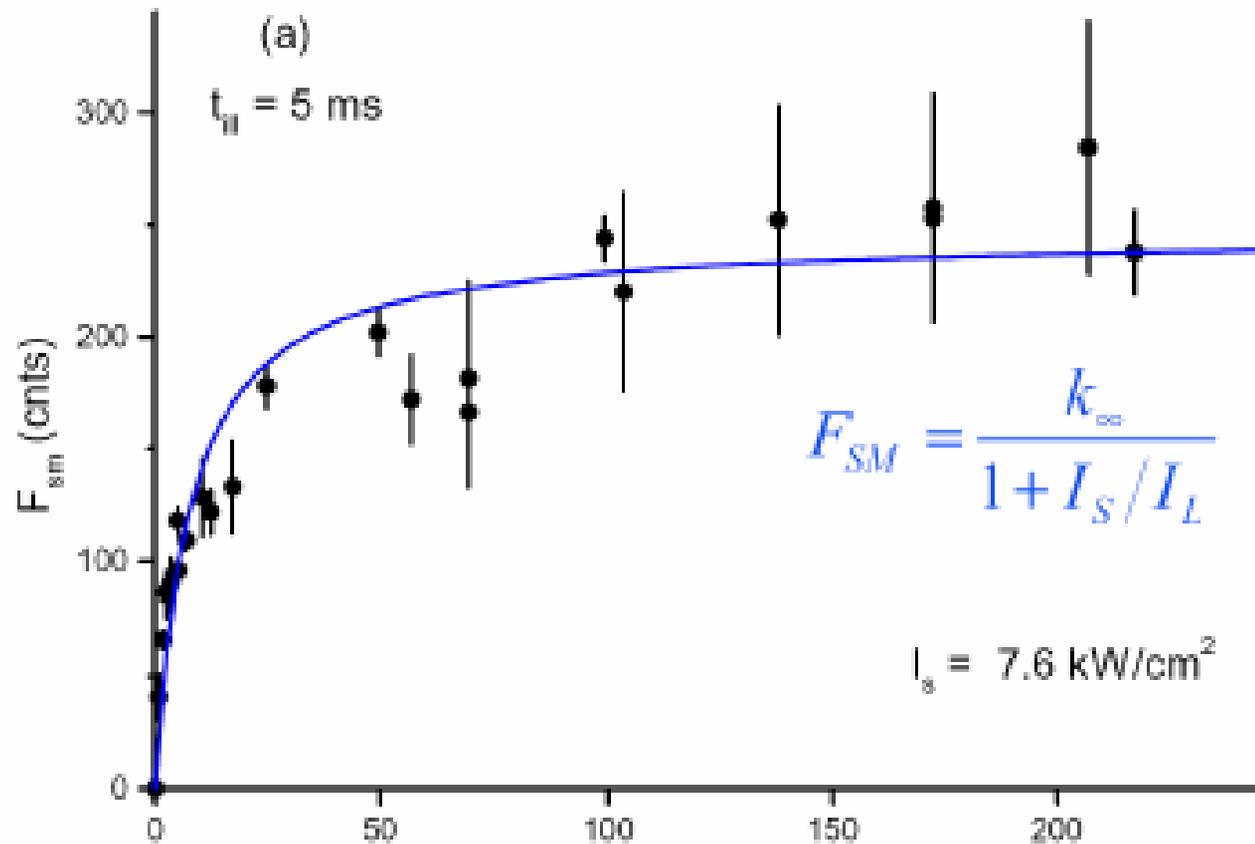
A forte intensité, régime saturée :

$$\text{Pour } I \gg I_s, \quad \Gamma = k_{des} = \frac{1}{T_{fluo}}$$

Pour gagner en signal sur bruit, on essaie toujours d'avoir $I \ll I_s$

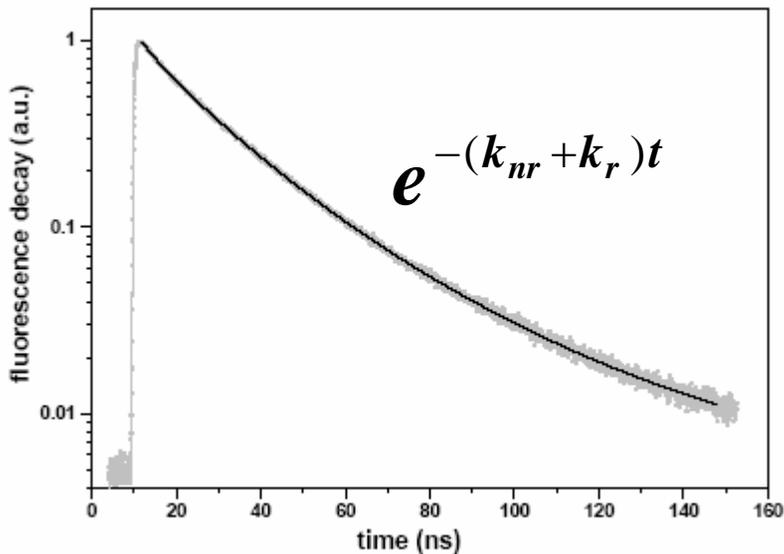
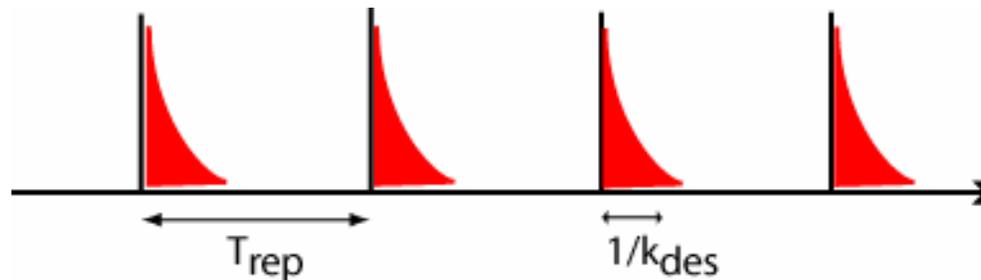
Saturation

[J Phys Chem, 99 (1995) 17662]



Etude résolue en temps

Si on excite avec un laser **pulsé** (à la fréquence $1/T_{\text{rep}}$):



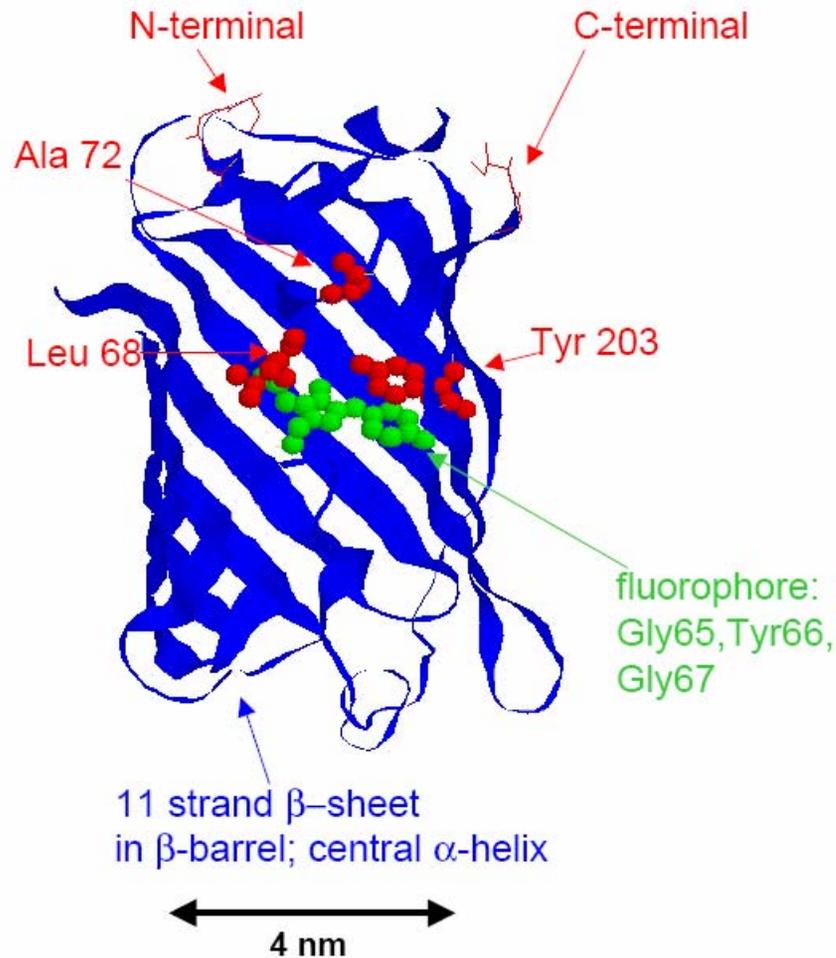
Si on connaît :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

$$Q = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

On peut déterminer k_r et k_{nr}

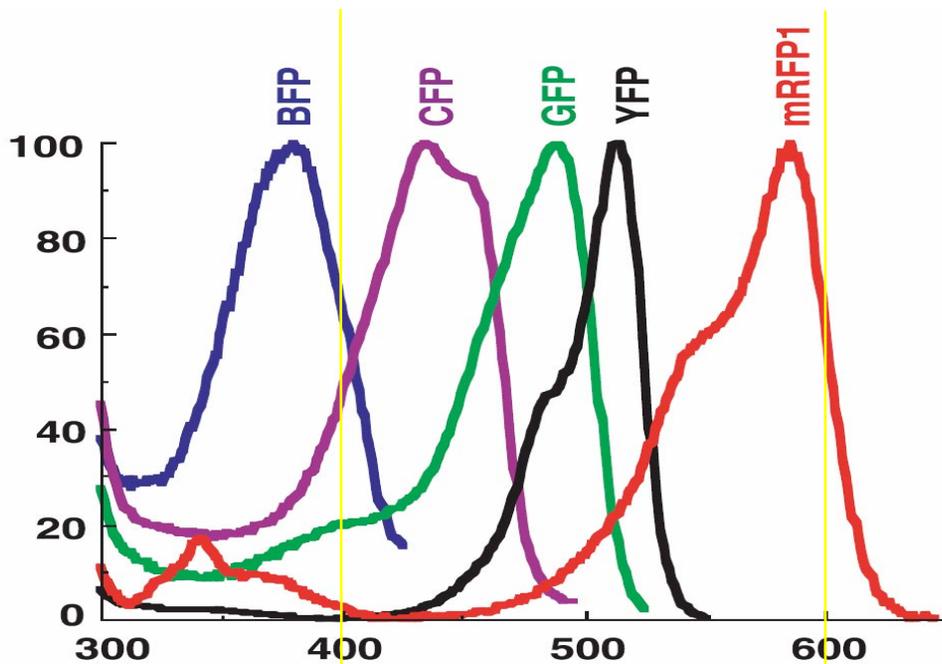
structure and photophysics of eYFP



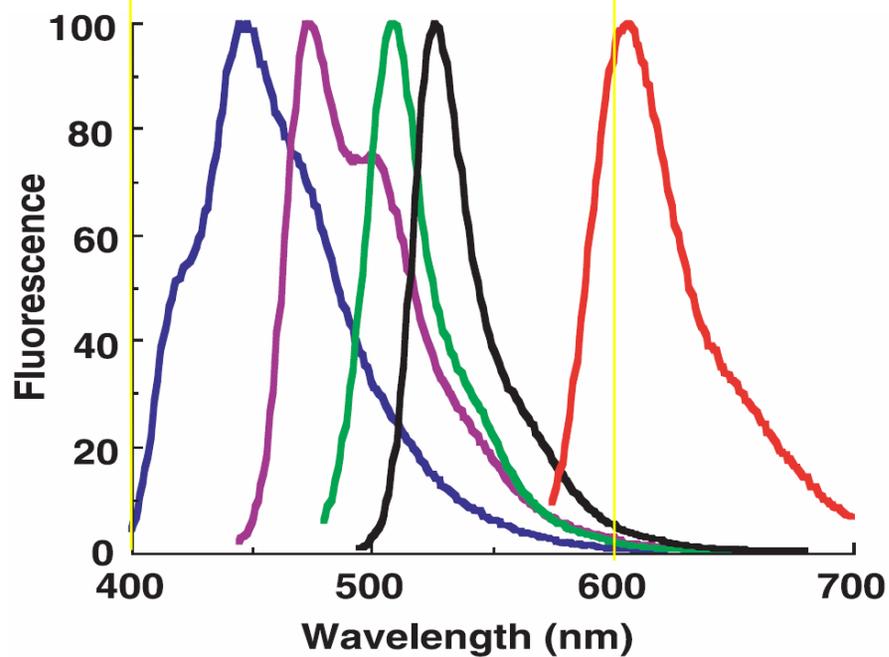
- 238 amino acid residues
- $\lambda_{\text{abs,max}} = 514 \text{ nm}$
- $\lambda_{\text{em,max}} = 527 \text{ nm}$
- $\epsilon = 84,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- $\Phi_{\text{F}} = 0.63$
- $\tau_{\text{F}} = 3.7 \text{ ns}$
- $\tau_{\text{T}} = 1 \mu\text{s}$
- $k_{\text{ISC}} = 3 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$

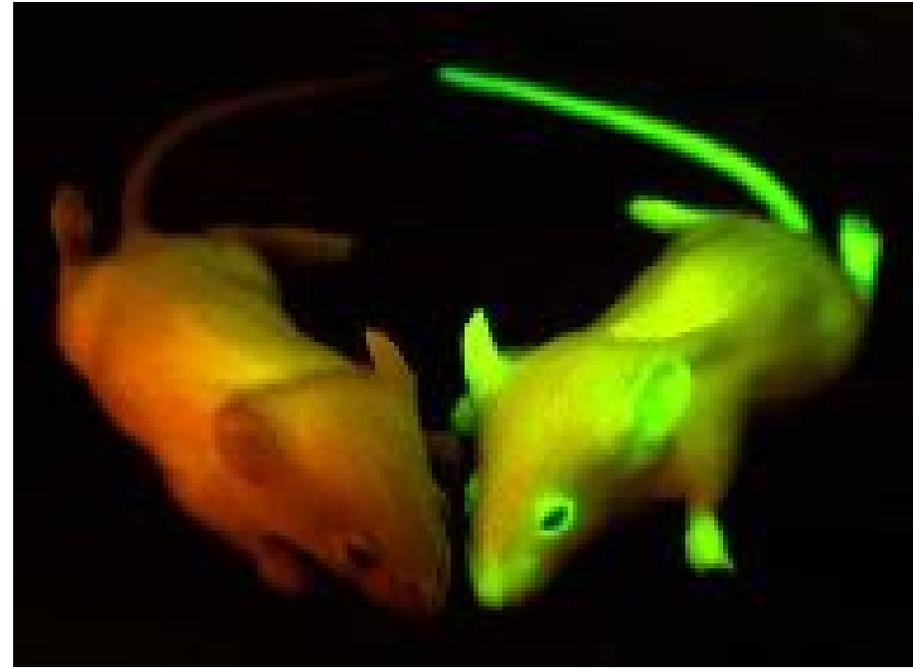


Absorption

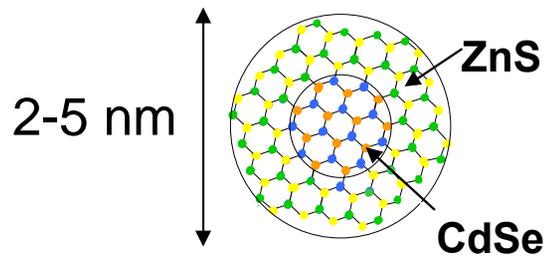


Fluorescence

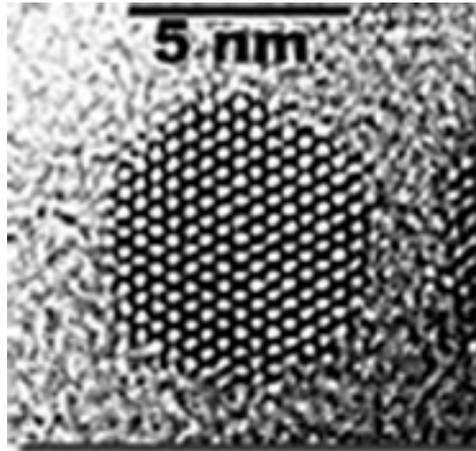




Nanocristaux semiconducteurs



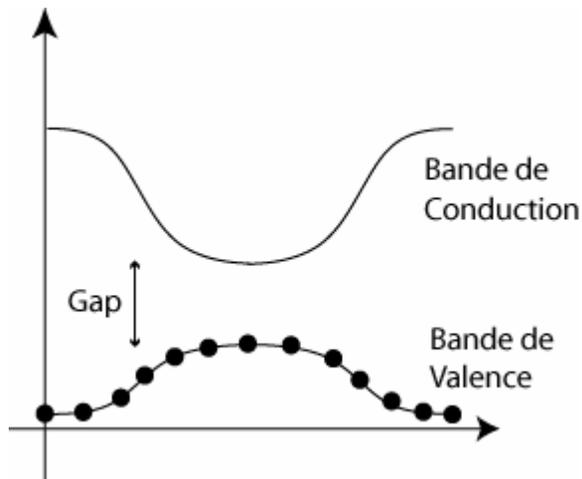
Nanoparticules composées de 100 à 100000 atomes of CdSe recouverts par une coquille de ZnS



Du semiconducteur massif à la boîte quantique

Semiconducteur : matériau cristallin isolant dont la bande interdite (« le gap ») est relativement petite.

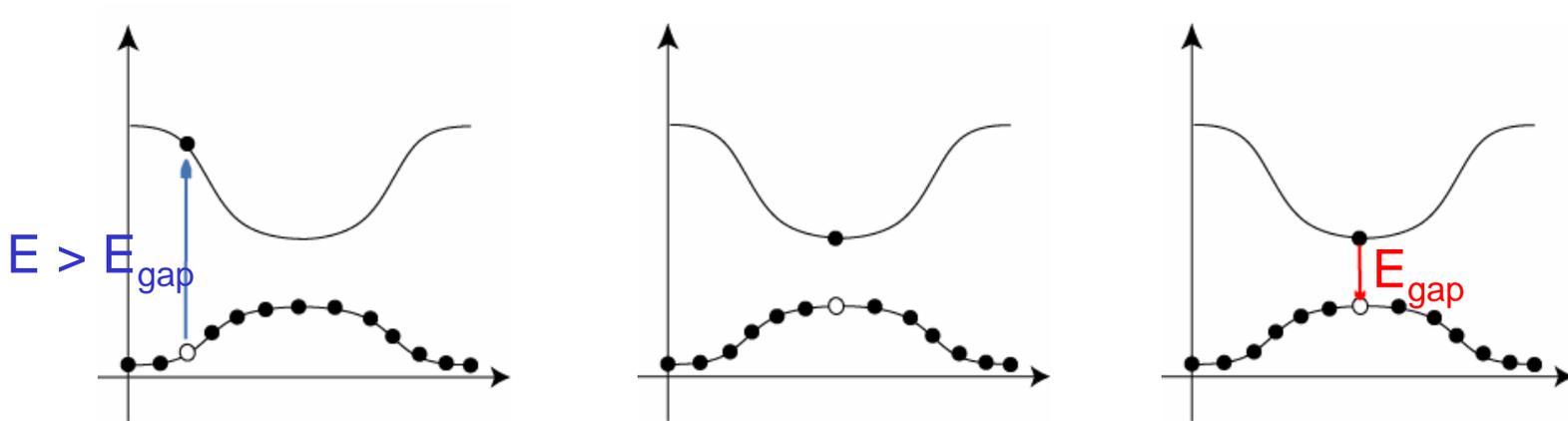
- Les électrons sont soumis au potentiel périodique du réseau cristallin
- Il existe une structure de bande des niveaux d'énergie



Dans un semiconducteur, la bande de valence est remplie, la bande de conduction est vide et E_{gap} n'est pas très grand.

Propriétés optiques de fluorescence

Que se passe t-il quand on excite le matériau avec de la lumière ?



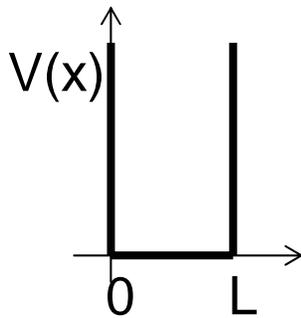
Des photons de fluorescence sont émis dont l'énergie correspond à E_{gap}

Que se passe t-il lorsqu'on réduit la taille du matériau ?

Des boites quantiques de quelques nanomètres

Quels sont les niveaux d'énergie des électrons ?

Une particule dans une boite à 1 D :



Fonctions propres:

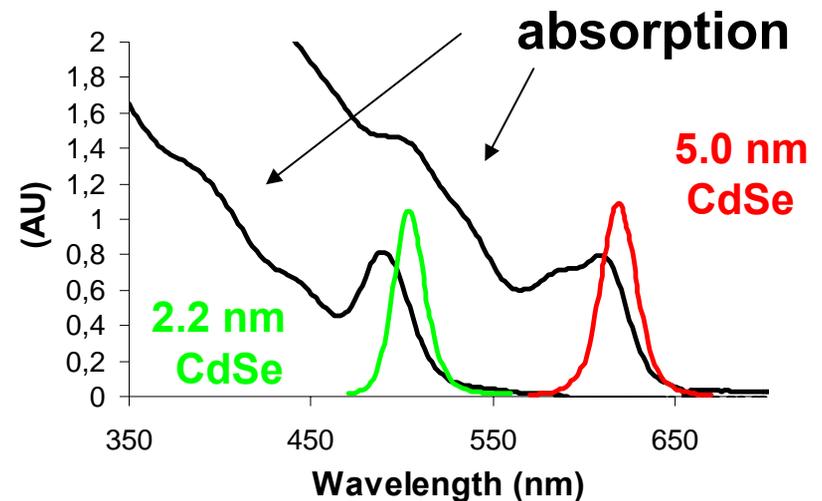
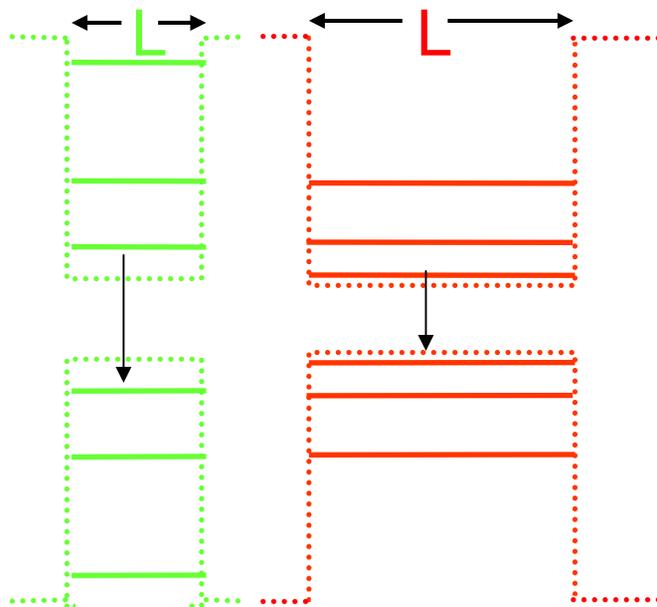
$$\psi_n(\mathbf{x}) = \sqrt{\frac{2}{L}} \sin\left(\frac{n\pi\mathbf{x}}{L}\right)$$

Energies propres:

$$E_n = \frac{\pi^2 \hbar^2 n^2}{2m L^2}$$

(en fait la boite est tridimensionnelle...)

Emission et absorption ajustable avec la taille des nanoparticules

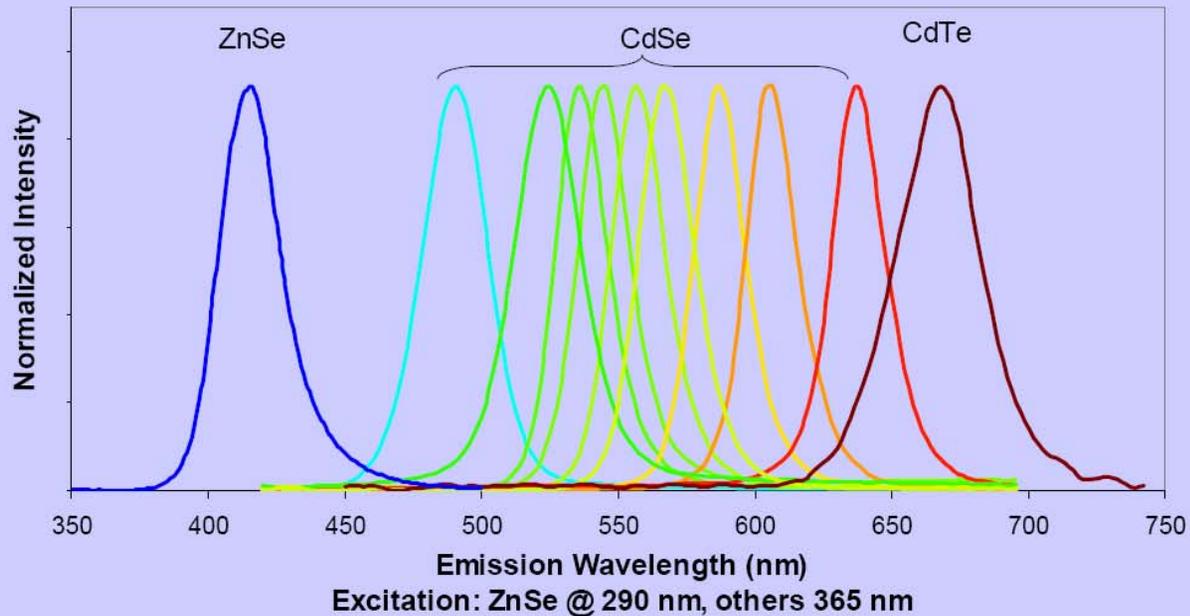


Plus les particules sont petites, plus l'émission est décalée vers les courtes longueurs d'onde (grandes énergies)

Semiconductor Quantum Dots



Many sharp, distinct emission colors

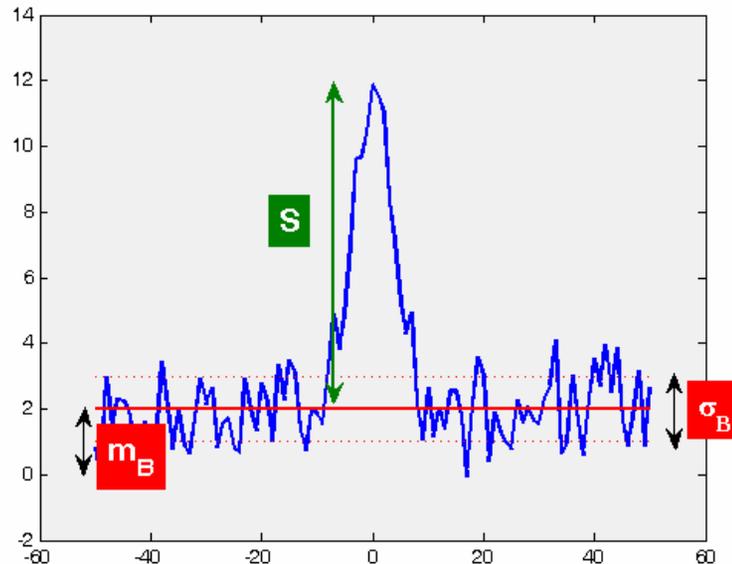


- Extremely broad absorption spectra allow all colors to be excited with a single excitation wavelength
- Water-soluble nanocrystal quantum yields are as high as 90%
- Narrow, symmetric emission spectra minimize overlap of adjacent colors

Bruit de photon et rapport signal sur bruit

Problème de détection: quel est le rapport signal sur bruit ?

- Signal **S** de fluorescence
- Bruit **B** de variance de moyenne m_B et de variance σ_B :



$$\frac{S}{\sigma_B} \gg 1$$

Sources de bruit

- **Fluctuations intrinsèques (bruit de photon / shot noise)**

- **Signal optique parasite (autofluorescence, lumière diffusée,...)**

proportionnel à l'intensité lumineuse /

- **Bruit électronique (courant d'obscurité, bruit de lecture,...)**

indépendant de l'intensité lumineuse

$$S_{total} = S_{photon} + S_{par} + S_{elec}$$

les processus sont indépendants :

$$\sigma_{total}^2 = \sigma_{photon}^2 + \sigma_{par}^2 + \sigma_{elec}^2$$

Bruit de photon

On considère un flux où des particules (des photons) arrivent avec un taux k sur un détecteur (une photodiode)

Quel est la distribution des temps entre 2 événements ? Quelle est la probabilité Π qu'on ne détecte rien entre 0 et t ?

$$\Pi(t) = e^{-kt}$$

Quelle est la probabilité de détecter N photons durant le temps t ?

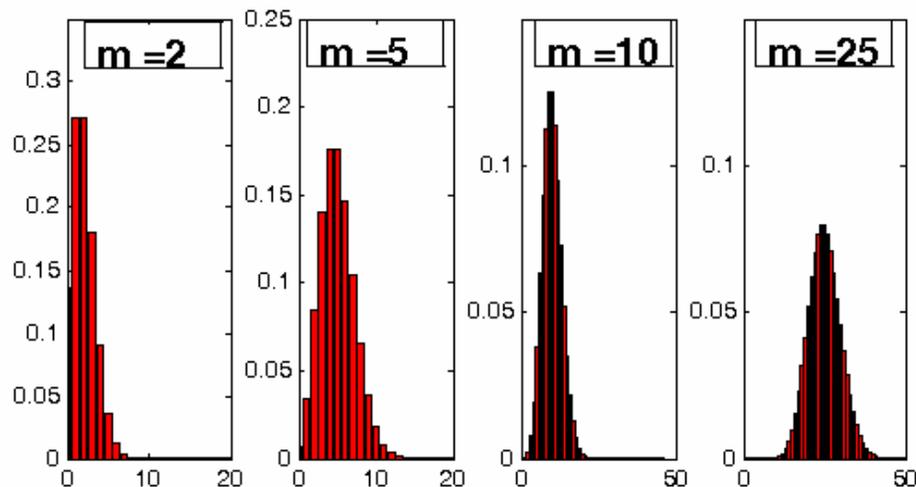
$$P(n) = e^{-kt} \frac{(kt)^n}{n!} \quad (\text{distribution de Poisson})$$

Distribution de Poisson

$$P(n = N) = e^{-kt} \frac{(kt)^n}{n!}$$

Valeur moyenne : $\langle n \rangle = \sum nP(n) = \sum ne^{-kt} \frac{(kt)^n}{n!} = kt$

Variance : $\sigma^2 = \langle (n - \langle n \rangle)^2 \rangle = \langle n \rangle = kt$



Bruit d'origine lumineuse

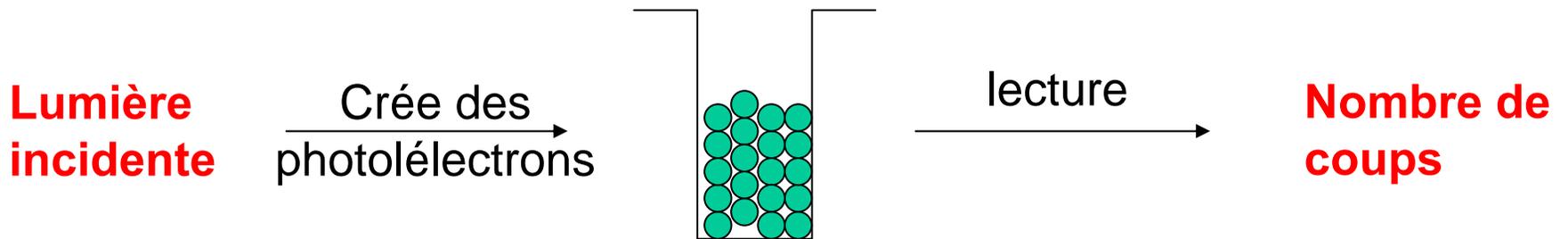
- **Bruit de photons des molécules (non saturées):**

$$\boxed{S = \beta I t} \quad \longrightarrow \quad \boxed{\sigma_S^2 = \beta I t}$$

- **Bruit dû à la lumière parasite :**

$$\boxed{N_{par} = \alpha I t} \quad \longrightarrow \quad \boxed{\sigma_{par}^2 = \alpha I t}$$

Sources de bruit électronique



- **Courant d'obscurité** : dû à l'apparition de N_{obs} photoélectrons à cause du bruit thermique (proportionnel au temps)

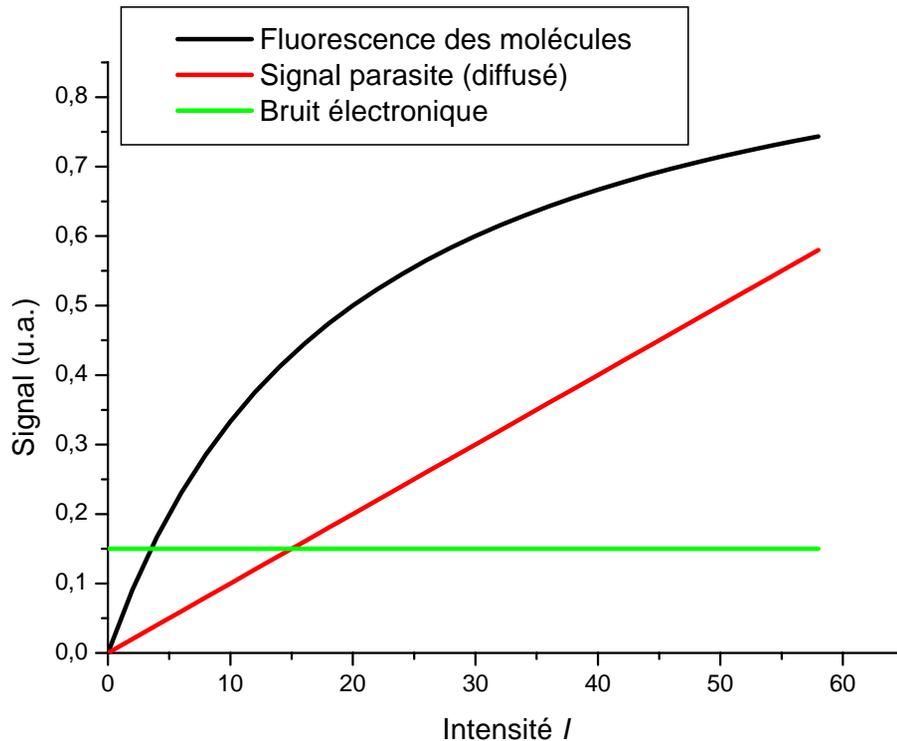
$$\boxed{N_{obs} = a^2 t} \longrightarrow \boxed{\sigma_{obs}^2 = N_{obs} = a^2 t}$$

- **Bruit noir de lecture** : dû au convertisseur analogue-digital

$$\boxed{\sigma_{lec}^2 = b^2}$$

Rapport signal sur bruit

$$\frac{S}{\sigma_B} = \frac{\beta I t}{\sqrt{\beta I t + \alpha I t + a^2 t + b^2}}$$



Cas limite du « shot noise »:

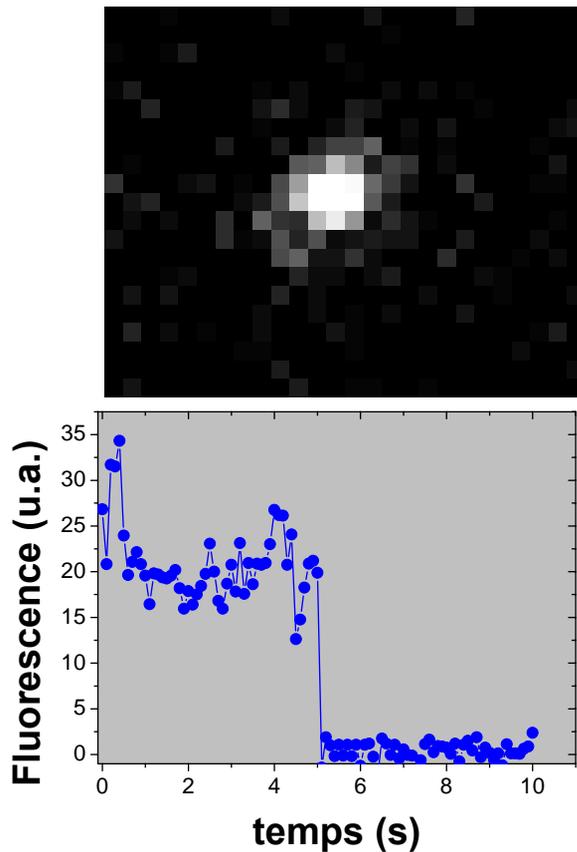
$$\frac{S}{\sigma_B} = \sqrt{\beta I t}$$

Peut-on voir une seule molécule ?

- **expérience à froid (4°K): Moerner 1989, Orrit 1990**
- **expérience à température ambiante : Betzig 1992**
- **expérience sur une molécule biologique : Xie 1998**
- **expérience sur une molécule dans une cellule : 2001**

Identifier une molécule unique

Pour un fluorophore :
photodestruction instantanée



Pour un nanocrystal :
scintillement

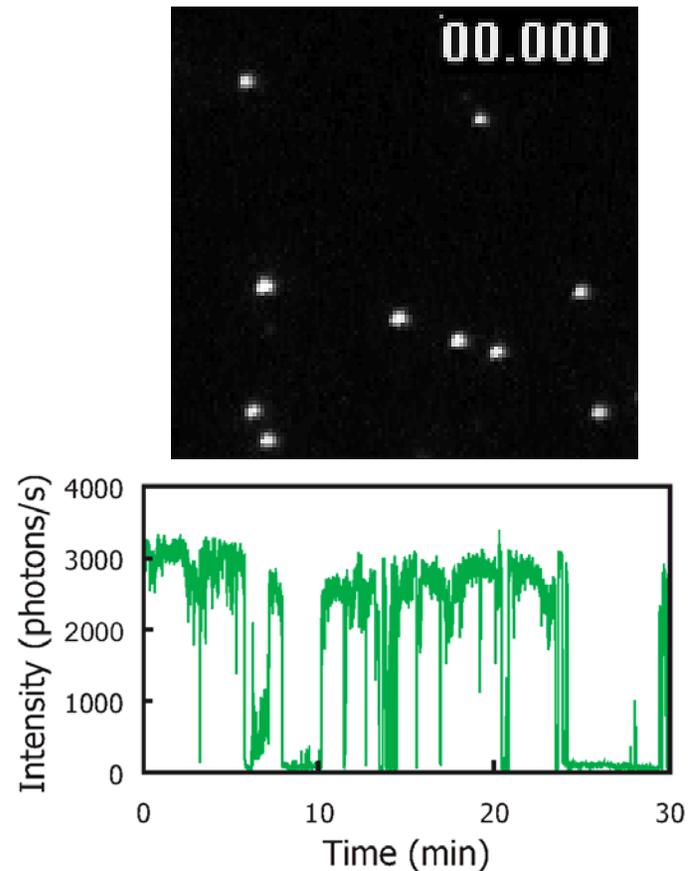


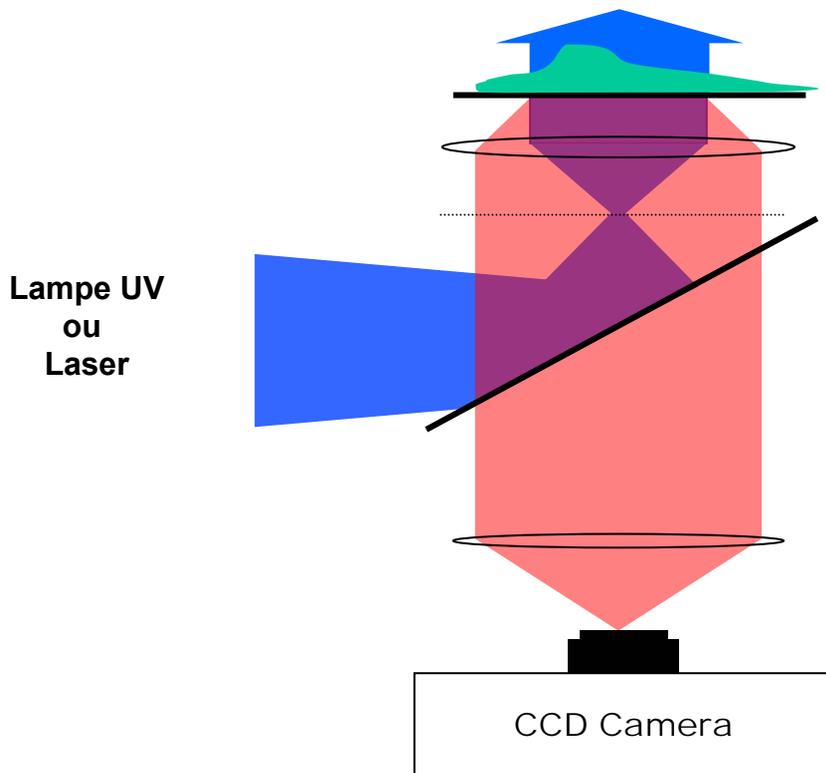
Tableau comparatif

	Taille	Photostabilité	Absorption
Cy3	1 nm	~ 5 s	$\varepsilon = 10^5$
GFP	2-4 nm	~ 10-100 ms	$\varepsilon = 10^4$
QD	10-30 nm	> 20 mn	$\varepsilon = 10^6$

Microscopie et imagerie de fluorescence

- **microscopie en épifluorescence**
- **microscopie confocale**
- **microscopie en onde évanescente**
- **microscopie à deux photons**

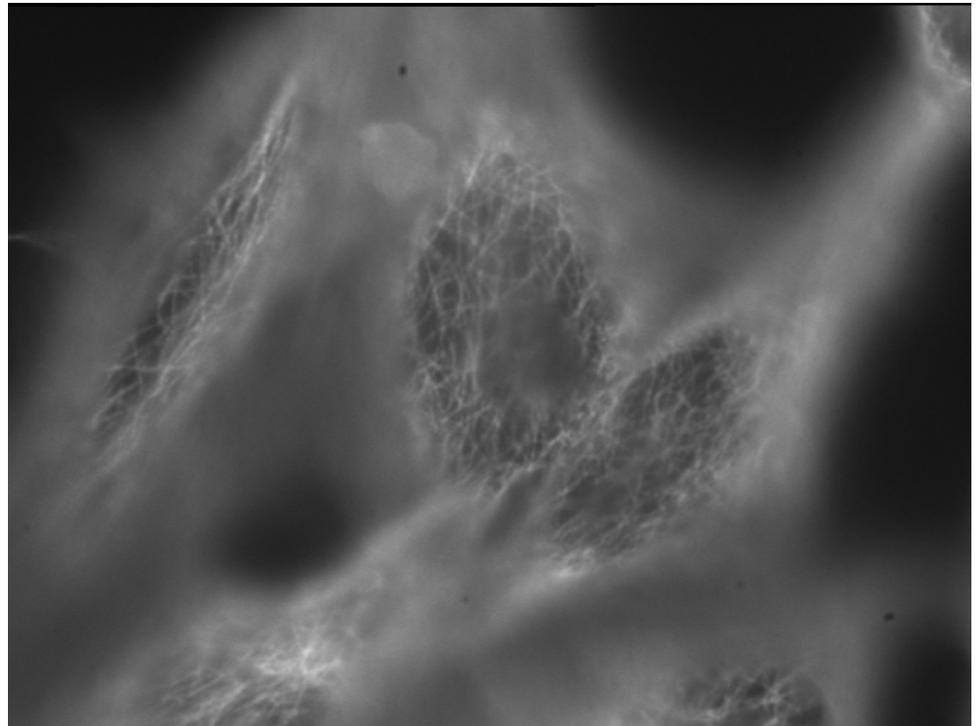
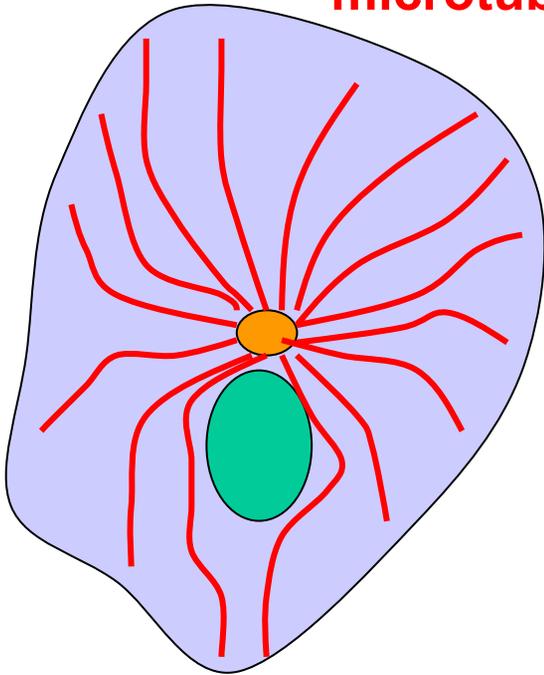
Microscopie en épifluorescence



On éclaire l'échantillon avec une lumière collimatée. Pour cela, on focalise la lumière dans le plan focal arrière de l'objectif.

Exemple : le cytosquelette d'une cellule

microtubules

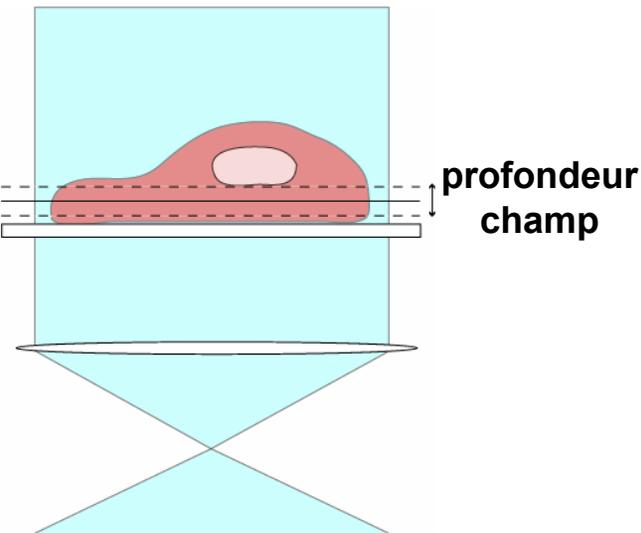


On voit des zones nettes et des zones plus floues

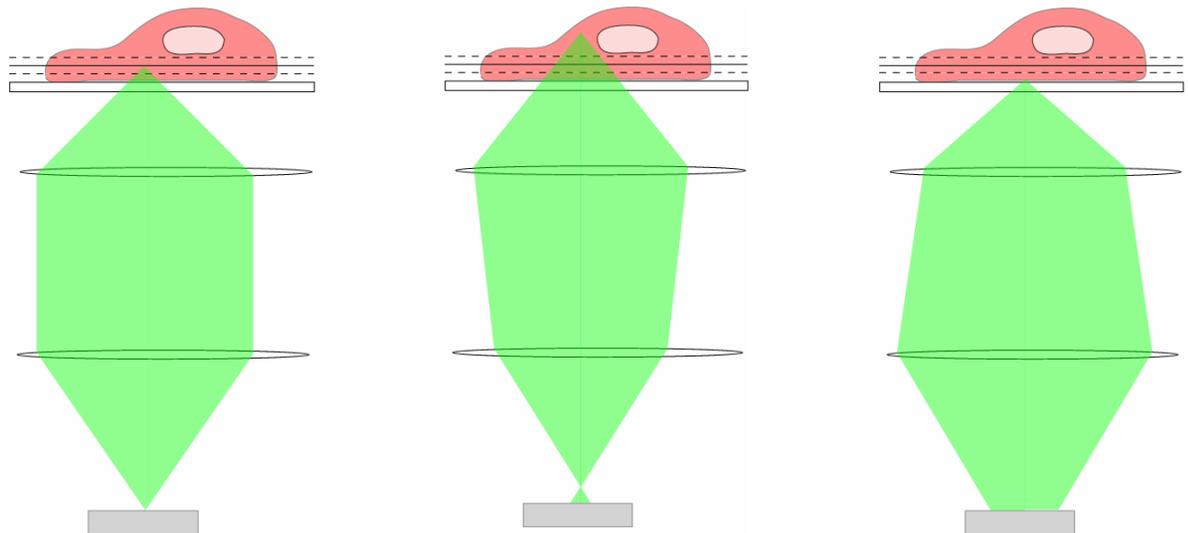
Problème

Dans un échantillon épais, on collecte la lumière de tous les plans de l'échantillon

Excitation



Détection



Objet dans le plan focal

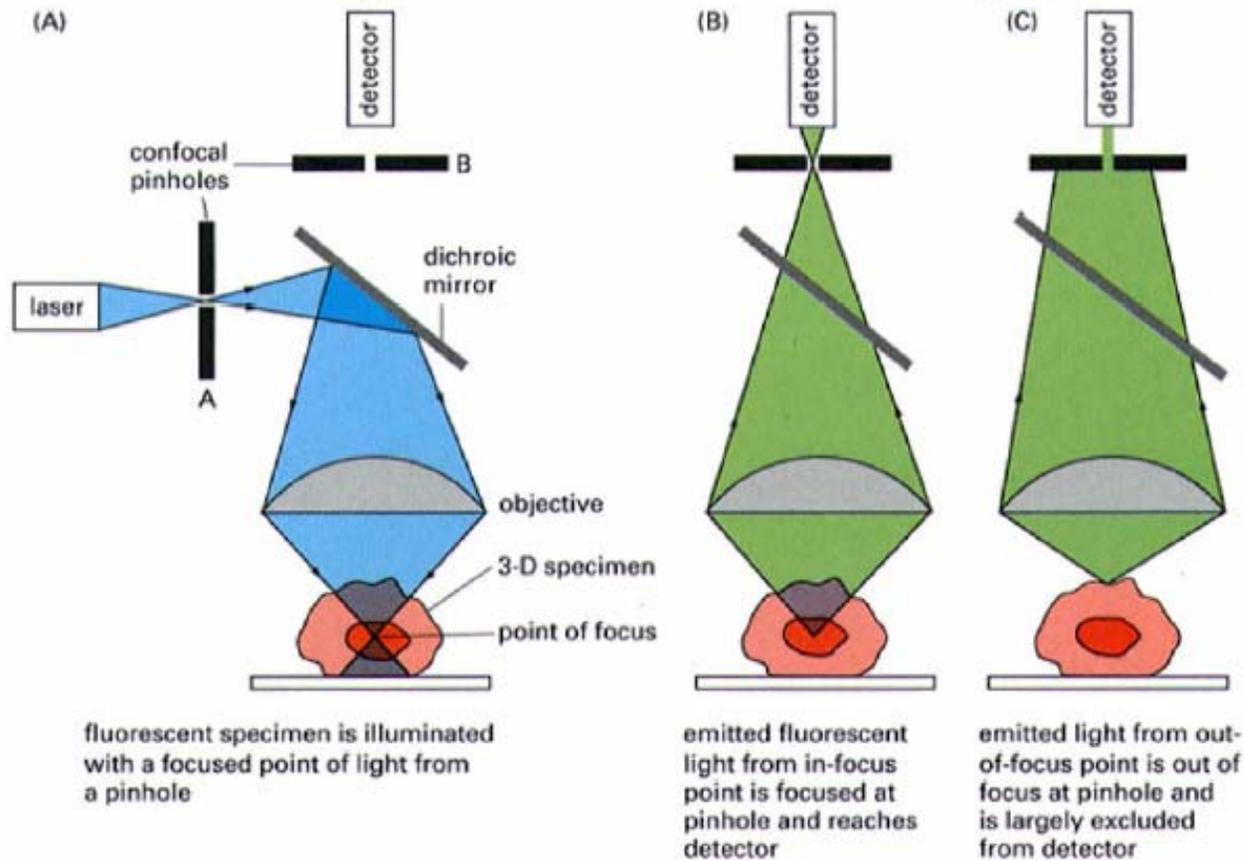
Objet au dessus du plan focal

Objet en dessous du plan focal

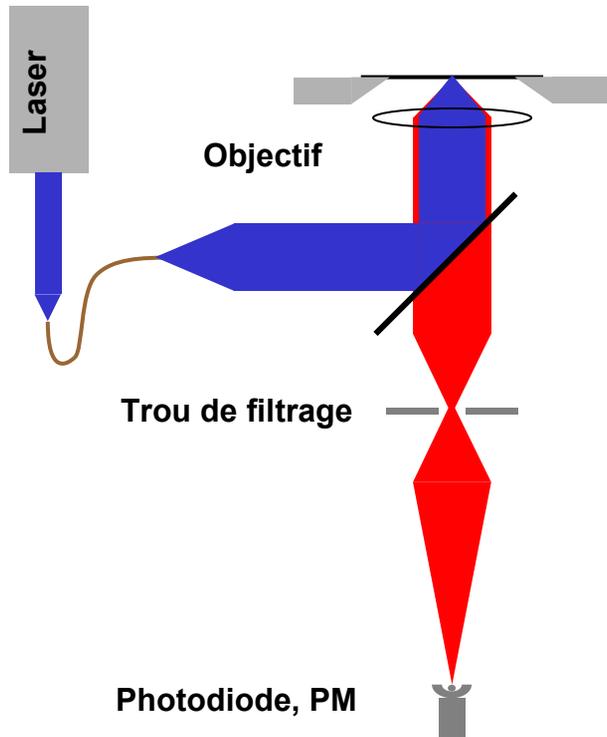
Comment se débarrasser de la lumière provenant des plans hors focus ?

Microscopie confocale

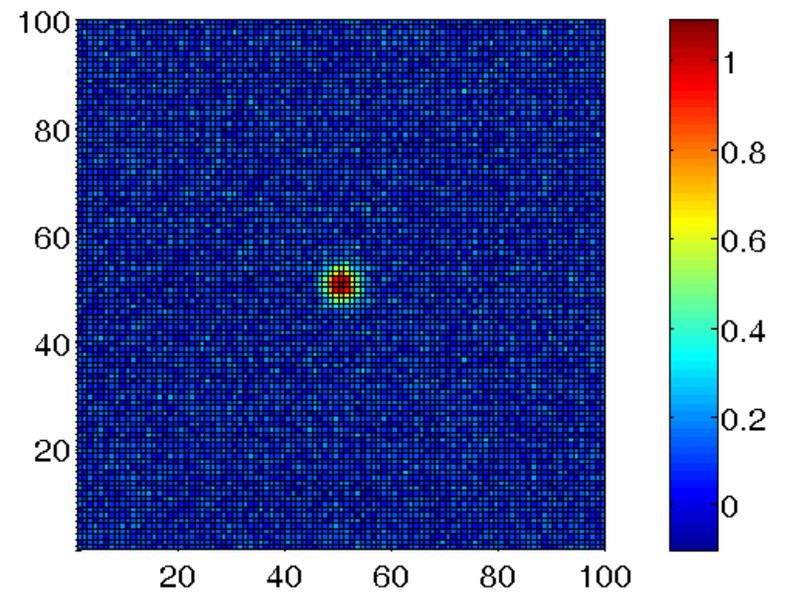
Confocal Microscopy

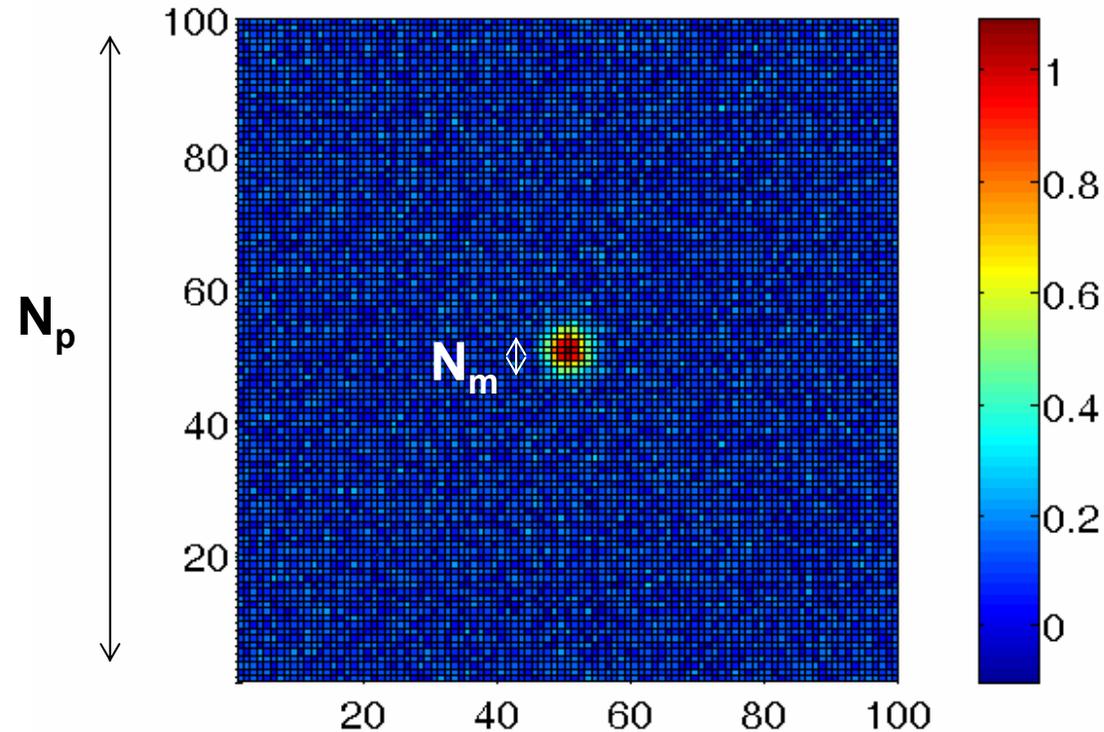


Microscopie en balayage

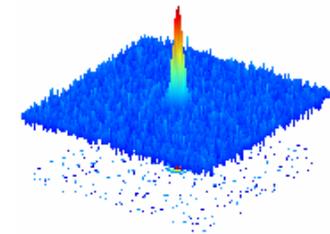


On déplace le point de focalisation sur l'échantillon.





Inconvénient : le temps passé sur un petit objet est bref



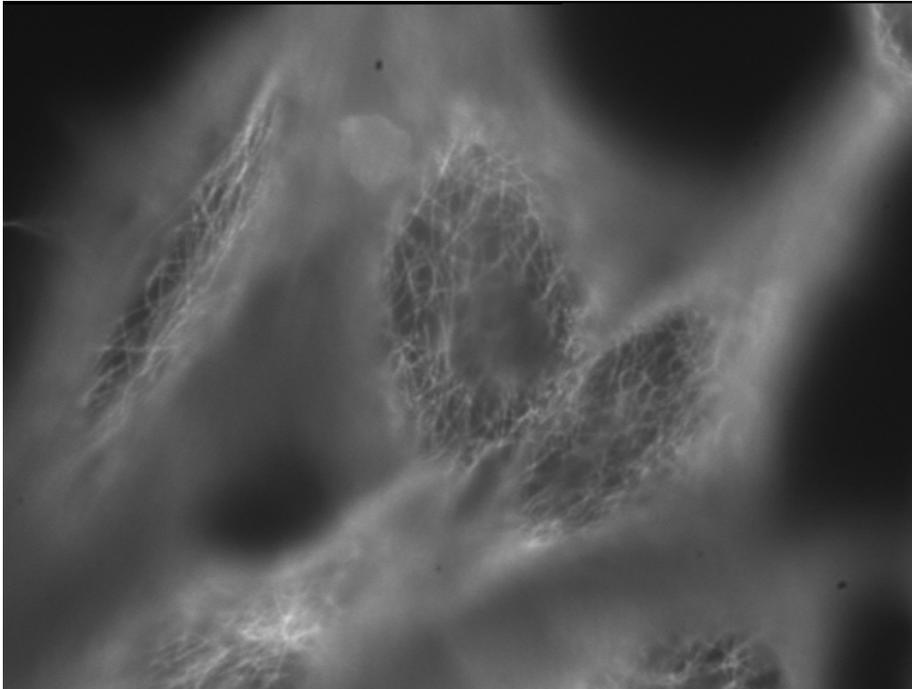
Taille de l'image : $N_p * N_p$ pixels - Taille de la molécule : $N_m * N_m$ pixels
 Fraction du temps passée à exciter la molécule : $F = (N_m/N_p)^2$

Exemple : taille d'un pixel : 200 nm, $N_p = 100$, $N_m = 4$, soit $F = 0,16 \%$

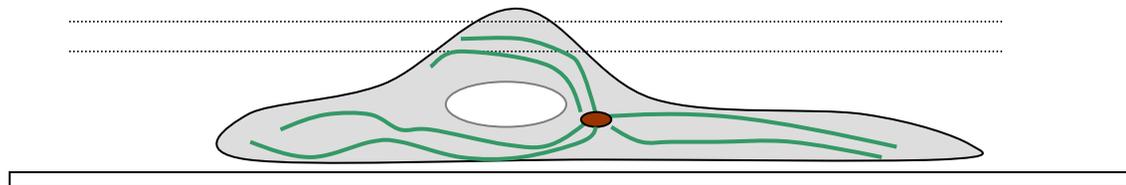
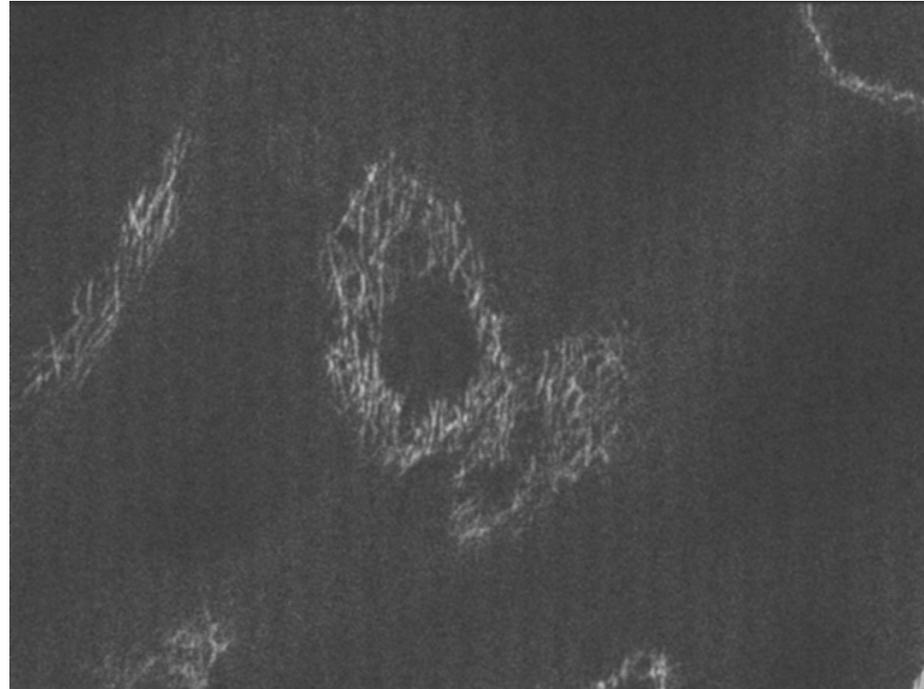
Si durée totale de l'image : 100 ms ($10 \mu\text{s}/\text{pixel}$), cela correspond à $160 \mu\text{s}$.

Exemple

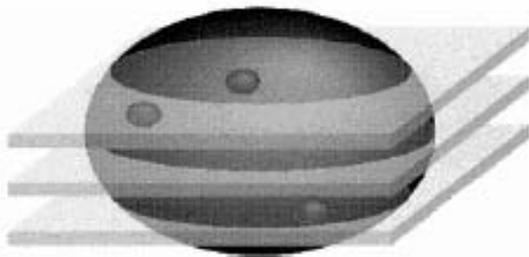
Epifluorescence



Section confocale



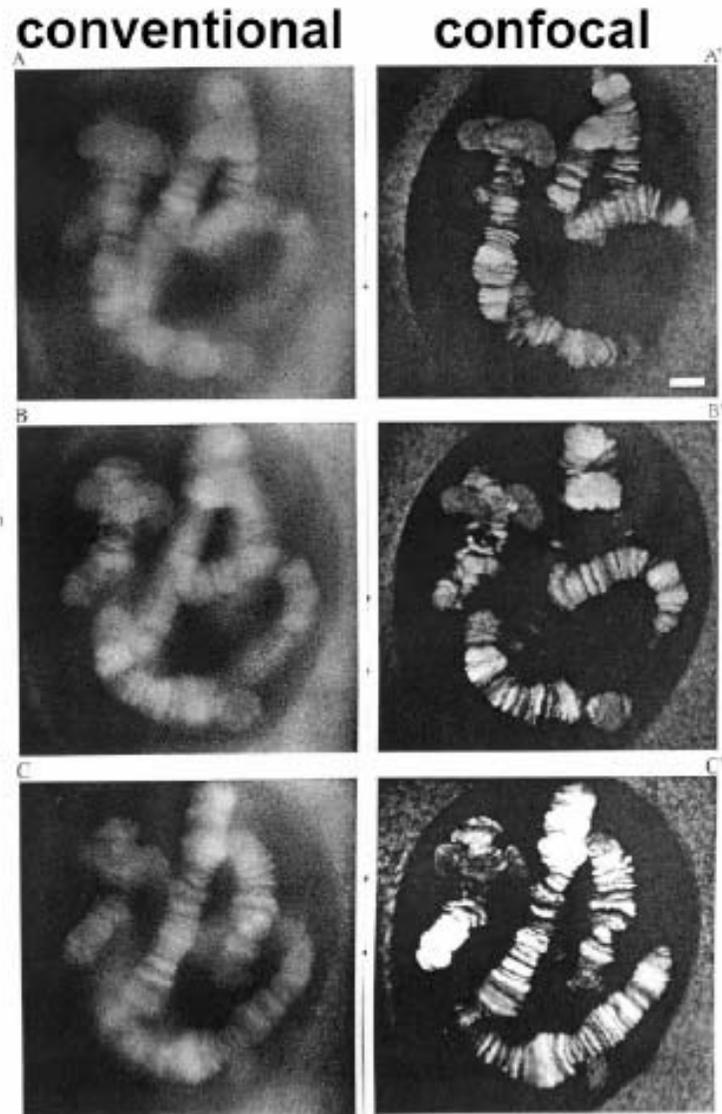
3D-slices through the nucleus



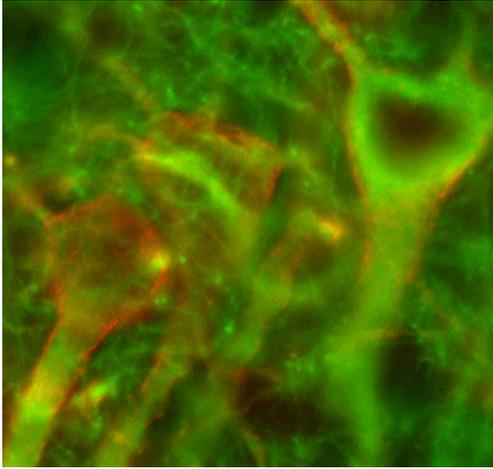
Confocal (A'-C') and non-confocal (A-C) fluorescence images of *Chironomus thummi* polytene chromosomes in situ. Optical slices were taken through a cell nucleus of an explanted salivary gland at three levels of focus with 4 μm separation. Acridine Orange staining, $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} \approx 515 \text{ nm}$. Scale bar $\approx 10 \mu\text{m}$.

M. Roben-Nicoud,
D. Arndt-Jovin and T. Jovin,
Abt. Molekulare Biologie,
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen,
West Germany.

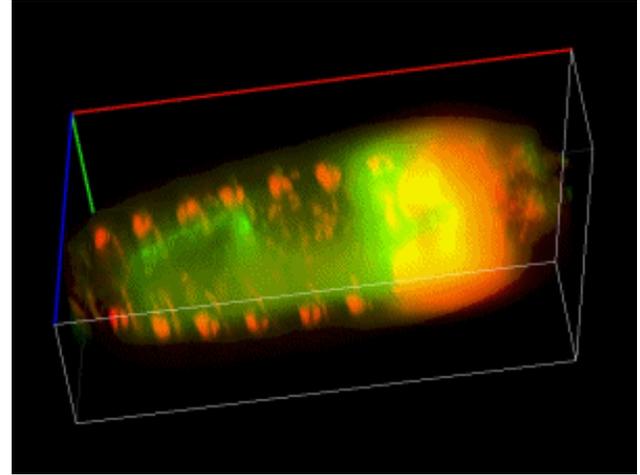
4 μm steps



Neuronal tissue (brain)



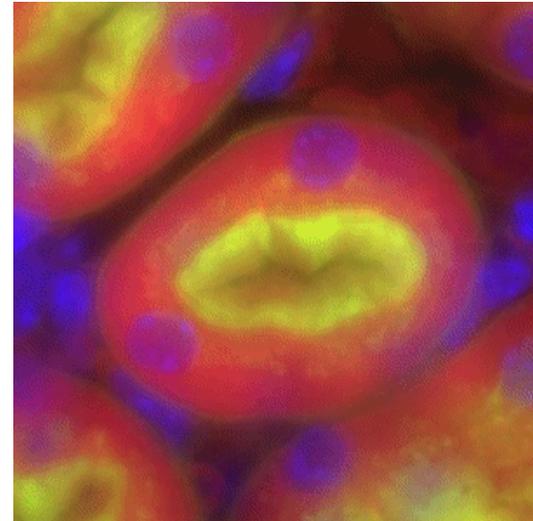
Drosophila nervous system



Mouse intestine



Mouse kidney



Microscopie en onde evanescente

Total Internal Reflection Fluorescence

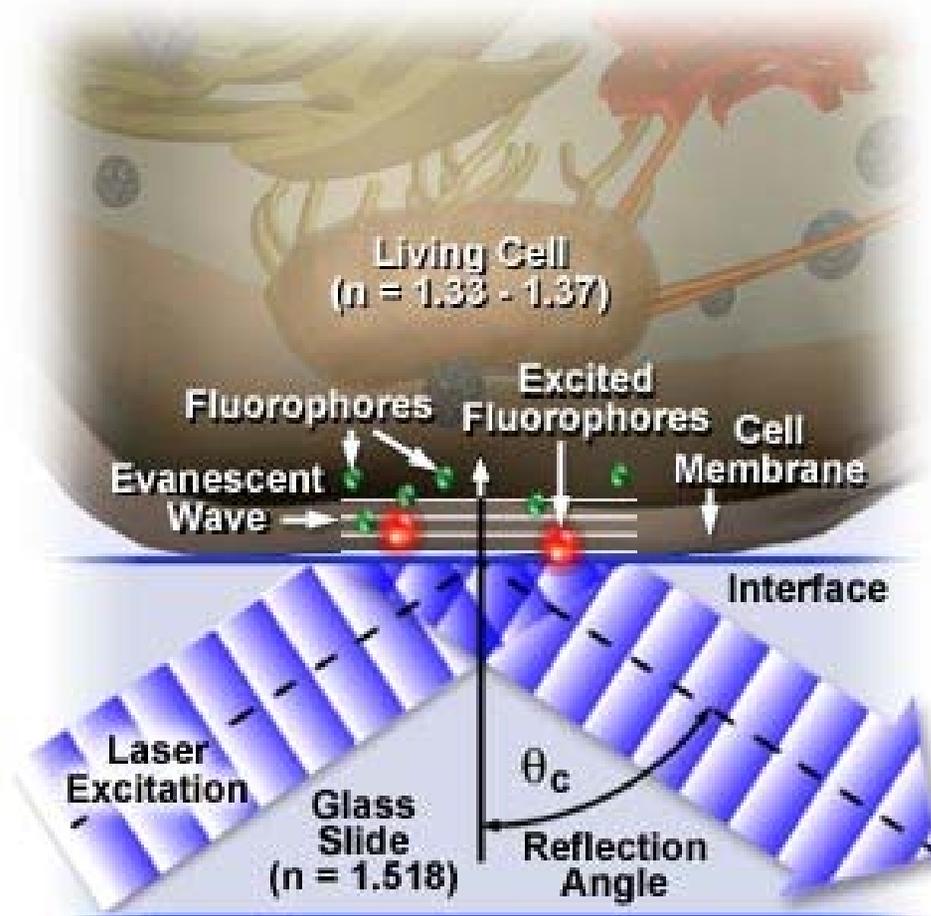
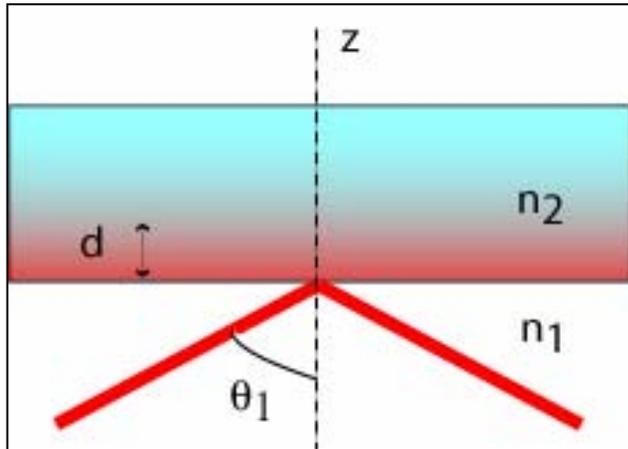


Figure 1

Portée de l'onde évanescente



$$I(z) = I_0 e^{-z/d}$$

$$\frac{1}{d} = \frac{4\pi}{\lambda} \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2}$$

Angle critique : $\theta_c = \arcsin(n_2 / n_1)$

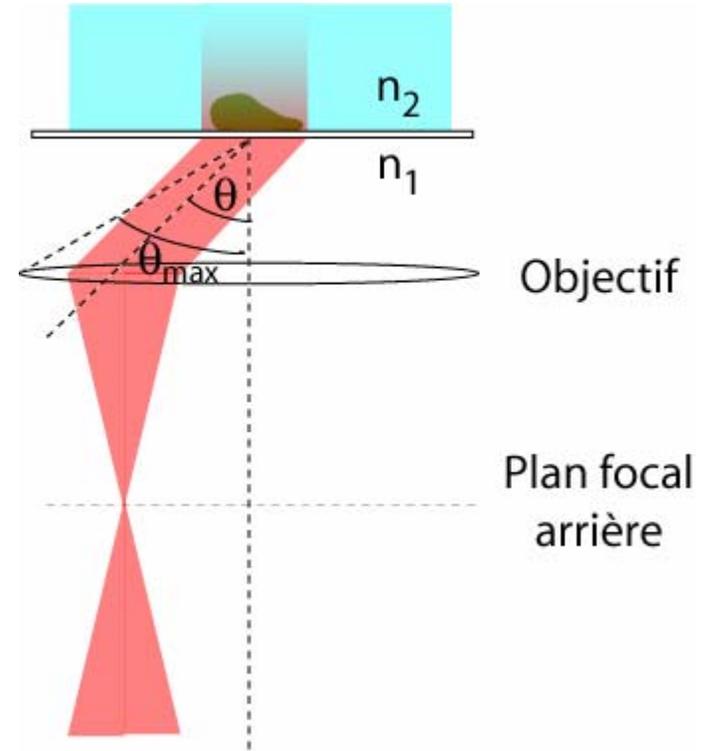
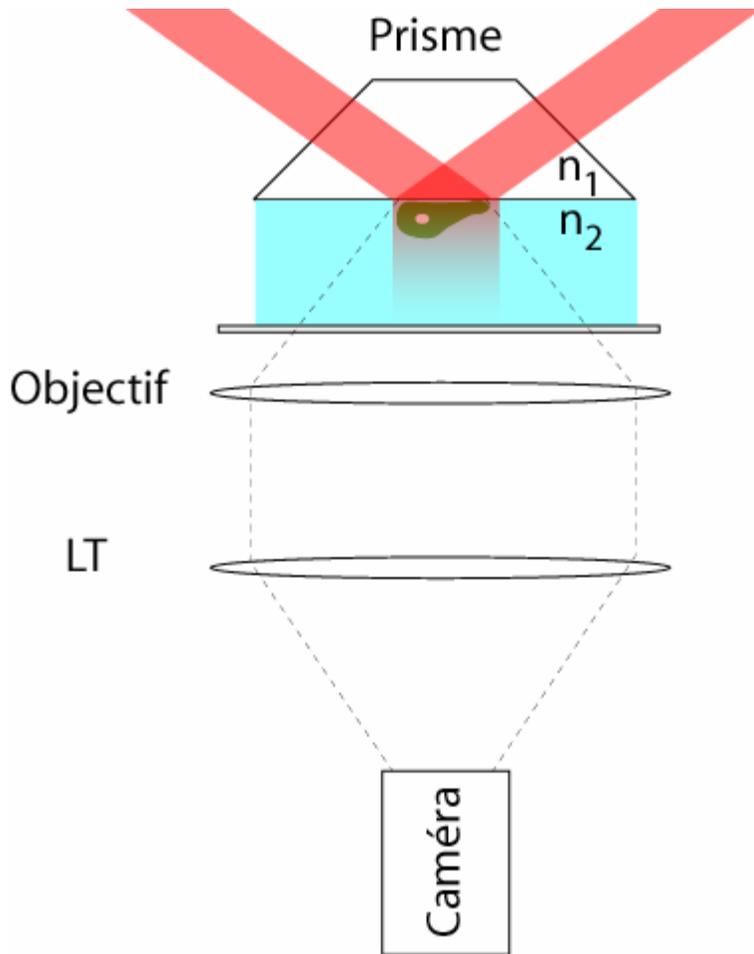
$$n_1 = 1.5 \quad \text{et} \quad n_2 = 1.0 \rightarrow \theta_c = 41.8^\circ$$

θ	d
41.8	∞
50	84,4 nm
60	57,6 nm
65	51,8 nm

$$n_1 = 1.5 \quad \text{et} \quad n_2 = 1.33 \rightarrow \theta_c = 62.5^\circ$$

θ	d
62.5	∞
65	170 nm
70	100 nm
75	83 nm

($\lambda = 600 \text{ nm}$)



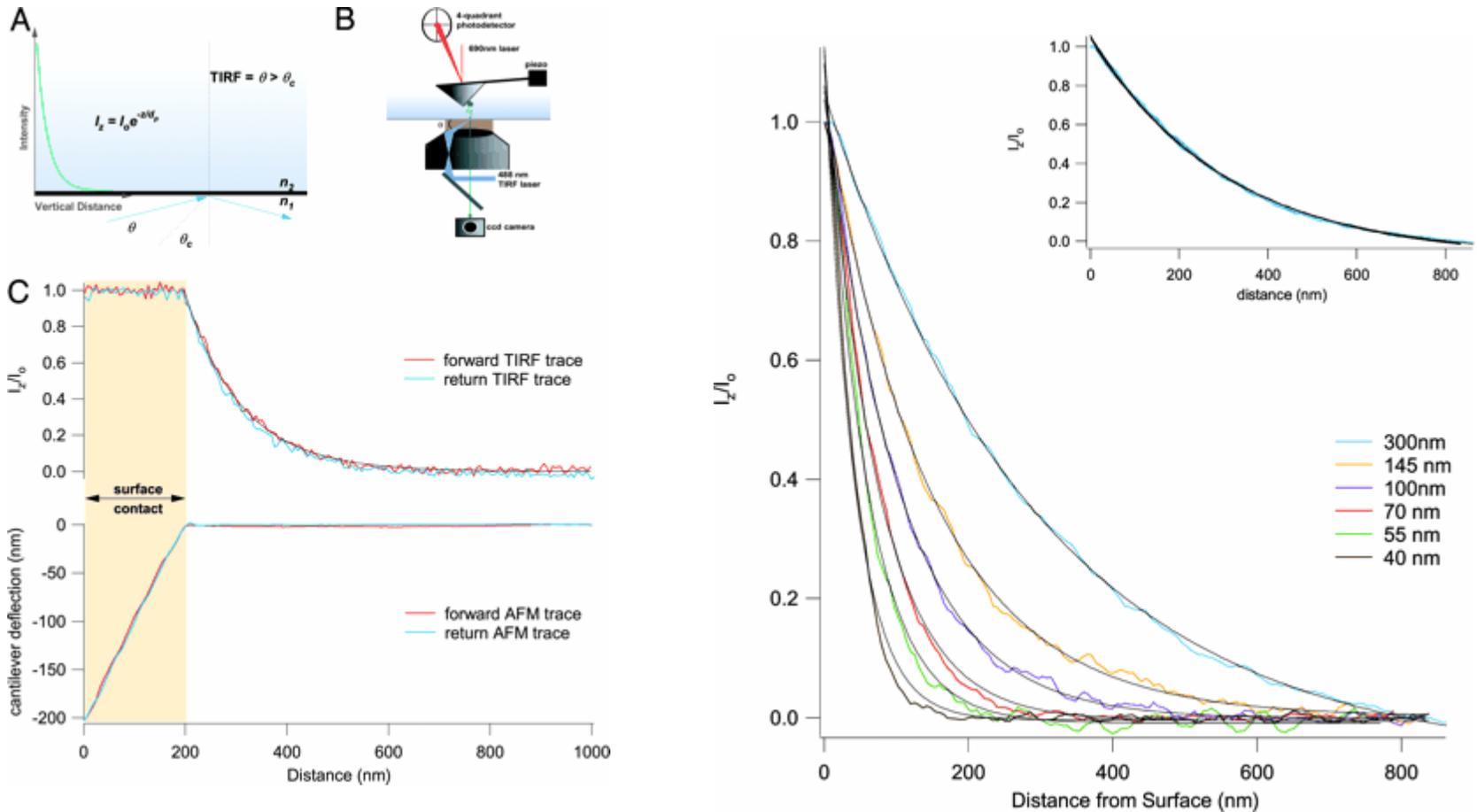
Il faut que l'objectif ait une ouverture numérique supérieure à n_2

$$\theta_{\max} = \arcsin(NA / n_1)$$

pour $NA = 1.4$ et $n_1 = 1.5$

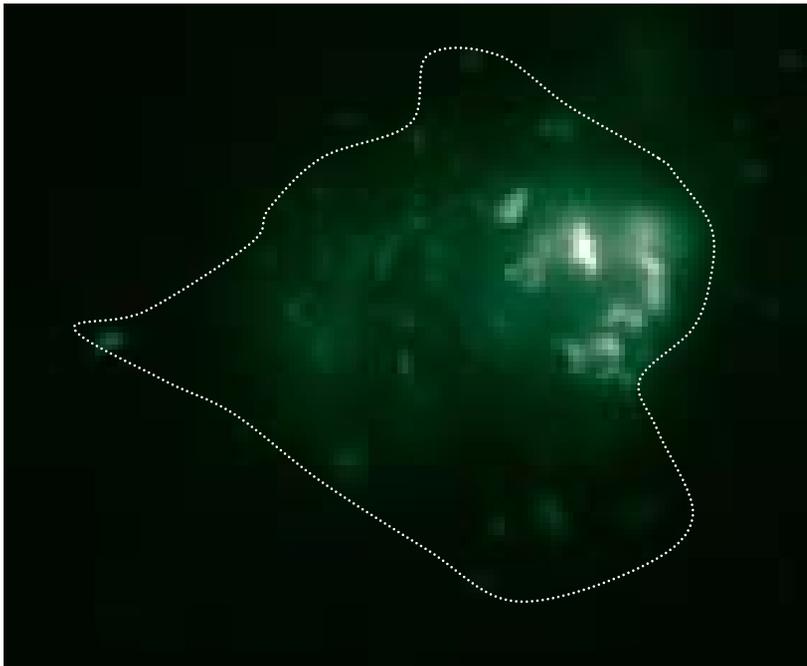
$$\theta_{\max} = 69^\circ$$

Vérification expérimentale

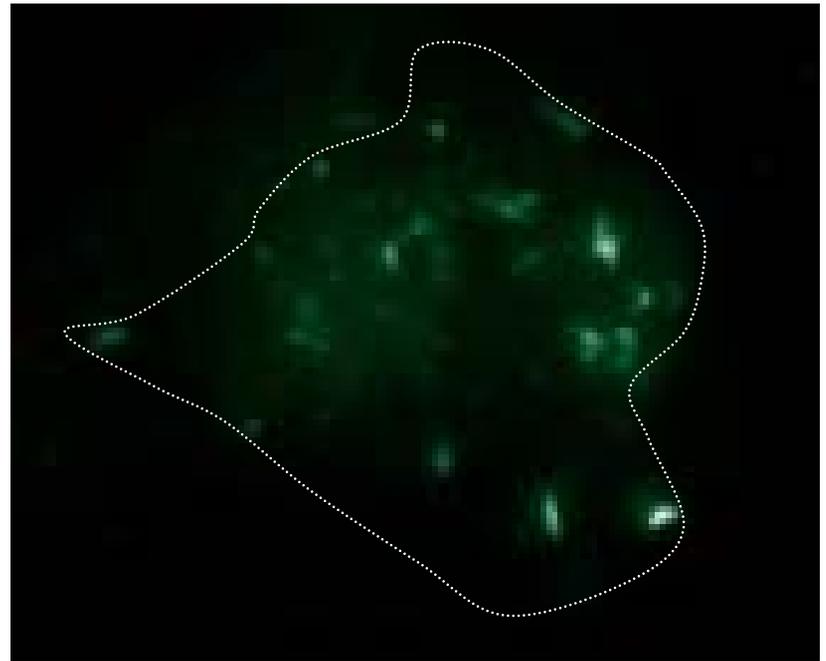


Exemple

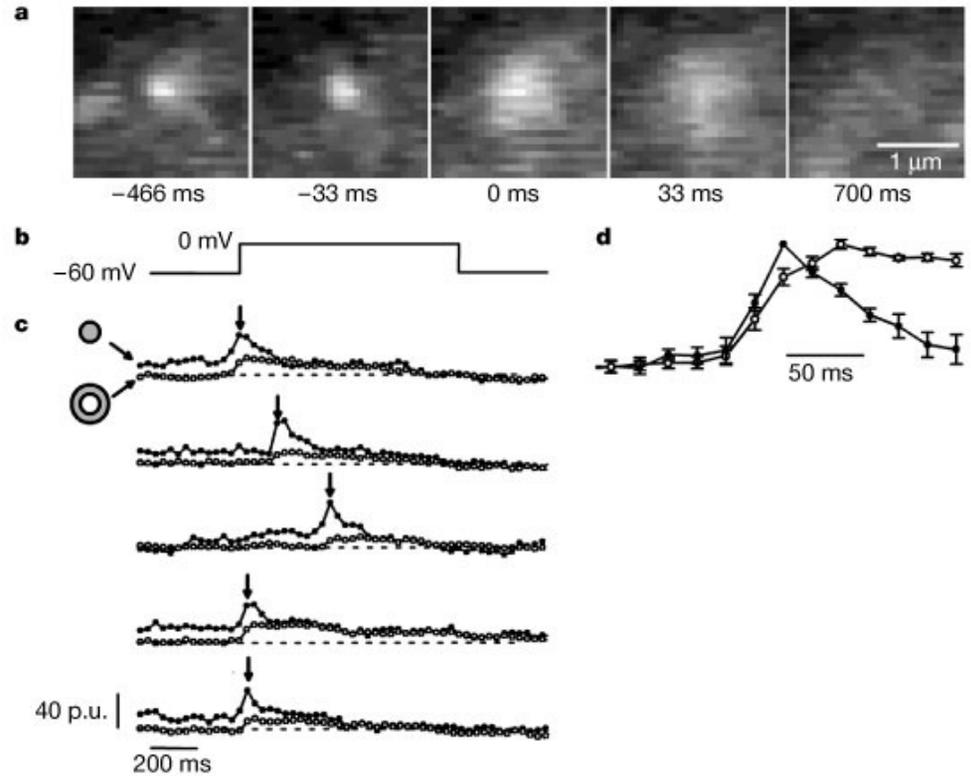
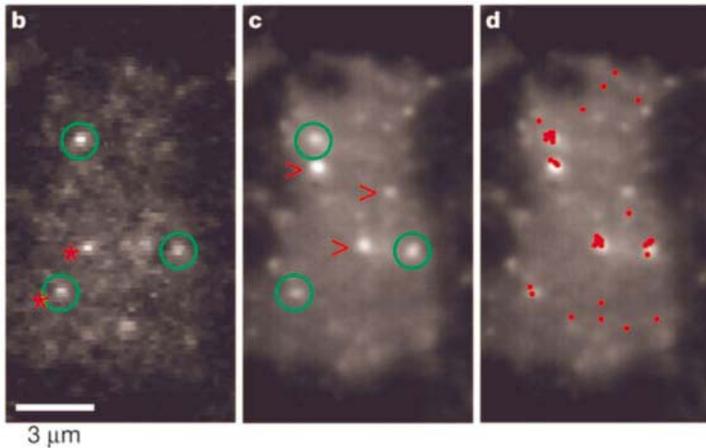
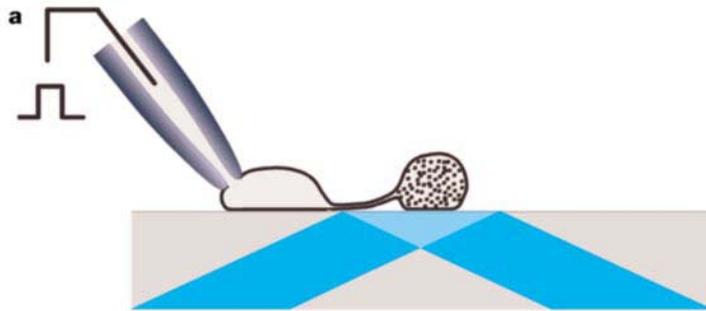
epifluorescence



onde évanescente



Exemple d'application : visualisation de l'exocytose de vésicules



Film en onde evanescente de l'exocytose

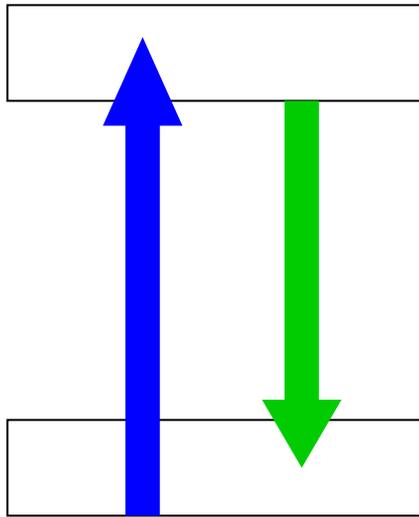
Microscopie non-linéaire

MICROSCOPIE A 2 PHOTON

Questions :

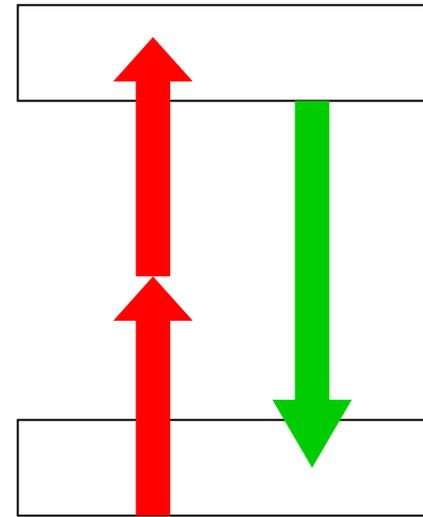
- quel est le processus physique de la fluorescence à 2 photons
- qu'est ce que la section efficace à 2 photons ?
- pourquoi faut-il un laser pulsé femtoseconde ?
- quelle est la résolution spatiale ?
- qu'est ce qui limite la profondeur d'observation ?

One-photon excitation

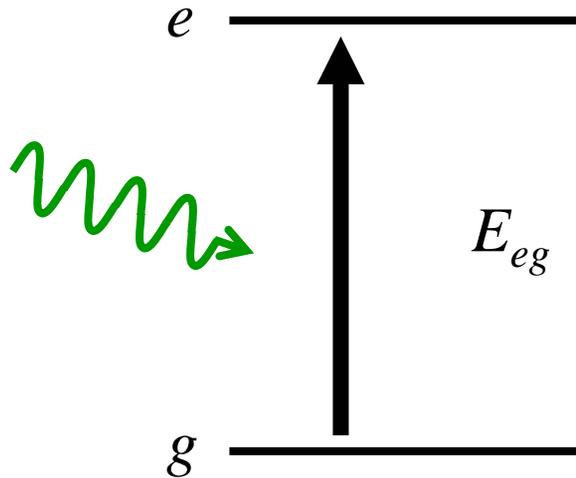


$$F \propto I$$

Two-photon excitation

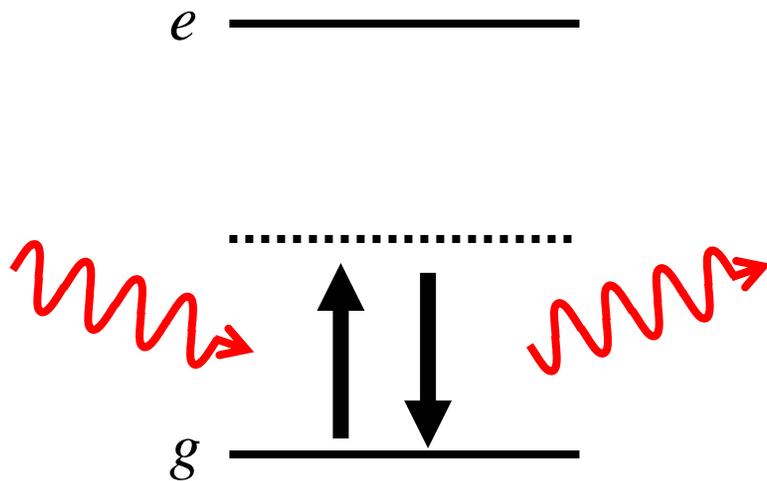


$$F \propto I^2$$



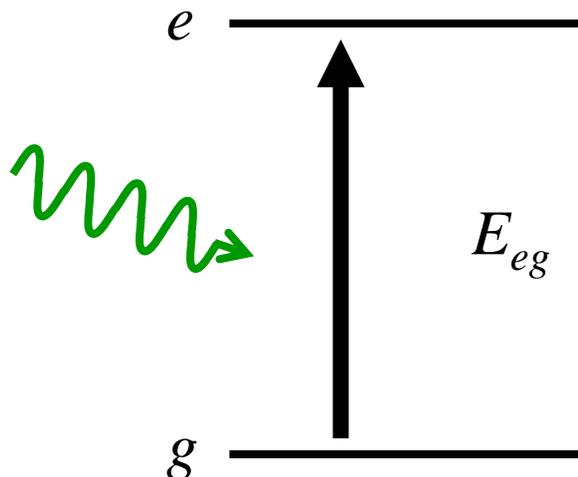
$$\sigma_{\text{abs}} \approx 10^{-16} \text{ cm}^2 \text{ (resonant)}$$

$$\sigma_{\text{abs}} = \frac{2303\varepsilon}{N_A}$$



diffusion Rayleigh (le ciel est bleu,
les couchers de soleil sont rouges...)

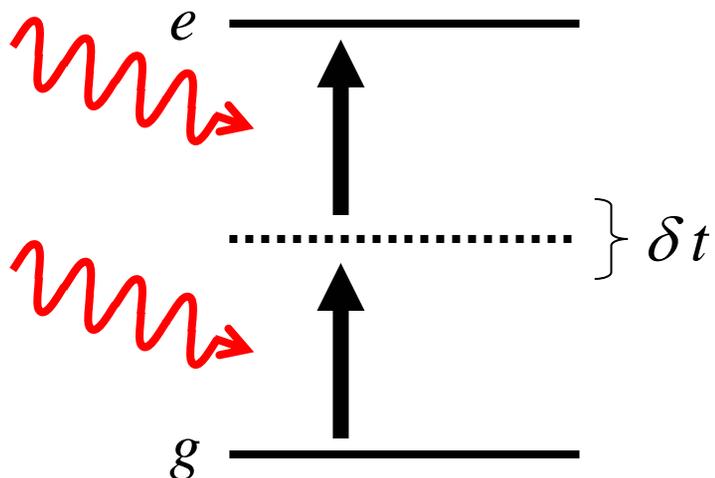
$$\sigma_{\text{diff}} \propto \omega^4$$



$$\sigma_{\text{abs}} \approx 10^{-16} \text{ cm}^2 \text{ (resonant)}$$

(Uncertainty principle - Heisenberg)

$$E_{eg} \delta t \approx h \quad \Rightarrow \quad \delta t \approx 10^{-15} \text{ sec}$$

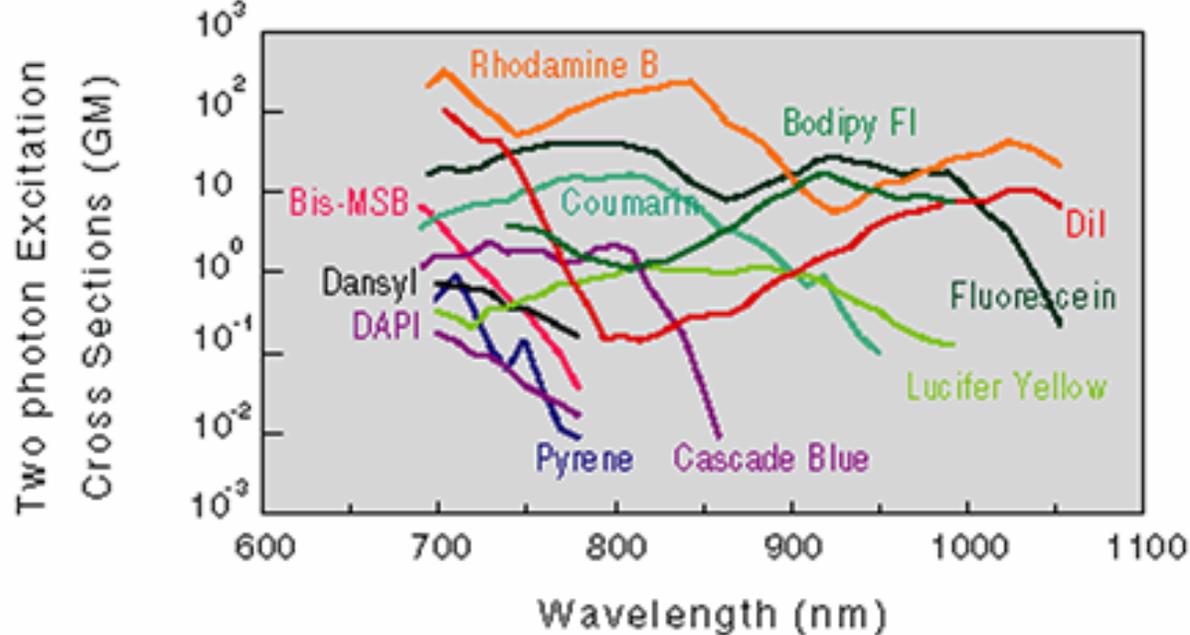


$$\sigma_{2p\text{-abs}} \approx \sigma_{\text{abs}} \sigma_{\text{abs}} \delta t$$

(non-resonant)

Göppert-Mayer

$$(1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s/photon})$$



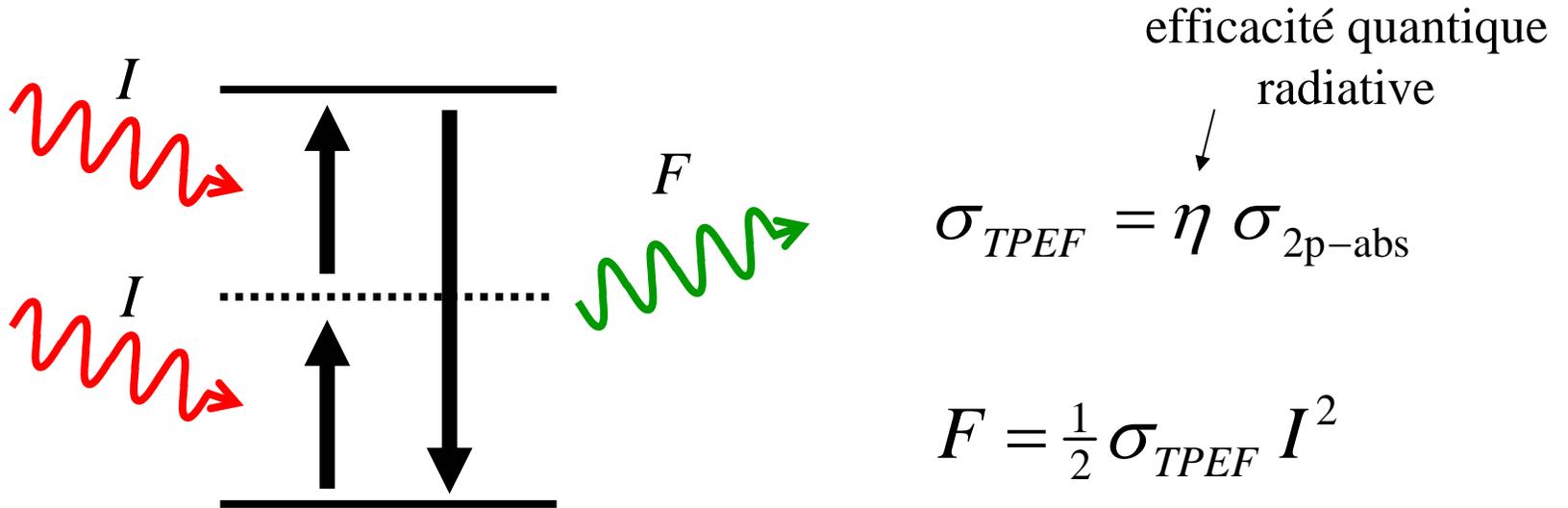
Rhodamine : ~ 100 GM

GFP : ~ 2 GM (?)

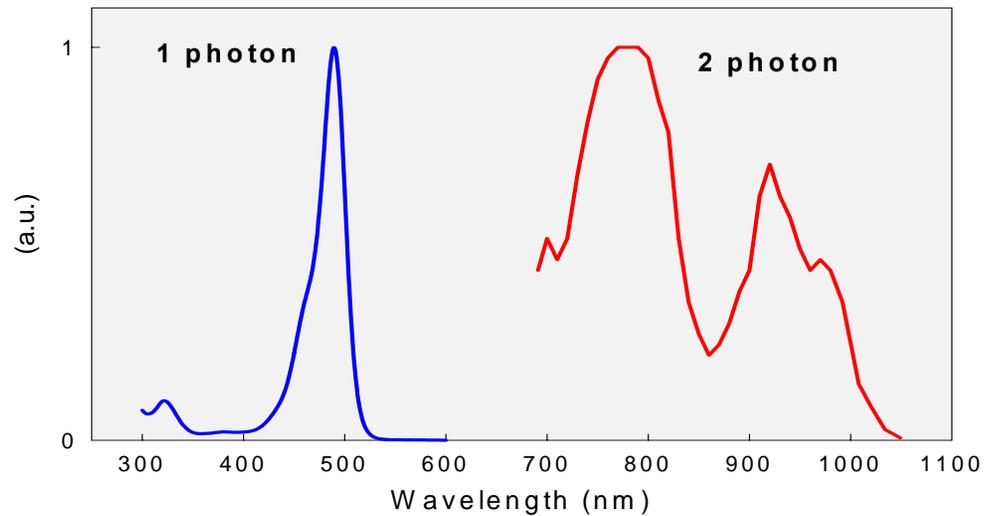
Fluorescein : ~ 10 GM

QD : ~ 30 000 GM

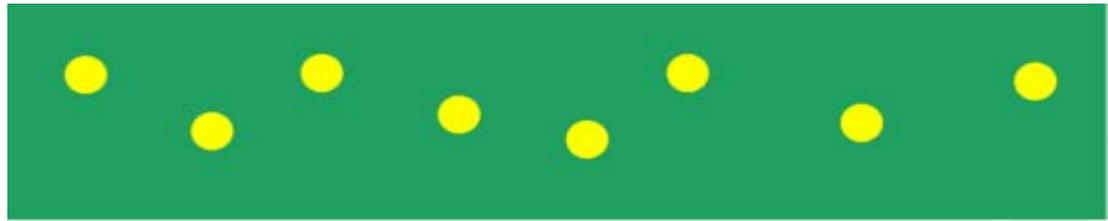
Fluorescence



Absorption spectrum of Fluorescein

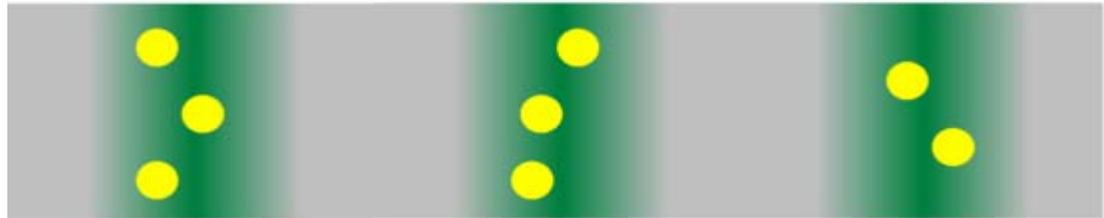


continu



time 

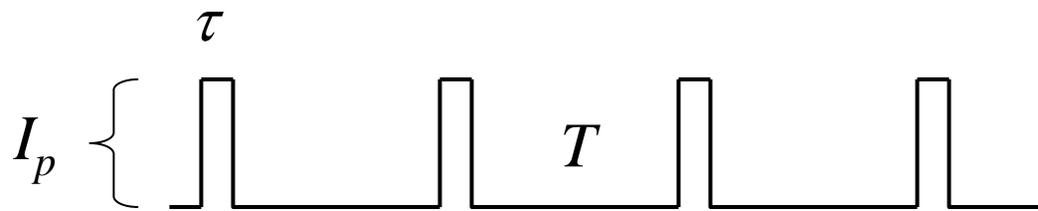
pulsé



T

τ

2-photon enhancement factor $\rightarrow T / \tau$



Intensité moyenne

$$\bar{I} = \frac{\tau}{T} I_p$$

Fluorescence
pendant une
impulsion

$$F_p = \frac{1}{2} \sigma_{TPEF} I_p^2$$

Fluorescence
moyenne

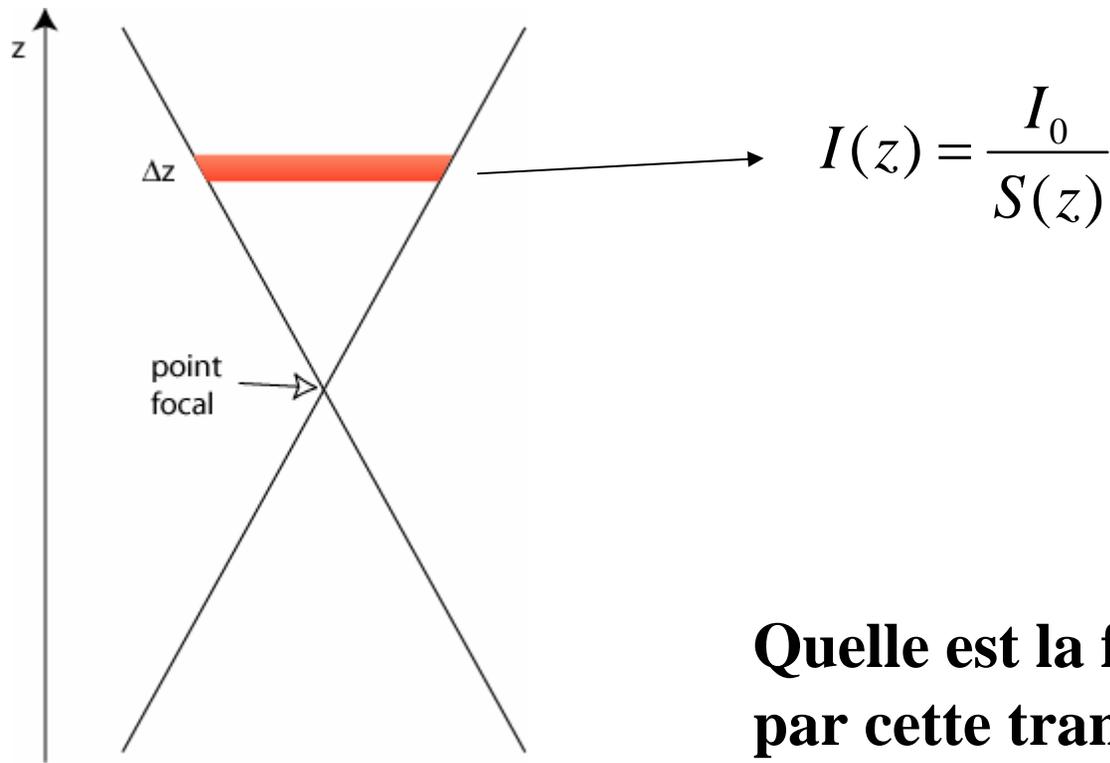
$$\begin{aligned} \bar{F} &= \frac{F_p \tau}{T} = \frac{1}{2} \sigma_{TPEF} \frac{\tau}{T} \left(\frac{T}{\tau} \bar{I} \right)^2 \\ &= \frac{1}{2} \sigma_{TPEF} \left(\frac{T}{\tau} \right) \bar{I}^2 \end{aligned}$$

“enhancement
factor”

g

Laser ti:saphire:

$$\left. \begin{array}{l} T \approx 10 \text{ ns} \\ \tau \approx 100 \text{ fs} \end{array} \right\} g \approx 10^5$$

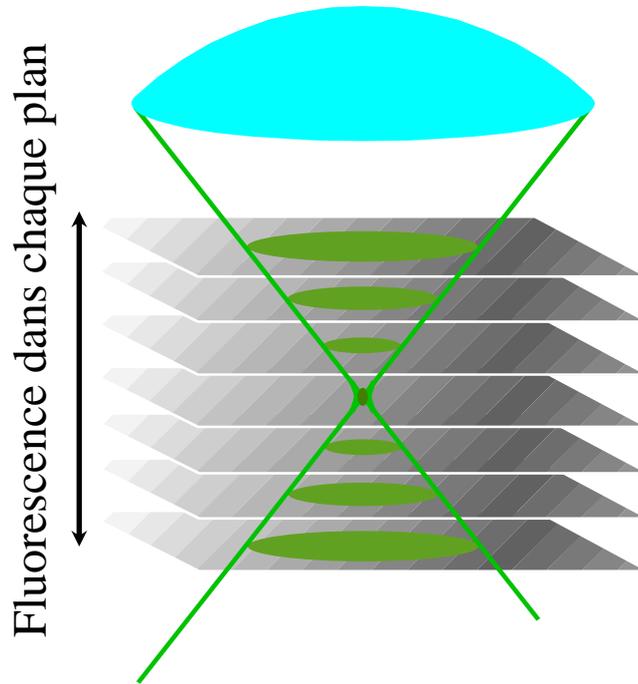


Quelle est la fluorescence émise par cette tranche d'épaisseur Δz ?

$$\Delta F_{1p}(z) = \Delta z S(z) I(z) = \Delta z I_0$$

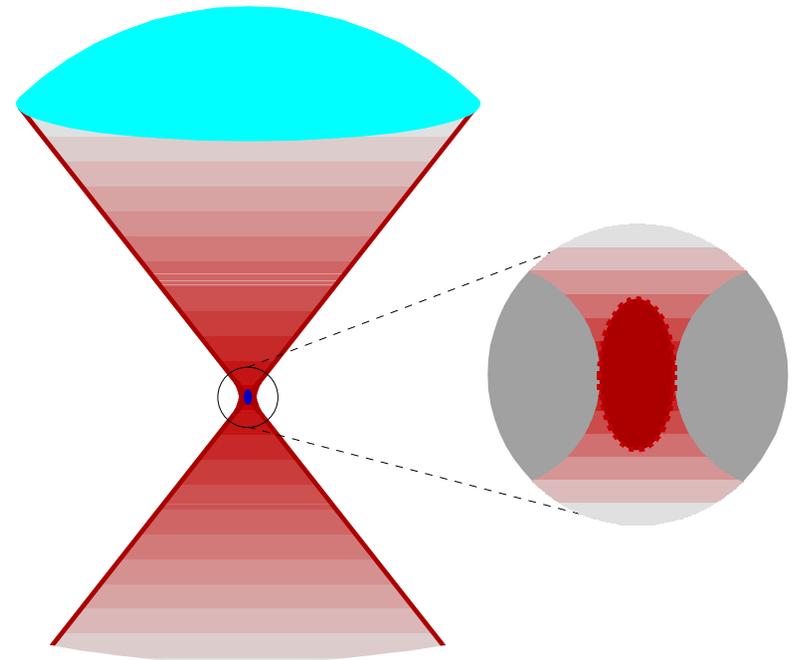
$$\Delta F_{2p}(z) = \Delta z S(z) I^2(z) = \frac{\Delta z I_0}{S(z)}$$

Excitation à 1 photon

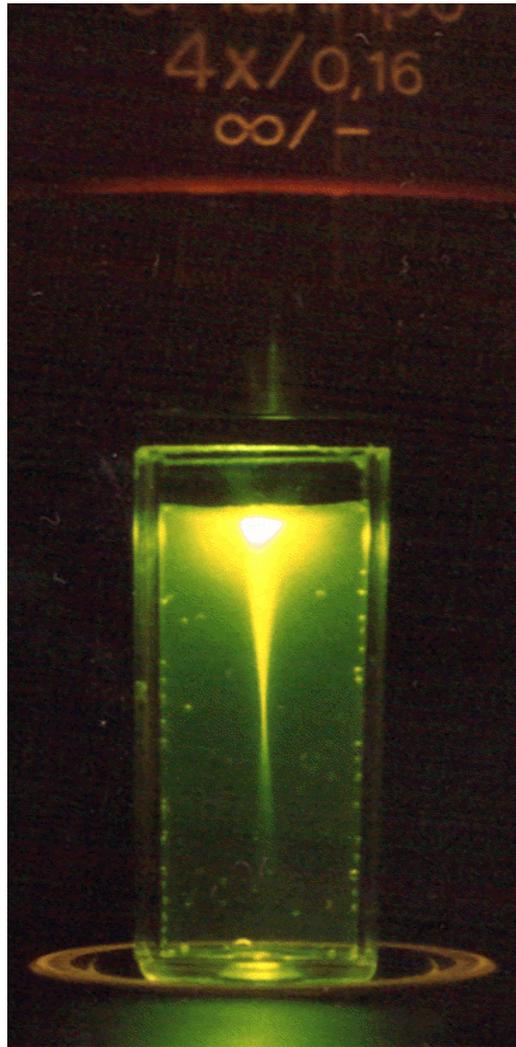


La fluorescence n'est pas confinée en z

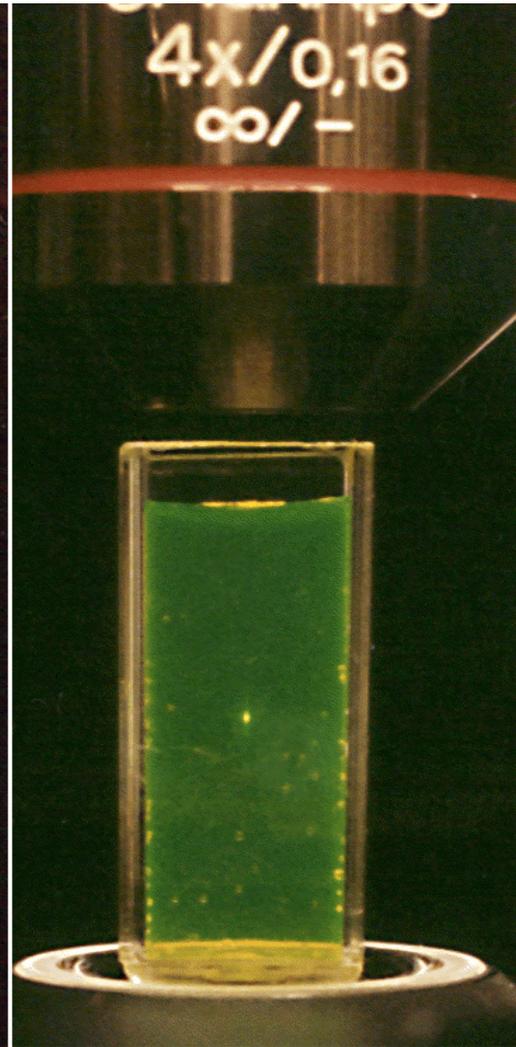
Excitation à 2 photons



La fluorescence est confinée dans le volume d'excitation (PSF 2 photons)

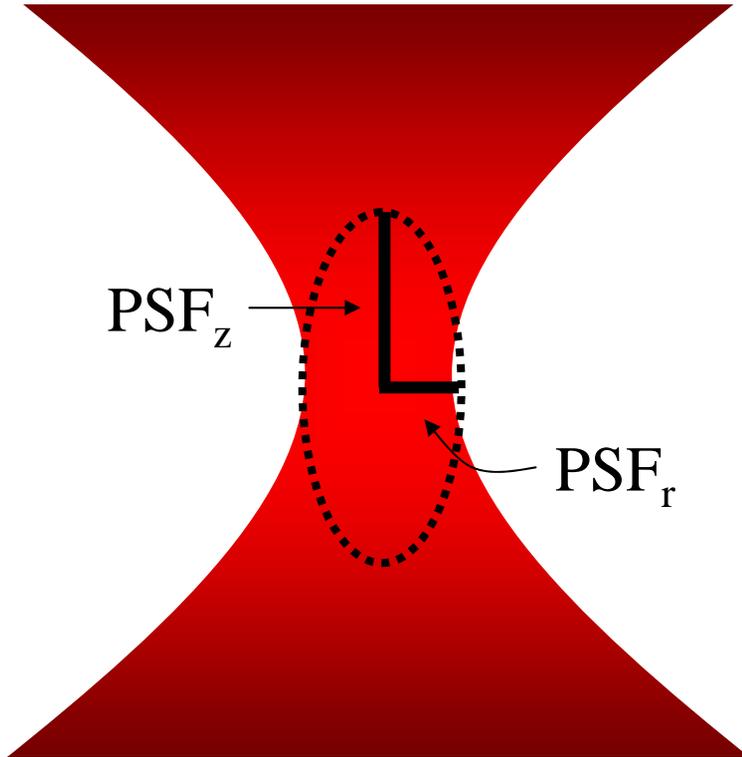


1-photon



2-photon

Résolution



$$\text{PSF}_r = w_0 \approx \frac{\lambda}{2\text{NA}}$$

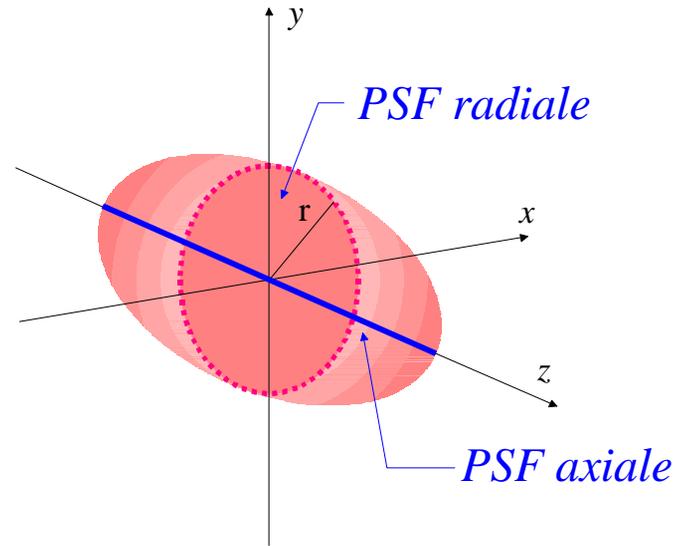
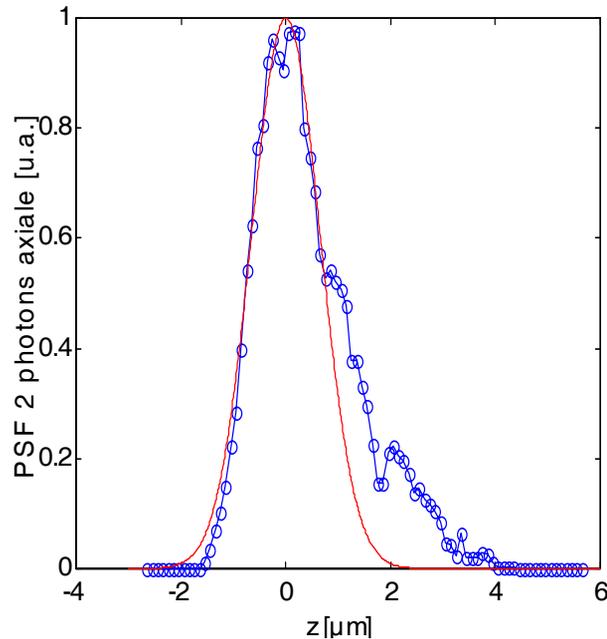
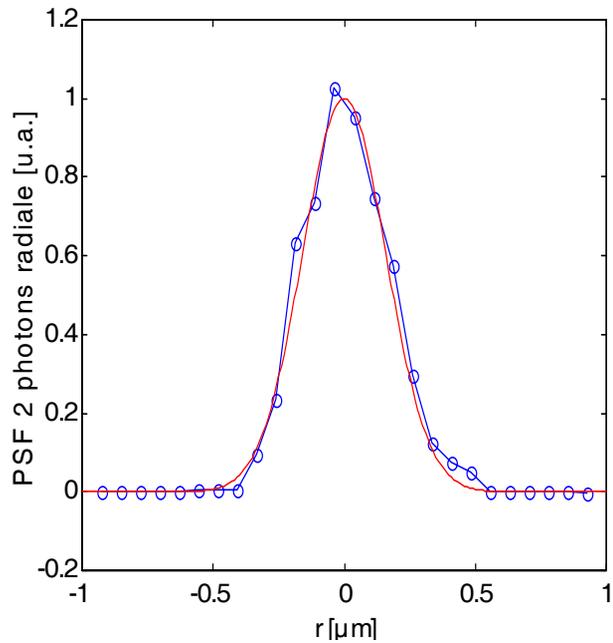
$$\text{PSF}_z = \begin{cases} z_0 = \frac{\pi w_0^2}{\lambda} & \text{G-L} \\ w_z \approx \frac{1.3n\lambda}{\text{NA}^2} & \text{Gaussian 3d} \end{cases}$$

Gaussien-Lorentzien (G-L)

$$I(r, z) = I_0 \left(\frac{w_0}{w(z)} \right)^2 \exp \left[-\frac{2r^2}{w^2(z)} \right]$$

$$w^2(z) = w_0^2 \left(1 + \frac{z^2}{z_0^2} \right)$$

Résolution 3D (PSF 2 photons)

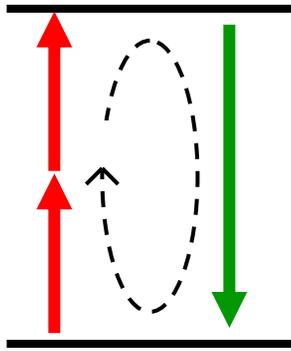


Objectif de microscope $NA = 0.9$ W	PSF radiale	PSF axiale
Théoriquement	450 nm	1.68 μm
Expérimentalement	467 nm	1.85 μm

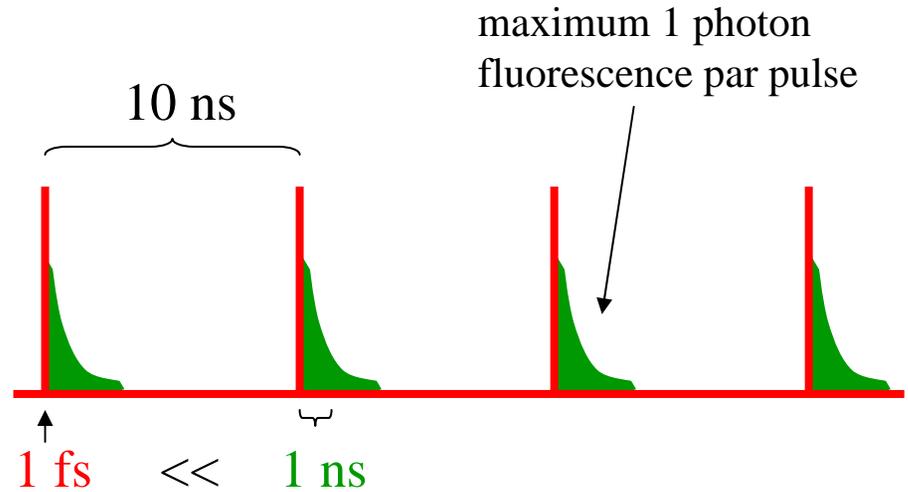
↓
Mesure avec des billes fluorescentes de 100 nm

Facteurs limitants pour la fluorescence

Durée de vie ~ 1 ns



$$\bar{F}_{\max} < 10^9 \text{ photons/s}$$

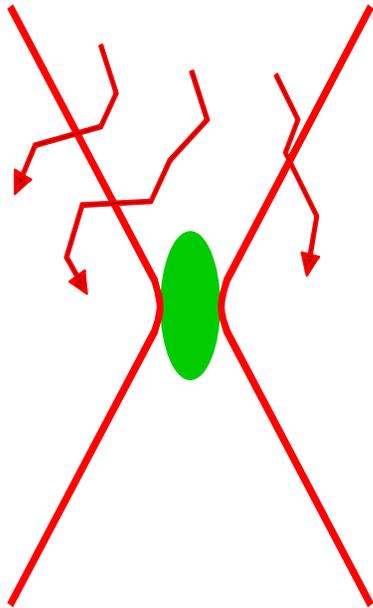


$$\bar{F}_{\max} < 10^8 \text{ photons/s}$$

(taux de répétition laser)

Quelle est la limite en profondeur ?

Principalement limitée par la diffusion et l'absorption du milieu.



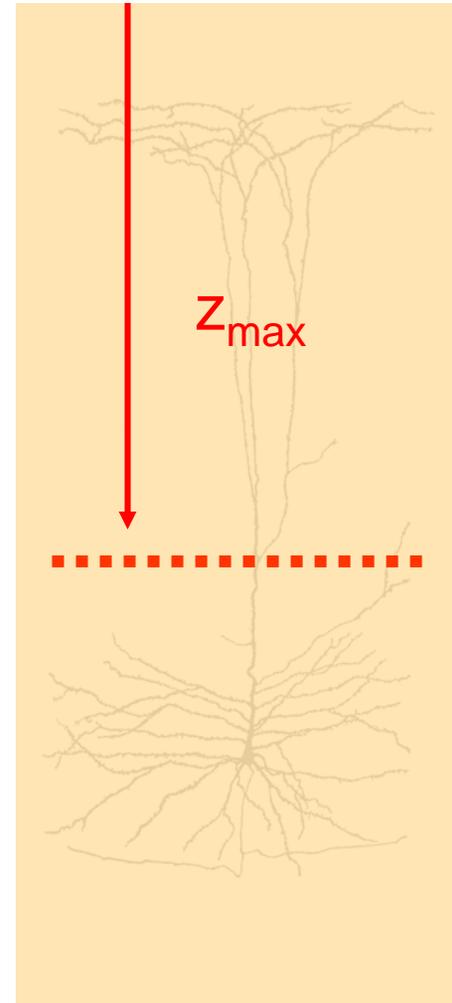
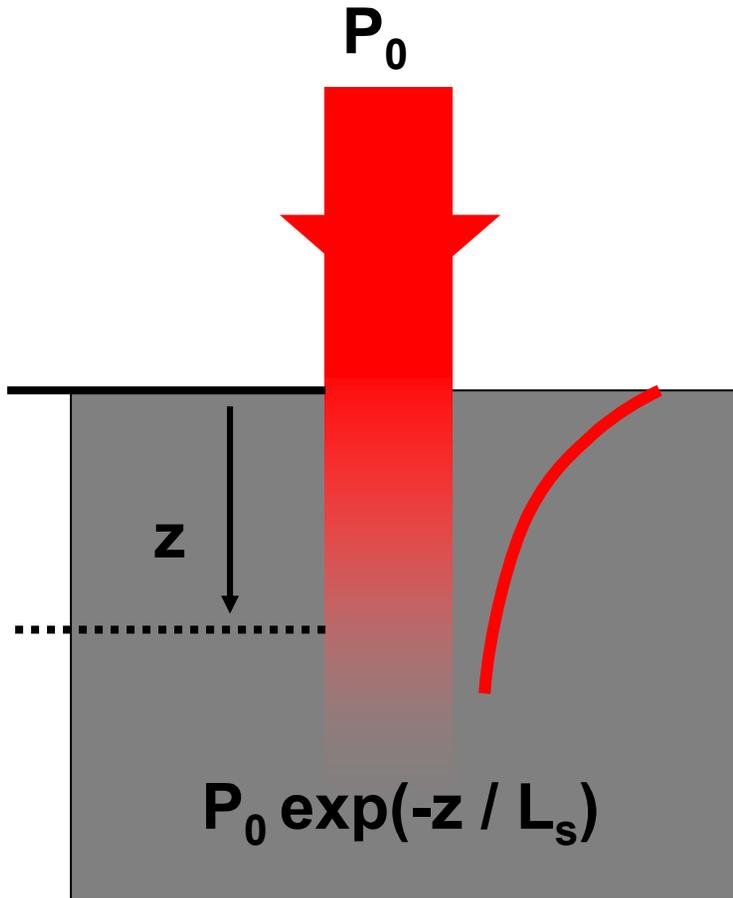
- **photons balistiques** : trajectoire rectiligne

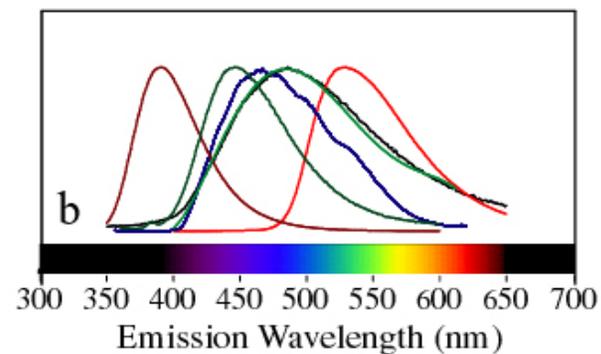
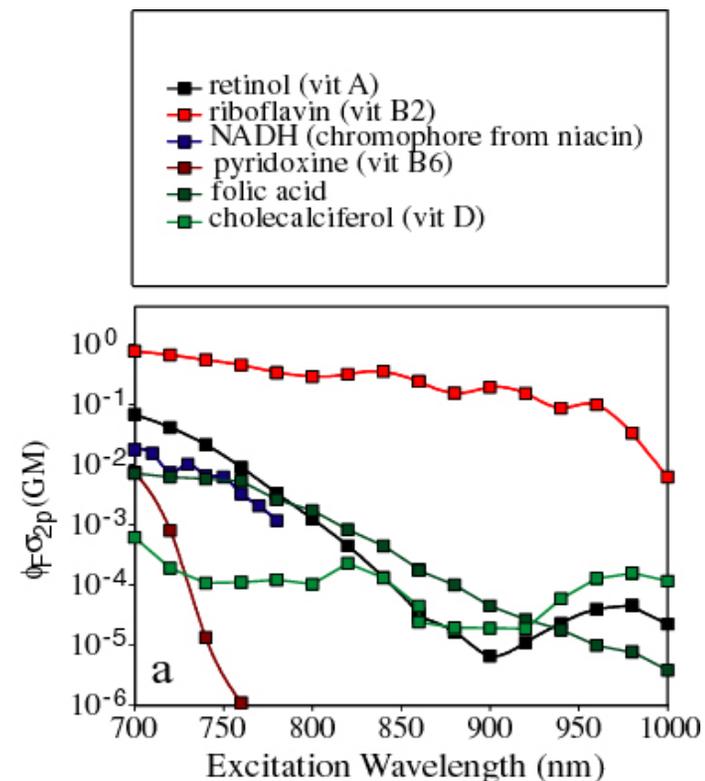
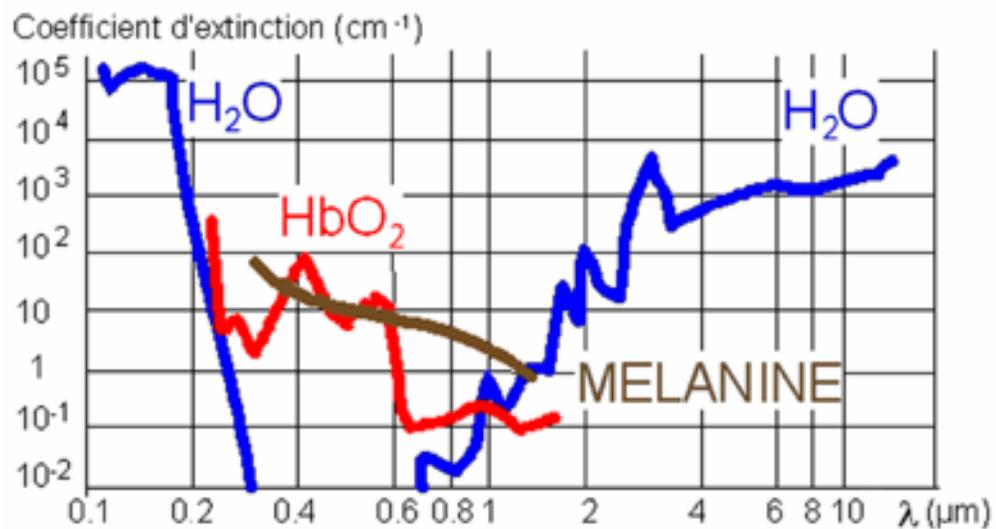


- **photons diffusés** : le photon dévie de sa trajectoire rectiligne

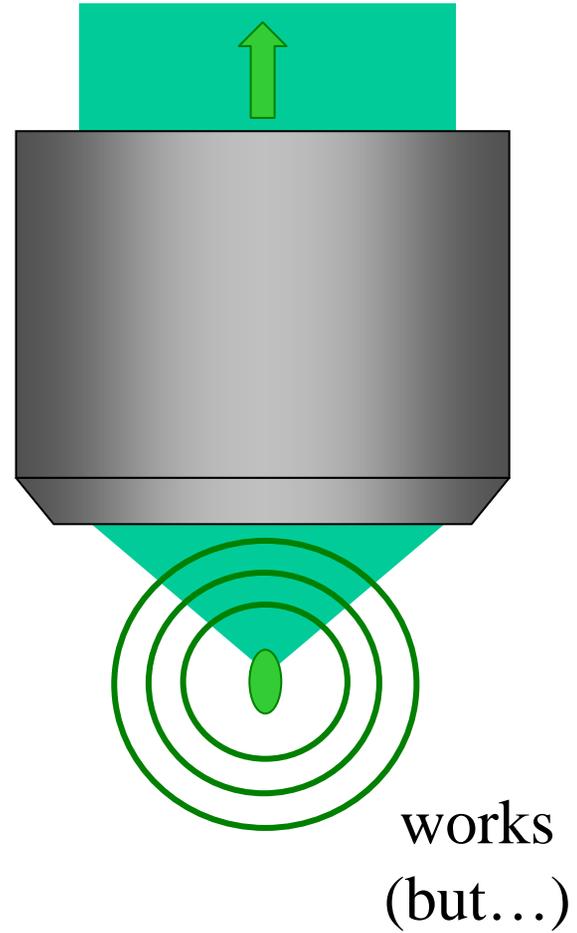
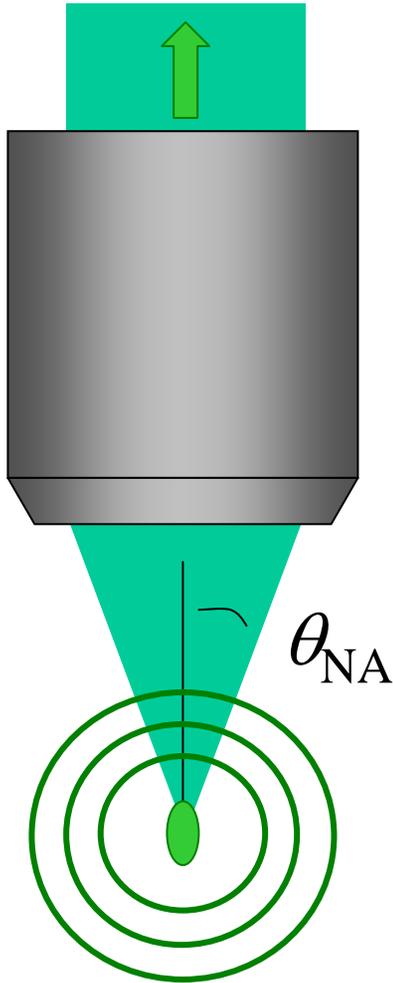


Le nombre de photons balistiques décroît exponentiellement avec la distance

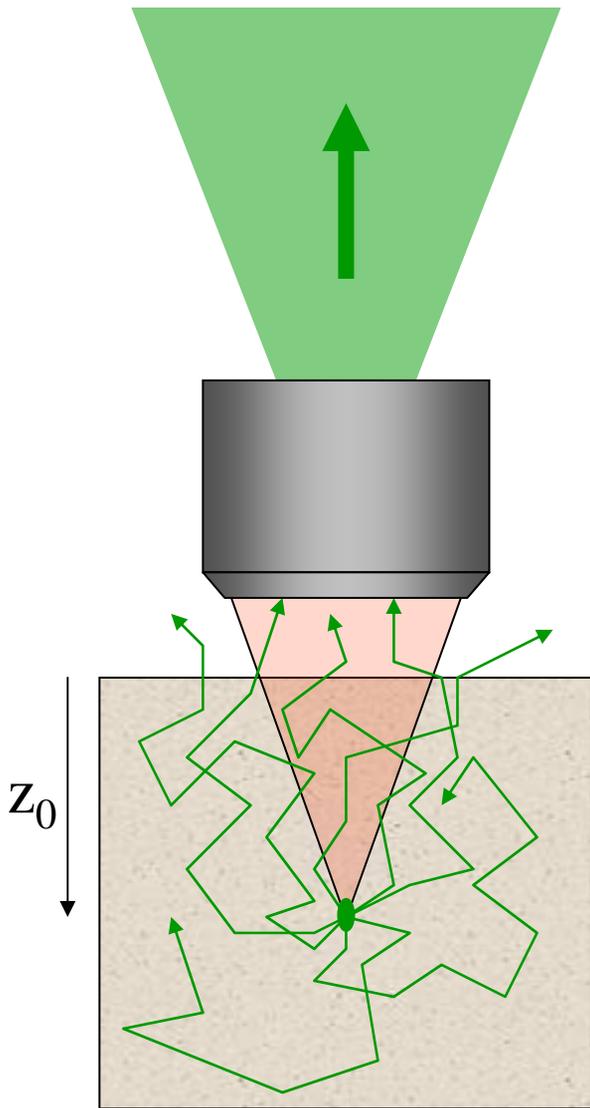




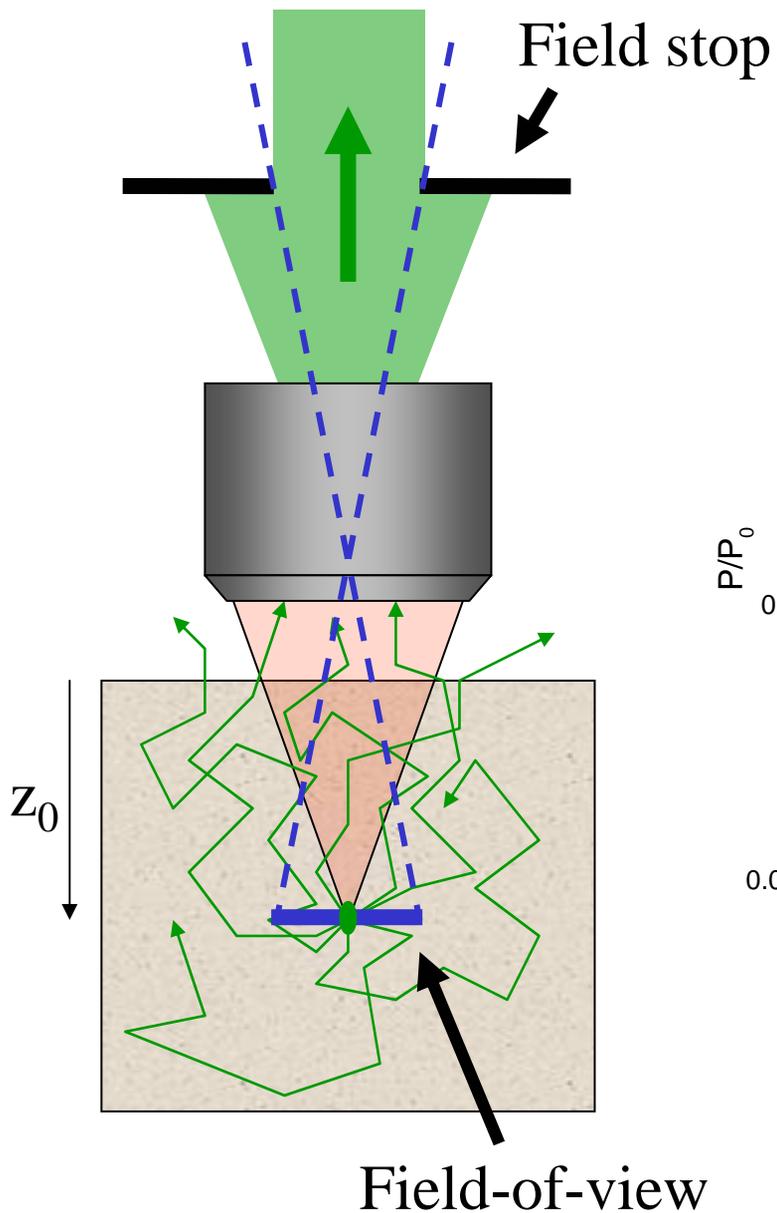
What is the collection efficiency?



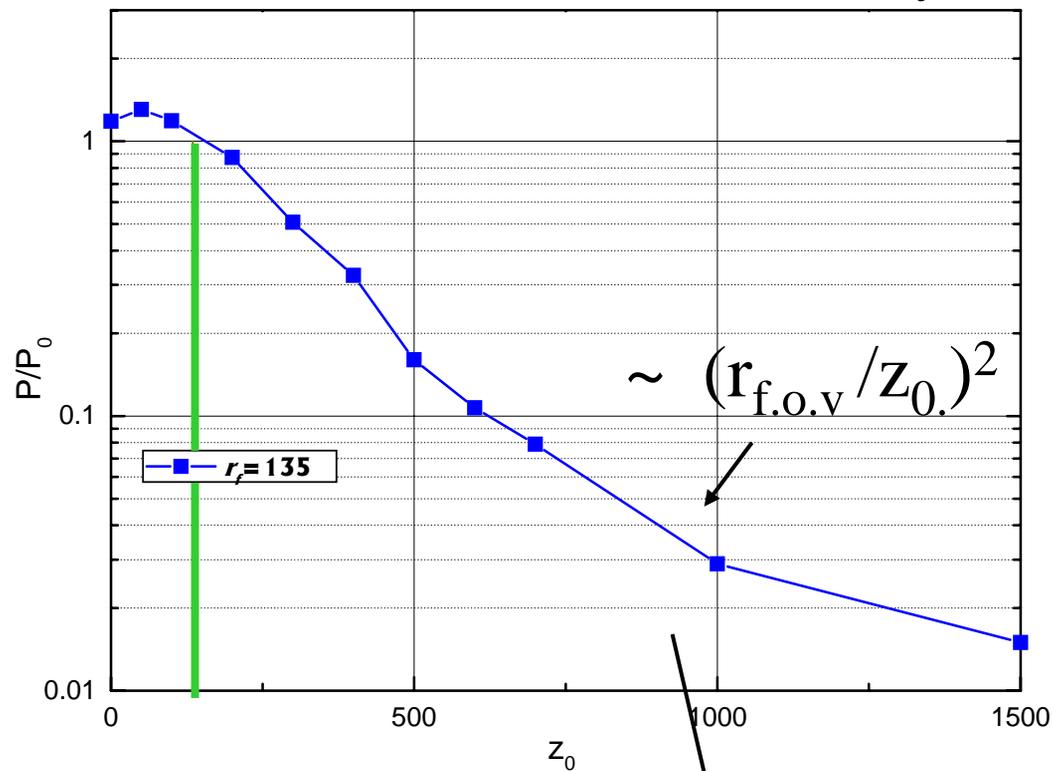
$$\Phi \propto \theta_{NA}^2$$



What if sample is scattering?

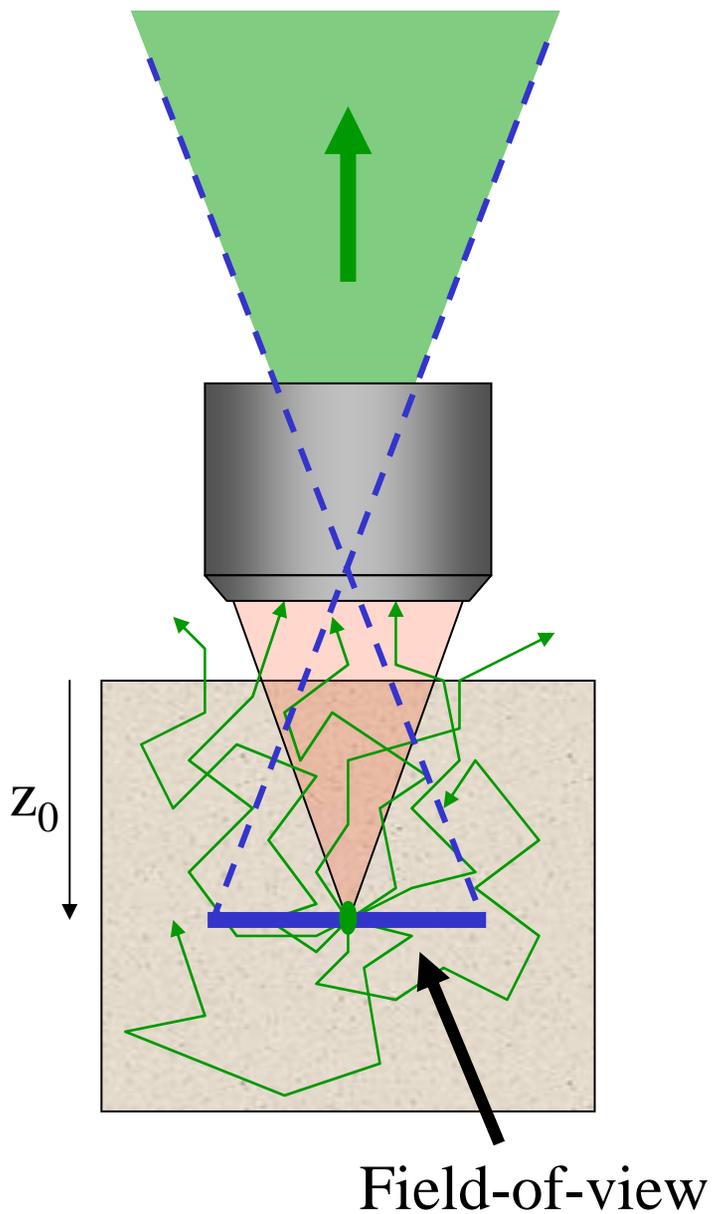


Relative collection efficiency

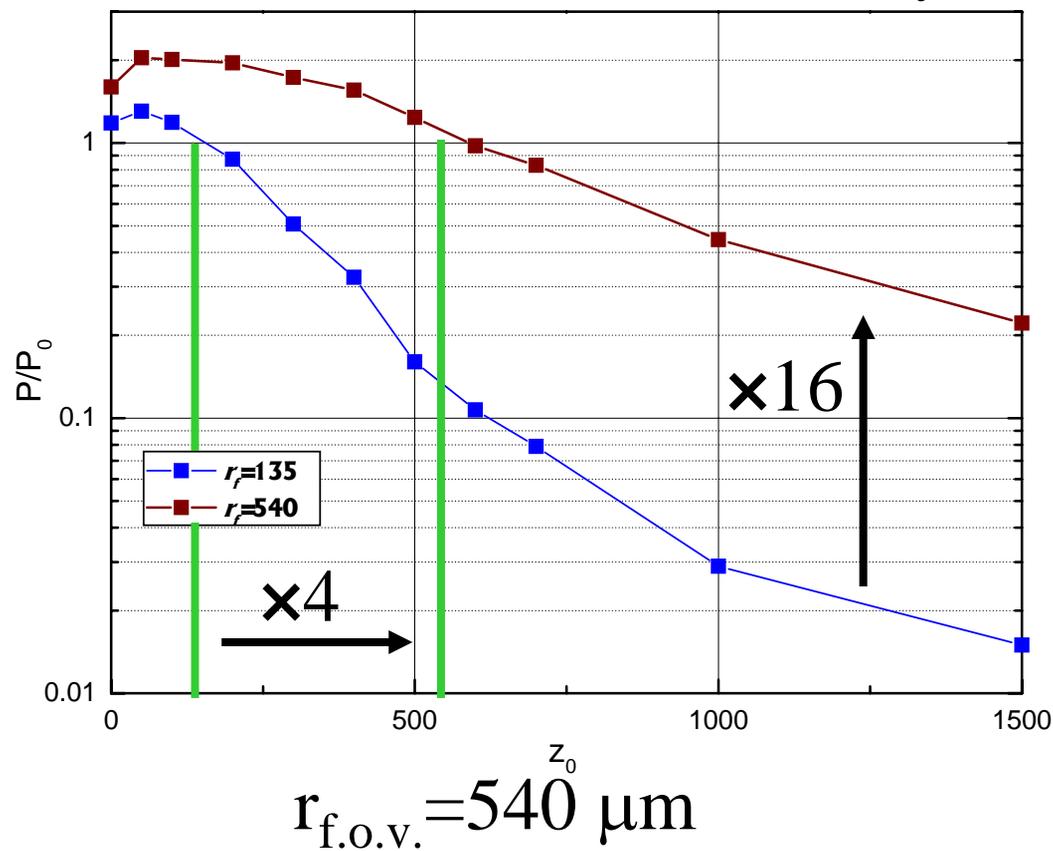


$r_{\text{f.o.v.}} = 135 \mu\text{m}$

$$\Phi \propto \theta_{\text{fov}}^2 \theta_{\text{NA}}^2$$



Relative collection efficiency

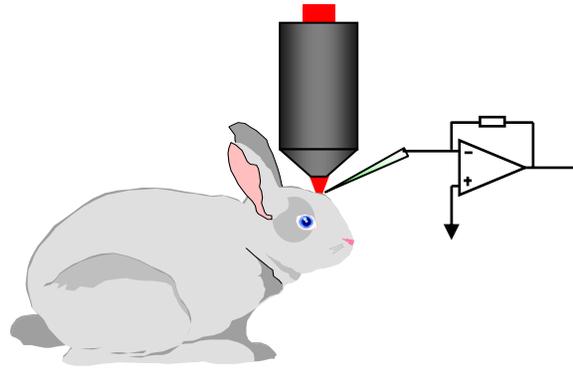


La taille du champ de vue est aussi importante
que l'ouverture numérique

- en général, les objectifs de grande ouverture numérique ont un fort grossissement. Cela veut dire que le champ de vue est plus petit.
- nouveaux objectifs pour la microscopie biphotonique : grande ouverture numérique **et** faible grossissement
Ex: Olympus, x20 et NA~0.95

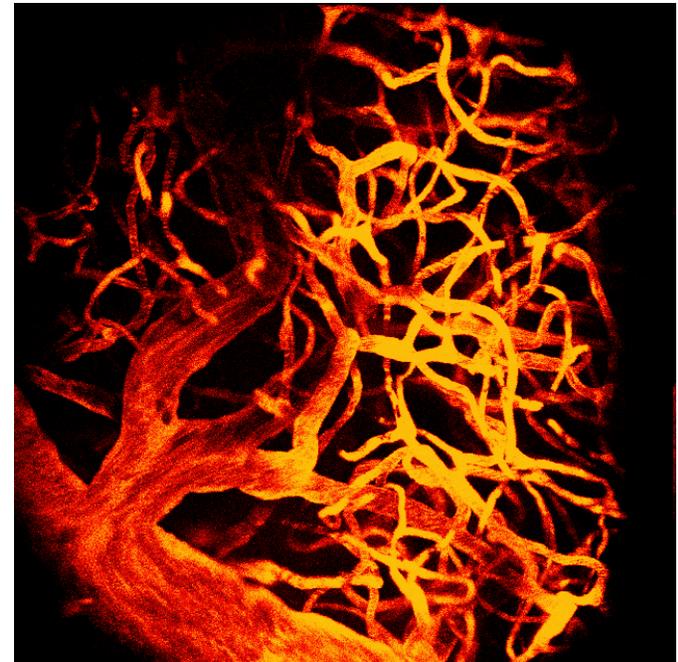
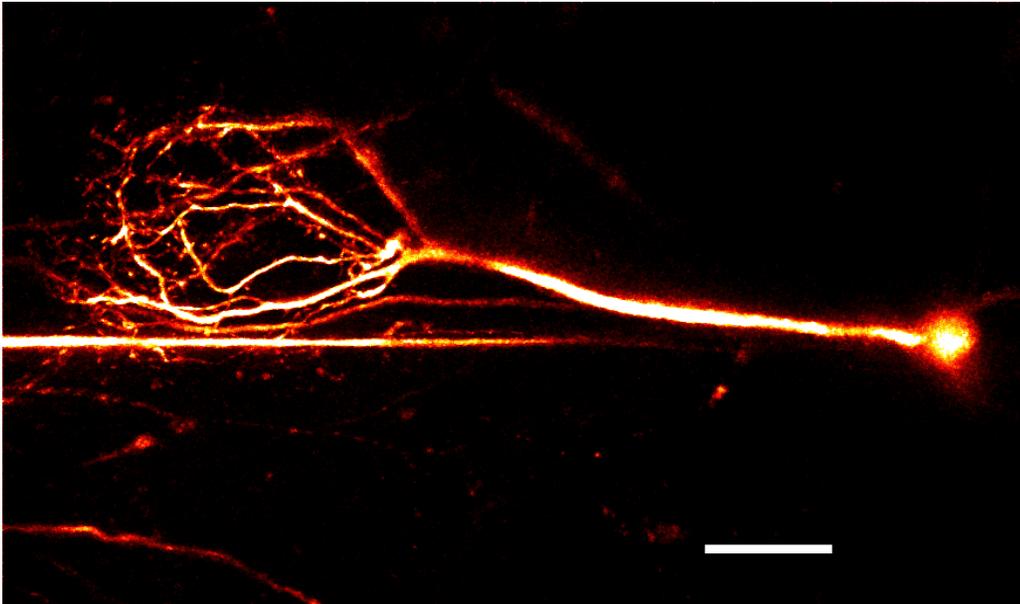
(rappel : pour un microscope à balayage, la taille de la zone observée n'est pas liée au grossissement)

Application: imagerie sur des petits animaux



Mitral cell

Système vasculaire



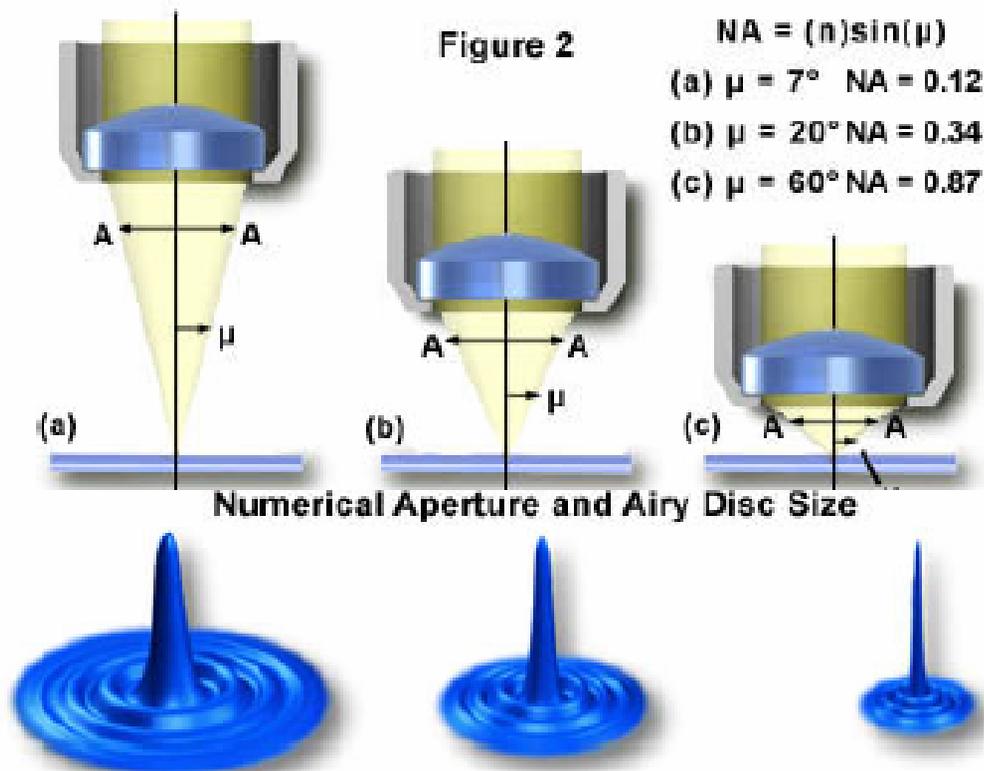
Mouvement d'un embryon de drosophile

[Film des mouvements](#)

Imagerie de molécules uniques

Résolution spatiale vs Localisation

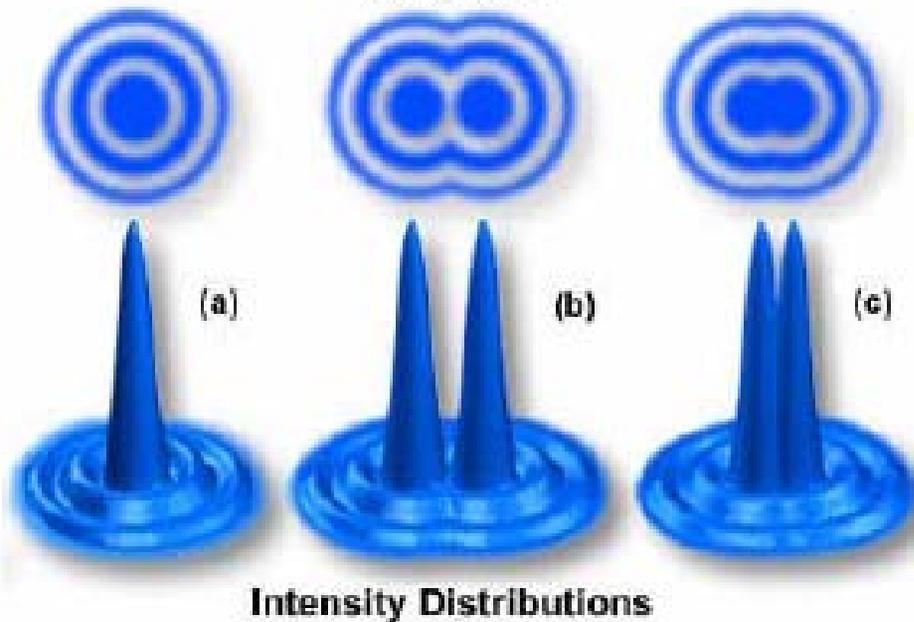
résolution spatiale : déterminée par la précision de pointé du centre de la PSF (réponse impulsionnelle du système optique)



Résolution spatiale

Figure 3

Airy Discs

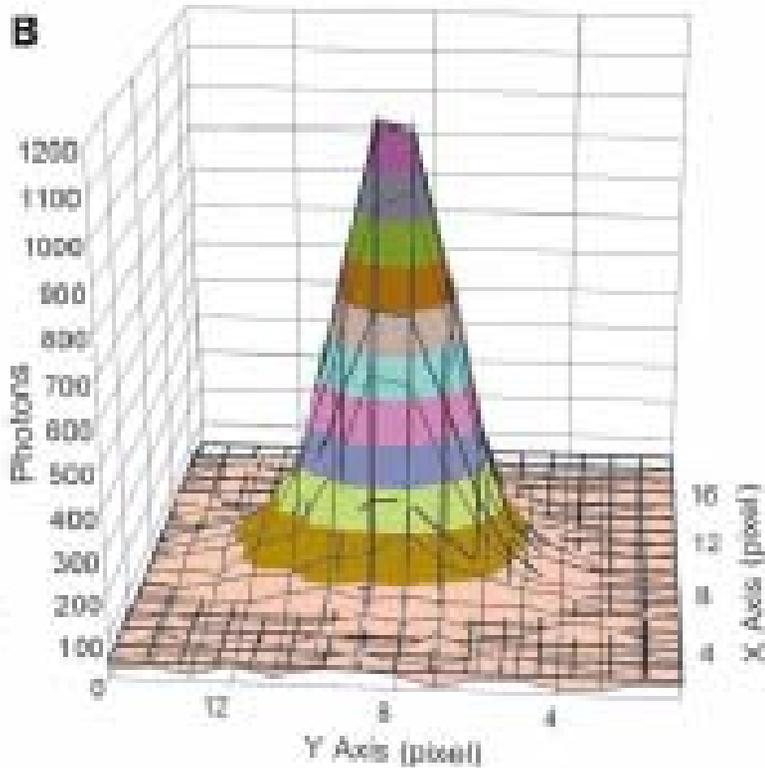


Tache de diffractions ou d'Airy:
 $I(P) = I_{\max} \left(\frac{J_1(ka \sin\theta)}{ka \sin\theta} \right)^2$

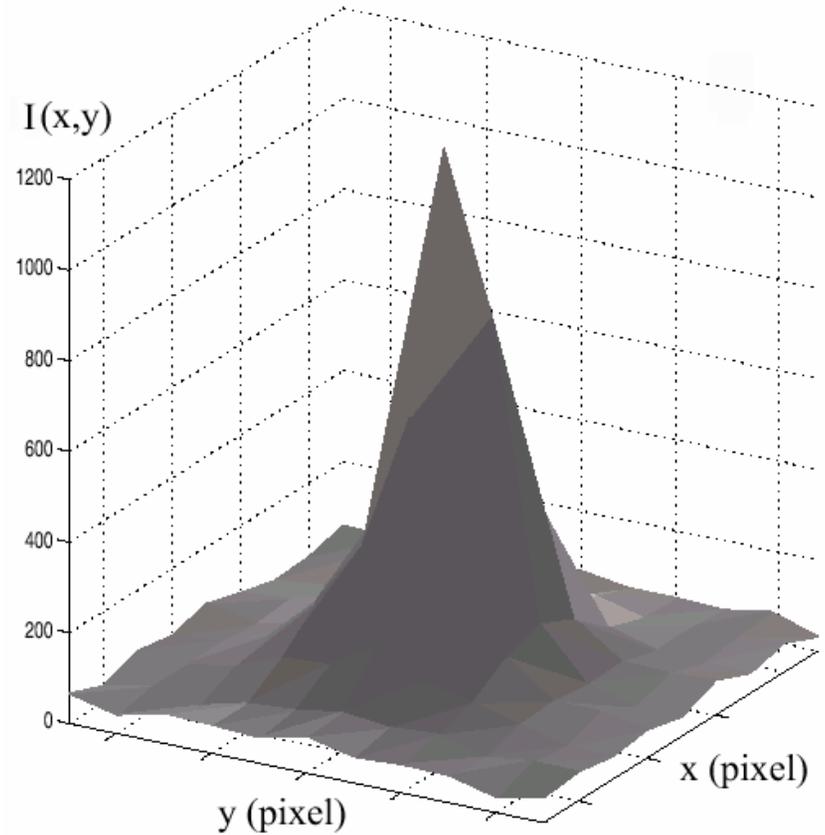
Résolution:
 $R = 1.22 \lambda / 2 NA$

Pour un bon objectif: $NA = 1.4$, $R = 250 \text{ nm}$

PSF expérimentale



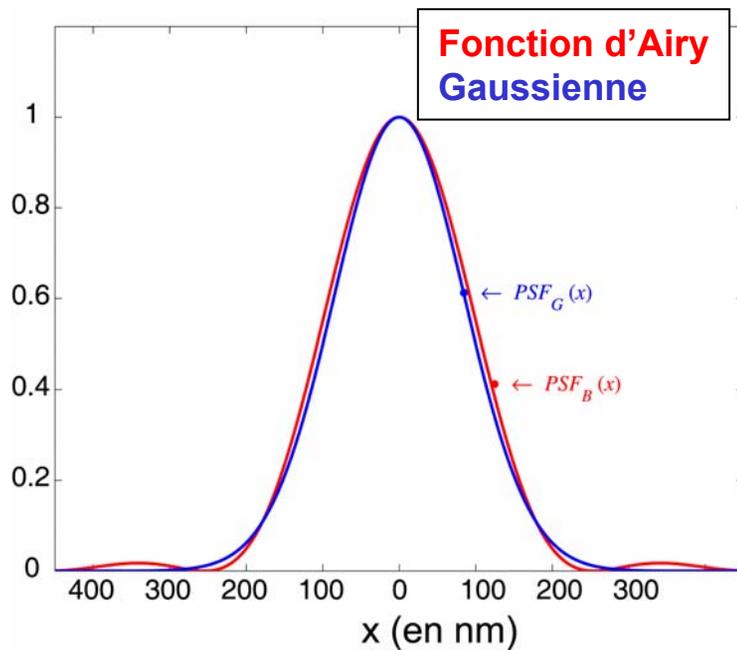
Yildiz et al., taille du pixel: 86 nm



Taille pixel : 216 nm

Réponse impulsionnelle

Une molécule unique peut être considérée comme **une source ponctuelle** pour le système optique. La réponse impulsionnelle (la PSF, point spread function) est une fonction d'Airy, souvent approximée par une courbe gaussienne 2D.



NA = 1.45, $\lambda = 600$ nm

Rayon d'Airy (premier zéro) :

$$R_A \approx \frac{1.22\lambda}{2NA} \approx 255 \text{ nm}$$

Gaussienne 2D :

$$PSF_G = A \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{2s^2}\right)$$

$$\text{où } s \approx R_A/3$$

Localisation

La précision du pointé dépend de la capacité à déterminer la position du pic

De manière générale, la précision σ dépend de :

- nombre de photons collecté N
- taille a des pixels
- niveau de bruit b

$$\sigma \approx \sqrt{\frac{s^2}{N} + \frac{a^2}{12} + \frac{8\pi s^2 \sigma_B^2}{a^2 N^2}}$$

Dans le cas d'un signal dominé par le bruit de photons:

$$\sigma \approx \frac{\lambda/2}{\sqrt{N}}$$

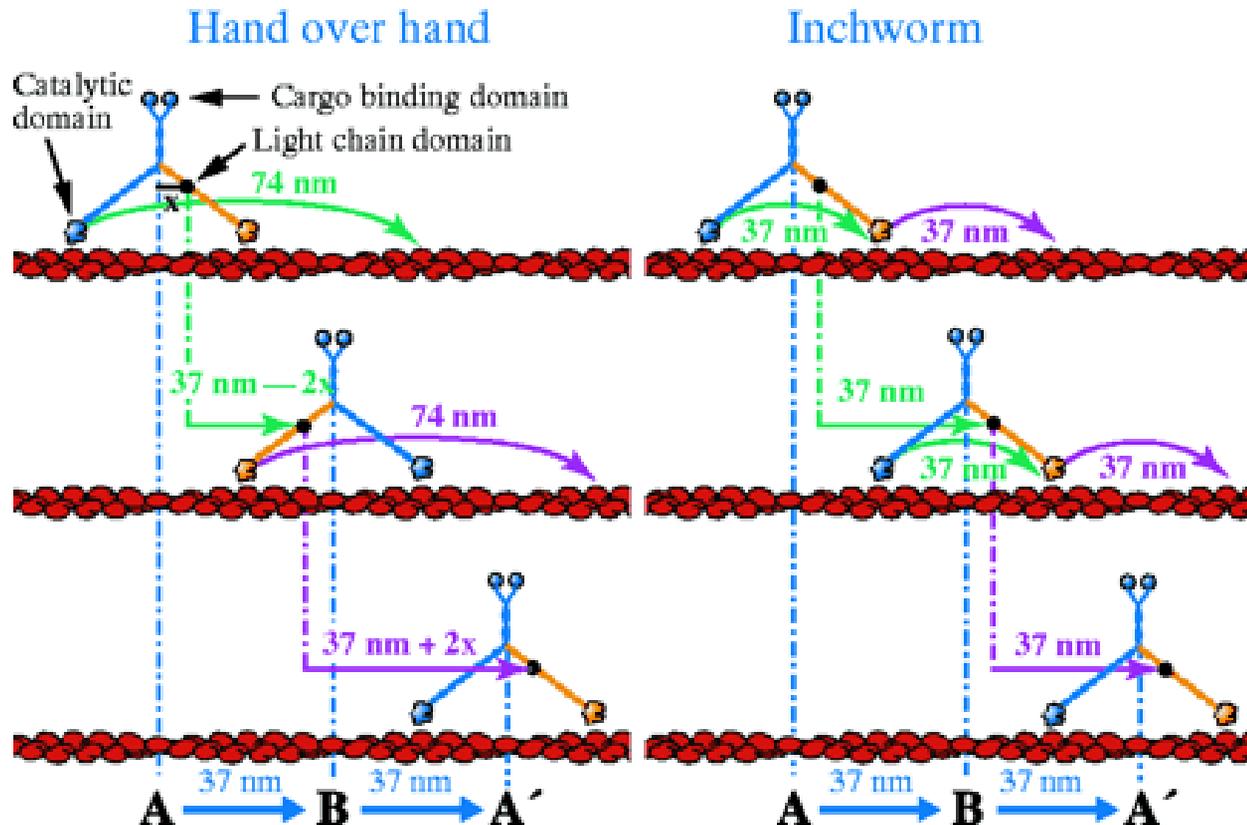
Explication qualitative

On imagine que le point d'arrivée X_i de chaque photon peut être localisé sur le détecteur avec une précision infinie (pixel infiniment petit). On collecte N photons dont la distribution des positions (X_i) correspond à la PSF (de position moyenne m et de largeur σ).

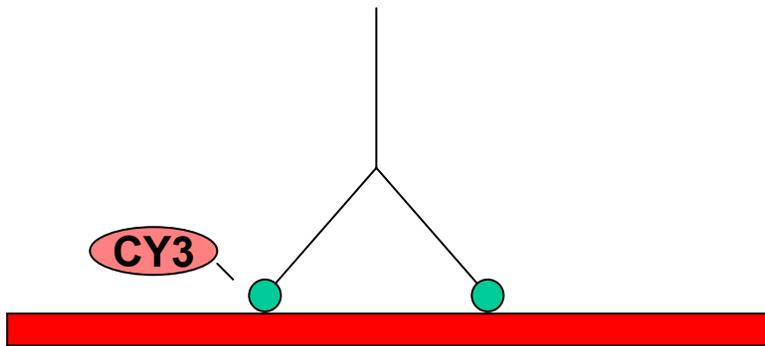
$$\begin{aligned}\bar{X} &= \frac{\sum X_i}{N} \approx \frac{Nm \pm \sqrt{N}\sigma}{N} \\ &\approx m \pm \frac{\sigma}{\sqrt{N}}\end{aligned}$$

On a un **estimateur** de la position moyenne.

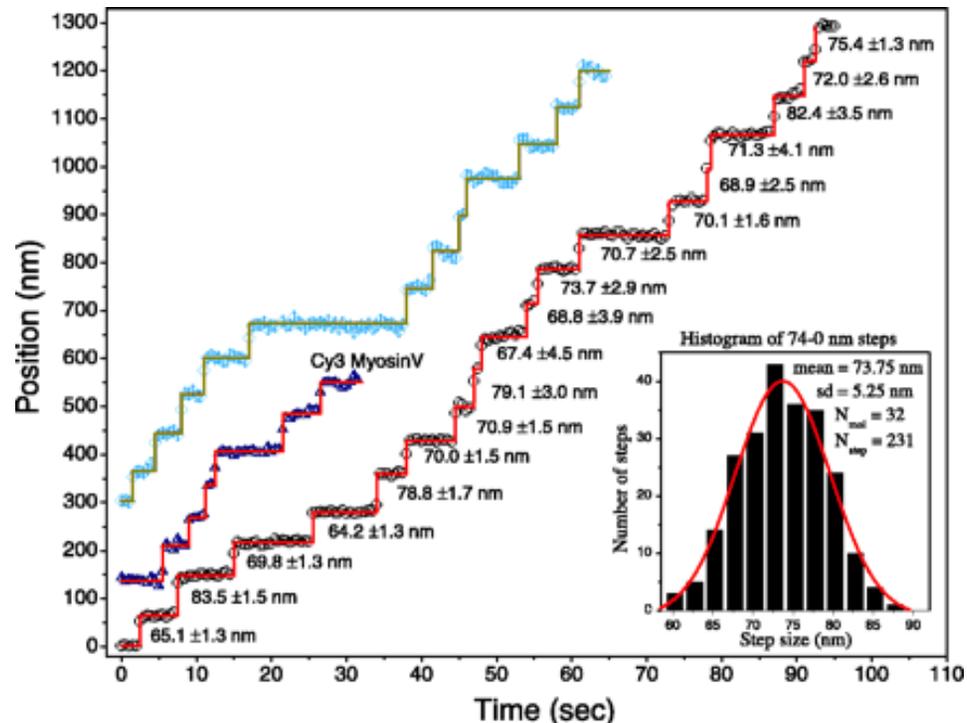
Mouvement d'un moteur moléculaire : la myosin V



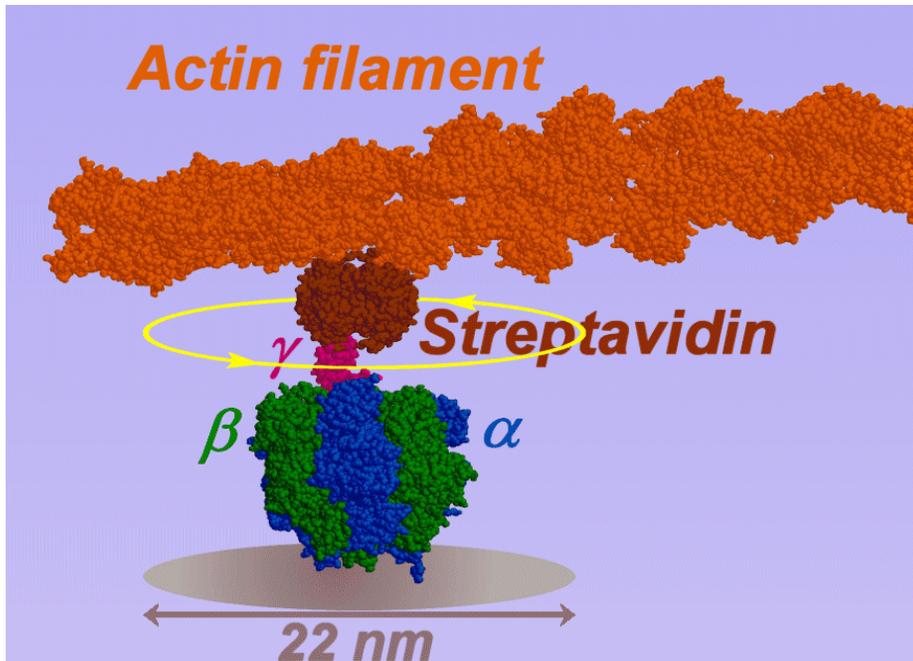
Myosin V Walks Hand-Over-Hand: Single Fluorophore Imaging with 1.5-nm Localization: A. Yildiz et al., *Science* 300, 2061-2065 (2003).



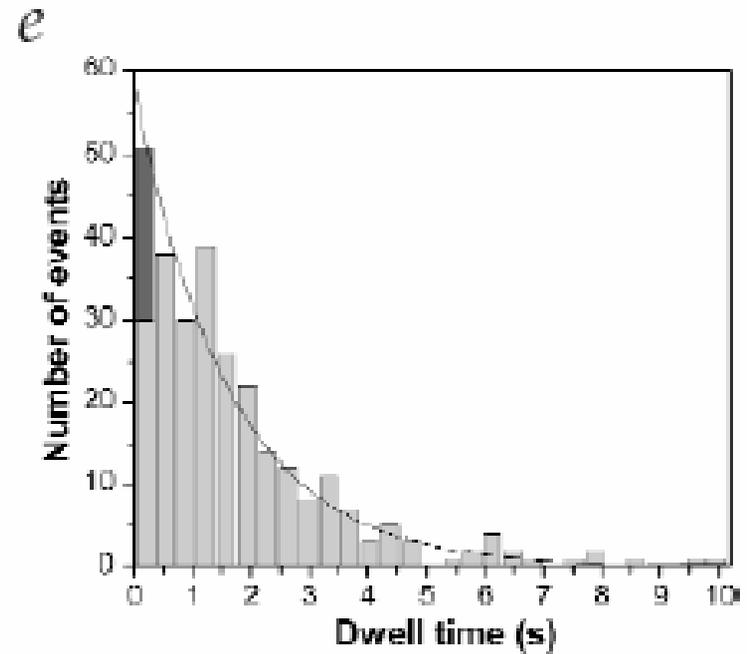
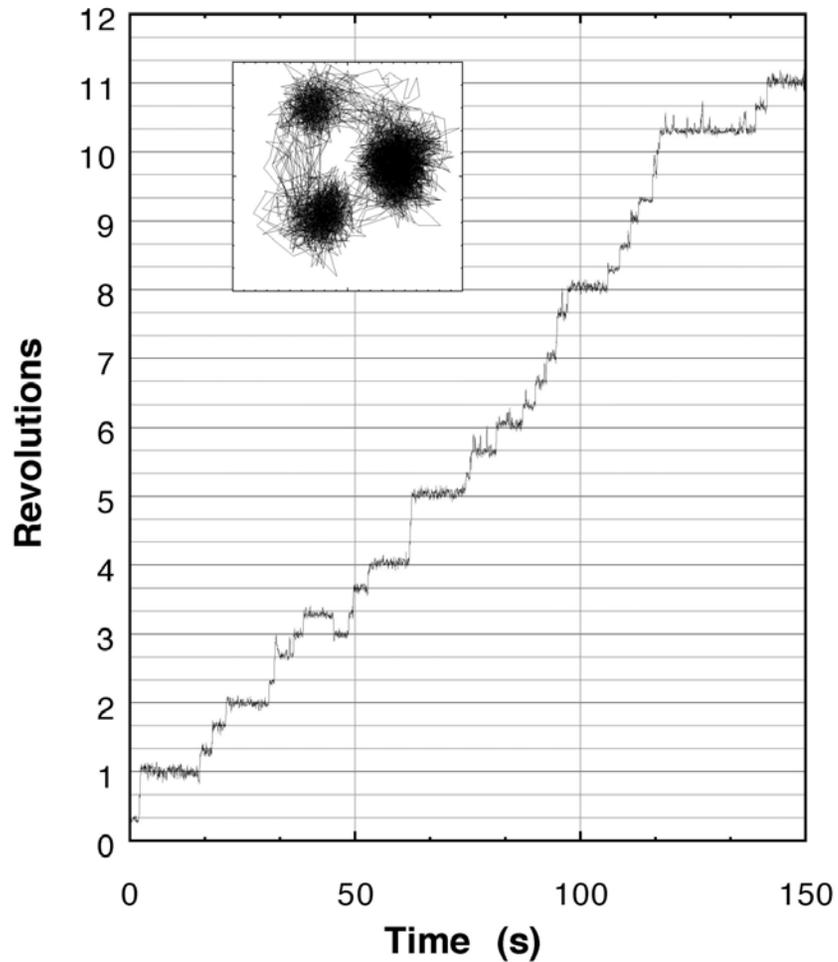
Déplacement de la myosin



Rotation de la F1ATPase



Le moteur tourne avec des pas de 120°



Mécanisme de synthèse de l'ATP

Mécanisme de la F₀F₁ATPase

La F₀F₁ ATPase convertit une différence de potentielle chimique

10-12 protons pour produire 3 ATP

Efficacité du moteur rotatif ~ 100 %