

Microscopies optiques

Plan de la présentation

Prérequis

- Optique géométrique
- Diffraction

Sommaire:

- Introduction (remarques étymologiques, types de microscopies, échelle de taille)
- Système œil-loupe
- Microscope à deux lentilles
- Microscope à contraste de phase
- Microscopie à fluorescence
 - microscope confocal
 - Superrésolution PALM
- Autres types de microscope : Microscope en champ proche
- Conclusions

Microscopie: étymologie, types de microscopies

Microscopie: Du grec ancien mikros et skopein signifiant "petit" et "examiner" (étymologiquement l'observation d'objets invisibles à l'oeil nu).

Microscopie: étymologie, types de microscopies

Microscopie: Du grec ancien mikros et skopein signifiant "petit" et "examiner" (étymologiquement l'observation d'objets invisibles à l'oeil nu).

Pouvoir de résolution: Ce besoin vient de la limite de résolution de l'œil. **ODG:**
 $\theta_m = 3 \cdot 10^{-4} \text{ rad}$ (1 mm pour un objet à 3 mètres de distance).

Microscopie: étymologie, types de microscopies

Microscopie: Du grec ancien mikros et skopein signifiant "petit" et "examiner" (étymologiquement l'observation d'objets invisibles à l'oeil nu).

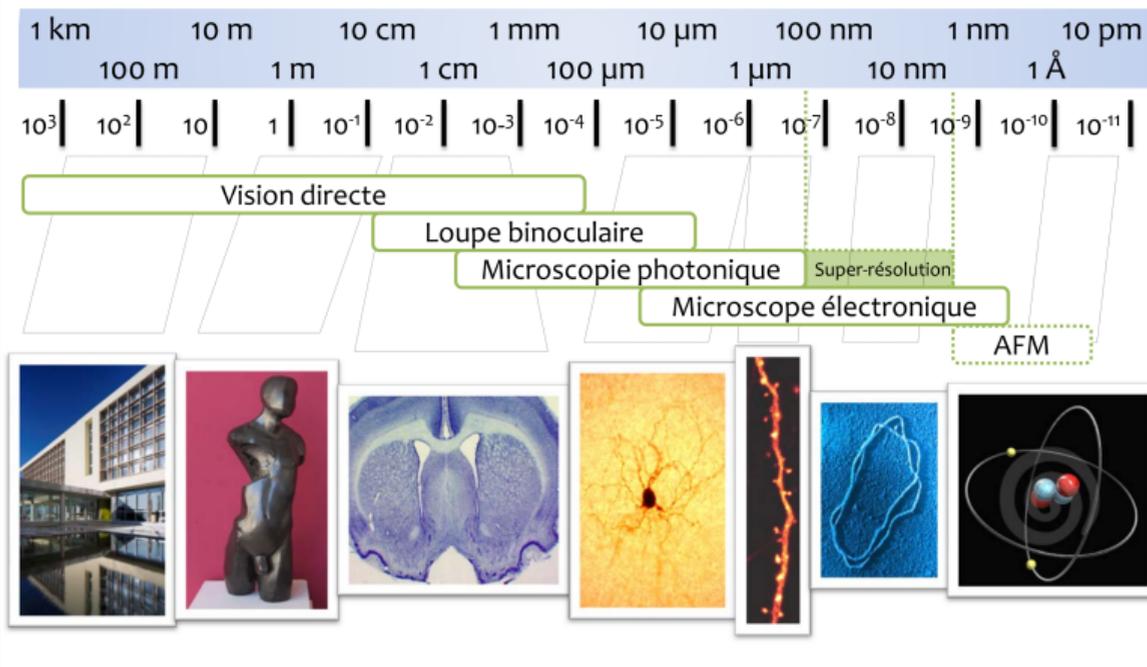
Pouvoir de résolution: Ce besoin vient de la limite de résolution de l'œil. **ODG:**
 $\theta_m = 3 \cdot 10^{-4} \text{ rad}$ (1 mm pour un objet à 3 mètres de distance).

Types de microscopies : On en distingue principalement trois types

- Microscopie **optique** (faisceau lumineux interagit avec l'objet à observer et est recueilli par un détecteur)
- Microscopie **électronique** (même principe que l'optique mais avec un faisceau d'électrons)
- Microscopie **à sonde locale** (un capteur sonde directement la surface de l'objet)

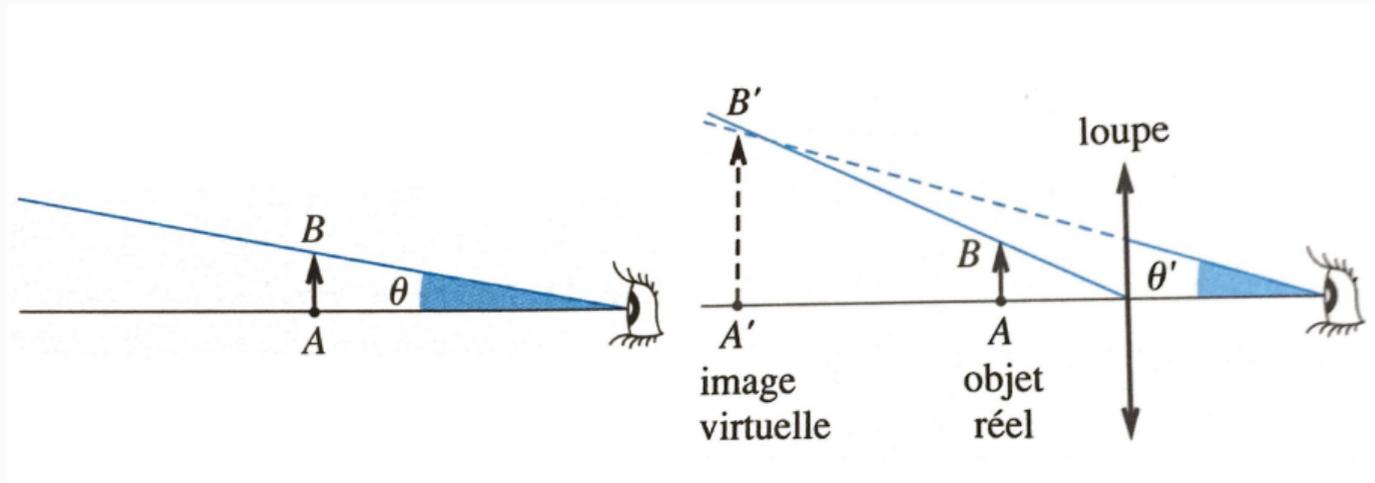
Microscopie: échelle de taille

Ordres de grandeur

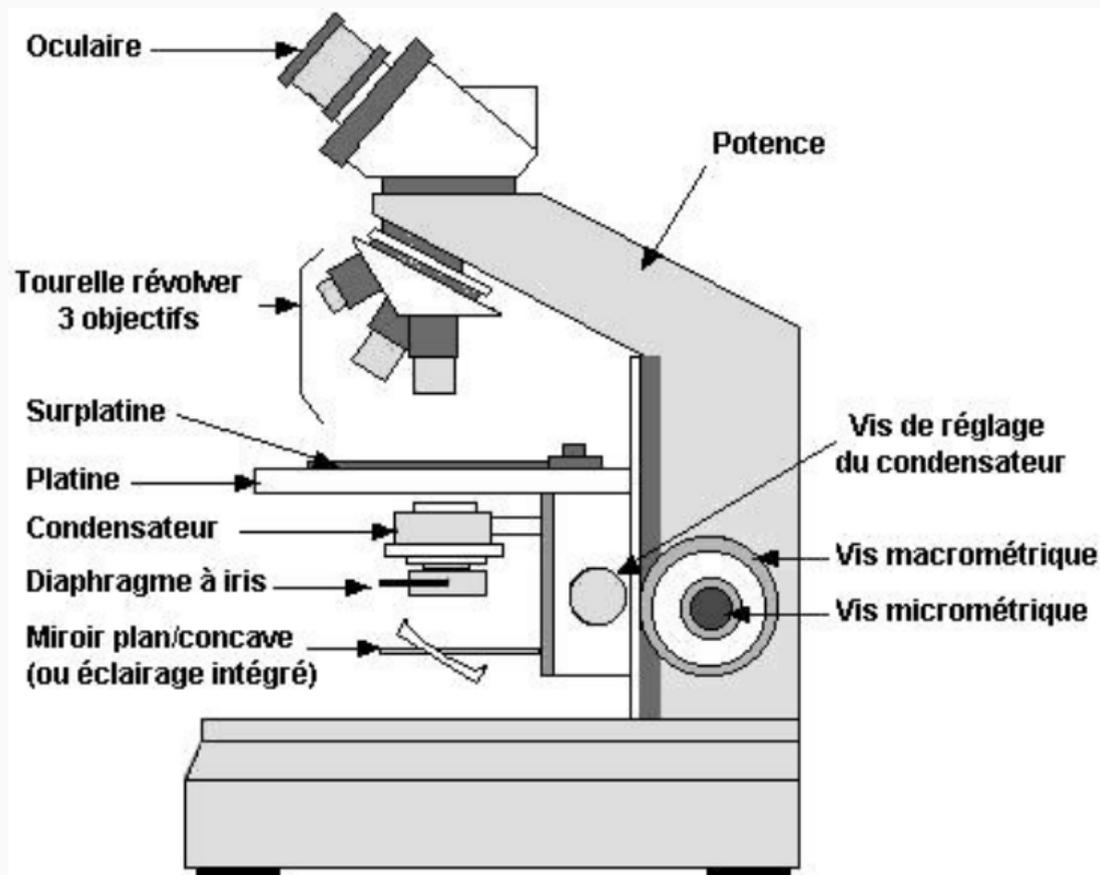


Systeme œil-loupe

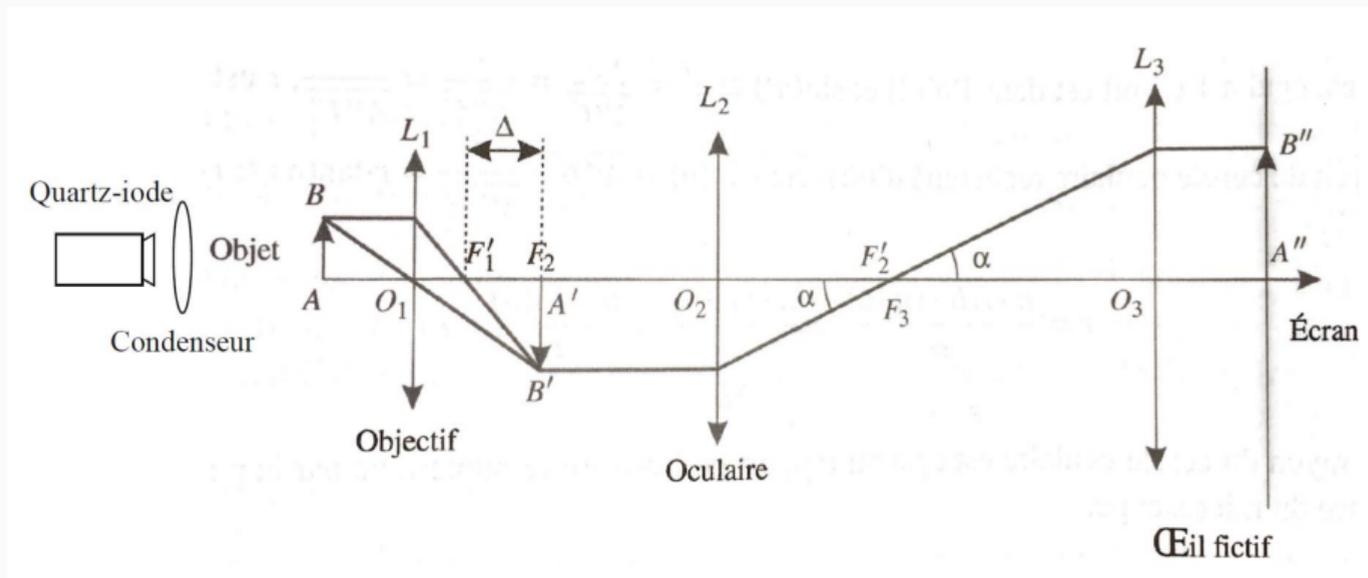
Système œil-loupe



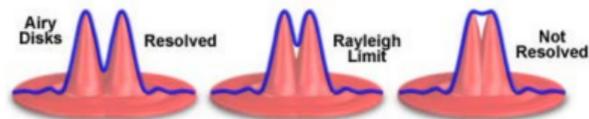
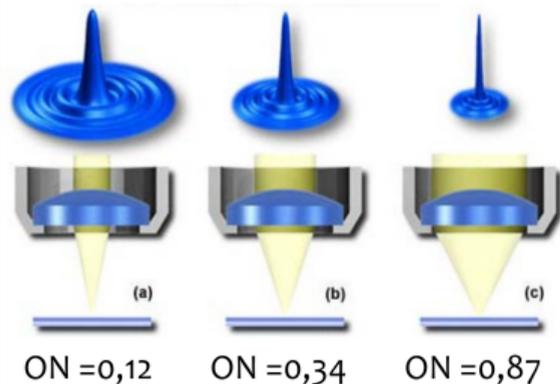
Microscope commercial



Microscope à deux lentilles: expérience



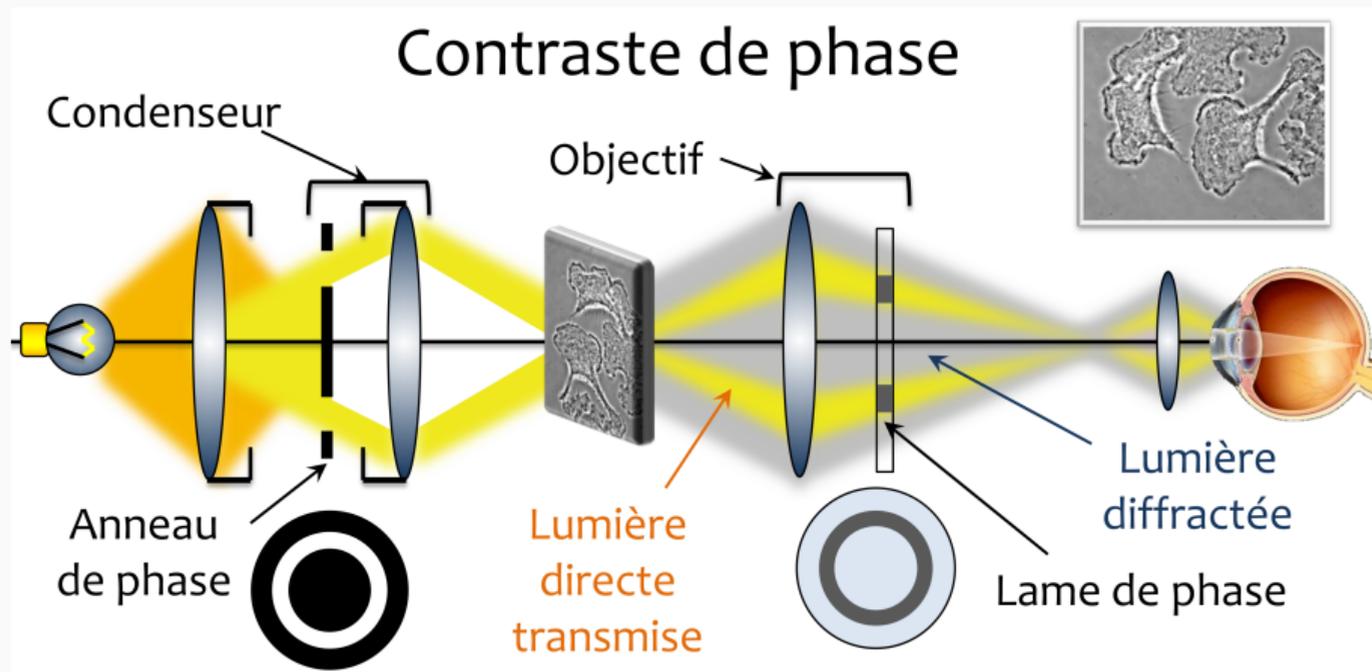
Grossissement et ouverture numérique



La résolution dépend de l'ON
et non du grossissement

A 488nm	5X sec ON= 0.15	10X sec ON= 0.3	20X sec ON=0.8	40X huile ON=1.3	60X eau ON=1.2	60X huile ON=1.4
Résolution XY en μm	1.984	0.992	0.372	<u>0.229</u>	<u>0.248</u>	0.212

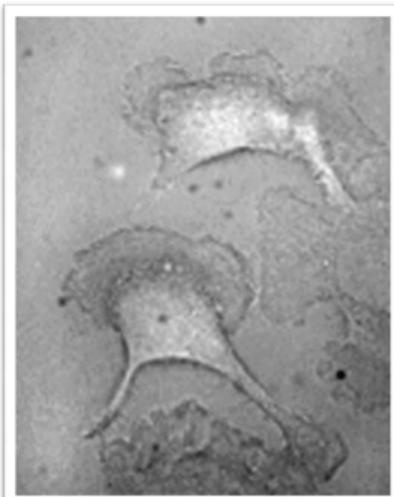
Microscope à contraste de phase



Microscope à contraste de phase

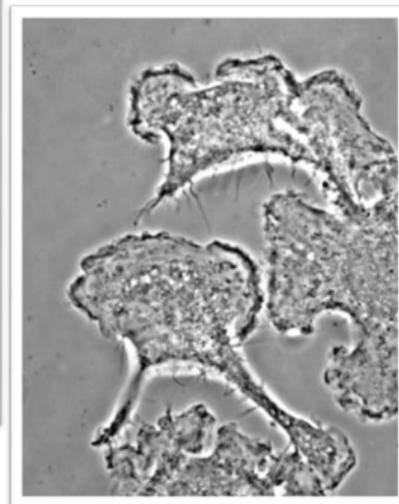
Le contraste de phase permet de **visualiser des échantillons transparents.**

Illumination standard



Bright field

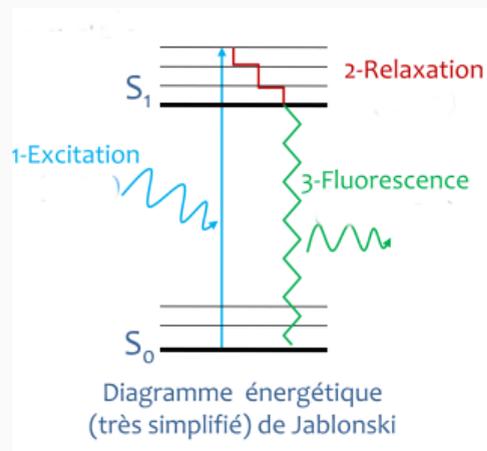
Contraste de phase



Phase contrast

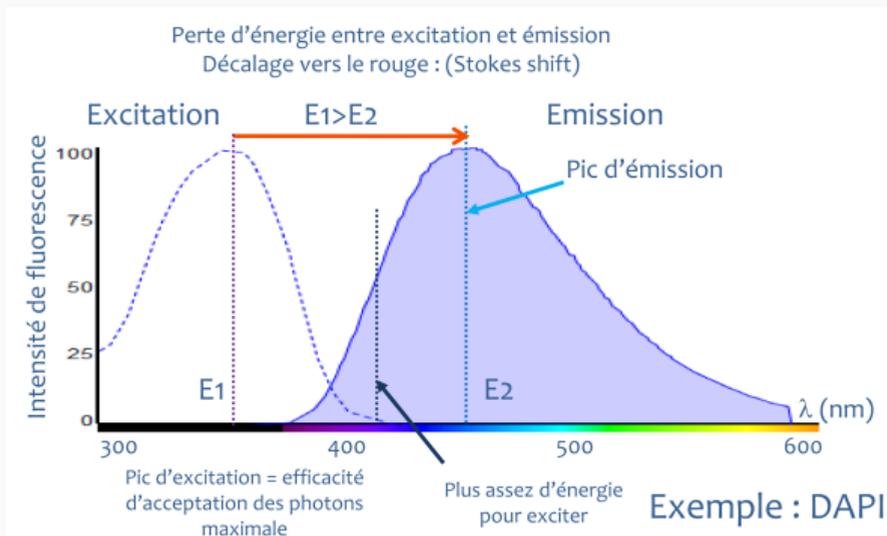
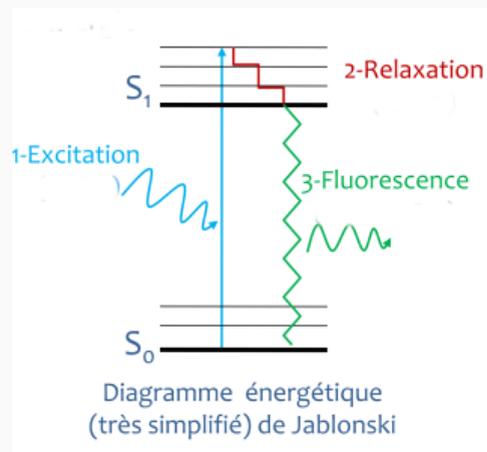
Fluorescence: principe

Molécule fluorescente = **Fluorophore**

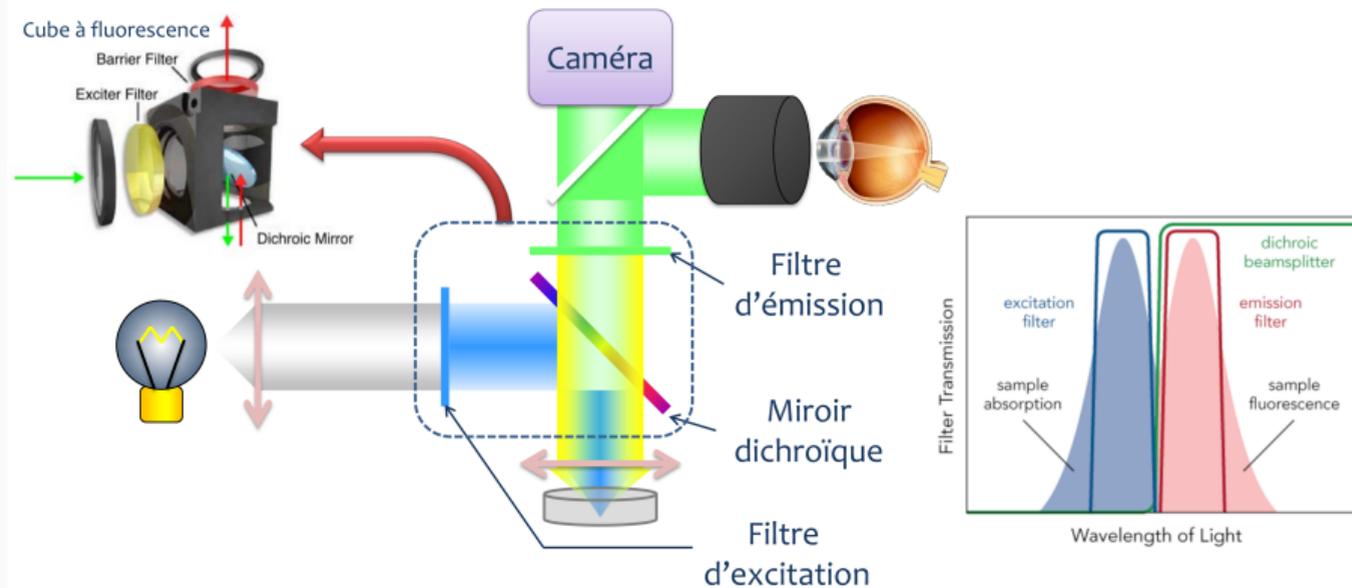


Fluorescence: principe

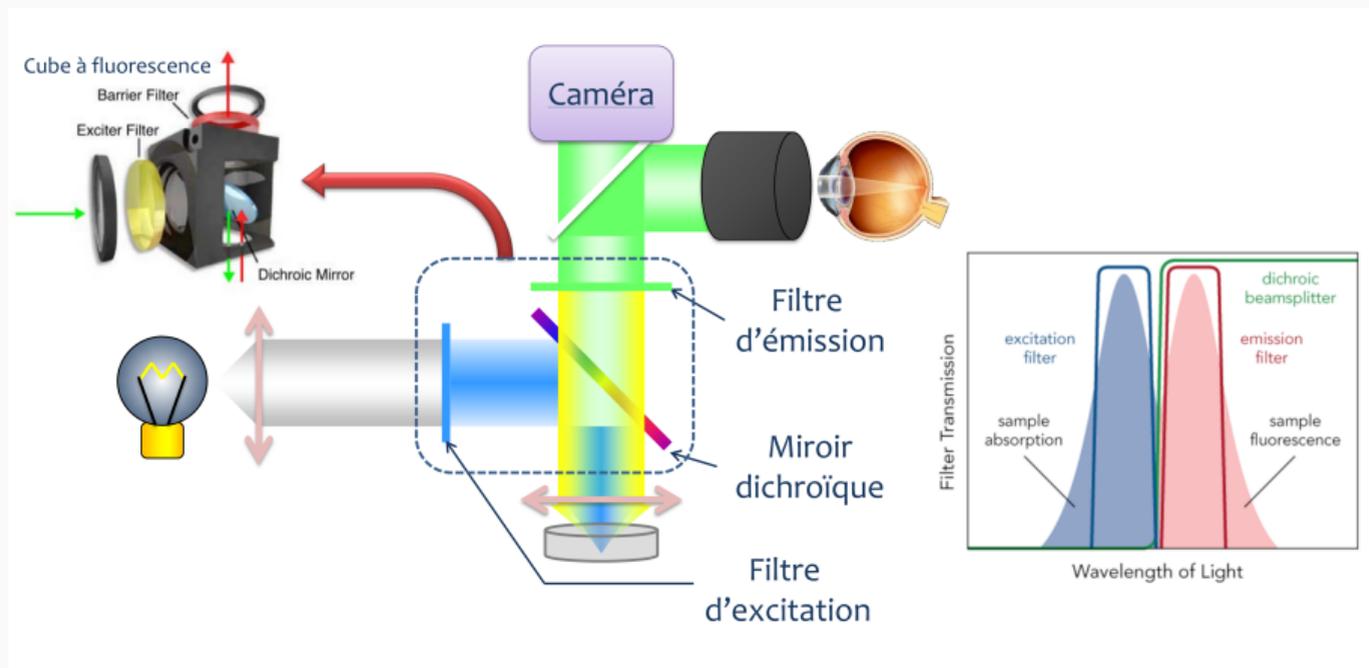
Molécule fluorescente = **Fluorophore**



Microscopie à fluorescence



Microscopie à fluorescence



L'importance de cette technique est **liée à** la découverte et les applications de **la protéine fluorescente verte (GFP)**.

Microscope confocal

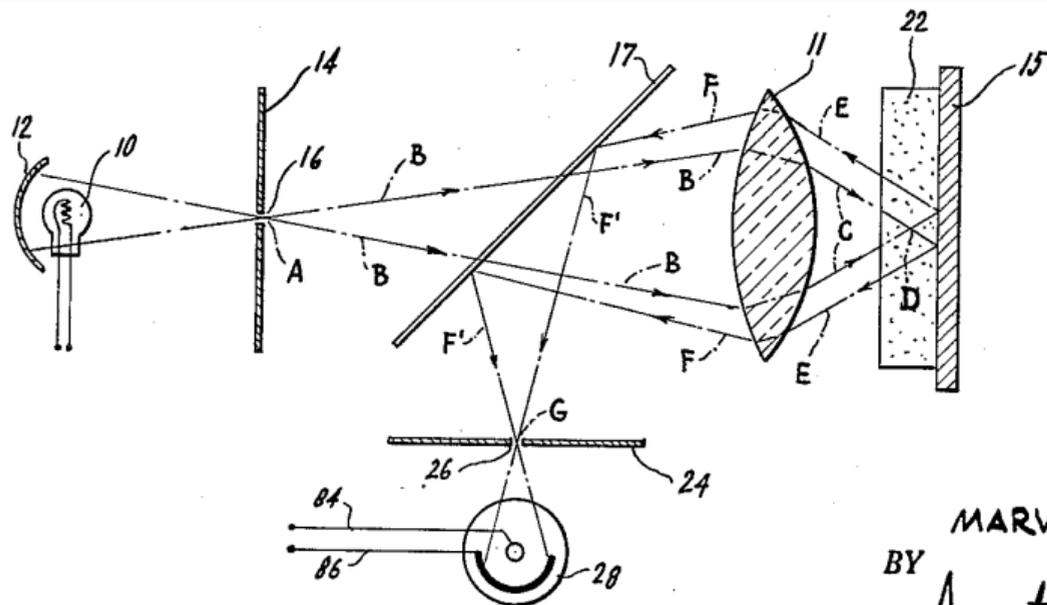


FIG. 3.

INVENTOR.

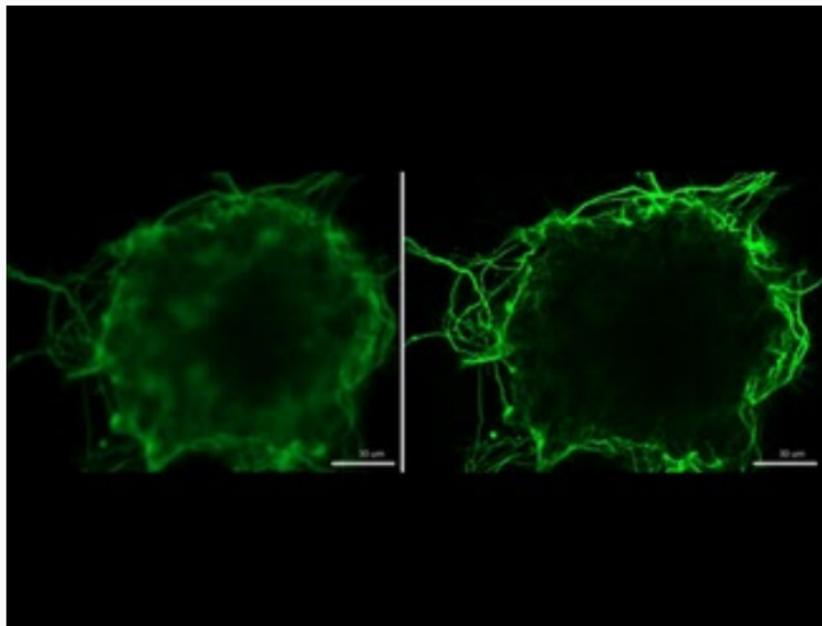
MARVIN MINSKY

BY

Amster & Levy
ATTORNEYS

Microscope confocal

La microscopie confocale permet de **visualiser des tissus profonds**.

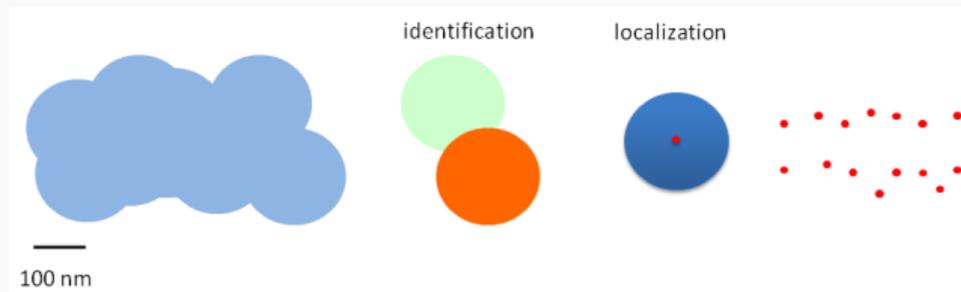


Superrésolution PALM

On utilise des molécules photoactivables (qui deviennent des fluorophores sous l'effet d'un faisceau de lumière).

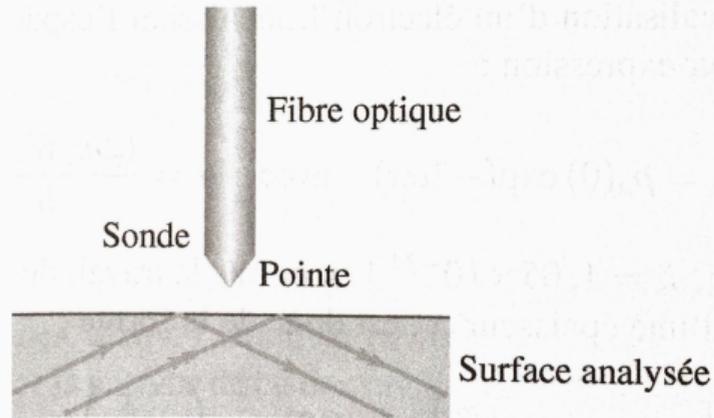
Superrésolution PALM

On utilise des molécules photoactivables (qui deviennent des fluorophores sous l'effet d'un faisceau de lumière).

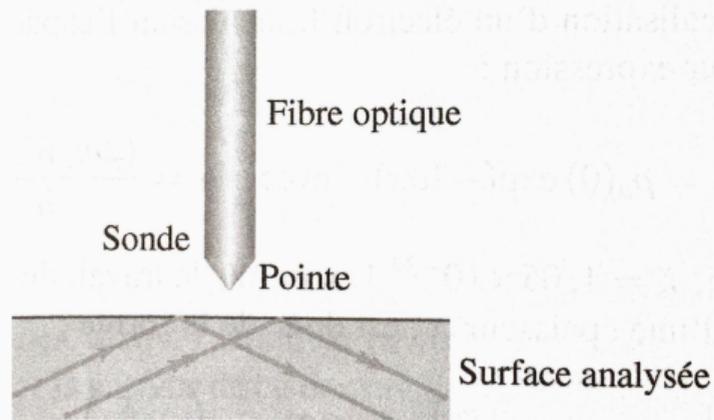


La PALM est une microscopie à fluorescence en champ large permettant de **dépasser la limite de diffraction**.

Microscopie à champ proche

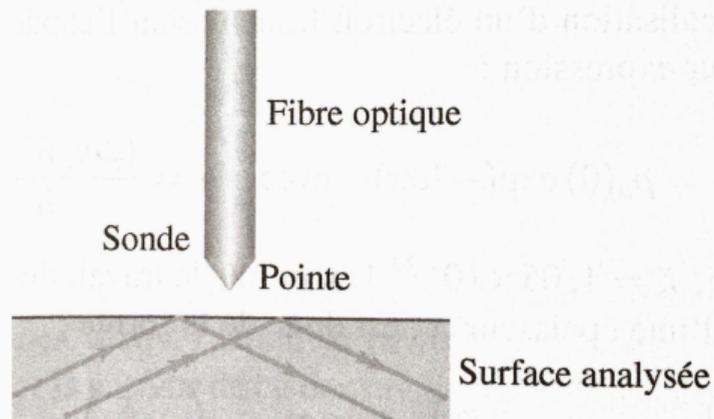


Microscopie à champ proche



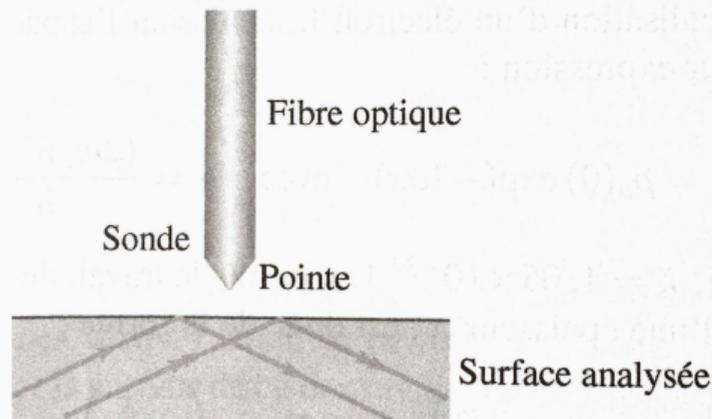
- On place le détecteur de lumière très proche de la surface.

Microscopie à champ proche



- On place le détecteur de lumière très proche de la surface.
- On observe l'onde évanescente et non pas l'onde dispersée.

Microscopie à champ proche



- On place le détecteur de lumière très proche de la surface.
- On observe l'onde évanescente et non pas l'onde dispersée.
- peut donc visualiser des détails plus petits que la longueur d'onde de la lumière (**dépasser la limite de diffraction**).

Resume et conclusions

- Principe de la microscopie optique (système œil-loupe, microscope à deux lentilles)

Resume et conclusions

- Principe de la microscopie optique (système œil-loupe, microscope à deux lentilles)
- Techniques de microscopie optique qui ont révolutionné la biologie:

Resume et conclusions

- Principe de la microscopie optique (système œil-loupe, microscope à deux lentilles)
- Techniques de microscopie optique qui ont révolutionné la biologie:
 - Contraste de phase (échantillons transparents), Confocal (tissus profonds).

Resume et conclusions

- Principe de la microscopie optique (système œil-loupe, microscope à deux lentilles)
- Techniques de microscopie optique qui ont révolutionné la biologie:
 - Contraste de phase (échantillons transparents), Confocal (tissus profonds).
 - Fluorescence (importance lie a la protéine fluorescente verte, GFP)

Resume et conclusions

- Principe de la microscopie optique (système œil-loupe, microscope à deux lentilles)
- Techniques de microscopie optique qui ont révolutionné la biologie:
 - Contraste de phase (échantillons transparents), Confocal (tissus profonds).
 - Fluorescence (importance lie a la protéine fluorescente verte, GFP)
 - Superrésolution PALM (dépassement limite diffraction)

Resume et conclusions

- Principe de la microscopie optique (système œil-loupe, microscope à deux lentilles)
- Techniques de microscopie optique qui ont révolutionné la biologie:
 - Contraste de phase (échantillons transparents), Confocal (tissus profonds).
 - Fluorescence (importance lie a la protéine fluorescente verte, GFP)
 - Superrésolution PALM (dépassement limite diffraction)
- Microscopie à champ proche (sonder les surfaces des objets, dépassement limite diffraction)