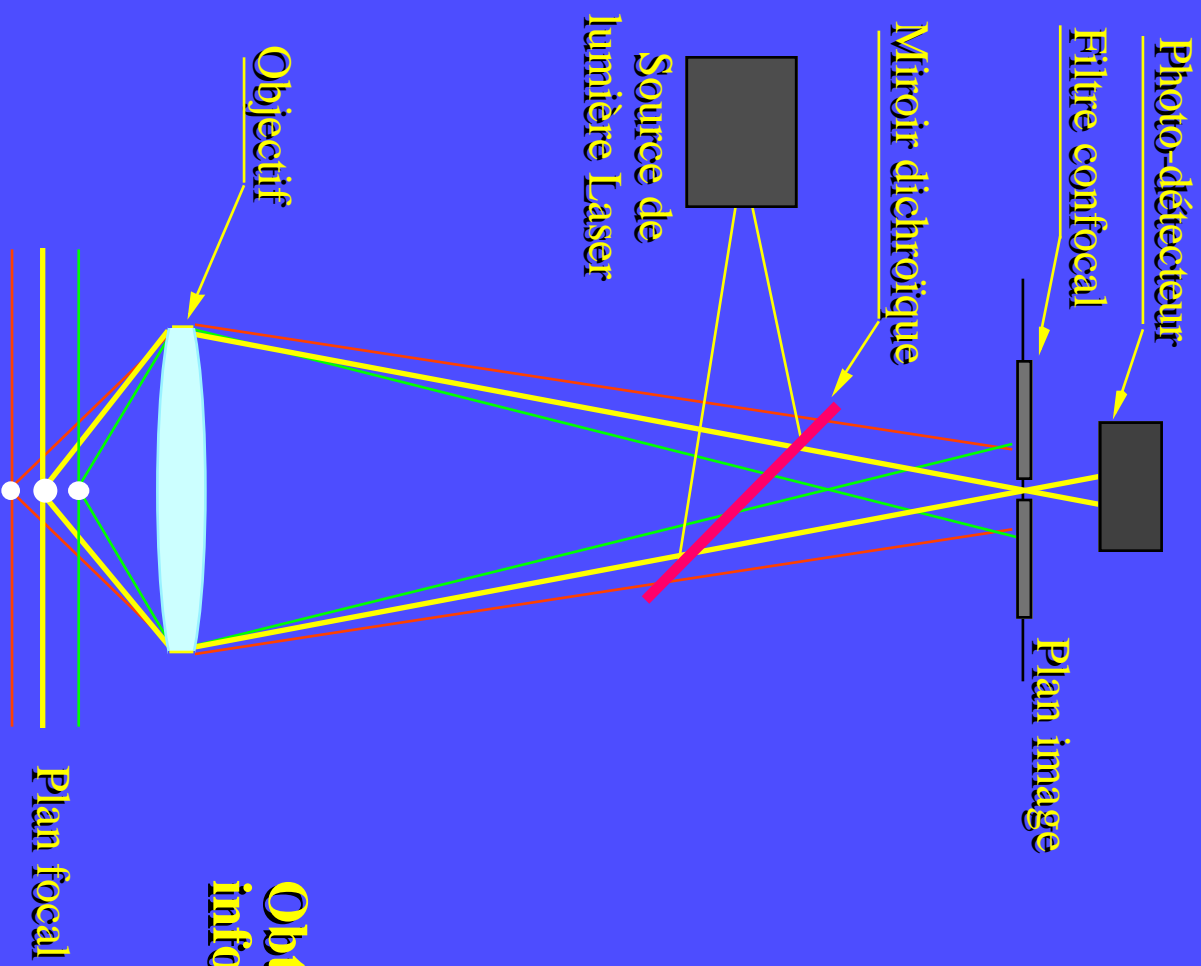
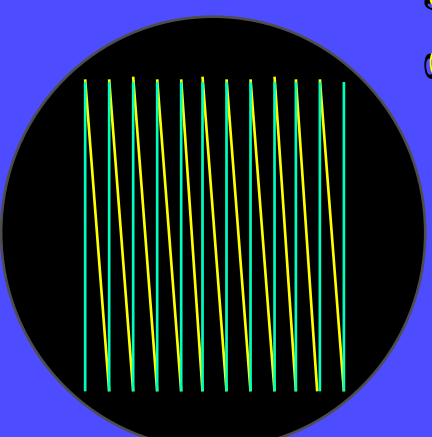


Microscopie photonique

Microscopie confocale à balayage laser



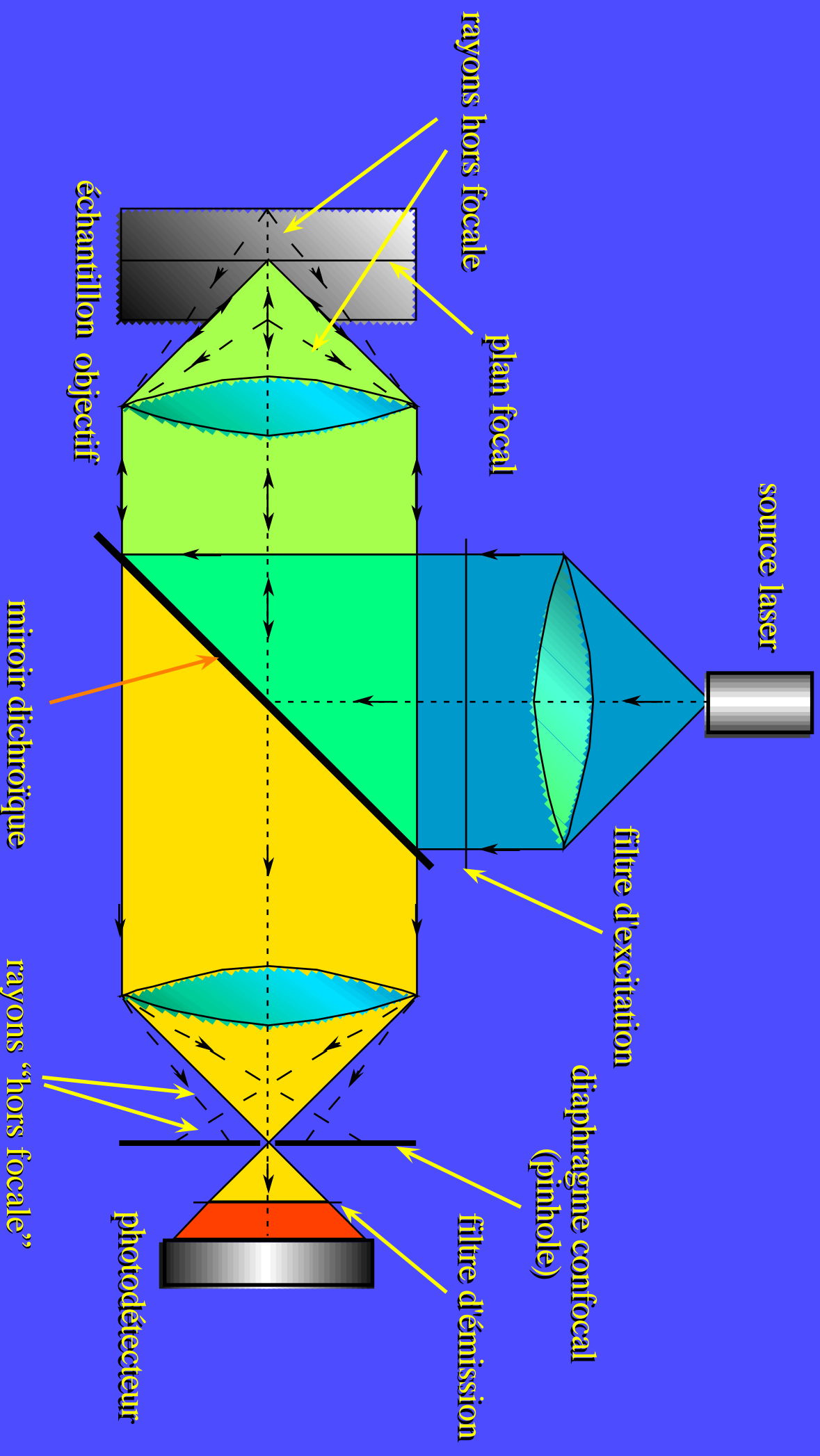
**Image reconstruite point par point
par balayage laser**



**Obtention directe de coupes optiques sans
information parasite des plans voisins**

Microscopie photonique

Schéma de principe du microscope confocal

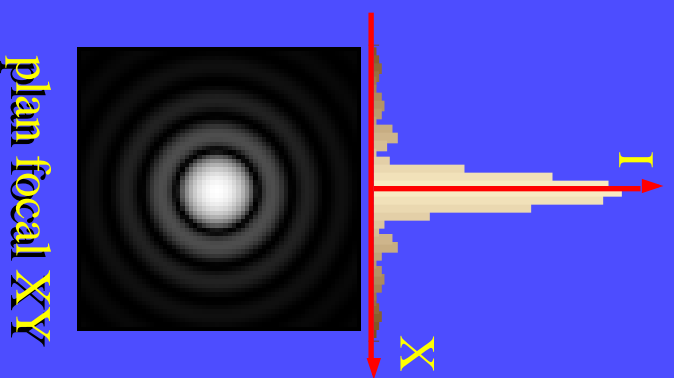


Microscopie photonique

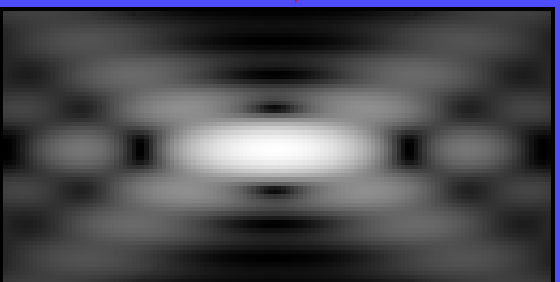
Formation de l'image

Microscopie conventionnelle

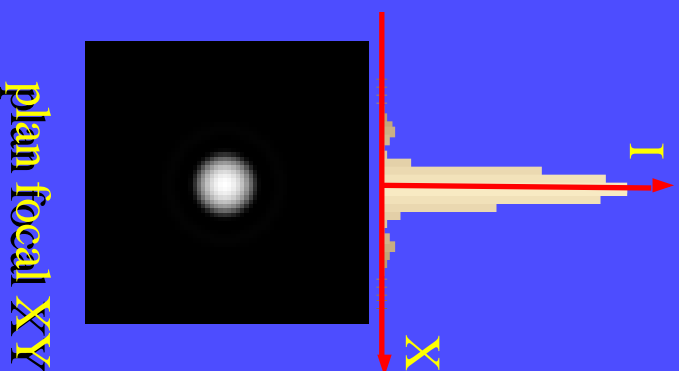
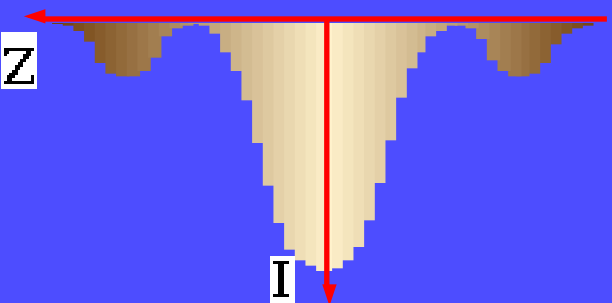
Microscopie confocale



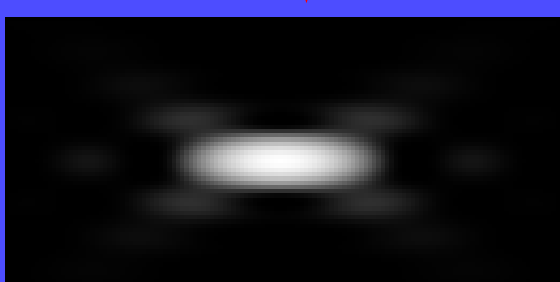
plan focal XY



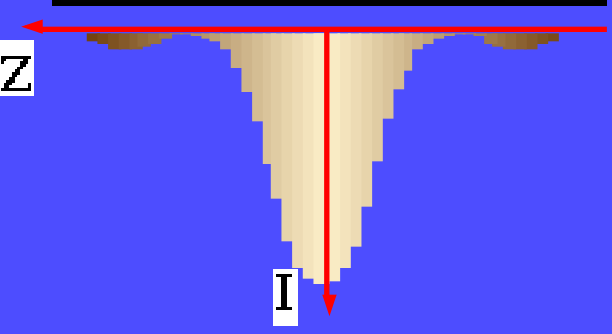
vue XZ



plan focal XY

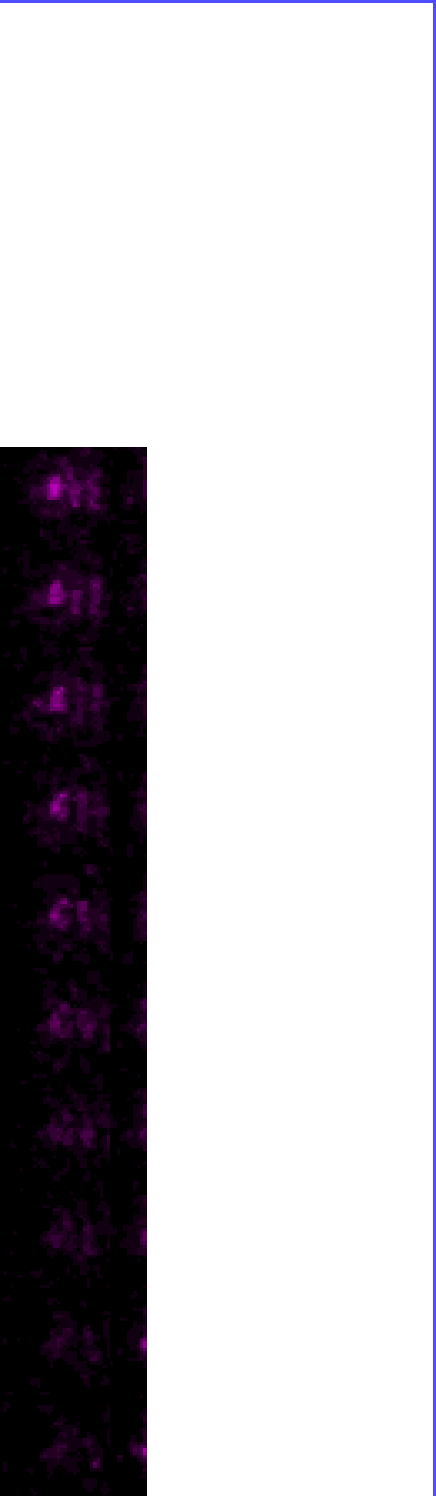


vue XZ



Microscopie photonique

Microscopie confocale - PSF réelle



Bille diamètre 200nm
Imagée avec objectif 63x 1.4NA
échantillonnage 100x100x100nm



Microscopie photonique

Comparaison Conventiomel/Confocal

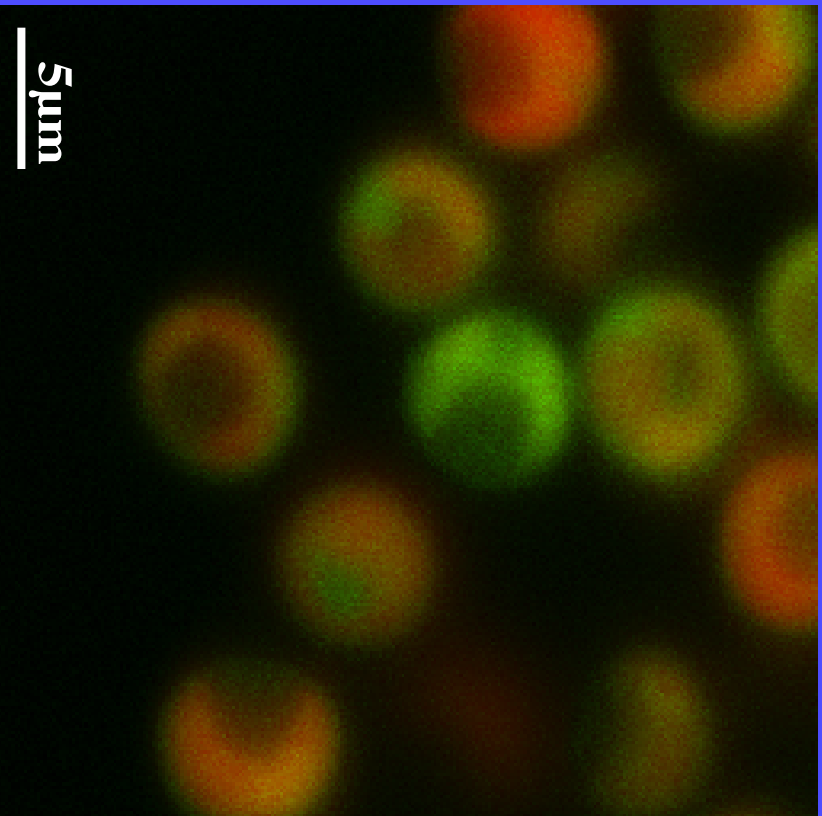


Image 256x256
Fluorescence conventionnelle

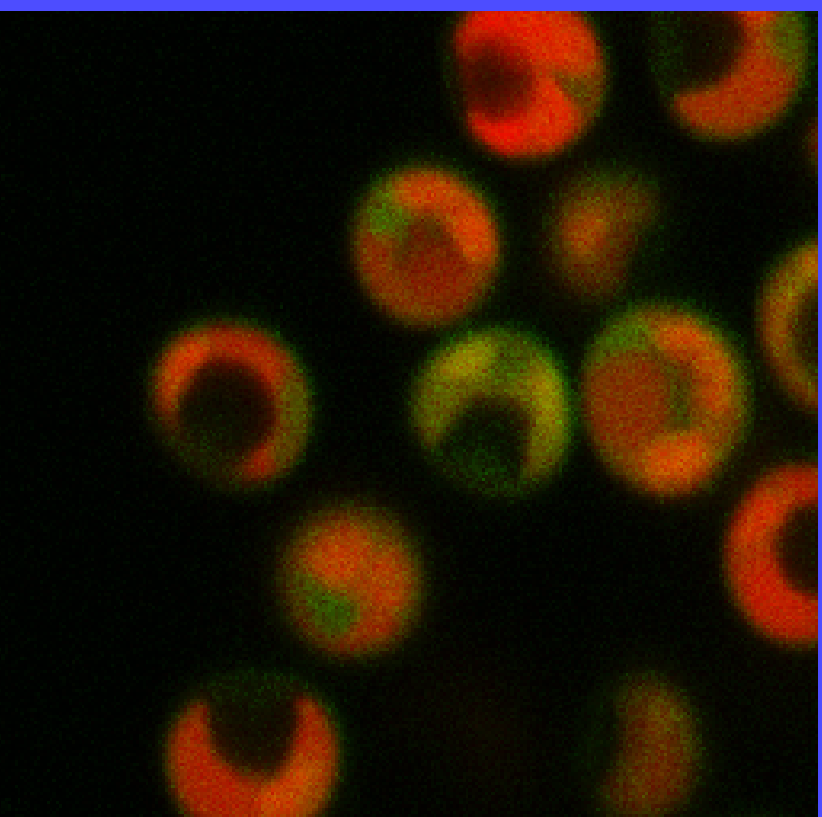
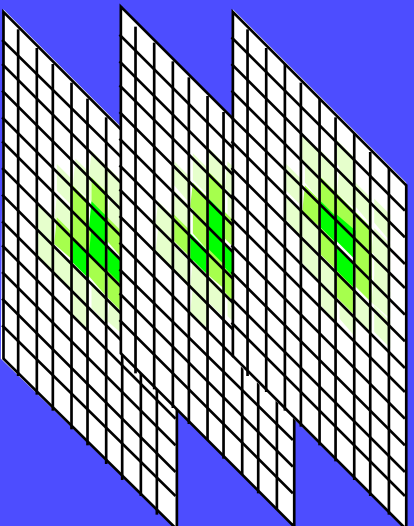


Image 256x256
Fluorescence confocale

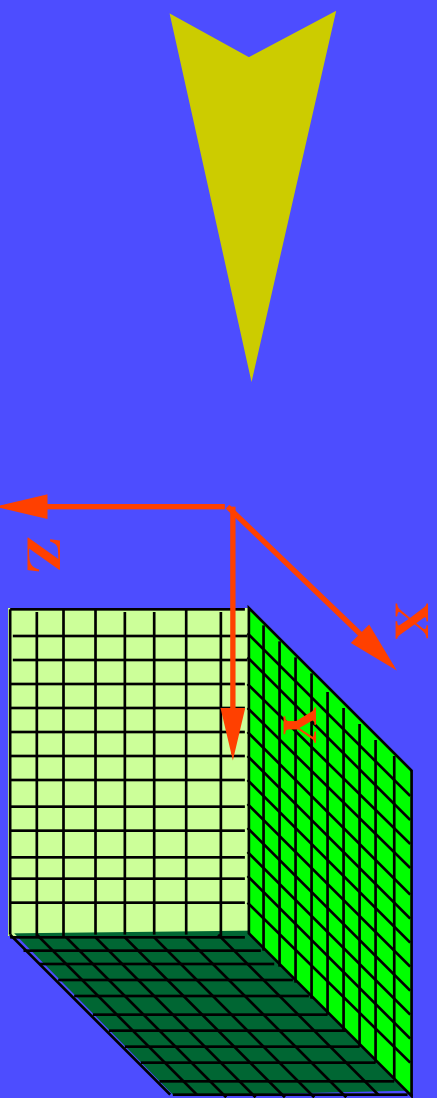
Microscopie photonique

Description des données 3D

Pile de sections numérisées

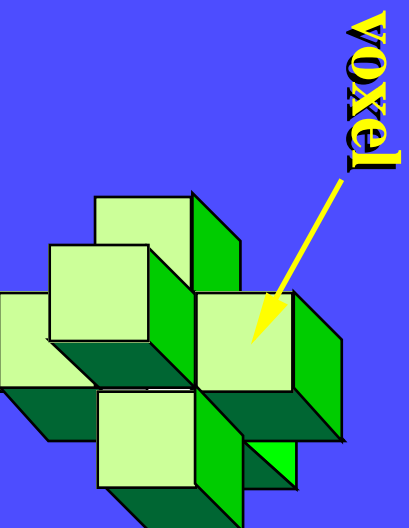


Volume numérique

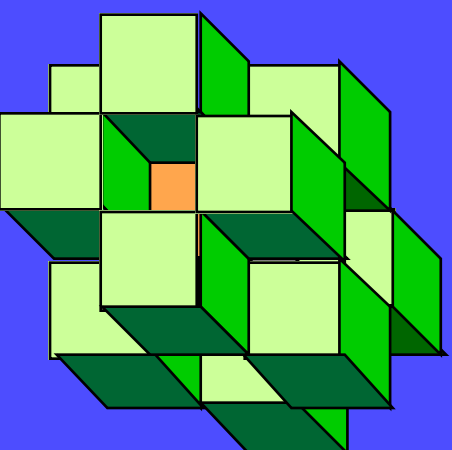


Connexité (voisinage) dans un volume numérique

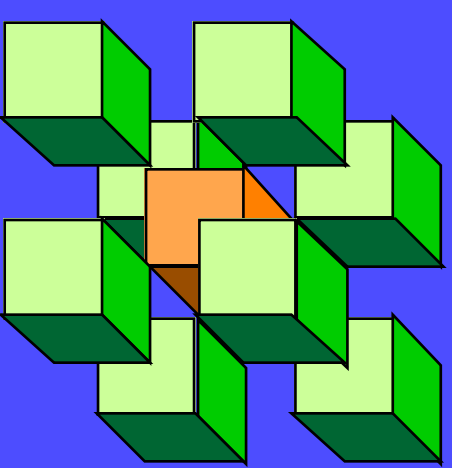
facette commune



arête commune

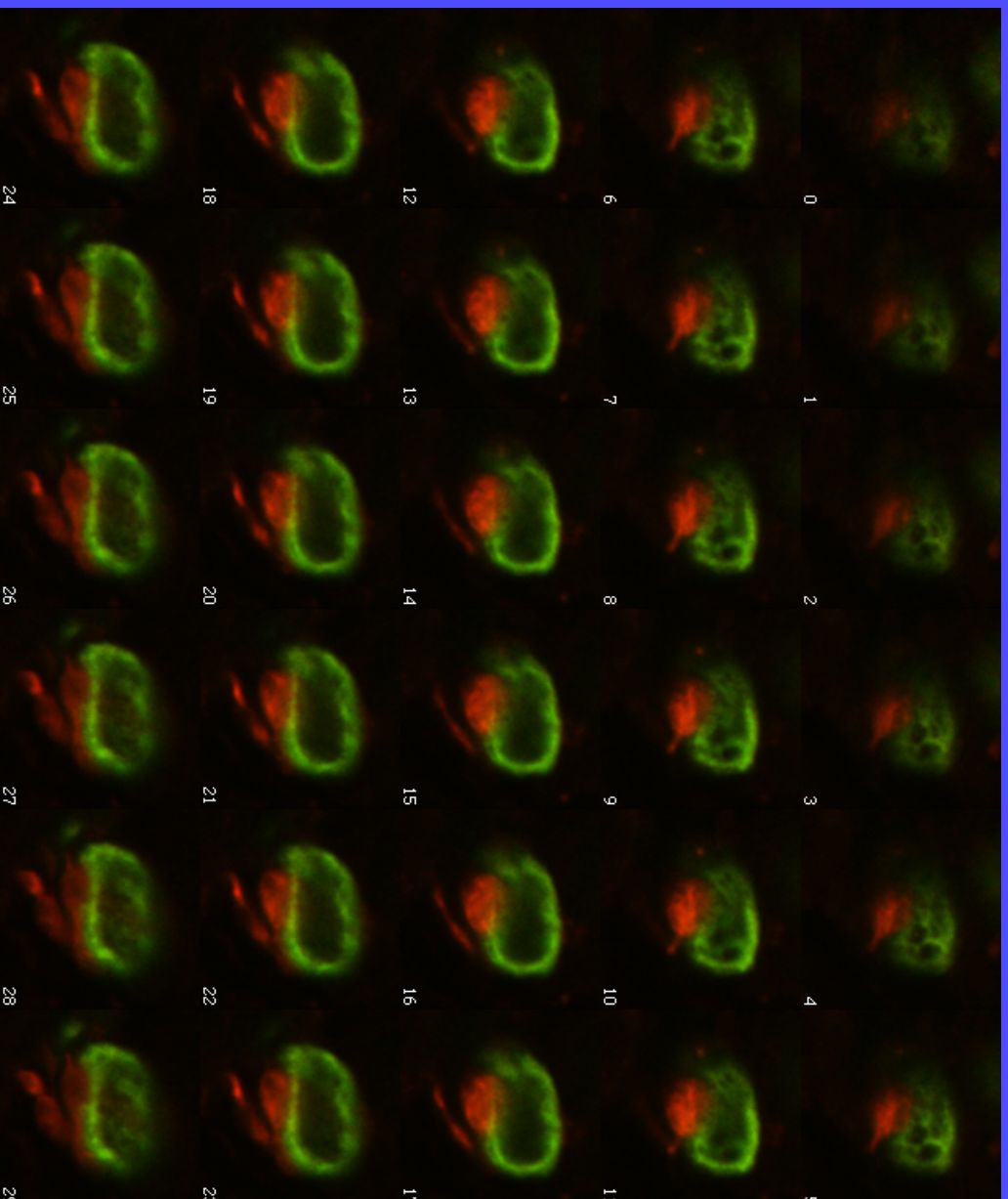


sommet commun



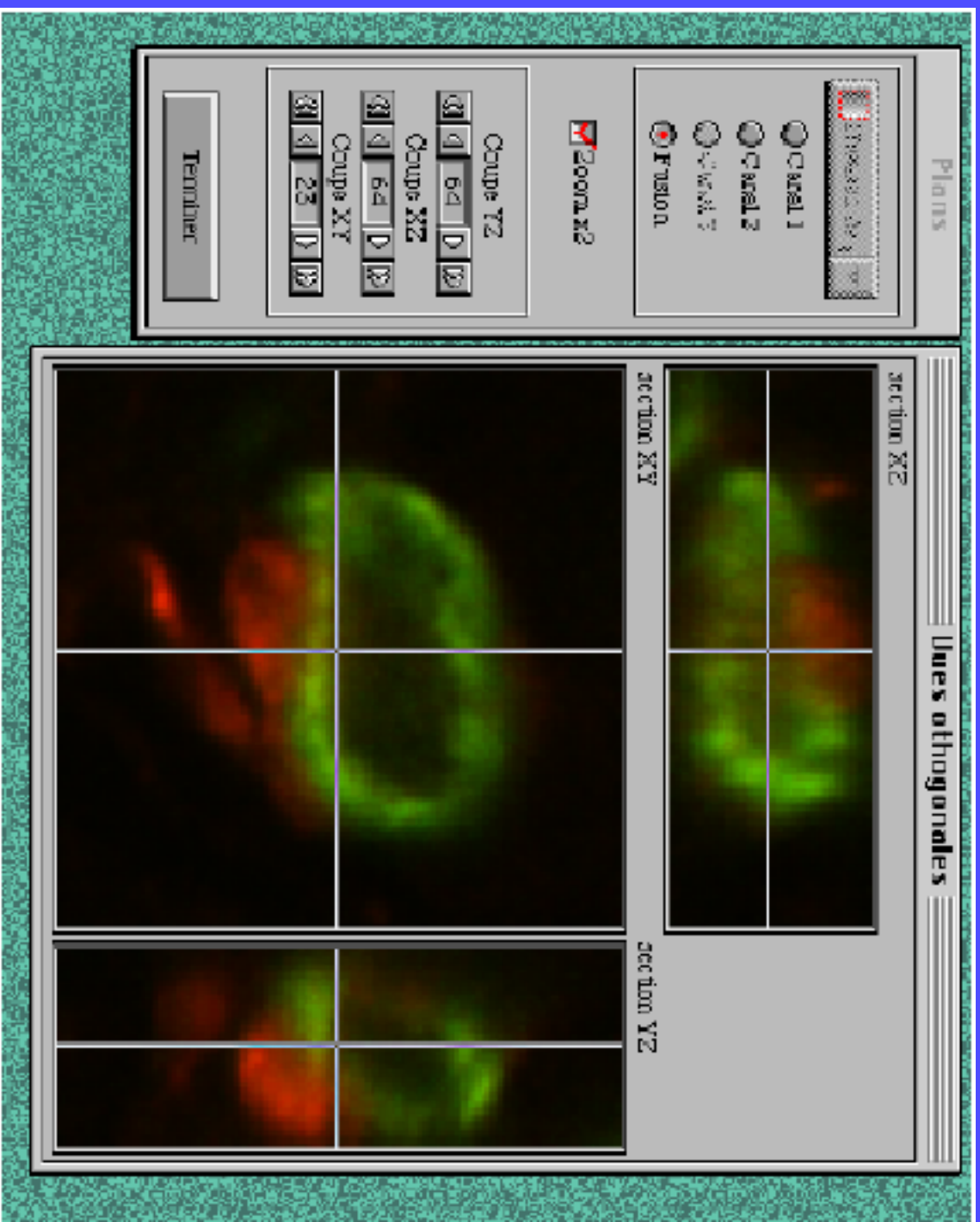
Microscopie photonique

Galerie de sections optiques



Microscopie photonique

Microscopie 3D - Sections orthogonales



Microscopie photonique

Limites des méthodes d'acquisition en microscopie confocale

Modes de microscopie limités

Profondeur d'observation limitée par les propriétés des objectifs

Photodégradation des fluorochromes

Absorption de la lumière par le spécimen

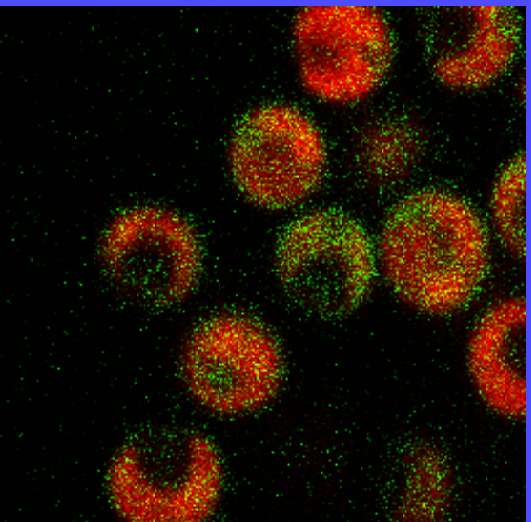
Atténuation du signal lumineux par l'optique du microscope

Bruits photonique et électronique

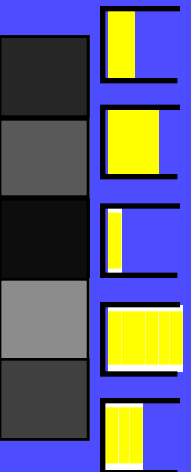
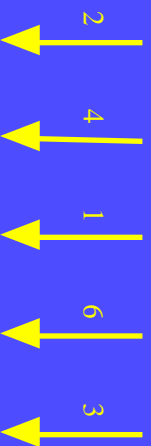
Déformations dues aux différences d'indice de réfraction

Microscopie photonique

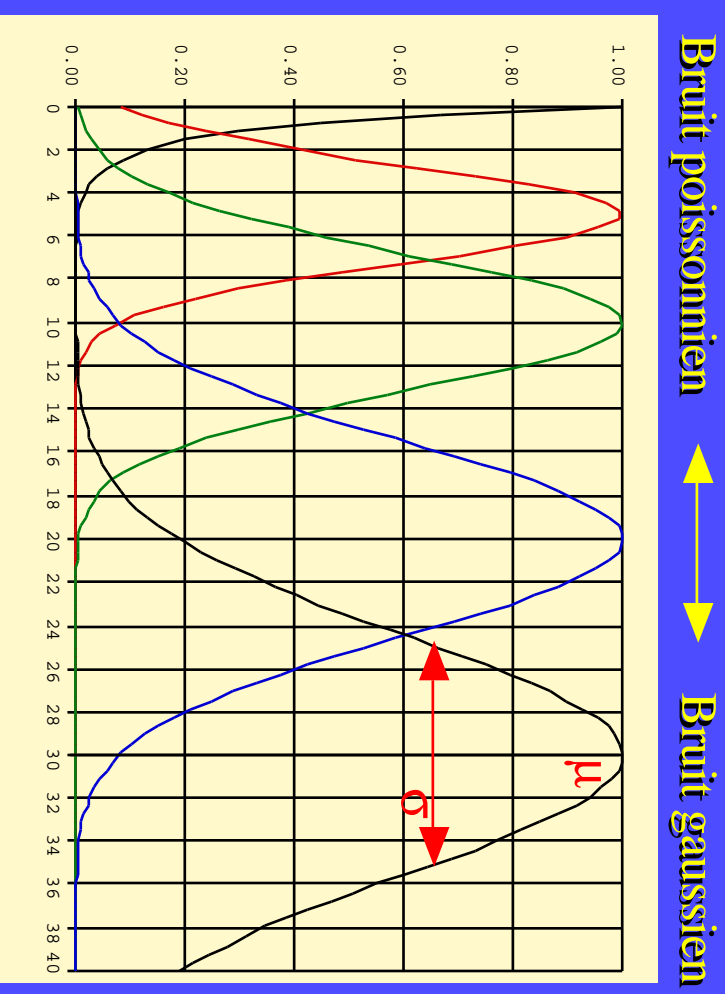
Fluorescence - Nature du bruit photonique



Source 3 photons/ms



PIXELS temps d'intégration 1 ms



Amélioration du rapport signal-bruit



Microscopie photonique

Amélioration du rapport signal/bruit

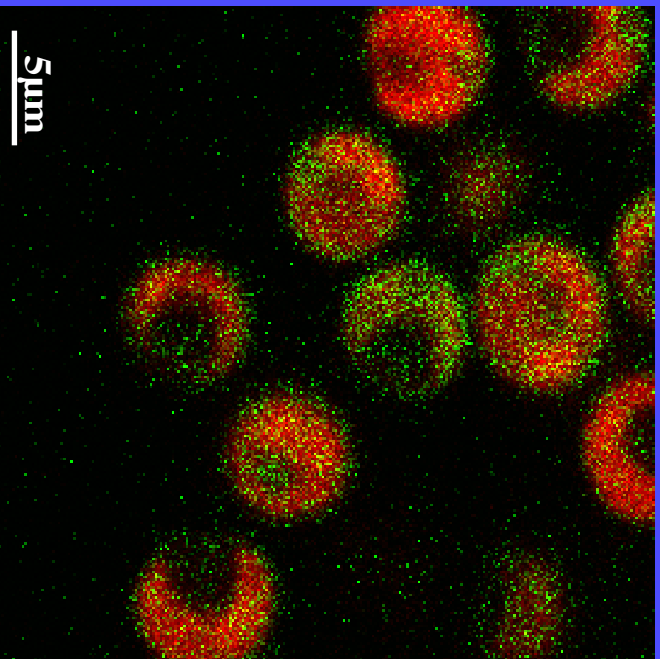
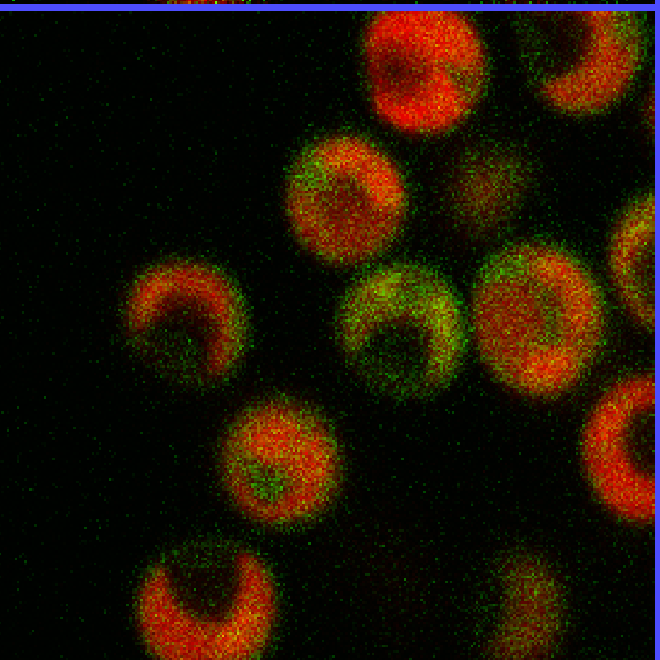
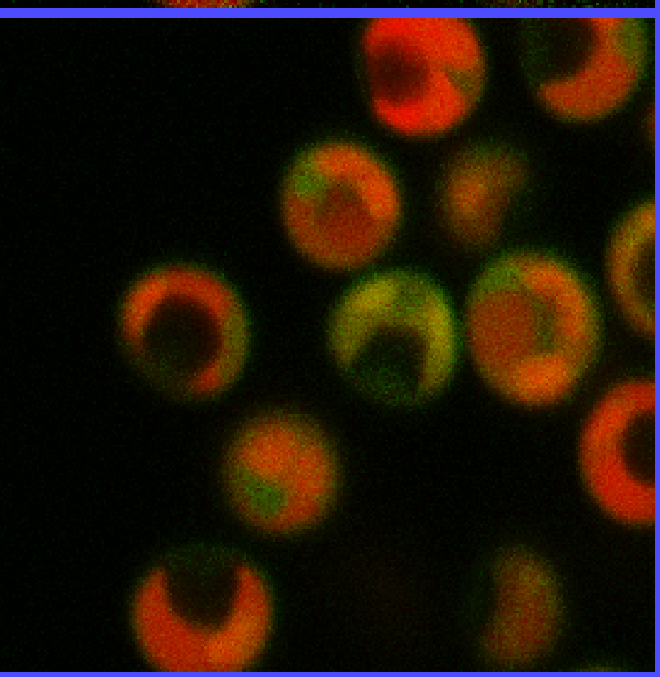


Image 256x256 : 1 trame
durée : 0,5 s/trame



Moyennage de 4 trames

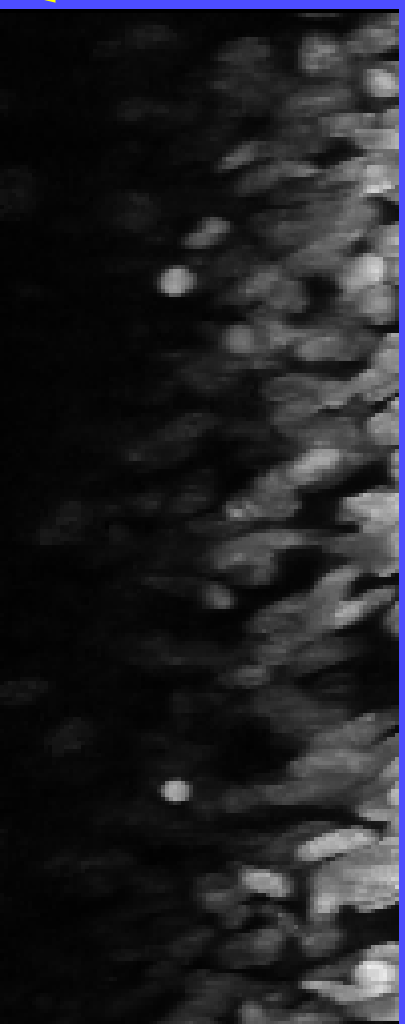


Moyennage de 32 trames

Microscopie photonique

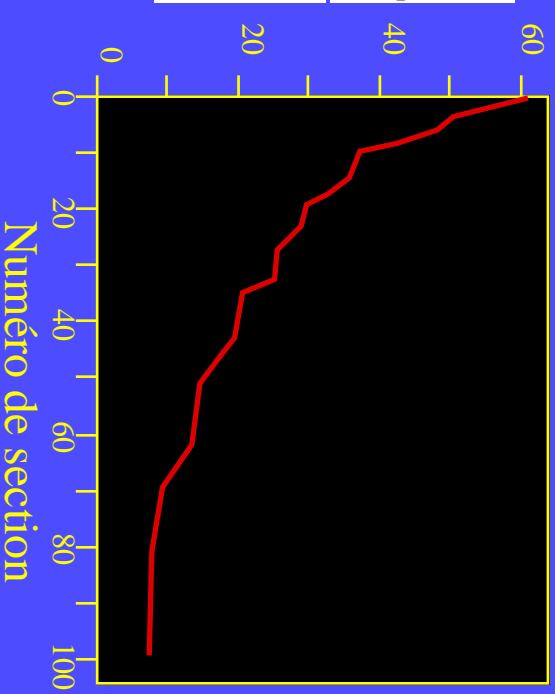
Absorption de la lumière par le specimen

Axe optique (50 μ m)

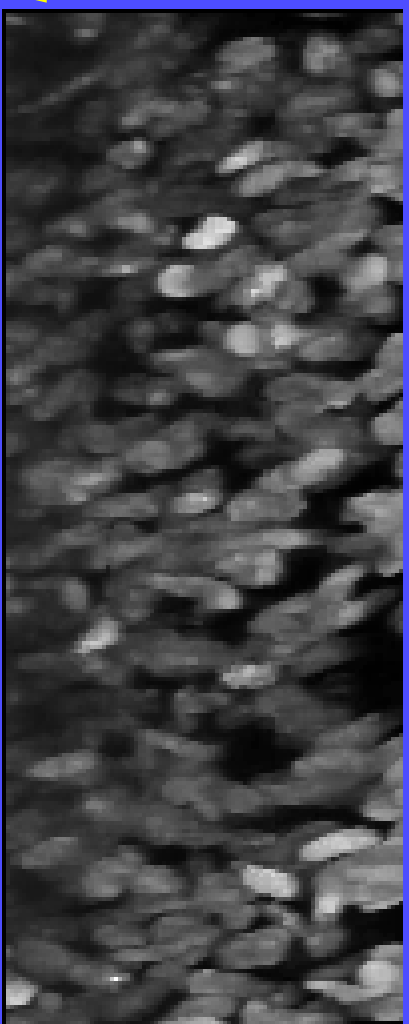


Vue latérale brute (noyaux de cellules myocardiques)

Intensité moyenne

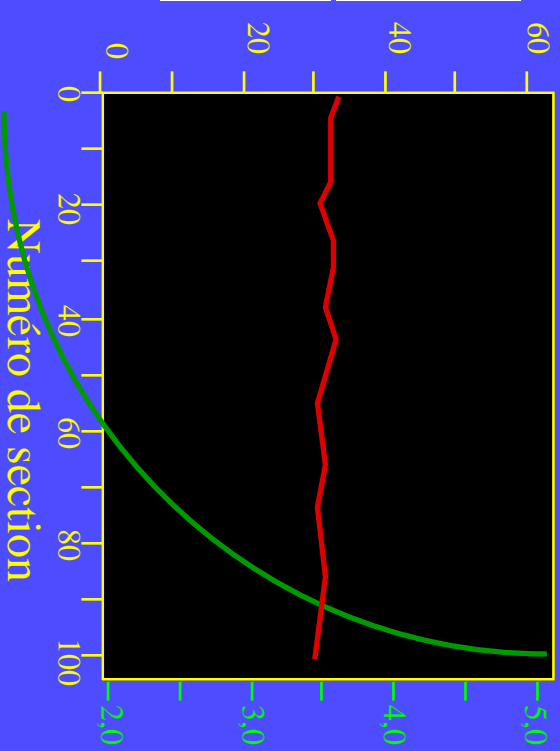


Axe optique (50 μ m)



Vue latérale après compensation par une fonction log-logistique (Rigaut et al., 1991)

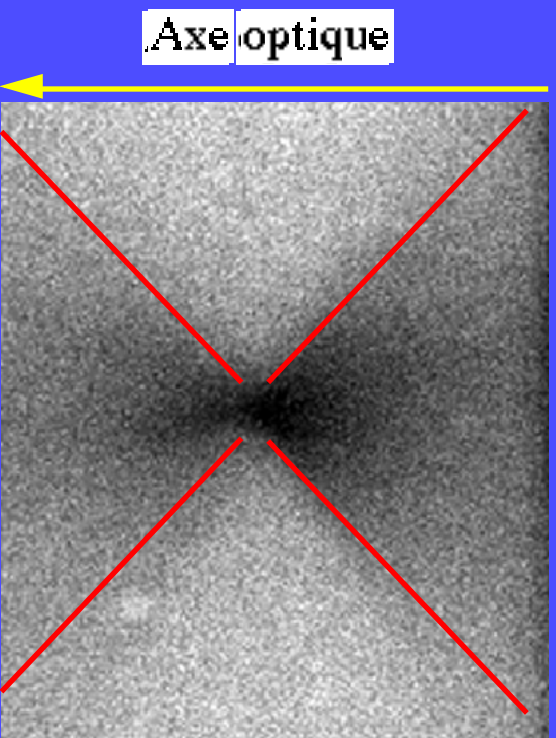
Intensité moyenne



Microscopie photonique

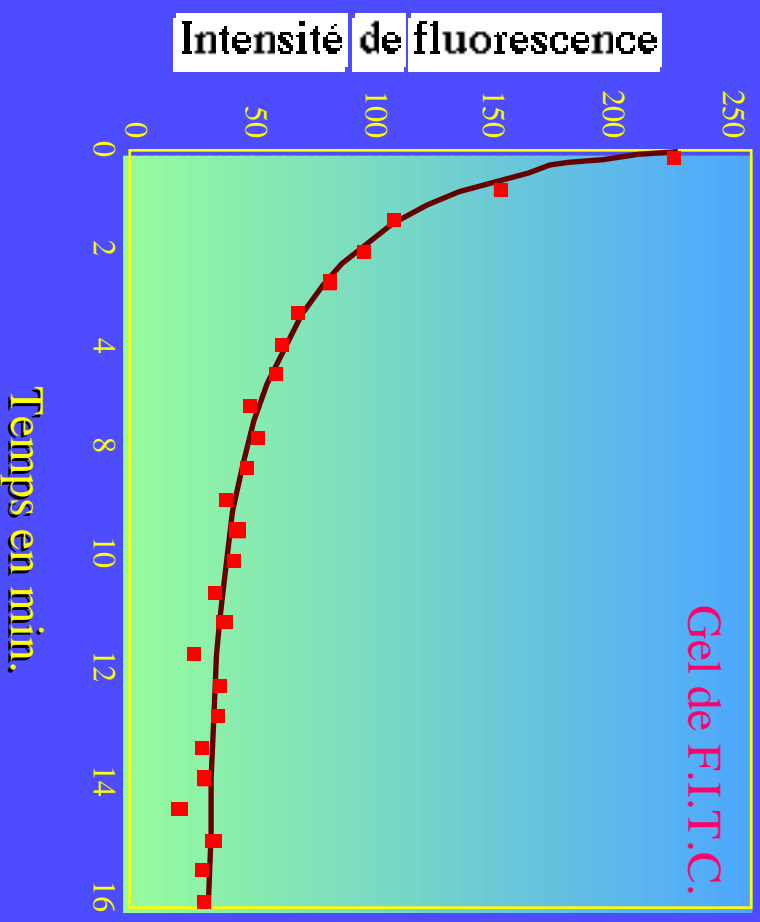
Photodégradation de la fluorescence

Photodégradation
d'une préparation homogène



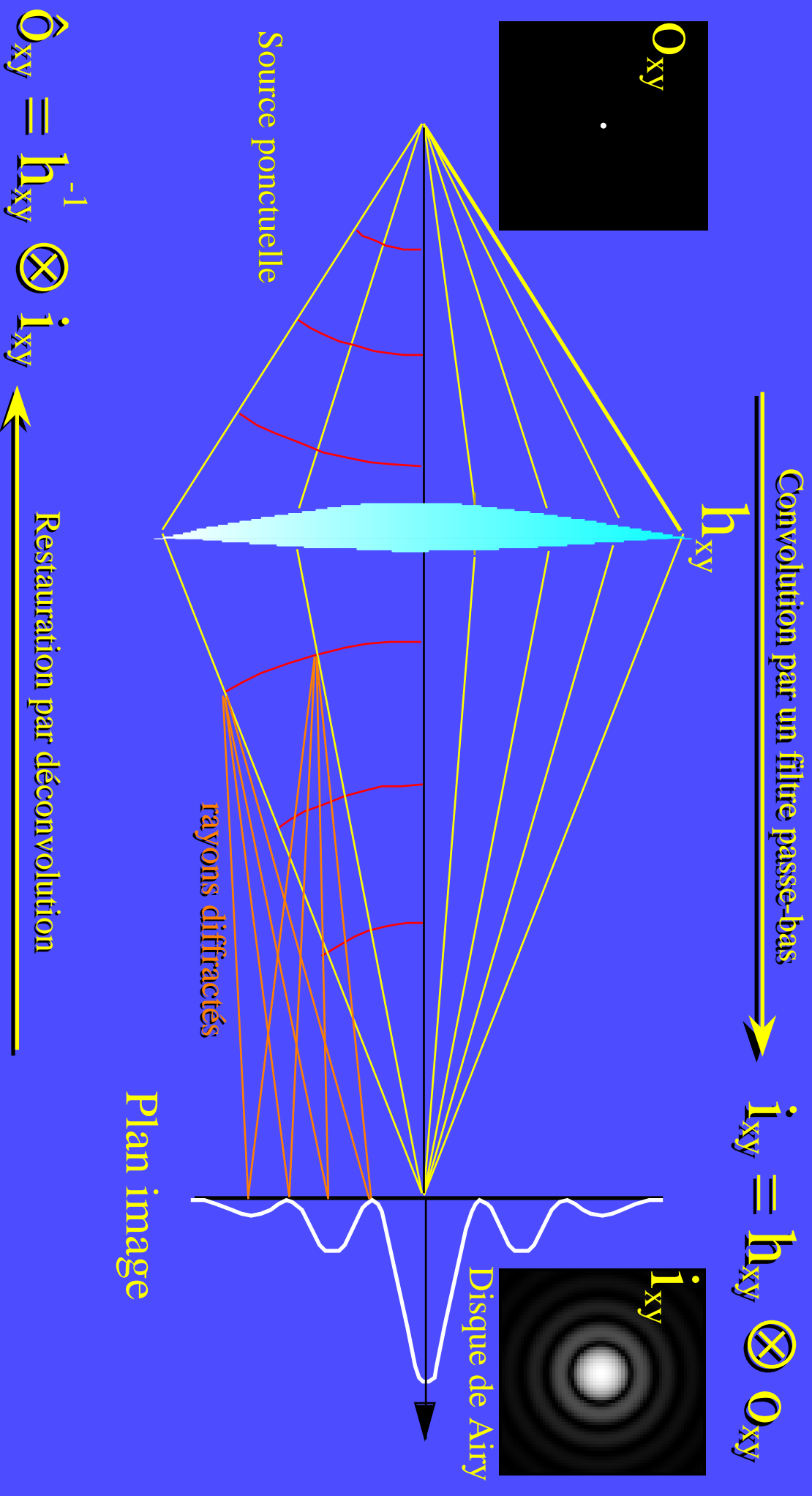
Les molécules de fluorochrome
situées dans le double cône de
lumière sont altérées

Photodégradation en fonction
du temps d'exposition



Microscopie photonique

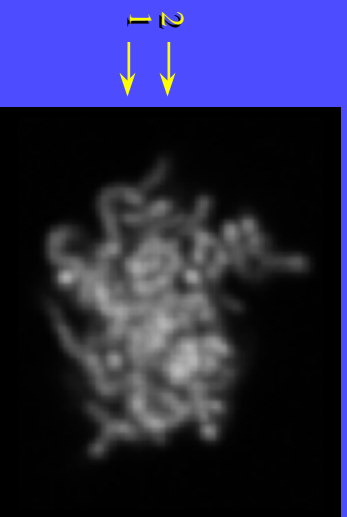
Formation de l'image par une lentille



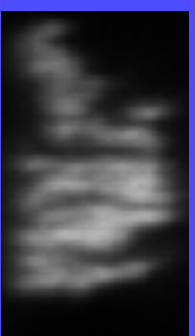
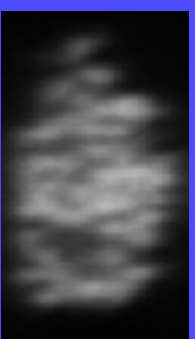
Microscopie photonique

Restauration de la résolution par déconvolution

Spermatozoïde démembrané de *Xenopus laevis* incubé dans un extrait d'oeuf
Etude de la cinétique de recondensation chromosomique (1h30)
Marquage YOYO (de la Barre & Dimitrov)

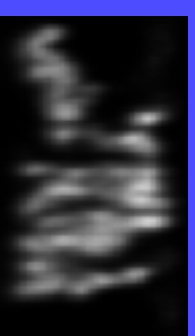
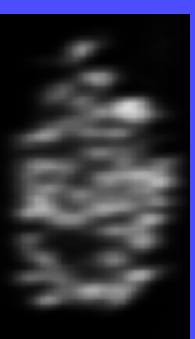
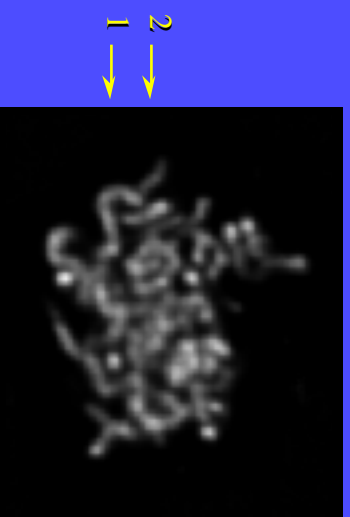


Sections XY

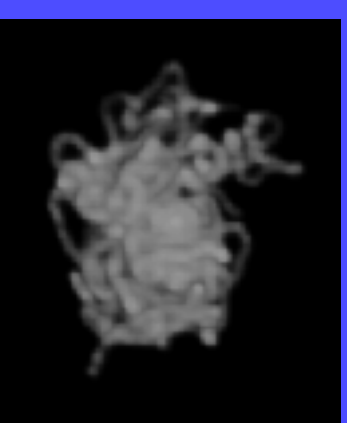


Données

Sections XZ



Données restaurées

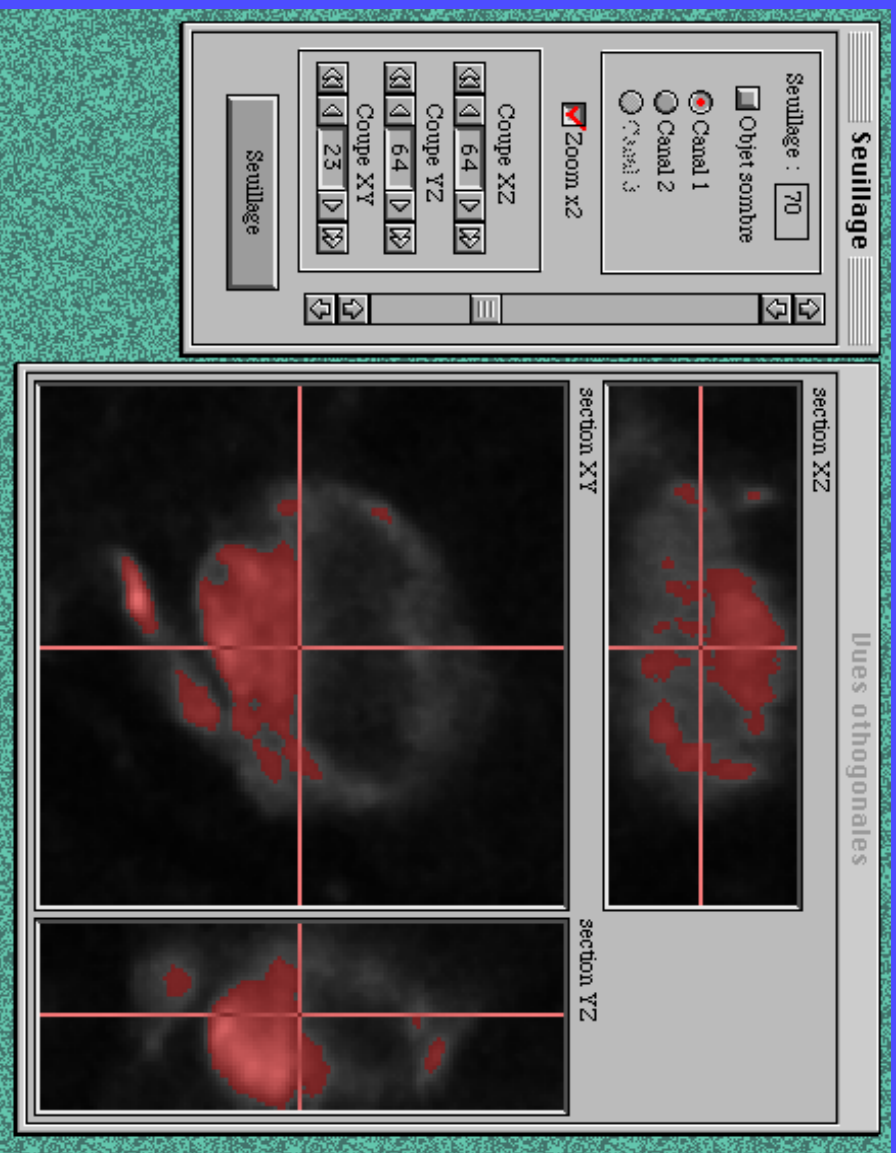


Reconstructions



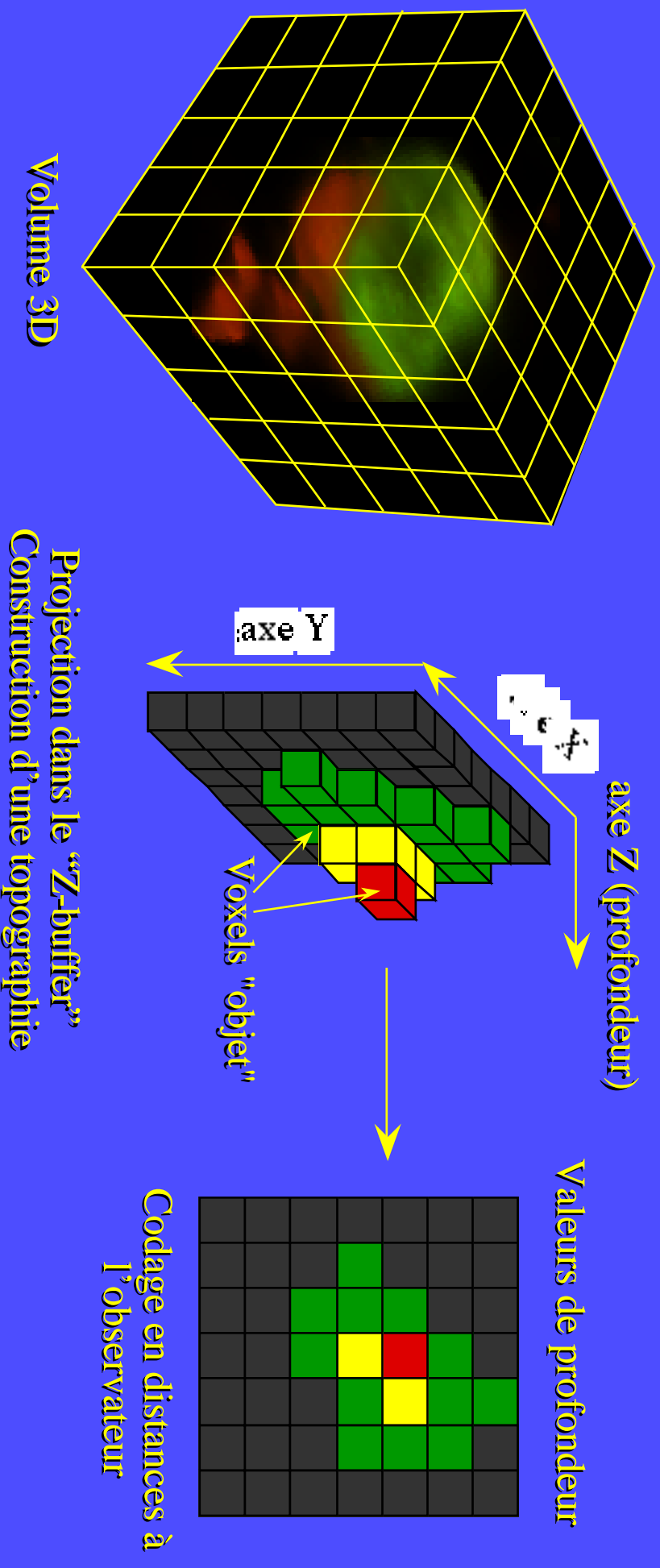
Microscopie photonique

Reconstruction surfacique - Seuillage objet



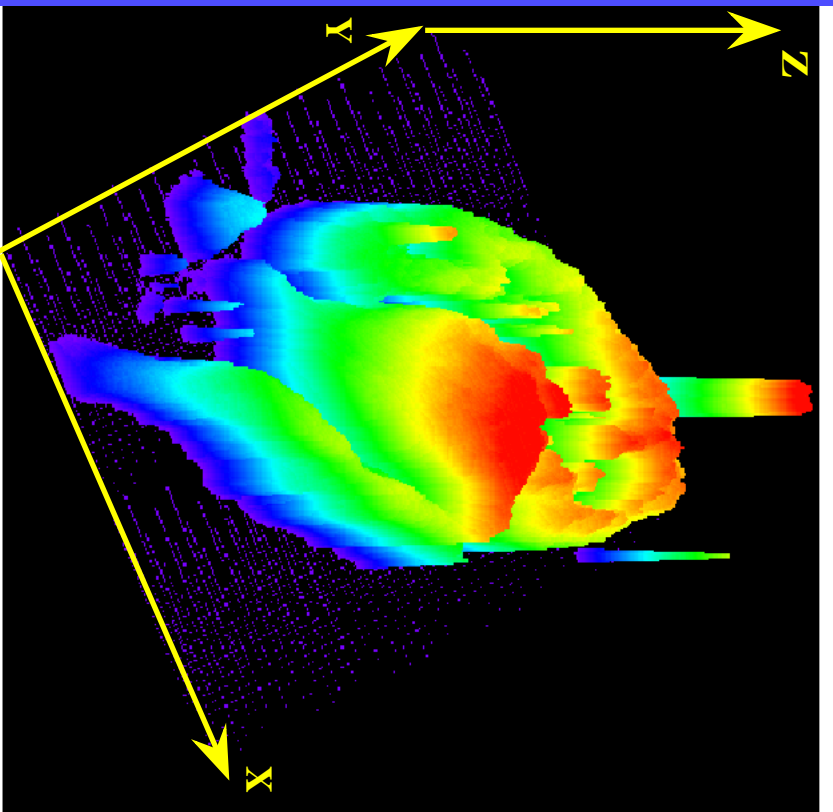
Microscopie photonique

Reconstruction surfacique - codage de distance

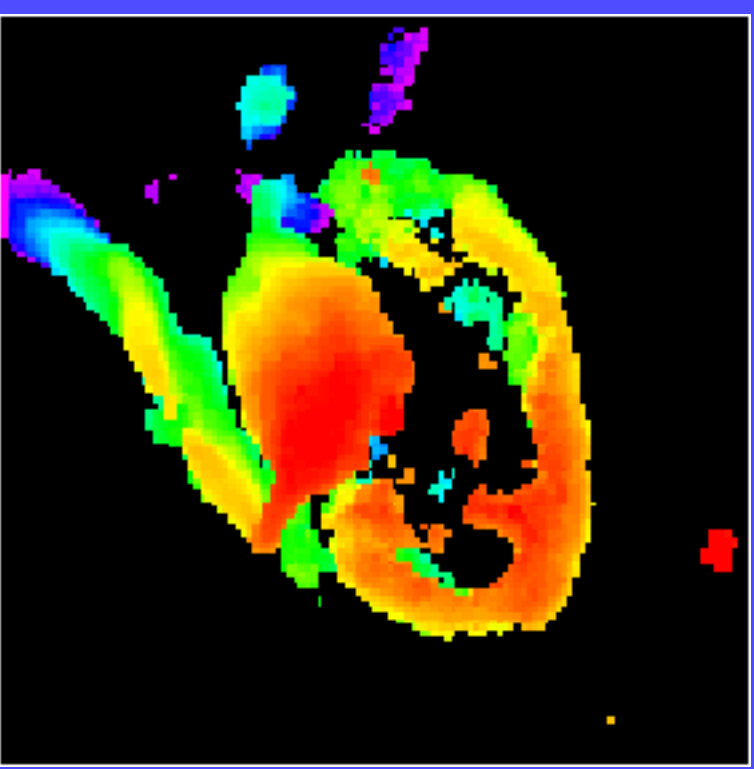


Microscopie photonique

Reconstruction surfacique - Tampon Z



Z-buffer

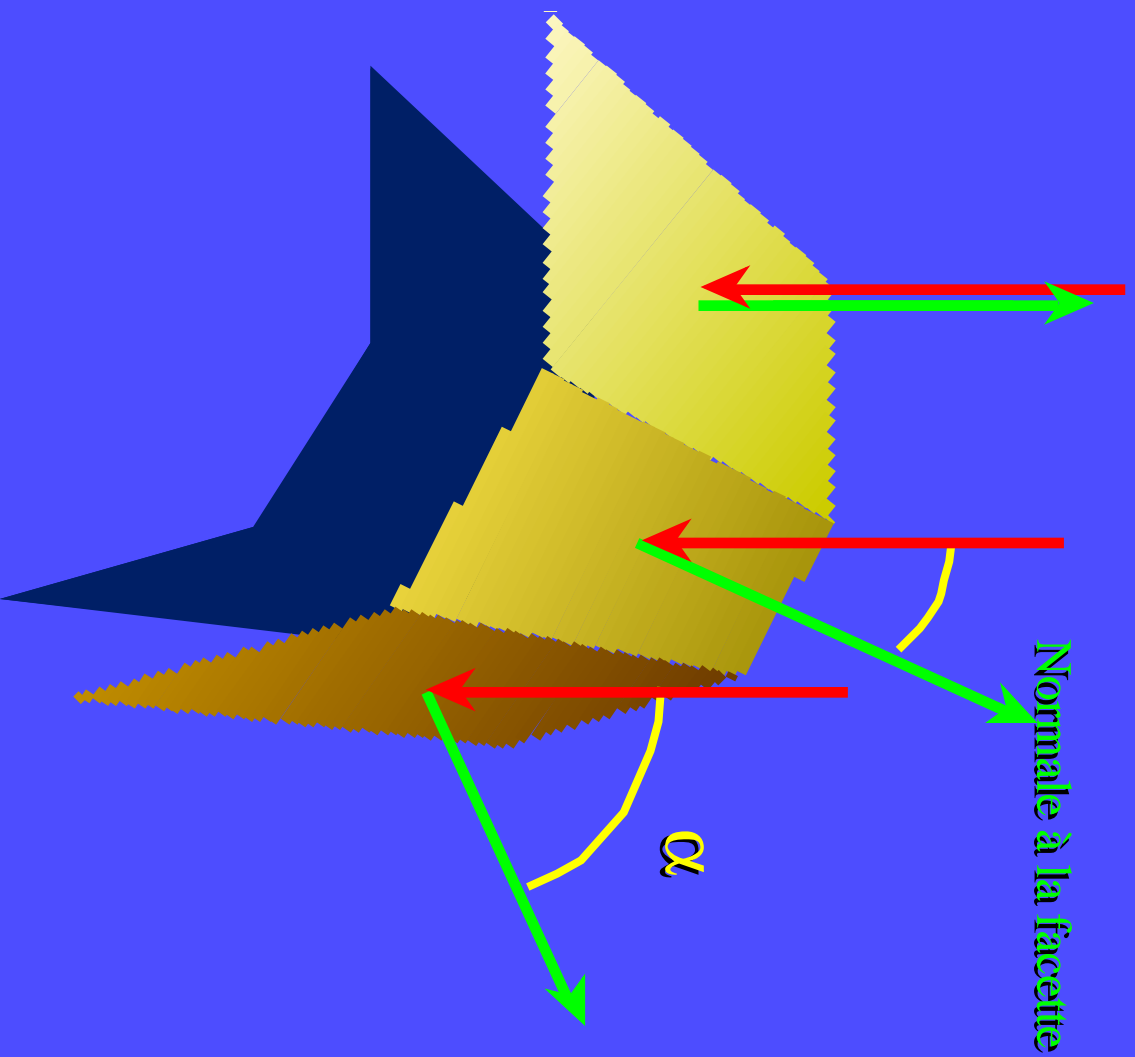


Carte de distance

Microscopie photonique

Reconstruction surfacique - Modèle d'illumination

Direction d'observation
& lumière incidente



Modèle simplifié d'illumination
par diffusion et réflexion

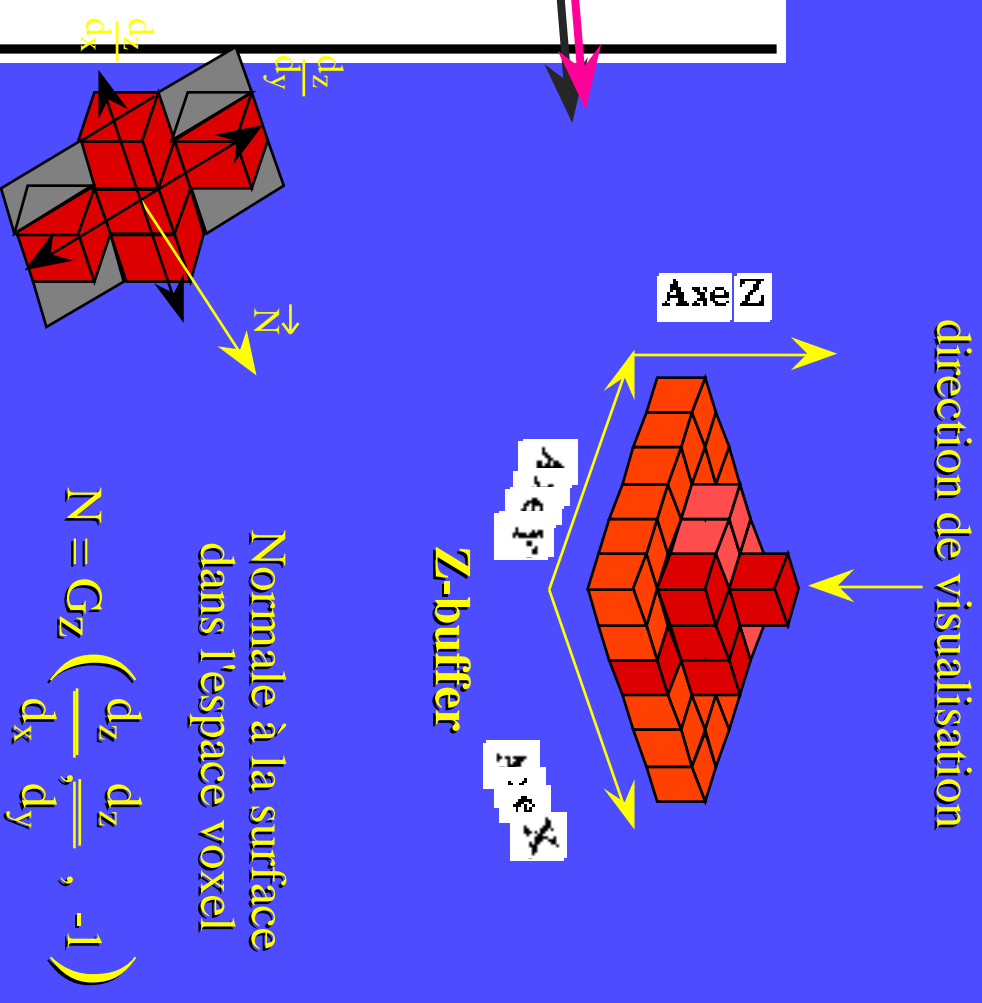
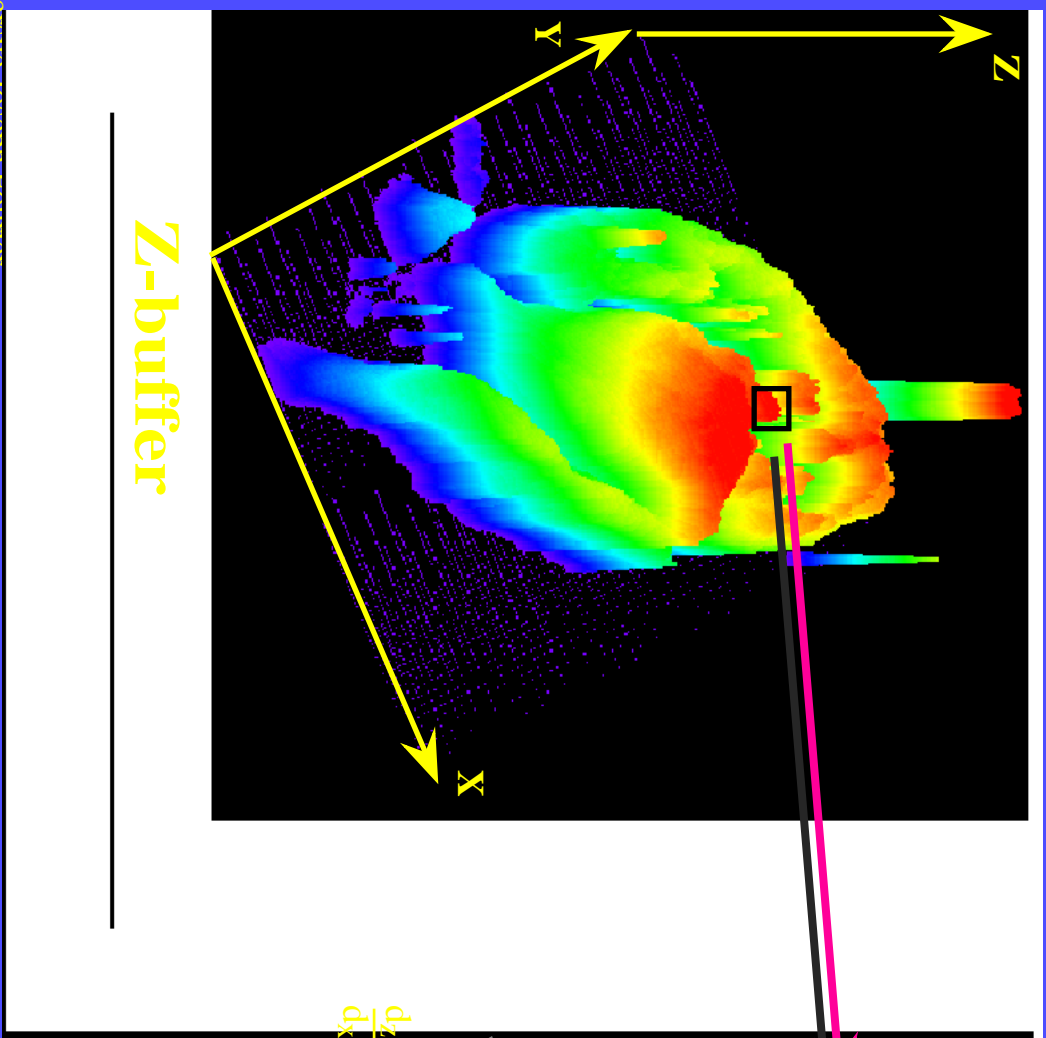
α angle entre la normale à la surface
et la lumière incidente I_0

$$I = I_0 (k_1 + k_2 \cos \alpha)$$

k_1 constante de lumière diffuse ambiante
 k_2 constante de lumière réfléchie
avec $k_1 < k_2$ et $k_1 + k_2 = 1.0$

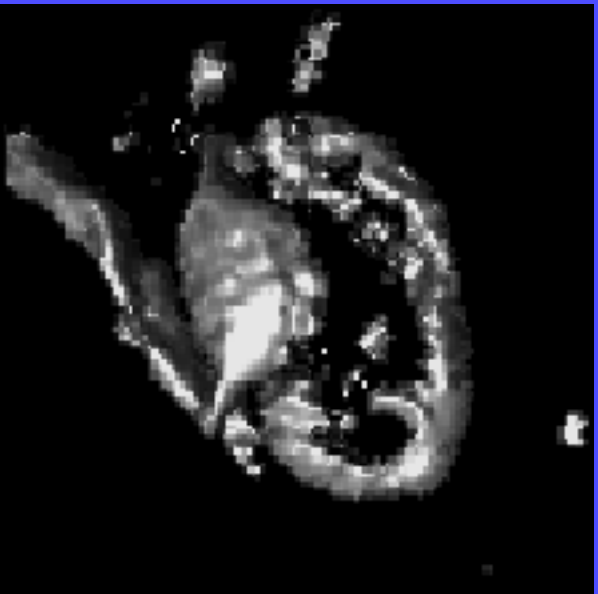
Microscopie photonique

Reconstruction surfacique - Modèle d'illumination

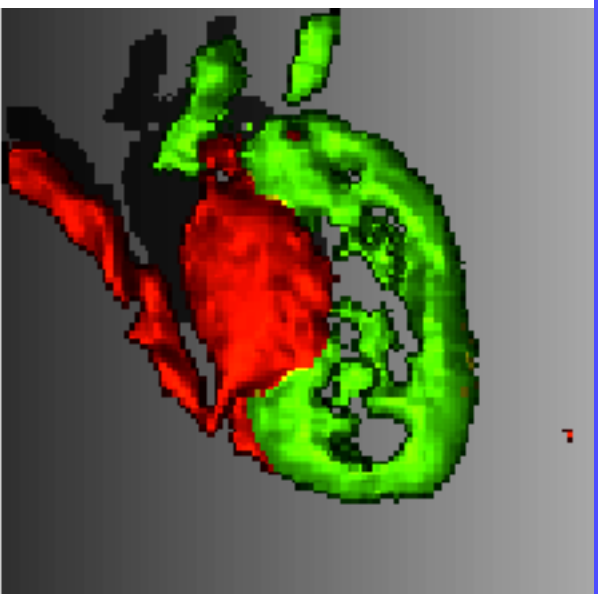


Microscopie photonique

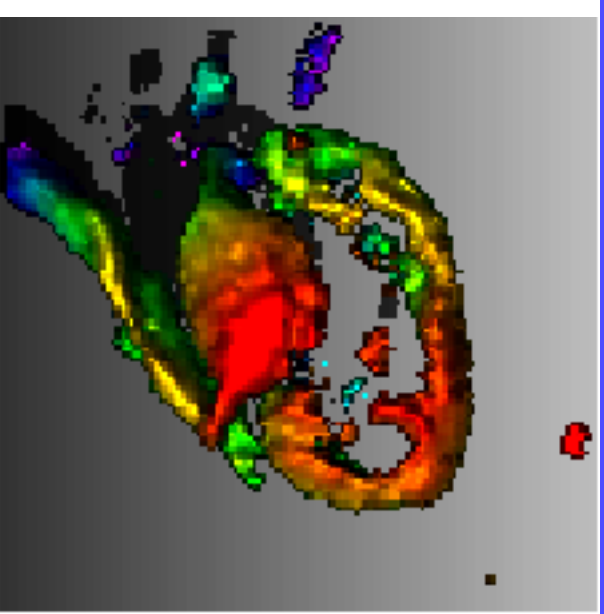
Reconstruction surfacique - Modèle d'illumination



Modèle d'illumination
diffuse



Prise en compte du marquage
fluorescent et ajout d'ombrages

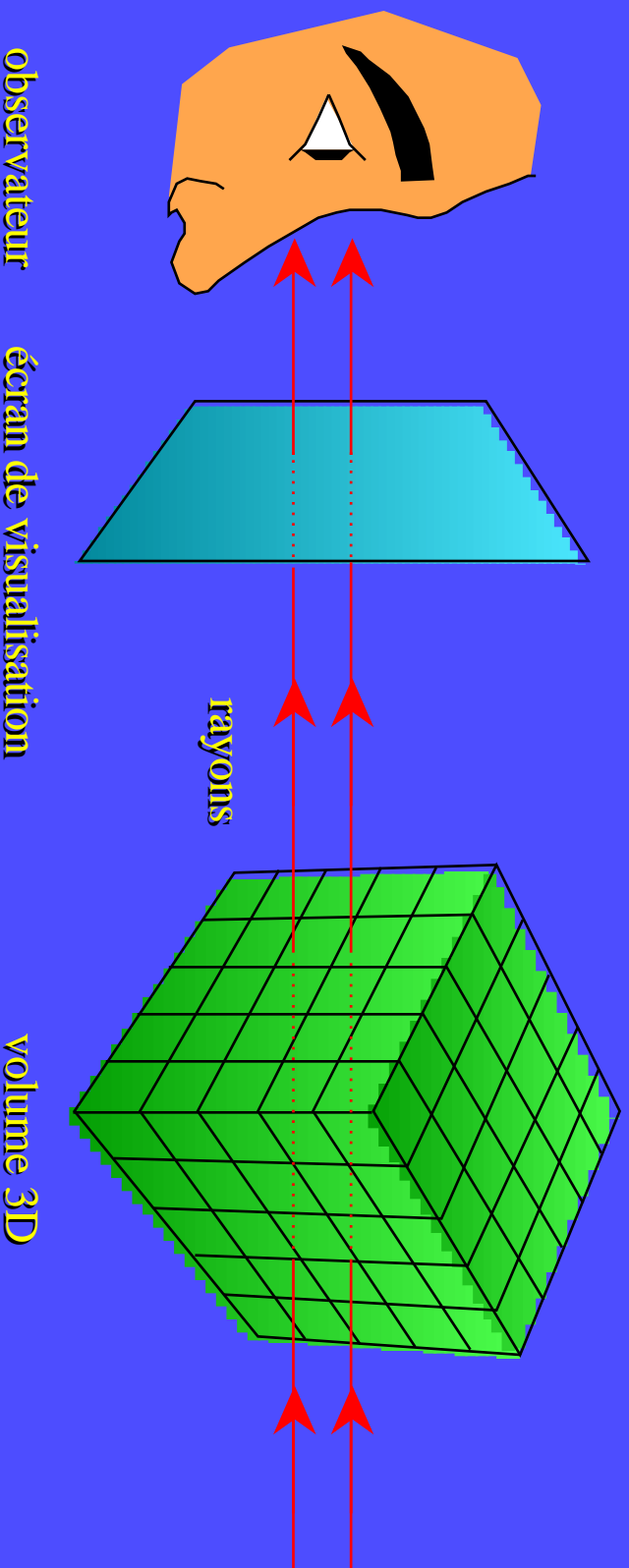


Codage en distances
et ajout d'ombrages

Microscopie photonique

Microscopie confocale - Visualisation 3D

Reconstruction par suivi de rayons



Microscopie photonique

Microscopie confocale - Visualisation 3D

Reconstruction par suivi de rayons - Transparence

Règle de transparence $P_{ij} \begin{cases} I_k = \alpha_k V_k + (1 - \alpha_k) I_{k-1} \\ \alpha_k = f(V_k) \end{cases}$

I_k est l'intensité collectée sur le chemin du rayon, I_{k-1} la valeur précédente; α_k est le coefficient de transparence qui dépend de V_k , la valeur du voxel courant

