



## FORMATION SUR LES TECHNIQUES DE MICROSCOPIE

---

### ➤ Sommaire

- La microscopie
- La lumière
- Les sources de lumière (en microscopie)
- Réfraction
- Les 3 types de microscopes
- Structure d'un microscope
- Choix de la structure
- La terminologie
- Ouverture numérique
- Pouvoir séparateur
  
- Profondeur de champ
- Les modes d'observations
- Le fond clair
- La polarisation
- Le contraste de phase
- La fluorescence
- L'acquisition d'images
- Les notions de base
- Choix d'une caméra (ou d'un appareil photo) pour équiper un microscope

## 1 LES PRINCIPES DE LA MICROSCOPIE

---

### ➤ Introduction

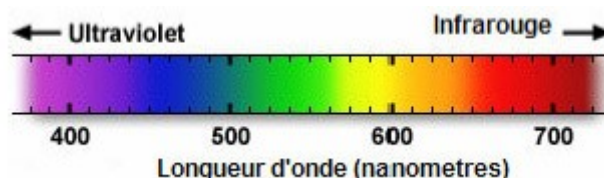
Les propriétés d'un faisceau de lumière émis par une source lumineuse naturelle ou artificielle sont modifiées lorsqu'il traverse un échantillon. Ces modifications contiennent des informations spécifiques et caractéristiques de l'échantillon. Les lentilles des objectifs intégrées au microscope permettent l'amplification et la transformation de ces informations en une image visible à l'œil.

Plusieurs paramètres, parmi lesquels les propriétés des milieux traversés par la lumière et la qualité des lentilles, agissent alors et modifient la qualité de l'information que l'observateur va recevoir.

Chaque fois que le rayon lumineux va changer de milieu ou traverser une lentille, il va subir des changements de direction, des pertes d'informations.

La qualité de la source lumineuse et son origine sont également des paramètres importants en microscopie.

### ➤ La Lumière



*Le spectre de la lumière visible*

La lumière est un ensemble d'ondes électromagnétiques qui stimulent les cellules nerveuses (cônes et bâtonnets) de l'œil. Notre œil est plus sensible aux variations de la couleur qu'à celles de l'intensité.



## ➤ LES SOURCES DE LUMIERE

Les sources de lumière fréquemment utilisées en microscopie sont les suivantes :  
le soleil, les lampes à incandescence, les lampes à arc, les diodes électroluminescentes (LED) et le laser.

### ▪ Le Soleil

Notre référence naturelle  
Température de couleur 5300 °K  
Lumière filtrée par l'atmosphère terrestre  
Spectre visible bleuté

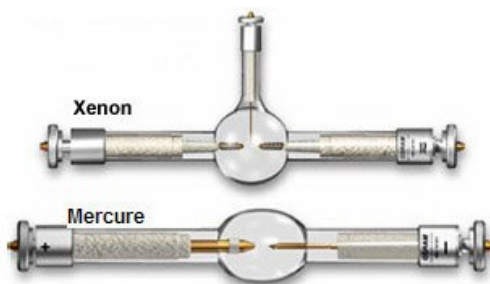
### ▪ Lampes à incandescence



Exemples de lampes à incandescence

Pour un usage général  
Faible coût  
Température 3600 °K  
Le spectre visible dépend de la tension exercée aux bornes de la lampe.  
Faible intensité dans les couleurs froides

### ▪ Lampes à arc



Exemple de lampe à arc

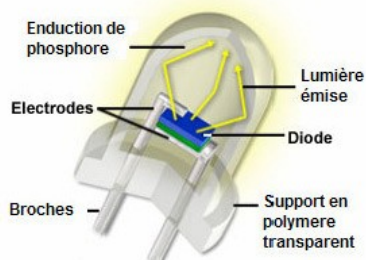
Usage :  
- Fluorescence (mercure)  
- Métallographie (xénon)  
- Loupe binoculaire (néon)

Avantages :  
- Intensité constante  
- Forte concentration lumineuse

Inconvénients :  
- Durée de vie limitée  
- Prix élevé

### ▪ Diodes électroluminescentes (LED)

Architecture d'une diode électroluminescente



De plus en plus utilisé pour l'éclairage des loupes, des microscopes d'enseignement et de laboratoire, ainsi que pour la fluorescence.

- Avantage : longue durée de vie (30000 h contre 1000 h pour une lampe classique)

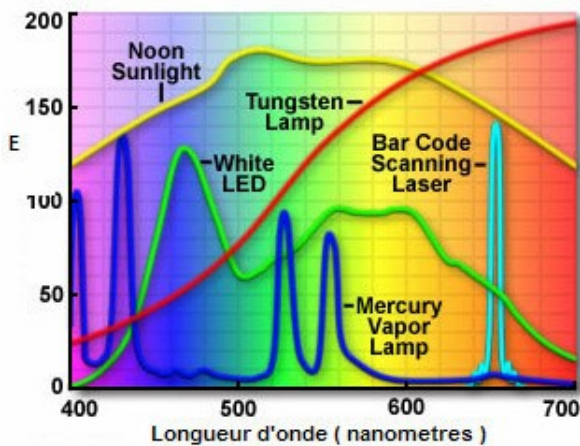
- Faible consommation

- Intensité constante



## ▪ Comparaison des différentes sources

Spectre d'émission des sources lumineuses visibles



Comme on peut le constater sur ce graphique, chaque source de lumière possède un spectre d'émission spécifique.

Cette donnée devra parfois être prise en compte lors du choix de la source lumineuse la plus adaptée à l'application souhaitée.

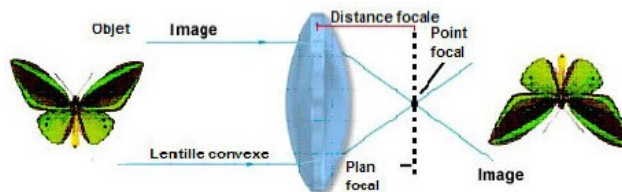
On peut ainsi constater qu'une lampe à incandescence donne une lumière jaune orangé alors que la LED tirera davantage vers le bleu.

## ➤ Les Lentilles

On appelle lentille tout milieu transparent limité par deux surfaces dont l'une au moins n'est pas plane.

La lentille est définie géométriquement par les paramètres suivants :

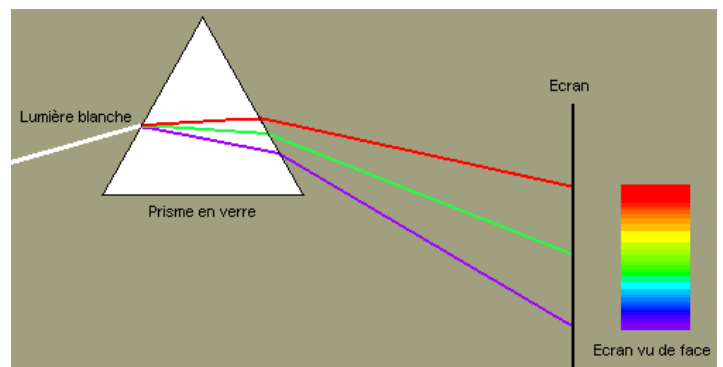
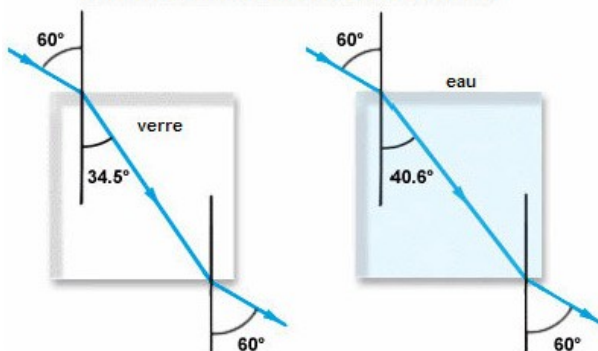
le rayon de courbure, l'axe principal, la section principale, le diamètre d'ouverture, la distance focale.



Exemple de lentille simple

## ➤ Réfraction / Diffraction

Réfraction de la lumière à travers le verre et l'eau



### • Réfraction :

Les lentilles transmettent la lumière par un phénomène appelé "réfraction" qui varie selon le milieu traversé et les différentes longueurs d'onde composant la lumière.

Cela peut entraîner des distorsions plus ou moins grandes au niveau de l'image transmise.

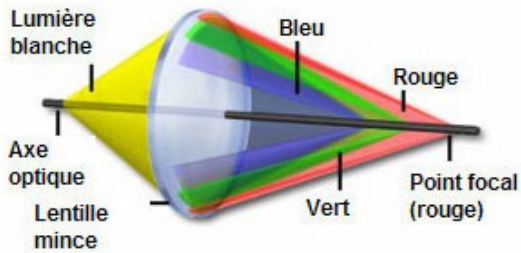
### • Diffraction :

L'angle de réfraction dépend aussi de la longueur d'onde

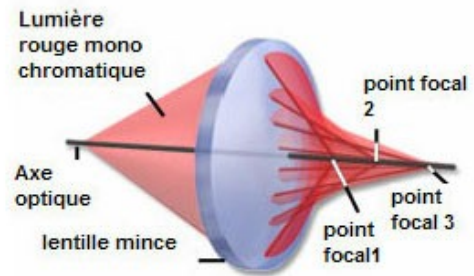


# CLAUDE GONON MICROSCOPIE

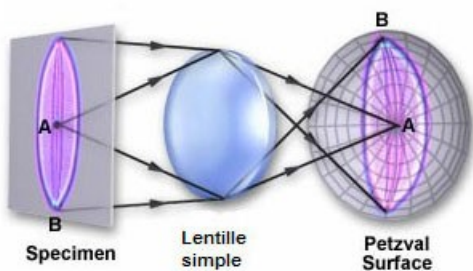
➤ Les défauts les plus courants observés quand le rayon lumineux traverse une lentille :



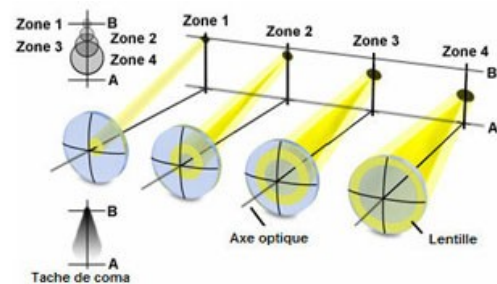
Aberration chromatique



Aberration sphérique



Courbure du champ



Déformation d'un objet, effet Coma

## LES OBJECTIFS

Pièce maîtresse d'un microscope, ils en déterminent la qualité mais aussi le prix. Sur un objectif sont gravées les caractéristiques suivantes :

- **Grossissement :**

C'est le facteur le plus connu.  
 Sur un microscope de 2.5X à 100X  
 Sur un stéréo microscope soit :  
 - Grossissement fixe ( 2X, 4X)  
 - Zoom ( 0.5x à 20x)

- **Aberration :**

Aberration chromatique :  
 - Achromatique : corrigé sur 2 couleurs  
 - Apo-chromatique: corrigé sur 3 couleurs

Planéité :

- Semi plan : planéité sur 90 % de la surface  
 - Plan : planéité sur 100 %

- **Comparaison Achro/Apo (figure 2)**

Plus un objectif est corrigé en planéité et en chromaticisme, plus le nombre de lentilles augmente ainsi que son prix.

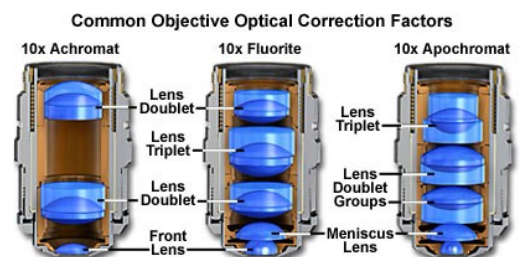
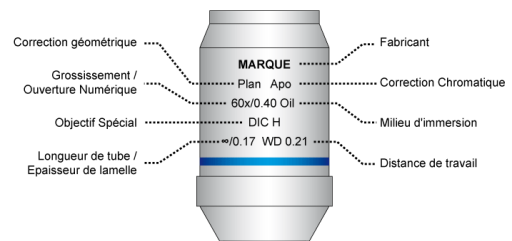


Figure 2



- **Ouverture numérique : O.N.**

La formule théorique est :

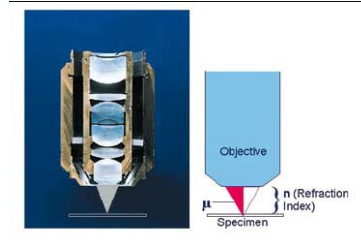
$$O.N. = Ir \times \sin a$$

O.N. : ouverture numérique

Ir : indice réfraction du milieu :

Ir Air = 1 / Ir Eau = 1.33 / Ir Huile = 1.515

a= moitié de l'angle d'ouverture de l'objectif



- **Pouvoir Séparateur**

Capacité d'un système optique de distinguer 2 points distincts.

La résolution dépend de O.N. et de la longueur d'onde :

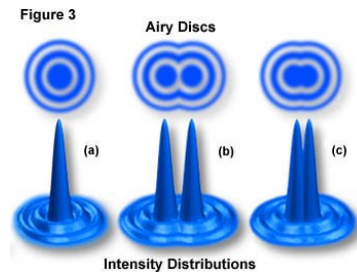
$$R \text{ en micron} = 0,61 (L / O.N.)$$

L: longueur d'onde (0,55 nm)

O.N. : ouverture numérique

En fait elle dépend aussi du condenseur :  $R = 1,22 \times L / (O.N. \text{ obj} + O.N. \text{ cond})$

Soit une résolution maximale latérale de 0,23 microns (ON : 1,45)



Solutions permettant d'améliorer le pouvoir séparateur :

- Utiliser un milieu autre que l'air (milieu séparant l'objectif de l'échantillon) par un indice de réfraction plus élevé (huile d'immersion ou eau).
- Diminuer la longueur d'onde en utilisant des faisceaux d'électrons (microscope électronique).

- **Haute résolution**

Pour une haute résolution en fond clair, il faut un objectif avec une très grande ouverture numérique couplé à un condenseur apochromatique à immersion.

La fluorescence permet la haute résolution, l'objectif servant de condenseur.

Autre technique le DIC (Contraste Interférentiel Différentiel) ou NIC (Contraste Interférentiel Normarski).

- **Profondeur de Champs**

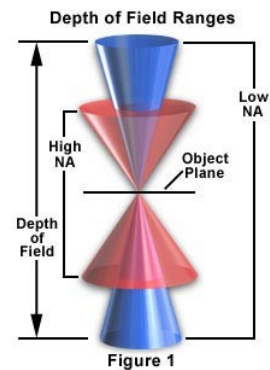
Épaisseur de la préparation ou l'image est nette.

La profondeur de champ est liée :

- à l'ouverture numérique de l'objectif (NA)
- à l'indice de réfraction du milieu (n)
- à la longueur d'onde ( $\lambda$ )

Plus l'ouverture numérique de l'objectif est élevée, plus la profondeur de champ est faible.

$$d = \frac{\lambda \sqrt{n^2 - (NA)^2}}{(NA)^2}$$

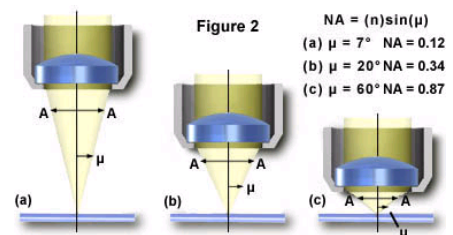


- **Distance de Travail**

De manière générale plus un objectif à une O.N. élevée, plus sa distance de travail est faible.

Exemple pour 3 objectifs 40x :

- Plan 40X/0.65      WD 0.6mm
- Plan Apo 40X/0.9      WD 0.18mm
- Plan LWD 40X/0.6      WD 2.6 mm





## CLAUDE GONON MICROSCOPIE

- **Luminosité**

Un objectif à grande ouverture numérique laisse passer plus de lumière.  
 Intensité lumineuse =  $O.N.^4 / \text{Grossissement}^2$

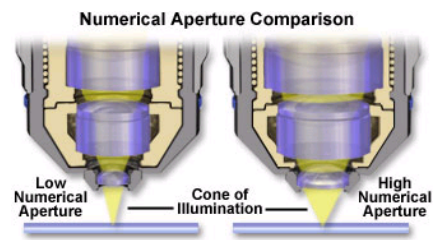


Figure 2

- **Parfocalité**

Propriété d'une gamme d'objectifs de travailler à la même distance de la tourelle porte objectifs.

- Optique 160mm : standard commun 45 mm, pas de vis 20,32 mm
- Optique infinie : aucun standard, pas de vis 20.32 ou 25 mm

- **Distance de travail :**

Distance entre la lentille frontale et le plan focal.

Pour un objectif corrigé pour une lame couvre objet :  
 distance entre la lentille frontale et la lame couvre objet.



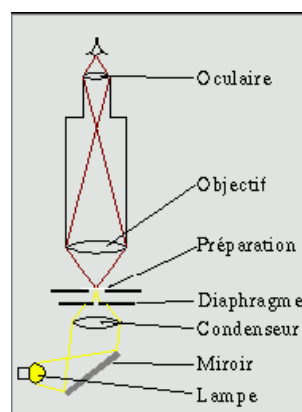
Figure 3

- **Optiques en 160mm ou à l'infini**

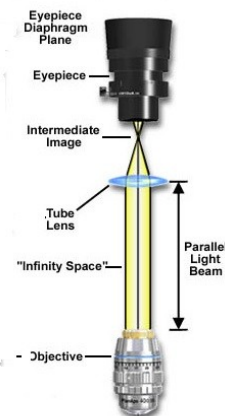
Deux constructions optiques existent pour les microscopes droits et inversés :

- Optique à 160 mm : ancienne conception de la longueur du tube d'observation  
 Le faisceau est convergent à la sortie de l'objectif, plan image à 160 mm
- Optique à l'infini : nouvelle conception  
 Le faisceau est parallèle à la sortie de l'objectif et la convergence se fait par une lentille au niveau de la tête.

Optique à 160mm



Optique à l'infini



- **Lamelles couvre-objet**

Pour les objectifs ayant une O.N. > à 0,3 (10x) il est nécessaire de tenir compte de la lame couvre objet (0,17 mm)

- Objectif « biologie » corrigé 0,17 mm
- Objectif « métallog » non corrigé
- Objectif à correction variable (0-2 mm)

- **Bague de correction**

Certains objectifs possèdent une bague de correction :

- Correction de l'épaisseur de lamelle (ex 0-2 mm)
- Modification de l'ouverture numérique (ex 1-1,3)
- Modification de l'indice de réfraction du milieu
- Ajustement de la parfocalité



## CLAUDE GONON MICROSCOPIE

- **TABLEAU RECAPITULATIF POUR QUELQUES OBJECTIFS :**  
Grossissement, Ouverture numérique, Distance de travail, Profondeur de champ et Résolutions

Objectif	Ouverture numérique	Diam. Observe en mm	Distance frontale en mm.	Prof. de Champ (microns)	Résolution (microns)
U.PL.APO.2	0,08	11,00	6,00	398,00	4,19
U.PL.FL.4	0,13	5,50	17,00	70,00	2,58
U.M.PL.5	0,10	4,40	19,60	98,00	3,36
U.PL.10	0,25	2,20	10,25	28,00	1,34
U.PL.FL.20	0,50	1,10	1,60	7,00	0,67
L.MPLFL.20	0,40	1,10	12,00	6,09	0,84
U.PL.FL.40	0,75	0,55	0,51	2,52	0,45
U.PL.50 (oil)	0,90	0,44	0,20	1,75	0,37
UMPL.FL100	0,95	0,22	0,31	0,67	0,35
U.PL.apo.100 (oil)	1,40	0,22	0,10	0,59	0,24

- **GROSSISSEMENT ET GRANDISSEMENT**

Différence entre grossissement et grandissement des microscopes.

- Le grossissement total est le produit du grossissement de l'objectif par celui de l'oculaire.
- Les oculaires ne servent qu'à grandir l'image mais n'apportent rien au pouvoir séparateur.
- En pratique un objectif est exploitable jusqu'à 1000 fois son ouverture numérique.
- Grossissement : augmente la taille de l'objet observé et la finesse des détails
- Grandissement : augmente uniquement la taille de l'objet observé.

➤ **LES DIFFÉRENTS TYPES DE MICROSCOPES**

On distingue trois types de structures de microscopes :

1. Les microscopes **Droits**
2. Les microscopes **Inversés**
3. Les **Stéréo microscopes**
4. Les **Macroscopes**

Puis deux types d'éclairage :

- A. L'éclairage "**diascopie**" (par transmission)
- B. L'éclairage "**épiscopie**" (par réflexion)

Il en découle différentes combinaisons suivant l'usage auquel le microscope est destiné :

**Microscope droit en Biologie**

- Transmission : fond clair, fond noir, contraste de phase, polarisation, interférentiel
- Réflexion : Fluorescence

**Microscope droit en Industrie**

- Transmission : Fond clair, Polarisation
- Réflexion : fond clair, fond noir, polarisation, interférentiel

**Microscope Inversé Biologie**

- Transmission : fond clair, contraste de phase, interférentiel
- Réflexion : Fluorescence

**Microscope inversé Métallographie**

- Réflexion : fond clair, fond noir, Interférentiel



## Stéréo microscope

- Transmission : fond clair, fond noir, polarisation
- Réflexion : fond clair, polarisation, fluorescence

### CHOISIR LA BONNE STRUCTURE

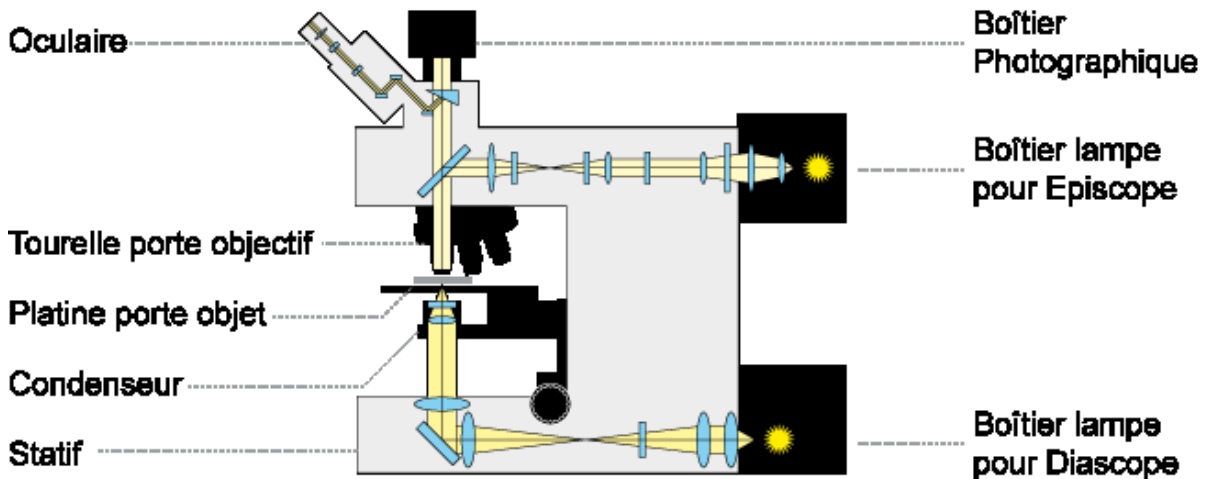
Le choix ne se fera ni en fonction des optiques (la plupart des objectifs se montent indifféremment sur les microscopes droits et les microscopes inversés) ni en fonction du mode d'observation. Ce sera en général la nature des échantillons à observer qui déterminera la structure mécanique du microscope.

#### ➤ LE MICROSCOPE DROIT :

Ce type de microscope sera choisi pour observer des échantillons relativement minces (moins de 50 mm) ou pour ceux qui demandent des déplacements de la platine supérieurs à 30 mm.

### Trajet optique d'un microscope droit

---

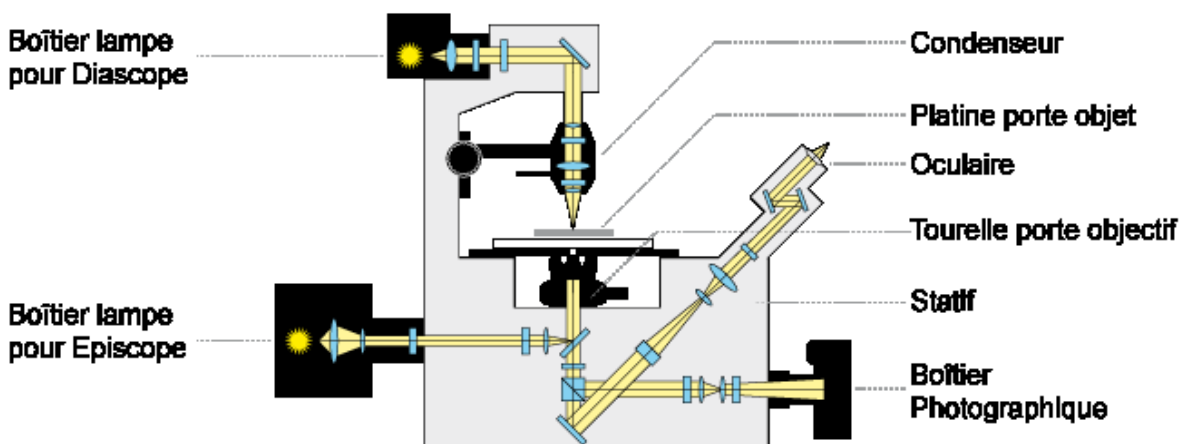


#### ➤ LE MICROSCOPE INVERSE (platine fixe)

Ce type de microscope sera choisi pour observer des échantillons de volume important (métallographie) ou bien quand l'échantillon est dans un récipient avec du liquide (culture cellulaire).

### Trajet optique d'un microscope inversé

---







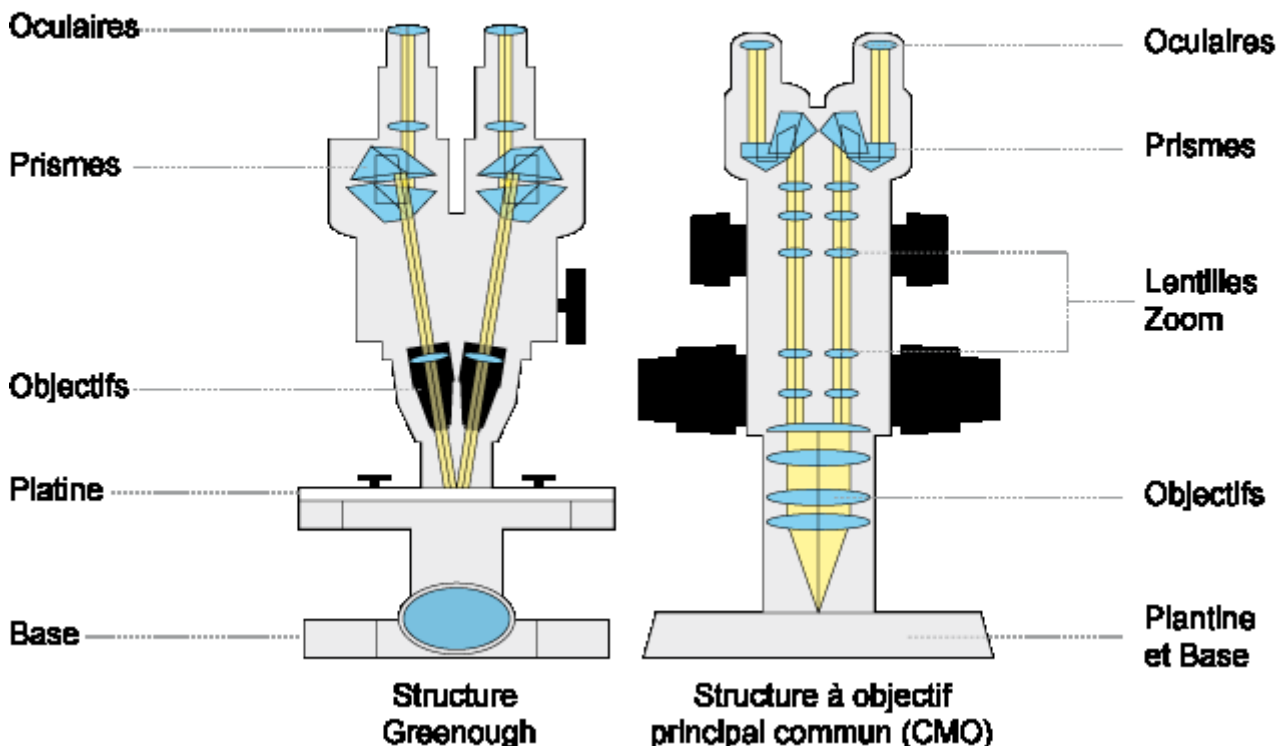
## ➤ LE STEREO MICROSCOPE

Il sera choisi pour des faibles grossissements, en stéréoscopie (de 1x à 150x)

Sur le plan économique à équipement équivalent (même mode d'observation et mêmes optiques), le microscope droit sera toujours plus économique à l'achat.

## Trajet optique des stéréo-microscopes

---



## ➤ LA TERMINOLOGIE

### STATIF :

C'est la pièce maîtresse, le support mécanique. Il supporte le système de mise au point et la platine il doit donc être d'une grande stabilité. De manière générale, il conditionne l'ergonomie générale de l'appareil.

### BOITIER LAMPE :

Il s'agit d'un système destiné à éclairer les échantillons à observer. Il doit être sécurisé tout en permettant un remplacement facile de la lampe. Il peut recevoir des lampes tungstène, halogène, led, xénon ou à vapeur de mercure.

### PLATINE :

C'est la partie qui va recevoir l'échantillon. Ses dimensions doivent être adaptées à celles des échantillons et elle doit être très résistante à l'abrasion. Sa mécanique doit être soignée et résistante car elle est toujours l'élément le plus sollicité du microscope. Elle peut être parfois motorisée.

### TOURELLE :

Elle reçoit les objectifs. Sa capacité peut varier selon les modes d'observation (de 4 à 7 objectifs). Sur des microscopes haut de gamme, elle peut être motorisée.

### ILLUMINATEUR :

Il permet de transmettre la lumière sur l'échantillon et de réguler son intensité pour une observation dans les meilleures conditions possibles. Il comporte un ou deux diaphragmes.



## CLAUDE GONON MICROSCOPIE

**CONDENSEUR** : Comme l'illuminateur il sert à éclairer l'échantillon. Son rôle est de concentrer le flux lumineux. Son bon réglage est très important. Ses caractéristiques sont liées au mode d'observation (fond clair, fond noir, contraste de phase, etc....)

### **TUBE (ou Tête) D'OBSERVATION** :

Fixe ou orientable, il est monoculaire, binoculaire ou trinoculaire, il reçoit les oculaires (un oculaire par œil) et un troisième adaptateur pour une caméra (ou appareil photo).

### **OCULAIRES** :

Ils se montent sur le tube d'observation. C'est là que l'observateur place son œil. Ils permettent l'exploitation de l'image par un grossissement de 5x à 15x (généralement 10x). Ils se caractérisent par leur indice de champ correspondant au diamètre observé.

### • **CHAMP OBSERVE**

Le champ observé dépend de l'indice de champ de l'oculaire (diamètre en mm) divisé par le grossissement de l'objectif.

Ex. Oculaire 10x/20mm avec Objectif 100X > Diamètre observé  $20/100 = 0,20$  mm

Surface observée :  $S = \pi.r^2$

- Oculaire 10/18 = 254 mm<sup>2</sup>

- Oculaire 10/23 = 415 mm<sup>2</sup> (+2/3)

### **OBJECTIFS** :

C'est l'élément le plus important pour le résultat final. Son rôle est de collecter un maximum de lumière à partir de l'objet et de former une image réelle de haute qualité. Il peut y avoir, de une à vingt lentilles dans un seul objectif.

Son grossissement peut varier de 1,25 à 250 fois. Un même microscope peut recevoir différents objectifs qui sont, aujourd'hui, souvent corrigés à l'infini. Le choix se fait en fonction du mode d'observation, du grossissement, de l'ouverture numérique, de la distance frontale et aussi du prix.

### **DIAPHRAGME DE CHAMP** :

Situé dans l'illuminateur (en épiscopie) ou à la base du statif (en diascopie) il permet de cerner le champ éclairé sur l'échantillon, et de régler le condenseur (Méthode de Köhler).

### **DIAPHRAGME D'OUVERTURE** :

Situé sur l'illuminateur (en épiscopie) ou sur le condenseur (en diascopie). Son ajustement est lié à l'objectif utilisé, son rôle est majeur pour obtenir une bonne image. Il permet de compenser le manque de profondeur de champ de certains objectifs et d'améliorer le contraste de l'image.

## ➤ **LES MODES D'OBSERVATION**

- LE FOND CLAIR : Le plus courant, éclairage coaxial qui permet le contrôle des motifs et restitue les couleurs.

- LA LUMIERE POLARISEE: Permet le contrôle de la biréfringence des substances.

- LE CONTRASTE DE PHASE : Il permet l'observation de coupes non colorées.

- LE FOND NOIR : Eclairage rasant. Il permet le contrôle des contours.

- L'EPIFLUORESCENCE : Ce mode permet d'observer et de localiser dans la préparation des substances organiques qui fluorescent à des longueurs d'ondes définies.

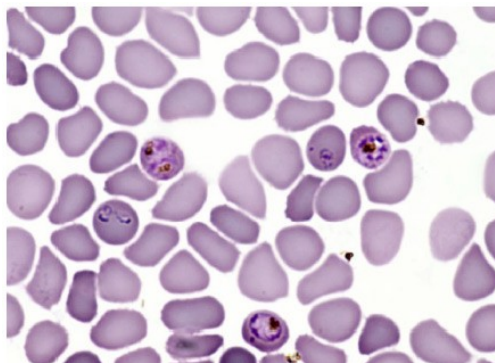
### ✓ **Le fond clair (BF)**

Droit : Transmission/Réflexion

Inversé : Transmission/Réflexion

Loupe : Transmission/Réflexion

Permet de visualiser un échantillon naturellement ou artificiellement coloré

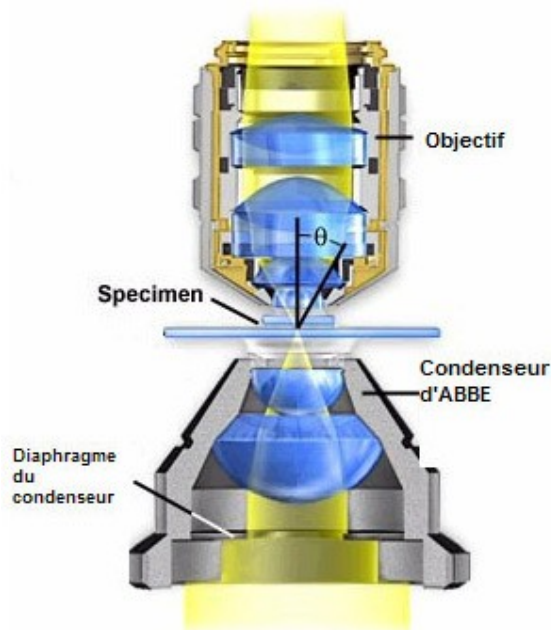




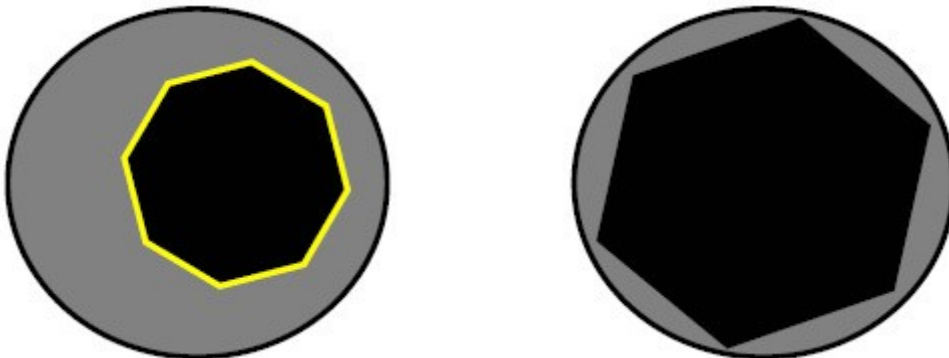
## CLAUDE GONON MICROSCOPIE

Pour une bonne image :

- Réglage de Köhler (transmission)
- Mettre au point avec un objectif à faible grossissement (10x)
- Fermer le diaphragme de champ (sur la statif)
- Modifier la hauteur du condenseur pour que l'image du diaphragme soit la plus petite et la plus nette possible.
- Elargir le condenseur pour que l'image du diaphragme soit tangente avec le bord des oculaires.



- L'opération finale consiste à centrer le diaphragme de champ. (**réglage de Köhler**)
- En épiscopie, utiliser les 2 vis de réglage.  
En diascopie, d'abord rechercher la netteté de ce diaphragme.  
Il faut, pour cela, trouver la bonne position (en z) du condenseur avant de centrer ce dernier.
- Ensuite, on se positionne sur le plus faible des objectifs et on ouvre son diaphragme de champ jusqu'à ne plus le voir.



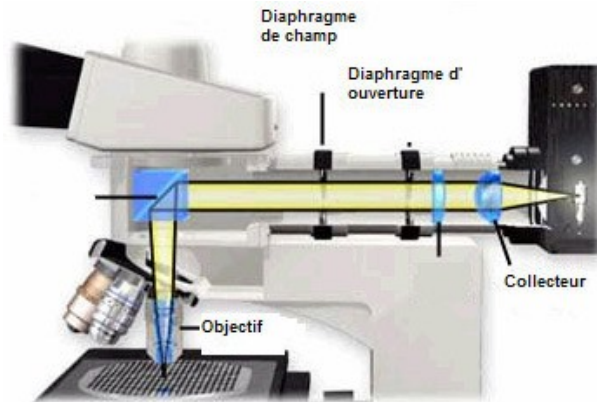
Le diaphragme est net mais non correctement centré La bonne position



## CLAUDE GONON MICROSCOPIE

### En réflexion

On centre les diaphragmes de champ et d'ouverture



Du bon usage du diaphragme d'ouverture

- Diaphragme trop ouvert : image plate
- Diaphragme trop fermé : trop de réfringence
- Le bon réglage : O N. condenseur = 80% O N. objectif

### Effet de l'ouverture du condenseur sur la qualité de l'image



### ✓ La polarisation

#### Usage général

- Droit transmission/réflexion
- Inversé : transmission/réflexion
- Loupe : transmission/réflexion
- But : visualiser et mesurer tous objets (structure cristalline) modifiant une lumière polarisée

#### Polarisation simplifiée :

- Simple visualisation des cristaux par l'ajout d'un filtre à un microscope en fond clair
- En transmission : un polarisateur avant le condenseur et un analyseur au dessus de l'objectif
- En réflexion : un filtre polarisant sur l'illuminateur avant le miroir et l'analyseur au dessus du miroir

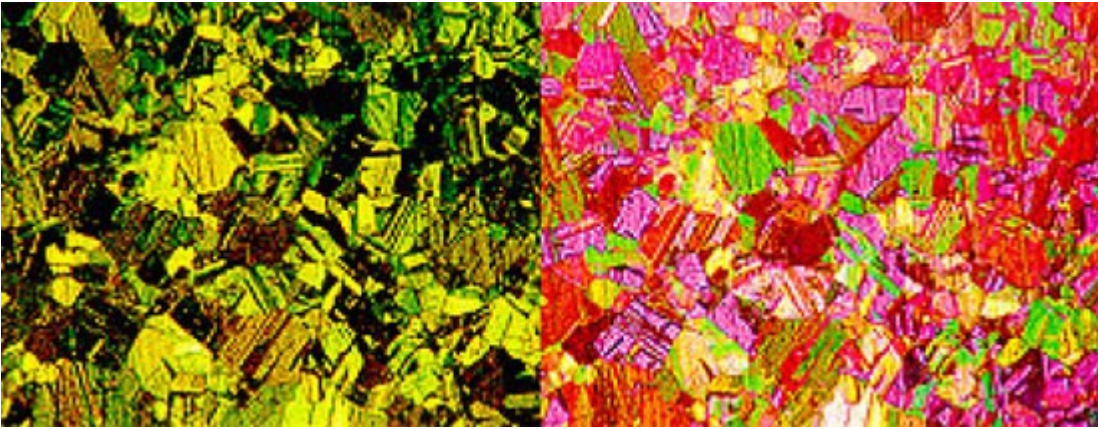
#### Le microscope Polarisant

- Principales caractéristique
- Polariseur et analyseur tournant et gradués sur 360°
- Platine circulaire tournant gradué sur 360° et orientable
- Optiques détensionnées (Pol)
- Objectifs centrables
- Fente pour compensateurs
- Lunette de Bertrand escamotable



## Orthoscopie

- L'orthoscopie d'une lame mince de roche est utilisée pour examiner sa structure, les caractéristiques optiques de ces cristaux permettent d'identifier les minéraux qui la composent.



### ✓ Le contraste de phase (PH)

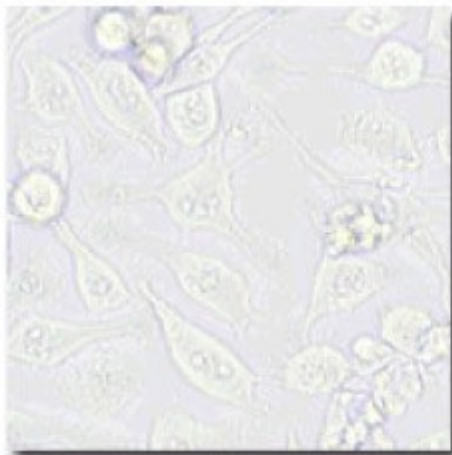
- Droit et Inversé uniquement en transmission
- Objectif : augmenter les contrastes d'objets peu ou pas colorés.

#### Principe

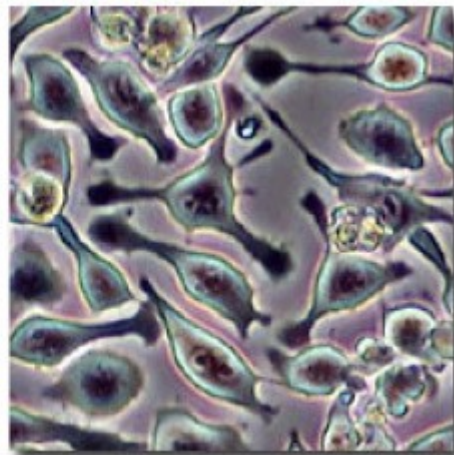
On utilise les propriétés ondulatoires de la lumière.

- 2 ondes en phase s'additionnent
- 2 ondes en contraste de phase s'annulent
- La lumière en traversant un objet va modifier son trajet optique et donc être en déphasage par rapport à la lumière ayant traversé le milieu.

#### Cellules vivantes en fond clair et en contraste de phase.



Fond clair



Contraste de phase

#### Matériel nécessaire

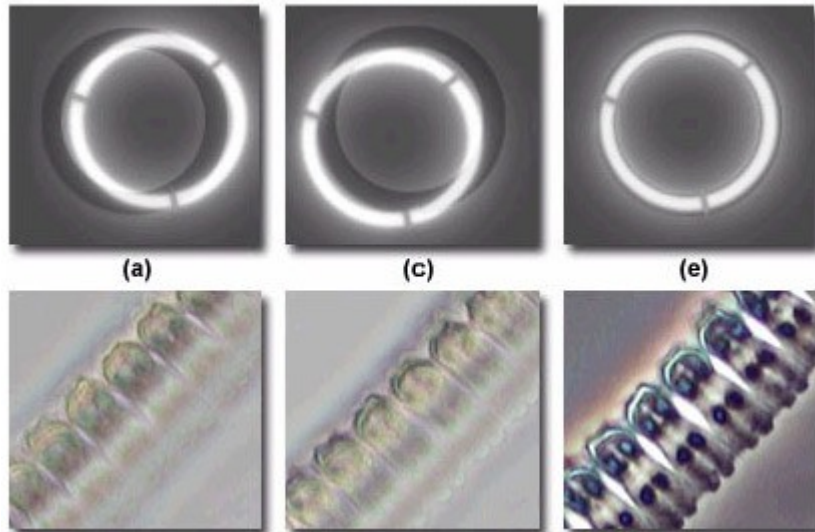
- Des objectifs avec Phase (notés PH) : un anneau noir est gravé dans l'objectif.
- Des anneaux de phase correspondants aux objectifs utilisés dans un condenseur à tourelle ou sur une barrette.
- Une lunette de centrage (facultative)



## Réglage des anneaux de phase

- Le réglage de Köhler a été effectué
- Pour chaque objectif PH
- Mettre l'anneau de phase du condenseur correspondant (même numéros)
- Après avoir fait la mise au point sur la préparation, visualiser avec la lunette de centrage les 2 anneaux (sombre et clair) et centrer l'anneau du condenseur pour que des deux anneaux soient superposés.
- Répéter l'opération pour chaque objectif phase.

## Alignement des anneaux de phase



## ✓ La fluorescence (FL)

Microscope droit ou inversé uniquement en réflexion.

- But : visualiser des détails d'une préparation ou mettre en évidence une catégorie d'objets.
- Technique en pleine expansion.
- Technique permettant la visualisation d'objets très fins.

### Fluoro-chrome

Molécule ayant la propriété quand elle est excitée par une lumière de longueur d'onde adéquate d'émettre une lumière dans une longueur d'onde supérieure.

On peut distinguer :

- Les fluoro-chromes naturels
- Les fluoro-chromes de synthèse.
- L'Immuno-fluorescence

### Principe d'un microscope à fluorescence

- On sélectionne une petite partie du spectre de la lumière émise par une lampe à large spectre LED ou vapeur de mercure) grâce à un filtre (filtre d'excitation).
- Cette lumière est réfléchiée vers l'objectif par un miroir particulier : le miroir dichroïque
- La lumière émise par le fluochrome traverse l'objectif puis le miroir vers les oculaires.
- Toutes les lumières intempestives sont rejetées par un deuxième filtre (filtre d'émission).



## CLAUDE GONON MICROSCOPIE

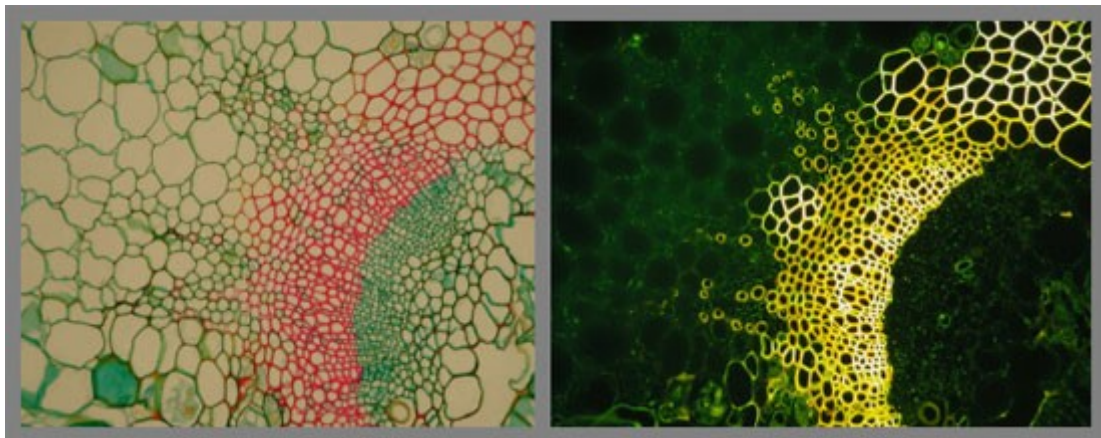


- Filtre d'excitation : longueurs d'onde qu'il laisse passer
- Miroir dichroïque : longueur d'onde à partir de laquelle il ne réfléchit plus la lumière.
- Filtre d'émission : longueur d'onde à partir de laquelle il laisse passer la lumière.
- Attention : par exemple les utilisateurs parlent souvent de fluo bleu car ils voient fluorescer dans les bleus leur préparation.

### Les objectifs FLUO

- Les verres ordinaires filtrent les ultraviolets UV.
- Les constructeurs ont développés une gamme d'optiques ayant une meilleure transmission dans les UV.
- De plus ayant une ouverture numérique ON plus élevée que des objectifs Plans classiques, ils sont plus lumineux, intensité lumineuse :  $ON^4 / \text{Grossissement}^2$

### Coupe végétale en fond clair et fluo



### Fading

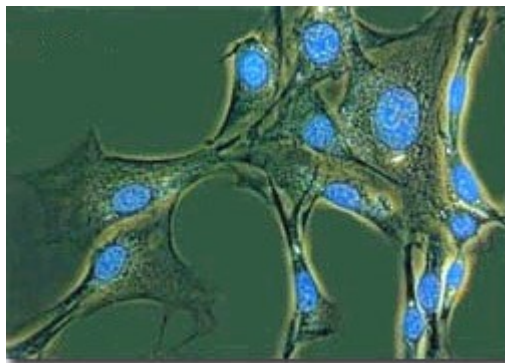
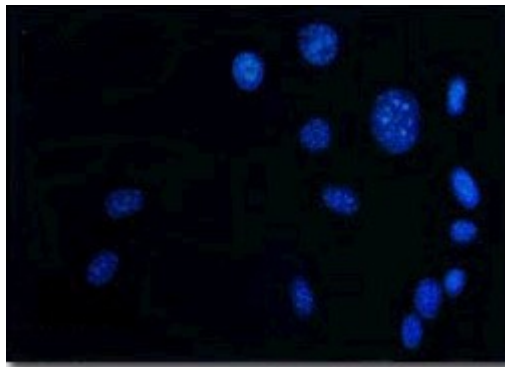
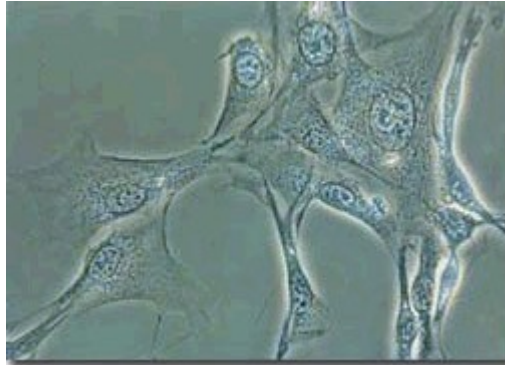
Un fluoro-chrome excité émet peu à peu moins de lumière

- Solution :
- diminuer l'intensité de l'excitation (filtres neutres)
- ou utiliser des agents anti-fading.



### **L'explosion des techniques :**

- Les techniques liées à la fluorescence sont en pleine expansion
- Quelques exemples, combinaison de la Phase/Fluo



### ➤ **L'acquisition d'images**



Depuis la révolution de la photo numérique, les techniques traditionnelles photo argentiques et polaroid sont en perte de vitesse.

### **Les notions de base**

Le capteur est la base de tout système d'imagerie numérique.

### • **PRINCIPE DE BASE :**

Un capteur peut être comparé à une grille matricielle composée de minuscules carrés sensibles à la lumière qu'on appelle photo-site. Quand un photo-site est exposé à la lumière, il change de valeur électrique.

La grille complète est lue d'abord par ligne puis par colonne pour mémoriser une image noir et blanc. Pour obtenir de la couleur il faut, au minimum, trois informations par « point image » (un rouge, un vert et un bleu). En fait, pour chaque pixel, il y a quatre photo-sites pour compenser le manque de sensibilité au vert du silicium.

Conséquence : La nécessité d'une miniaturisation extrême.



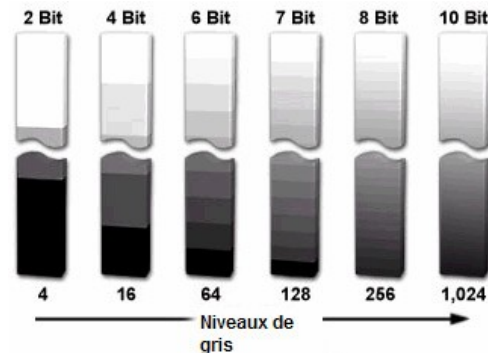


## CLAUDE GONON MICROSCOPIE

- Un capteur de 5 méga pixels supporte 20 millions de photo sites.
- **DEUX TYPES DE CAPTEURS** sont couramment utilisés : le CCD et le Cmos.
- Pour un usage général on utilise un seul capteur, mais pour un meilleur rendu des couleurs il existe des caméras 3 capteurs ou 3 passes.
- **TAILLE DES CAPTEURS :**  
Augmenter la taille des capteurs devrait permettre de gagner en définition et en luminosité mais cela n'a pas de sens économique. Ces capteurs sont gravés sur des disques de silicium ultra pur qui subissent de longues et onéreuses opérations. Au final il y a beaucoup de déchet avec un prix de revient est principalement lié au nombre de capteurs obtenus sur une seule tranche. Des capteurs mesurant 24x36 mm (43mm) auraient un prix de vente trop fort et il faut se contenter de tailles beaucoup plus modestes. En pratique sont utilisés des capteurs de 1/3 pouce (diagonale utile: 5,5mm.), 1/2 pouce (diagonale utile : 6mm.) 2/3 pouce (diagonale utile : 11mm.), 1 pouce (diagonale utile: 16mm.) et 4/3 pouce (diagonale utile: 22,5mm.)
- **BRUIT ELECTRONIQUE ET SENSIBILITE :** Plus les capteurs sont minuscules, plus petits sont les photo-sites et ils reçoivent peu de lumière. Il faut donc amplifier le signal jusqu'à un certain seuil. Au delà apparaît un bruit électronique (comme pour le son) qui vient détériorer l'image. Pour éviter le bruit électronique et augmenter la sensibilité d'un appareil photo ou d'une caméra numérique, il faut donc prendre un capteur plus grand, ne pas exiger une grande définition et le refroidir. (les capteurs sont plus sensibles par basse température.)
- **NOMBRE DE PIXELS :**  
Ce nombre va directement influencer la définition de l'image. Il est donc important d'avoir un grand nombre de pixels mais la qualité des optiques utilisées, la taille des capteurs et la sophistication des circuits qui traitent les données participent autant au résultat final. (codage couleur en 24 bits pour avoir un excellent rendu).

### Codage couleur BIT

- Le codage des niveaux d'intensité de lumière n'est pas linéaire mais par pallier.
- Par ex. une caméra 2 bits ne restitue que 4 niveaux d'intensité.



### REFROIDISSEMENT -

- Les capteurs sont plus sensibles à basse température.
- L'électronique d'une caméra chauffe. Cet échauffement crée des sauts électroniques qui provoquent des « faux photons »
- Sur des temps d'exposition long, ils s'additionnent à l'image en accumulant du bruit de fond.

On peut classer les caméras sur 3 niveaux.

- Caméra non refroidie pour usage général.
- Caméra rafraîchie pour faible luminosité.
- Camera refroidie (T°inf. 3°) pour très faible luminosité.

Une fois l'image obtenue, elle doit être transférée et stockée sur un ordinateur.

### COMMUNICATION :

Aujourd'hui, sont principalement utilisées les prises USB2 et les ports « Firewire » (ou IEEE1394.) Dans les deux cas il s'agit d'un transfert à haut débit (environ 400Mb/s).

### STOCKAGE :

De multiples « formats images » existent et les logiciels sérieux peuvent en lire un grand nombre.

Les deux plus répandus sont le « TIF » et le « JPEG »

Ce dernier a l'avantage de compresser les images et d'en réduire la taille mais des informations seront obligatoirement perdues. En microscopie, le format « TIF » sera préférable pour ne perdre aucun détail et conserver des informations complémentaires comme barre d'échelle, grandissement ou commentaires.



## ➤ Choix d'une caméra ou d'un appareil photographique numérique pour équiper un microscope

Sur un microscope, ce choix sera dicté principalement par trois critères :

- **1/ La quantité de lumière disponible.**

Sur un microscope, elle dépend principalement du mode d'observation. En fond clair, pas de problème. Tous les appareils photo numériques peuvent convenir mais dans le cas de la polarisation ou de la fluorescence, il faudra envisager une caméra numérique refroidie et possédant un capteur de grande taille.

- **2/ Champ photographié et grossissements désirés.**

Comme en 24x36 le grandissement final dépend de quatre éléments à connaître : le grossissement de l'objectif, des dimensions du capteur, du grandissement de l'adaptateur vidéo et du moyen de reproduction (écran, imprimante, projecteur...)

S'il est facile de connaître les deux premiers éléments il est parfois plus délicat d'avoir des certitudes sur l'agrandissement de la sortie vidéo car tous les microscopes bénéficient de nombreuses possibilités (le tableau ci-après donne un aperçu des nombreuses sorties vidéo possibles sur un seul modèle de microscope.)

Le grossissement visible à l'écran se détermine globalement comme suit :

$G = G_{\text{objectif}} \times G_{\text{objectif supplémentaire (si installé)}} \times G_{\text{adaptateur}} \times (\text{diagonale du moniteur} / \text{diagonale capteur CCD ou CMOS})$

La seule méthode efficace est de projeter une lame micrométrique à l'écran.

ADAPTATEURS VIDEO	GROSSISSEMENT	INDICE (en mm.) SELON LES DIMENSIONS DES CAPTEURS CCD DES CAMERAS ET APPAREILS NUMERIQUES		
		2/3	1/2	1/3
1x	1 x	11	8	5,5
0,5x	0,5 x	22	16	11
0,25x	0,25 x	/	/	22

- **3/ Le nombre de pixels nécessaire pour bénéficier pleinement de la résolution du microscope.**

Il va dépendre du grossissement, de la résolution de l'objectif, de la dimension du capteur et du grandissement du projectif vidéo, selon la formule suivante :  $NP = [1000 / (R \times G_o)] \times G_v \times D_c \times 3$

NP= Nombre de pixels

R= Résolution de l'objectif en micron

G<sub>o</sub>= Grossissement de l'objectif

G<sub>v</sub>= Grandissement de la sortie vidéo

D<sub>c</sub>= Dimension du capteur en millimètres (longueur ou largeur.)

3= Coefficient communément admis et qui correspond au nombre minimum de pixels pour visualiser une ligne.

**TABLEAU RECAPITULATIF DU NOMBRE DE PIXELS NECESSAIRE POUR QUELQUES OBJECTIFS**

Objectif (grossissement et caractéristiques données)	Résolution (microns)	GRANDISSEMENT VIDEO = 1 FOIS			
		Capteur ½ pouces (Diagonale 6mm.)		Capteur 2/3pouce (diagonale 11mm.)	
		Larg. 6,4mm.	Haut. 4,8mm.	Larg. 8,8mm.	Haut. 6,6mm.
Plan 2x	4,19	2291	1718	3151	2363
Plan 4x	2,58	1860	1395	2558	1919
Plan 5x	3,36	1143	857	1572	1179
Plan 10x	1,34	1433	1075	1970	1478
Plan 20x	0,67	1433	1075	1970	1478
Plan 20x	0,84	1143	857	1572	1179
Plan 40x	0,45	1067	800	1467	1100
Plan.50x	0,37	1038	778	1427	1070
Plan 100x	0,35	549	412	755	566
Plan 100x	0,24	800	600	1100	825



## CLAUDE GONON MICROSCOPIE

- Quelques remarques sur le nombre de pixels

- 1/ Comme on vient de le voir les systèmes optiques ont des limites physiques
- 2/ La taille des fichiers à exporter et à stocker sont proportionnels aux nombres de pixels
- 3/ Les écrans informatiques et les disques durs ont des limites physiques.

- Quelques conseils pratiques pour une bonne acquisition

1. D'abord bien régler le microscope et des optiques propres.
2. Ensuite utiliser les bons filtres : filtre lumière de jour, éventuellement filtre neutre.
3. Régler correctement l'intensité de sa lampe (en générale 80% de l'intensité maximale)
4. Comme nous l'avons vu au début une lampe halogène à son spectre qui varie suivant la tension exercée. Une des erreurs les plus classiques est de travailler en sous-tension (< 80%).

### Réglage de la balance des blancs sous différents éclairages



### Balance des blancs WB

La première opération avant toute acquisition d'une image est d'effectuer la balance des blancs (WB : White Balance). Se positionner sur une partie blanche de la préparation et valider la balance des blancs (en réalité grise).

### repères et marques pour la correction de la balance des blancs

