

Le Microscope confocal

1- introduction

Un microscope confocal, appelé plus rarement microscope monofocal, s (environ 400 nm) appelées « sections optiques ».

En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon, il est possible de réaliser des séries d'images à partir desquelles on peut obtenir une représentation tridimensionnelle de l'objet.

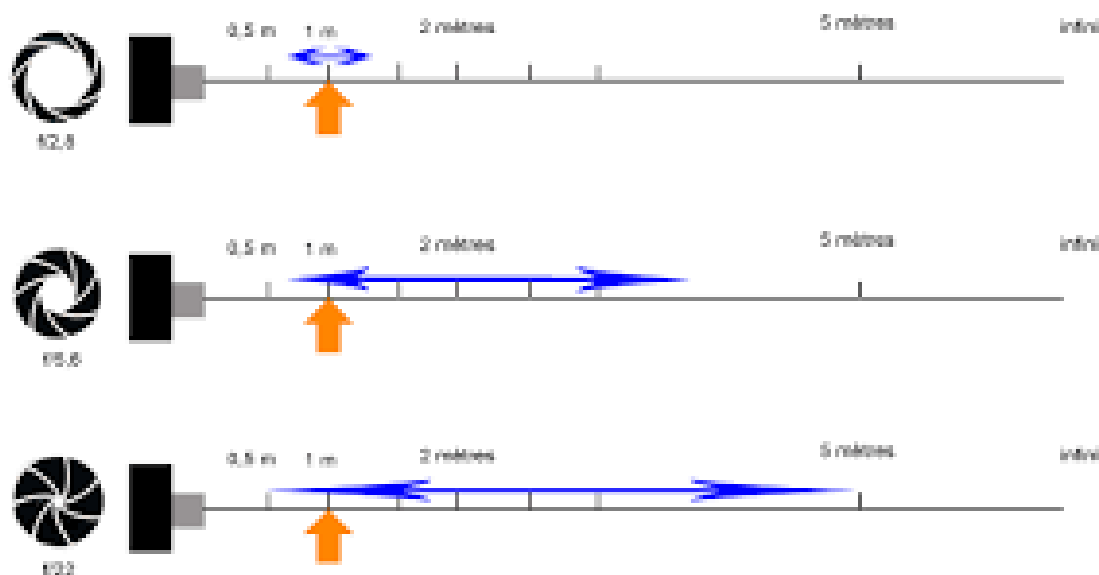


Figure1 : la profondeur de champ

2-Historique:

La microscopie confocale (MC) est un des progrès le plus remarquable de ce siècle en microscopie optique. Le principe du fonctionnement du microscope confocal a été présenté pour la première fois par Marvin Minsky en 1957.

mais ce n'est que dans la fin des années 1980 que les modèles commerciaux sont apparus, rendant cette technique disponible aux laboratoires. La microscopie

confocale est très utilisée aujourd'hui en biologie ainsi qu'en sciences des matériaux.

3-Principe de fonctionnement du microscope confocal :

Le microscope confocal agit presque comme le microscope optique, sauf que le faisceau de lumière blanche est remplacé par un faisceau laser (parfois par plusieurs faisceaux).

Son principe consiste à focaliser, par l'intermédiaire d'un objectif, le faisceau laser qui va exciter les fluorochromes en un point de l'échantillon, puis va récupérer, sur un photomultiplicateur, le signal lumineux émis en ce point.

Un diaphragme qui arrête tout signal ne provenant pas du plan focal est placé devant le photomultiplicateur.

Le signal reçu est amplifié dans le photomultiplicateur, traité afin d'améliorer le rapport signal sur bruit, puis numérisé.

L'image est construite point à point par balayage (X, Y) du champ analysé à l'aide de miroirs de déflexion de la source lumineuse.

Une platine motorisée déplace la préparation suivant l'axe Z permettant la saisie de différents plans optiques dans l'épaisseur de l'objet. Les images ainsi formées sont stockées sur la mémoire de masse d'un ordinateur

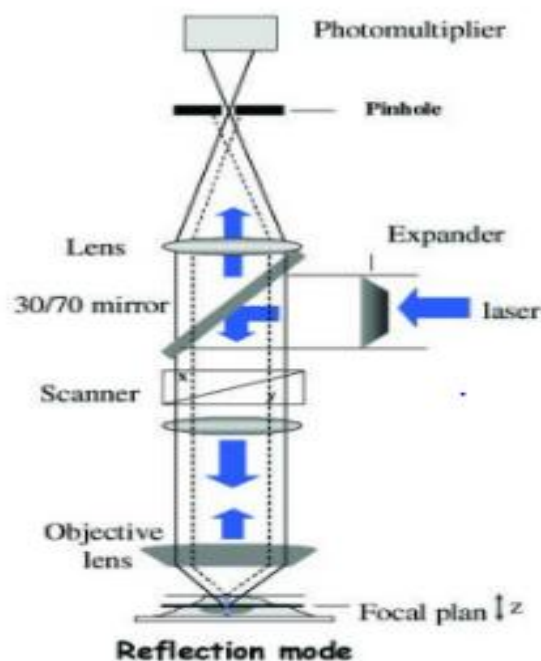


Figure2 : principaux constituants du microscope confocal

4-Appareillage et échantillonnage

Le microscope et l'ordinateur sont les appareils sur lesquels se base la microscopie confocale. Le microscope a le rôle de scanner ou de photographier l'image tandis que l'ordinateur enregistre et interprète l'information reçue

Autres matériels spécifiques 3 de la microscopie confocale sont les colorants utilisés et les échantillons (tissus, substances, solutions, etc.

Dans la microscopie confocale classique à balayage laser

(CSLM) la longueur d'onde du laser est utilisée pour exciter les molécules fluorescentes.

Le signal de fluorescence provenant de la zone de focalisation passe à travers un filtre spatial qui bloque le signal provenant de l'extérieur.

Les molécules fluorescentes sont excitées par le laser, ce qui rend le rendement de fluorescence linéairement dépendant de l'intensité d'excitation.

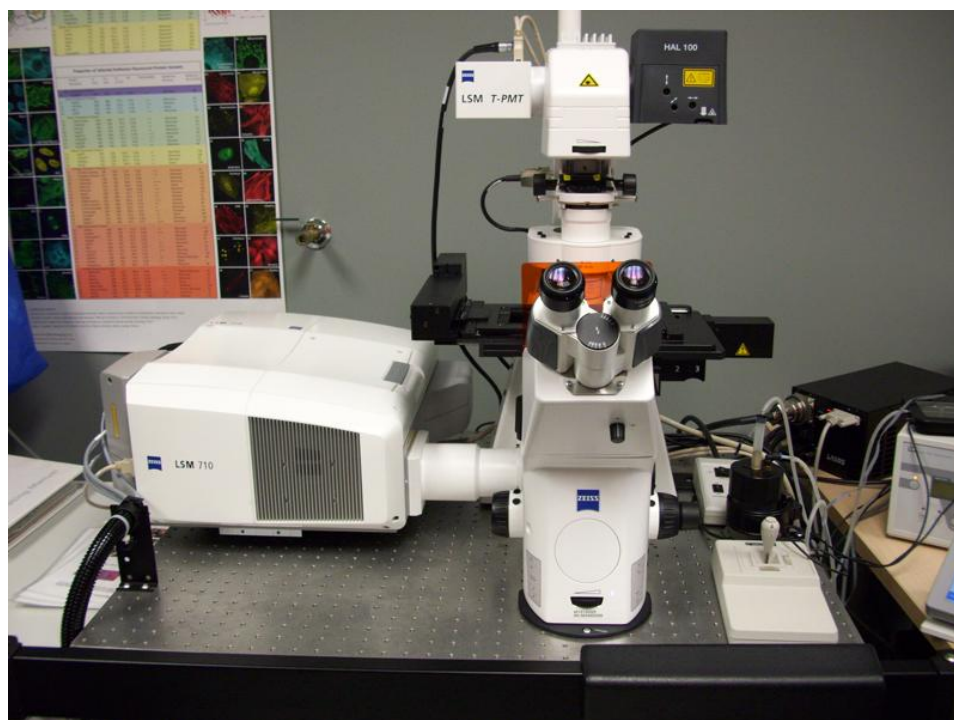


Figure3 : Un microscope confocal

4-1 Description du dispositif

Le but des lasers est de générer la lumière monochromatique spécifique qui est plus facile à contrôler (en termes de filtrage) que d'autres sources de lumière. De même que la finesse du pinceau laser permet d'améliorer énormément la résolution en XY (dans le plan).

Les lasers les plus utilisés sont :

- argon-ion (longueurs d'onde : (457 nm, 488 nm, 514 nm)
- mélange des gaz d'argon-krypton : (488 nm, 568 nm, 647 nm)
- hélium néon (longueurs d'onde : 543 nm, 633 nm)

4-2 Système de balayage

Il s'agit de miroirs galvanométriques très rapides effectuant le balayage en X, et en Y. Le positionnement de l'image dans la profondeur de l'échantillon est généralement obtenu en déplaçant en Z l'objectif.

4-3 Les détecteurs

L'utilisation de photomultiplicateurs (PMT) comme capteurs est devenue essentielle par le très faible signal émis pour chaque position du faisceau. Pour chacune de ces positions, le PMT va produire un signal électrique proportionnel au niveau de lumière collectée. Ce signal électrique est ensuite numérisé pour constituer une matrice de pixels.

4-4 Traitement de l'image

Réunissant les images obtenues, on reconstitue une vue en deux dimensions de l'ensemble de la préparation parfaitement claire dans tous les points créant une image stéréoscopique donnant une vue en trois dimensions de la préparation.

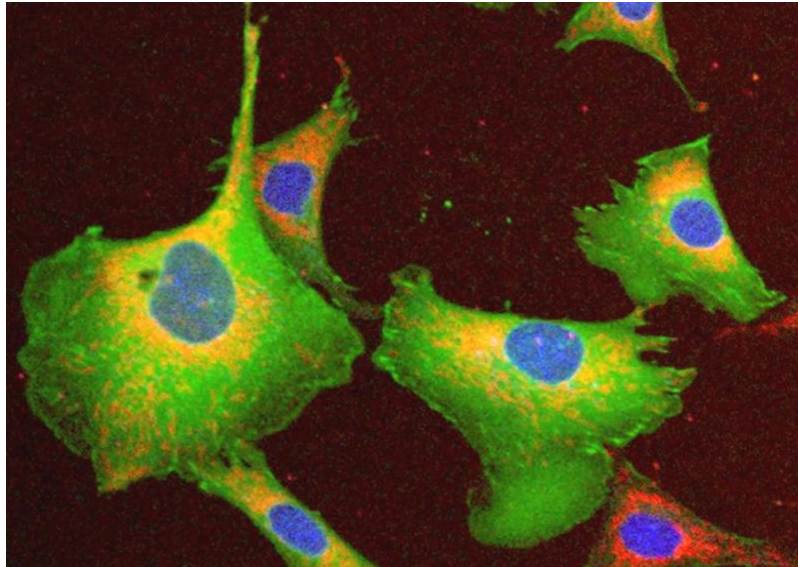


Figure4 : Image obtenue par un microscope confocal

5-Avantages et inconvénients

5-1 Avantages :

- Images nettes, sans flou parasite : Coupe optique
- Reconstruction 3D rapide
- Sensible .

5-2 Inconvénients

- Résolution temporelle faible. En effet, la vitesse de balayage ne permet pas l'acquisition de phénomènes dynamiques rapide demandant par exemple l'acquisition de 25 images/seconde.
- Nombreux paramètres à régler pour optimiser la qualité des images obtenues.
- Possibilité de photodestruction et photobleaching
- Choix des fluorochromes limité par les caractéristiques des lasers présents.