

Parcours OpticLab – MIFOBIO 2021

Table des matières

| | |
|---|----|
| Introduction..... | 2 |
| Parcours 1 : Plans conjugués | 3 |
| Parcours 2 : Illumination et chemin optique..... | 10 |
| Parcours 3 : Diffraction et résolution | 14 |
| Parcours 4 : Aberrations et chromatisme en imagerie | 19 |

Organisateurs

Amaury Badon (Amaury.Badon@cnrs.fr)

Pierre Bon (pierre.bon@cnrs.fr)

Sophie Brustlein (sophie.BRUSTLEIN@univ-amu.fr)

Aurelien Dauphin (aurelien.dauphin@curie.fr)

Laurent Gelman (laurent.gelman@fmi.ch)

Damien Schapman (damien.schapman@univ-rouen.fr)

Introduction

But de l'OpticLab

Le but de l'OpticLab est de permettre aux participants, débutants ou microscopistes plus expérimentés, d'apprendre à réaliser des mesures sur des systèmes optiques et surtout de comprendre les principes physiques sous-jacents à travers des travaux pratiques réalisables de manière autonome (sans ou avec très peu d'encadrement).

L'OpticLab propose quatre TPs organisés sous forme de « Parcours », comprenant chacun des stations avec bancs optiques, pour démontrer les principes d'optique (partie « Optique en pratique & Fabrique des images »), et des stations avec microscopes, pour apprendre les applications pratiques au quotidien, notamment entretien et réglage du microscope, diagnostic des problèmes, etc. (partie « Applications »). Les applications pratiques renvoient systématiquement à des éléments de la Valise Métrologie, que les participants pourront ainsi utiliser de manière autonome après leur formation au MIFOBIO.

Parcours 1 : Plans conjugués

Optique en pratique & Fabrique des images

Cette partie a pour but d'appréhender le chemin de la lumière à travers les optiques et d'étudier les lois "de conjugaison" entre les plans d'imagerie et d'observer les aberrations optiques. **Sauf indication contraire, l'observation se fait sur un écran en papier et pas avec l'œil.**

1. Observer effet d'une lentille :
 - a. Une lentille convergente forme l'image de la source (LED, équivalent à un objet fluorescent) située dans un plan, dans un autre plan.
 - i. Voir qu'il y a deux positions de la lentille possible avec un grandissement différent lorsque le plan de détection (écran) est suffisamment loin.
 - ii. Trouver le cas limite où il n'y a plus qu'un plan (condition dite "4f") pour une position plus proche de l'écran.
 - iii. En déduire qu'il n'y a formation d'aucune image si l'écran est trop près.
 - b. Cas particulier : former "à l'infini" une image de la source.
 - i. Trouver la position de la lentille pour que l'image se forme le plus loin possible (plusieurs mètres, le mur d'en face...). **L'objet est situé dans ces conditions au foyer de la lentille.** La distance lentille-objet est appelée "distance focale".
 - ii. **Baisser la puissance de la source au minimum** et mettre son œil sur le chemin de la lumière : on voit bien la structuration de la source (LED) : l'œil permet de voir les objets très loin (= "à l'infini").
2. Combinaison de deux lentilles : formation d'un "télescope".
 - a. Ajouter la lentille pré-réglée sur son pied (**NE PAS TOUCHER au réglage de cette lentille, le pied est au bon endroit et il y a un détrompeur pour l'angle de la lentille**).
 - b. La deuxième lentille forme une image à son plan focal.
 - c. On a formé un microscope moderne : un objectif (la première lentille) et sa lentille de tube la deuxième lentille.
3. Observation des aberrations.
 - d. Changer l'orientation de la première lentille sur son axe (rotation) : l'image se décale et devient de mauvaise qualité. On observe des aberrations (coma, astigmatisme principalement)
 - e. Retourner de 180° la 1ère lentille et retrouver le moment où il y a une formation d'image. La qualité d'image est très réduite : on ne voit plus la structuration de la LED. Il y a de l'aberration sphérique.
 - f. Les lentilles ont une forme définissant un sens d'observation.

Application : Réglage du microscope

Objectifs : Apprendre à faire un réglage de Köhler et aligner le contraste de phase. Montrer l'importance de ce réglage lors de réalisation d'acquisition en lumière transmise selon le type d'échantillon et le type d'objectif utilisé (exemple en Figure 1). Réaliser une collection d'images tout au long du processus du réglage pour en comprendre les différentes étapes et leur importance.

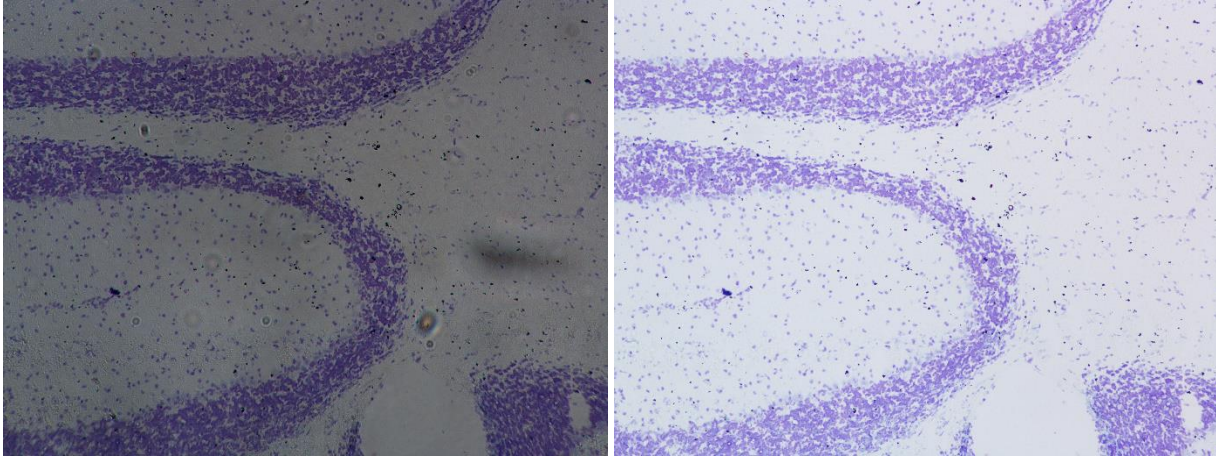


Figure 1: Réglage de Köhler. (a) Avant réglage. (b) Après réglage

Outils mis à disposition : un microscope champ large équipé de divers objectifs avec ou sans anneau de phase, d'un condenseur manuel et d'un échantillon observable en lumière transmise.

Étapes de réalisation :

1. Réaliser une image d'un échantillon (Figure 2a) en lumière transmise (échantillon mis à disposition par l'équipe pédagogique) à l'aide du microscope (droit/inversé) avec un objectif 10x ou 20x.

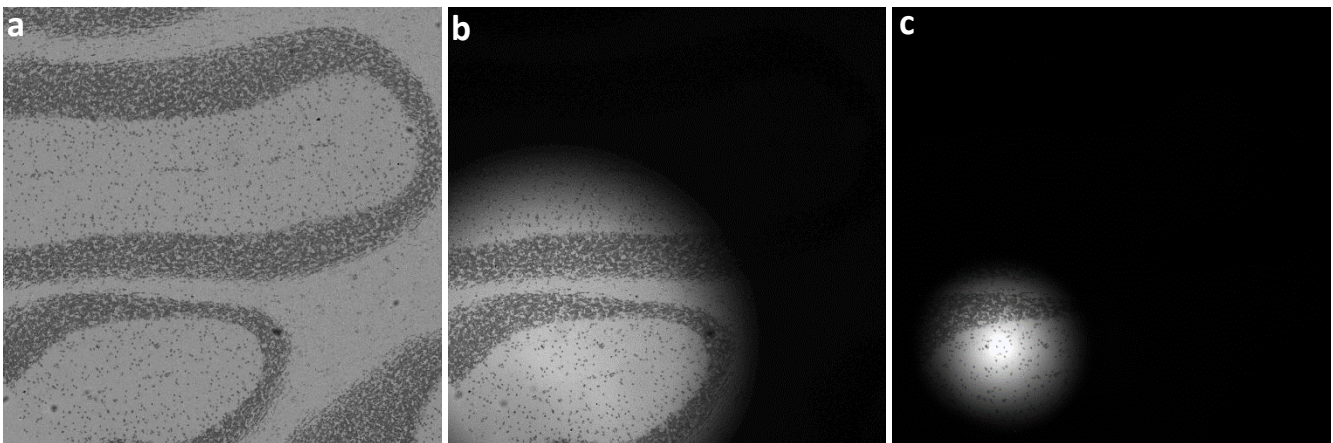


Figure 2 : images des étapes d'un réglage de Köhler. (a) Image initiale effectuée avant le réglage de Köhler. (b) et (c) Images montrant la fermeture du diaphragme de champ

2. Réaliser un réglage de Köhler :
 - a. Fermeture du diaphragme de champ (Figure 2b&c) : où est-il situé sur un microscope droit et inversé et à quoi sert-il ?

- b. Une fois le diaphragme de champ fermé complètement, ajuster la hauteur du condenseur à l'aide de la vis jusqu'à observer les bords nets du diaphragme de champ (Figure 3a).
- c. Centrer le diaphragme de champ à l'aide des outils proposés. Le centrage sera réalisé en regardant aux oculaires (Figure 3, Figure 4, Figure 5)

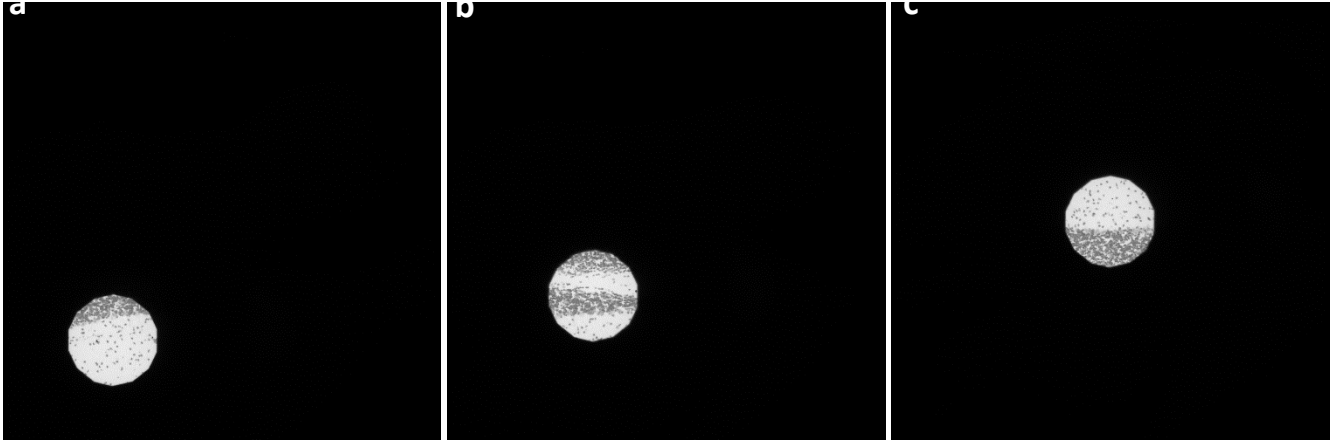


Figure 3: Observation des différentes étapes concernant le diaphragme de champ. (a) Image montrant l'ajustement de la hauteur du condenseur. (b) et (c) Images montrant le déplacement du diaphragme de champ réalisé lors du réglage.



Figure 4 : Exemple d'un condenseur sur un microscope droit (Leica DM6). (a) Le condenseur. (b) Outils et vis de réglages permettant le centrage du diaphragme de champ.



Figure 5 : Exemple d'un condenseur sur un microscope inversé (Leica DMI6000B). (a) Le condenseur. (b) Outils et vis de réglages permettant le centrage du diaphragme de champ.

- d. Ouvrir petit à petit le diaphragme de champ et ajuster le positionnement du diaphragme afin que les bords de celui-ci soient équidistants vis-à-vis du champ d'observation (Figure 6)

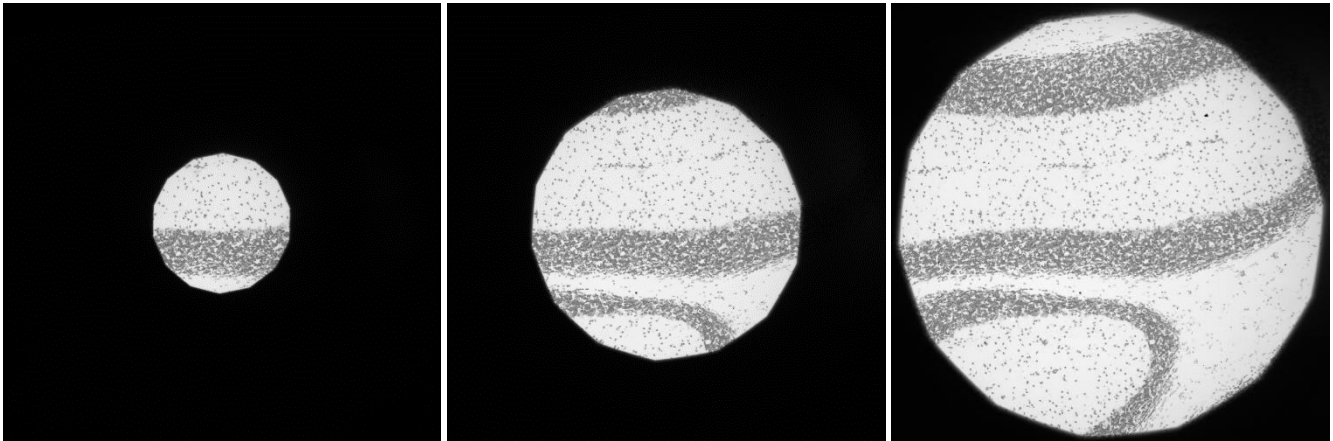


Figure 6 : Ouverture du diaphragme de champ. (a) Diaphragme de champ fermé. (b) et (c) Différentes ouvertures du diaphragme de champ.

- e. Ajuster l'ouverture du diaphragme d'ouverture : ou est-il situé sur un microscope droit et inversé et quel est son objectif dans le cadre d'un trajet optique ?

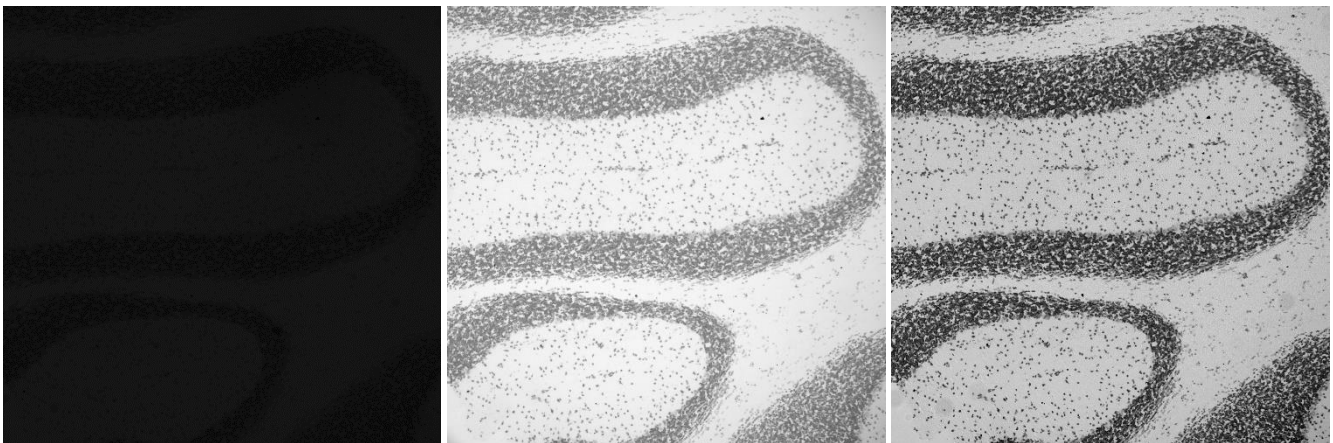


Figure 7 : Images de l'échantillon lors du réglage du diaphragme d'ouverture. (a) Diaphragme d'ouverture fermé. (b) Diaphragme d'ouverture étape intermédiaire. (c) Diaphragme d'ouverture optimisé.

- f. Réaliser de nouveau une image de l'échantillon en lumière transmise.
g. Observer les différences entre l'image initiale et l'image ainsi obtenue

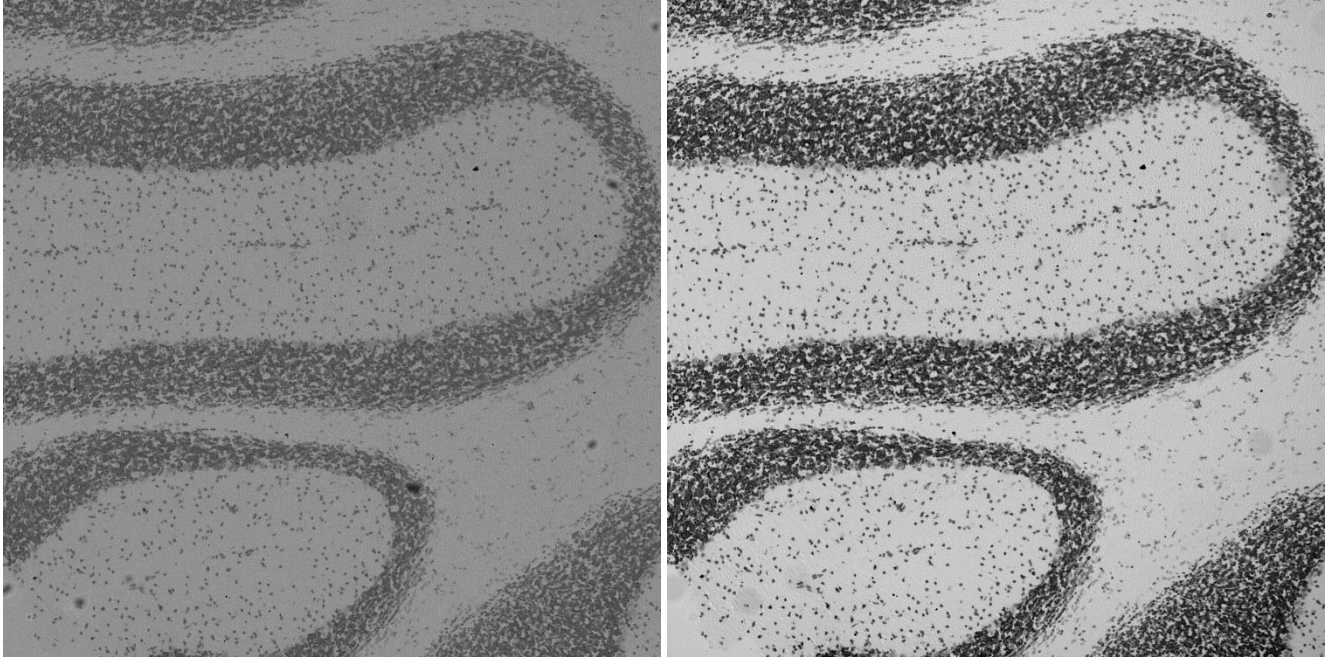


Figure 8: Images de l'échantillon lors du réglage de Köhler. (a) Image initiale. (b) Image finale après réglage de Köhler.

3. Changer d'objectif, choisir un objectif avec un anneau de phase et réaliser une image d'un nouvel échantillon (adapté au contraste de phase) en lumière transmise et en contraste de phase.
4. Doit-on refaire le réglage de Köhler effectué précédemment ?
5. Faire de nouveau le réglage de Köhler (Figure 9).

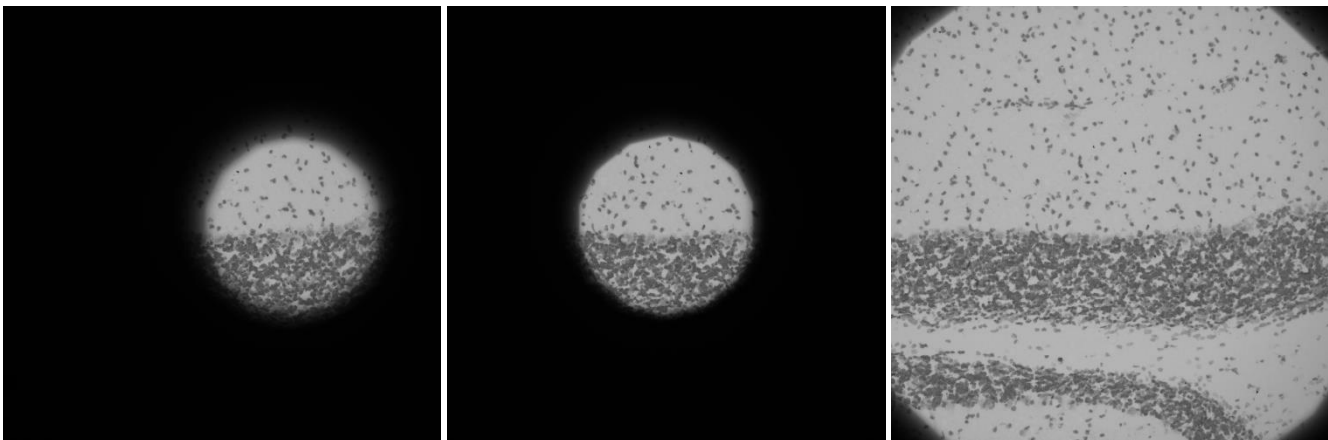


Figure 9 : Images des différentes étapes du réglage de Köhler. (a) Image du diaphragme de champ décentrée. (b) Image du diaphragme de champ centrée et fermé. (c) Image du diaphragme de champ centrée avec une ouverture adéquate.

6. Réaliser de nouveau une image de l'échantillon en lumière transmise

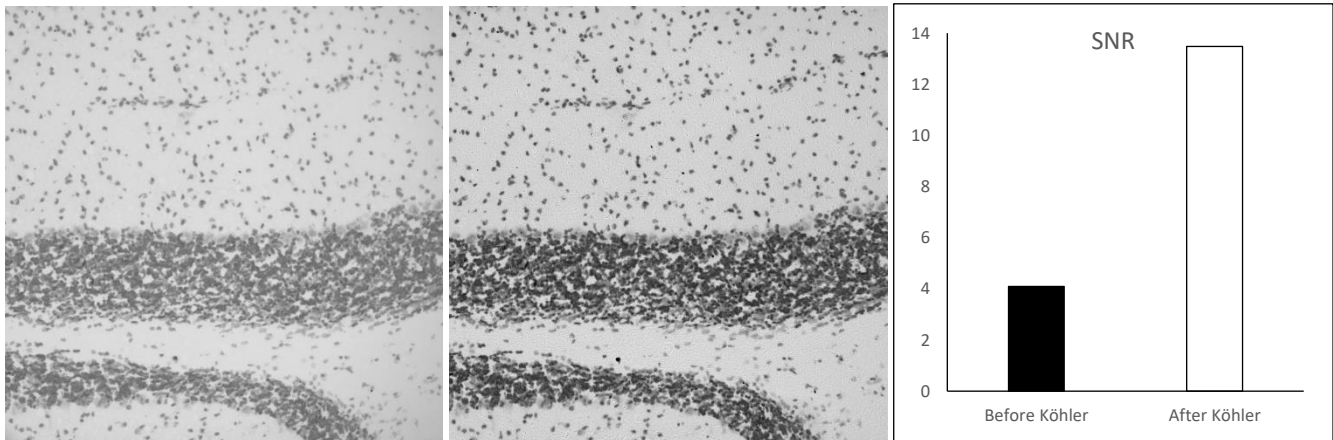
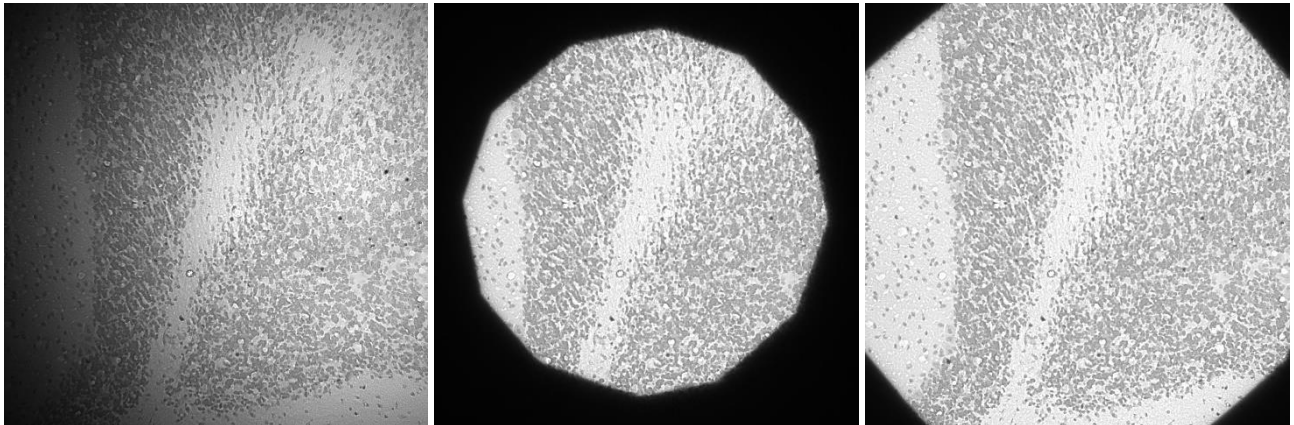


Figure 10 : Comparaison d'images avant et après le réglage de Köhler. (a) Image initiale avant réglage. (b) Image finale après réglage. (c) Graphique montrant la rapport signal sur bruit (SNR) entre les images avant et après réglage de Köhler.

7. Réglage contraste de phase : Selon le modèle du microscope et les objectifs disponibles, il est possible d'effectuer de l'imagerie en contraste de phase. Pour cela, il faut aligner l'anneau de phase correspondant à l'objectif choisi.
- a- Effectuer les étapes du réglage de Köhler effectué ci-dessus.
 - b- Passer en mode contraste de phase. Faire une image.
 - c- Aligner l'anneau de phase du condenseur avec l'anneau de phase contenu dans l'objectif.
 - d- Faire une image.



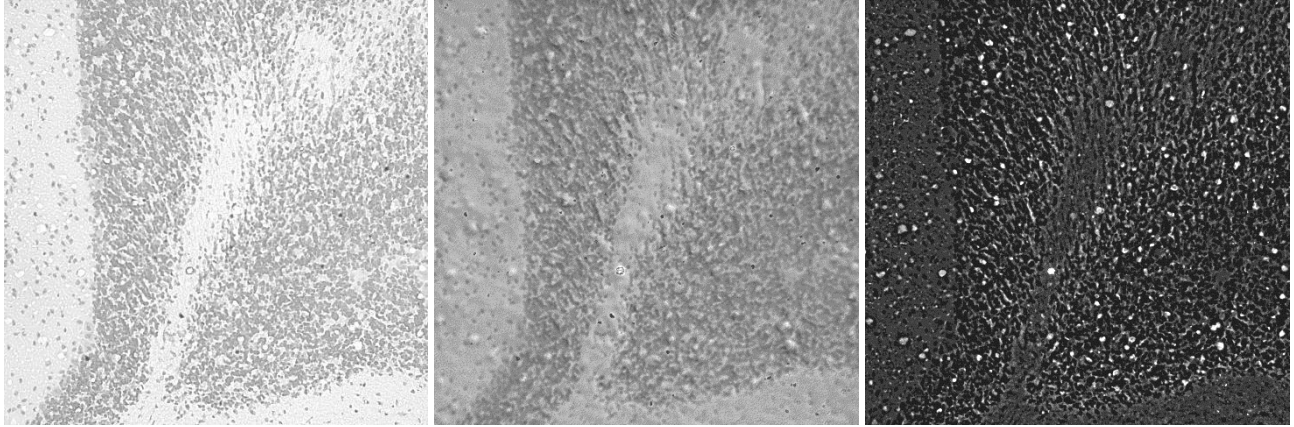


Figure 11 : Etapes de réglage d'un contraste de phase. (a) Fermeture du diaphragme de champ et réglage du condenseur. (b) Centrage du diaphragme de champ. (c) Ajustement de l'ouverture du diaphragme de champ. (d) Image obtenue après réglage de Köhler. (e) Insertion de l'anneau de phase dans le trajet de la lumière transmise. (f) Superposition des anneaux de phase (objectif-condenseur).



Figure 12 : Anneau de phase et lumière dans un microscope. (a) En mode champ clair. (b) en mode contraste de phase non superposé. (c) En mode contraste de phase centré.

8. Observer les différences obtenues entre chaque image (Figure 12).

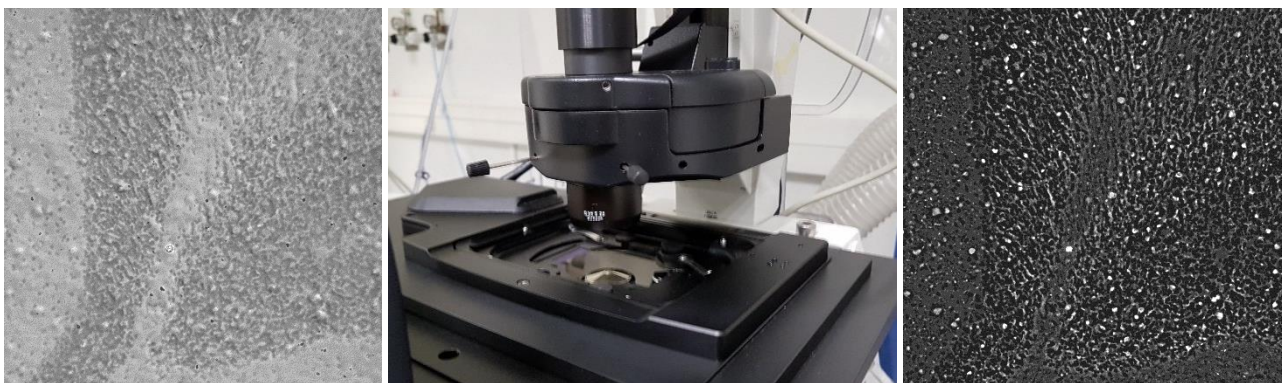


Figure 12 : Réaliser une image avant et après réglage.

Parcours 2 : Illumination et chemin optique.

Optique en pratique & Fabrique des images

Cette partie a pour but d'appréhender le guidage de la lumière à travers les fibres optiques et d'aborder les notions de couplage en fonction des différents types de fibres utilisées et de criticité de l'alignement optique. **Sauf indication contraire, l'observation se fait sur un écran en papier, sur une caméra et en aucun cas avec l'œil.**

1. Injection d'un laser dans une fibre optique, alignement d'un banc optique :
 - a. Observation des différents types de fibre : image des sorties de fibre sur une caméra. Quelles différences observez-vous ? Notions de taille du cœur (de la fibre...), gaine, ouverture numérique, fibre monomode vs multimode, longueur d'onde de coupure.
 - b. Focaliser les faisceaux laser 488nm et 633nm avec différentes lentilles et observer sur une caméra l'effet sur la taille du point de focalisation. Qu'observez-vous ? La caméra est placée dans le plan focal de la lentille et protégée par des filtres neutres (densités)
 - c. Choisir le laser et la lentille à utiliser en fonction du type de fibre (ouverture numérique, longueur d'onde de coupure). Utiliser deux miroirs pour injecter le faisceau laser dans la fibre. Evaluer l'importance de l'alignement sur l'efficacité du couplage (observation avec un papier).
 - d. Observer le couplage sur les caméras utilisées pour visualiser les cœurs en sortie de fibre. Comment se comporte le faisceau laser en sortie de fibre ?
2. Mesure de la puissance avant et après couplage dans la fibre :
 - a. Apprendre à utiliser un puissance-mètre
 - b. Mesurer la puissance en entrée de fibre puis en sortie après couplage et calculer le taux d'injection dans la fibre. Comparer ces taux en fonction des différents types de fibres utilisées et des participants (!)

Application : Vignetage et homogénéité de champs

Objectifs : Apprendre à préparer une lame de solution fluorescente, exemple fluorescéine ou rhodamine. Comprendre le rôle de l'alignement de la source de lumière (bruleur HBO, lampe métal halide ou source LED) dans le cadre d'acquisition en fluorescence. Mesurer et analyser l'uniformité d'un champ d'illumination. Déterminer les problèmes pouvant intervenir dans un tel type d'alignement.

Outils mis à disposition : un microscope champ large équipé de divers objectifs, d'une source de lumière (bruleur HBO, lampe métal halide ou source LED) de lames plastiques autofluorescentes (Chroma, Thorlabs) et de solutions fluorescentes.

Etapes de réalisation :

1. Réaliser la préparation d'une lame de fluorescence uniforme afin de réaliser les mesures de performance liée à l'uniformité du champ
 - a. **Technique 1** : lame de fluorescence non stable dans le temps : la technique dite du Stabilo appelée également la technique du « Fabulous Fab », technique du pauvre.

- i. Prendre une lame de verre, tracer un trait au Stabilo

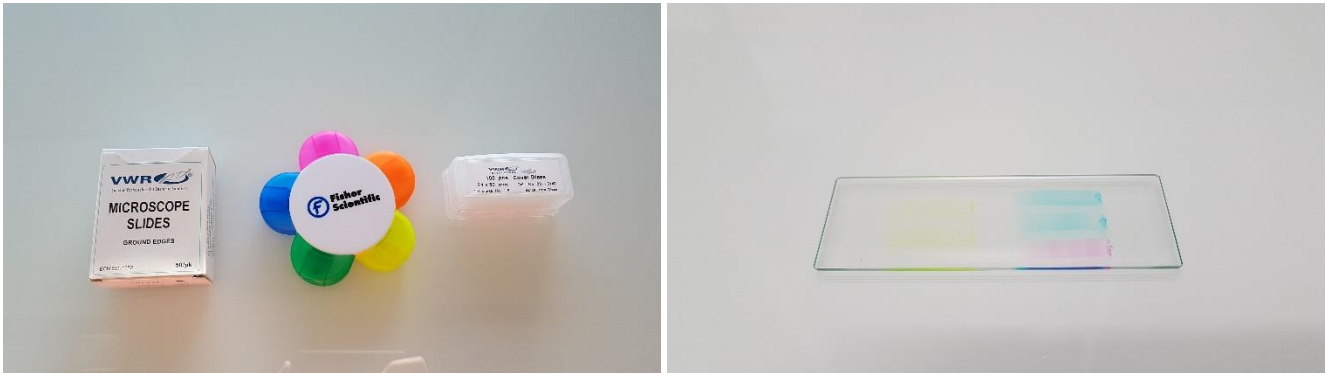


Figure 13: Préparation d'une lame de fluorescence en quelques minutes. (a) Outils nécessaires : lame de verre, Stabilo & lamelle de verre. (b) Exemple de réalisation d'une lame de fluorescence.

- ii. Recouvrir la lame de microscopie avec une lamelle adaptée aux corrections des objectifs (Connaissez-vous la différence entre les lamelles de Grade 0.5, 1 et 1,5 ?)
- b. **Technique 2** : lame de fluorescence stable dans le temps et réutilisable
- i. Prendre une boîte de Pétri de diamètre 35mm / 50 mm avec une lamelle de verre (ajuster le Grade en fonction du type de microscopie utilisé).
 - ii. Déposer 300µl de marqueur fluorescent (Rhodamine 800, de Rhodamine B et/ou de Fluorescéine). Note : attention à la concentration de la solution fluorescente : utiliser une concentration plus forte pour les systèmes à balayage (10^{-3} mol.l⁻¹) et une concentration plus faible pour les systèmes dépourvus de système de balayage (10^{-4} mol.l⁻¹).
 - iii. Optionnel : Déposer 100 à 200 µL d'un milieu de montage (attention à l'impact de l'indice de réfraction), ici on utilisera une solution de PBS/Glycérol. Note : étape nécessaire si l'on souhaite conserver l'échantillon.
 - iv. Optionnel : Recouvrir d'une lamelle de verre, puis sceller au vernis ou tout autre liquide de scellement (attention à ne pas avoir d'infiltration du liquide de scellement dans la préparation). Attention aussi aux bulles !! Note : étape nécessaire si l'on souhaite conserver l'échantillon. On peut également utiliser des « spacers » en silicone dans le cadre d'une utilisation d'une lame et d'une lamelle de verre.



Figure 14 : Préparation de solution fluorescente issu de marqueur. (a) Préparation de solution « mère » de Rhodamine 800 (bleu), Rhodamine B (rose) & Fluorescéine (jaune). (b) Préparation de solution « fille » des 3 solutions utilisées.

2. Sur un microscope à champ large, utiliser un objectif 10x et réaliser une image d'uniformité de champ.

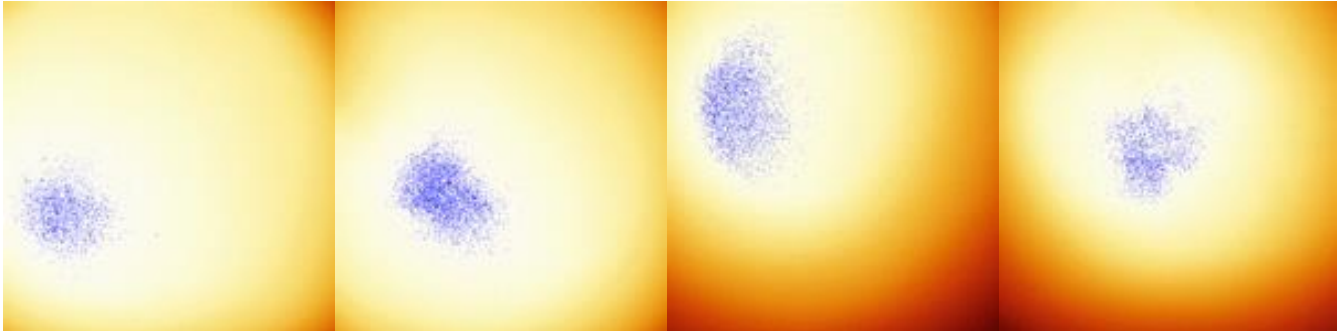


Figure 15 : Observation de plusieurs images de vignettage (aussi appelé « uniformité de champ ») provenant d'un microscope au cours de sa durée de vie.

3. Qu'observe-t-on ?
4. Comment fonctionne le trajet de lumière incidente ou lumière servant à l'observation d'échantillon fluorescent ?
5. Expliquer le rôle des diaphragmes de champ et d'ouverture.
6. Comment peut-on modifier le centrage de ce trajet : diaphragmes, brûleur HBO (pas sûr que cela existe encore), fibre sur système type EL6000 ou Colibri et/ou LED ?
7. Modifier l'alignement via ces éléments et réaliser une image.
8. Comparer l'image ainsi obtenue et l'image initiale.
9. Comment peut-on optimiser le centrage et obtenir un champ d'illumination homogène ?

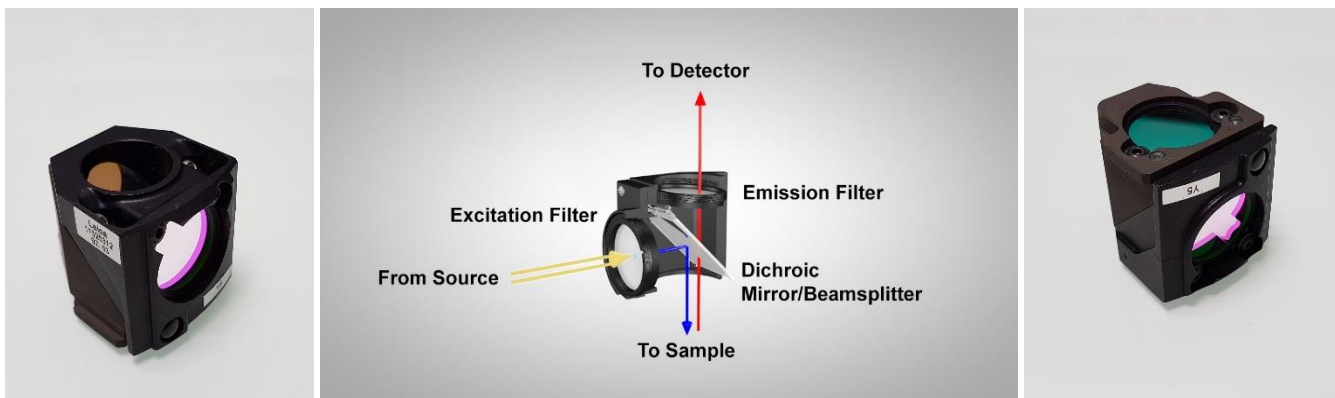


Figure 16 : Exemple de cube de filtres de fluorescences utilisé dans un microscope.

10. Réaliser ces différentes étapes avec les échantillons préparés : Stabilo, solution de marqueur fluorescent et lame de plastique autofluorescent.
11. Comparer les résultats obtenus.

Parcours 3 : Diffraction et résolution

Optique en pratique & Fabrique des images

Cette partie a pour but d'appréhender les notions de diffraction, de résolution et de comprendre ce qui se passe dans un microscope optique. Nous discuterons le fait que l'image formée par le microscope n'est qu'un reflet de la réalité et qu'il faut faire attention aux interprétations qu'on en fait. **L'observation se fait sur un écran en papier, sur une caméra mais pas avec l'œil.**

La source (LED) est collimatée (renvoyée à l'infini, cf parcours 1...) et sert à éclairer un objet. Deux lentilles sont montées pour simuler un microscope de grandissement $\times 1$, un cube séparateur permet de voir sur un écran à la caméra Raspberry ce qui se passe dans le plan image du microscope. **Ne jamais toucher ni à la source ni aux lentilles, ni à la caméra.**

1. Placer un objet devant la première lentille jusqu'à former une image sur la caméra/sur l'écran. **L'objet est alors placé dans le plan dit "objet"**. Placer un écran entre les deux lentilles à une distance de la première lentille équivalente à la distance "objet-1ère lentille". Regarder à quoi ressemble la lumière : **nous sommes dans le plan de la pupille du microscope également appelé plan de Fourier.**
2. Ajouter vos cheveux/poils (de bras...) sur le chemin de la lumière à peu près dans le plan objet et observer "l'explosion" de la lumière dans le plan de la pupille. C'est le phénomène de *diffraction*. Regarder le pattern de diffraction en fonction de l'orientation des cheveux : la lumière est déviée dans la direction orthogonal aux cheveux. S'il y a plusieurs participants, regarder si tout le monde à la même figure de diffraction (la taille du cheveu influence la distribution de la lumière) : **plus l'objet est fin, plus la lumière est déviée, c'est le phénomène de diffraction.**
3. Placer une mire Newport **(!!! FRAGILE !!!)** au plan objet et faire la netteté sur la caméra/écran. Regarder dans le plan de la pupille (avec un papier blanc) la répartition de la lumière. Comprendre ce que l'on voit par rapport à ce qui a été vu avec les cheveux. Tourner la mire autour de l'axe optique et voir l'évolution de la figure de diffraction.
4. Placer un diaphragme dans le plan de la pupille et le centrer sur le faisceau. Le diaphragme + la première lentille simule un objectif de microscope, le diamètre du diaphragme fixant l'ouverture numérique de l'objectif.
 - a. Fermer le diaphragme et observer l'effet sur l'image : les petits détails disparaissent, nous n'avons pas la résolution pour les voir.
 - b. L'ouverture numérique du système est liée aux angles collectés depuis l'échantillon, les plus grands angles permettent de voir les plus petits détails.
5. Retirer le diaphragme et l'objet et insérer une lame avec des points noirs occultants dans le plan de pupille.
 - a. Pour une taille de point égalant la taille du faisceau lumineux sans objet, on coupe toute la lumière : on observe une image noire (normale, on a tout coupé...)
 - b. Remettre l'objet (mire Newport) : on voit apparaître une image !
 - i. Nous avons créé un microscope en "champ sombre"
 - ii. La lumière qui a diffracté sur l'objet n'est pas bloqué par notre lame occultante et vient former une image : on ne voit que les bords des objets.

- c. Changer d'objet (tranche de cerveau, plante...) et observer l'effet sur la formation d'image en champ sombre (avec lame occultante) et en champ claire (sans lame).
6. On peut s'amuser à dessiner des points occultants pour couper certaines composantes dans le plan de Fourier pour faire disparaître certains détails
- a. Essayer de faire disparaître les lignes verticales (ou horizontales) sur l'image de la mire Thorlabs avec une lame occultante fait maison !
7. L'image n'est qu'un reflet de la réalité !

Application : Mesure de Point Spread Function (PSF)

Objectifs : Apprendre à préparer une lame avec billes dont la taille est inférieure au pouvoir de résolution du microscope et à acquérir et mesurer une PSF. Observer le rôle de l'indice de réfraction du milieu de montage et d'immersion pour la PSF, observer le rôle de la longueur d'onde. Apprendre à utiliser un réfractomètre.

Note : le parcours offre sans doute trop peu de temps pour réaliser toutes les étapes mentionnées ci-dessus. Il est aussi possible de ne pratiquer que le montage des billes, ou que les mesures des PSFs grâce à des lames préparées pour vous à l'avance. Adressez-vous à la personne qui est là pour superviser le TP pour obtenir le matériel. Vous pourrez aussi emporter avec vous les lames que vous aurez préparées.

Outils mis à disposition : 1 microscope champ large motorisé en Z, équipé de fluorescence et d'une caméra, billes « PS-Speck » en solution, milieux de montage, lames de billes préparées par l'équipe avec des milieux de montage différents, lames, lamelles, silicone dentaire.

Etapes de réalisation :

1. Préparer des billes fluorescentes.

Les opérations a. et b. ont été déjà réalisées pour vous pour gagner du temps durant le TP

- a. Immerger les lamelles dans une solution de HCl 1M et agiter doucement pendant 30 minutes (8.3 ml d'une solution à 37% de HCL à diluer dans 100ml volume final).
 - b. Rincer les lamelles deux fois à l'eau distillée et les immerger dans de l'Ethanol 100%. Les lamelles peuvent être conservée ainsi plusieurs mois.
2. Attraper une lamelle avec une pincette, l'égoutter, absorber les plus grosses gouttes avec du papier pour lentille (Figure 17), et laisser sécher à l'air.



Figure 17 : papier lentille

3. Centrifuger le tube de billes (175um Green-Yellow beads, Thermo Fisher Scientific P7220) quelques secondes pour collecter toute la solution au fond du tube puis vortexer pendant 2 à 3 minutes.
4. Diluer les billes 2500 fois en deux étapes :
 - a. Faire une première dilution au 100^{ème} en mélangeant 5ul de la solution mère à 495ul d'eau distillée. Vortexer 1 minute.
 - b. Diluer la solution obtenue au 25^{ème} en mélangeant 20ul de la première dilution à 480ul d'eau distillée. Vortexer 1 minute.
5. Avec une pipette P10, prélever 10ul de la solution au 2500^{ème} et les déposer sous forme de toutes petites gouttelettes (5 à 10 en tout) sur les lamelles. Chaque goutte correspond environ à 1 à 2ul.
6. Laisser sécher les lamelles à l'air libre jusqu'à disparition totale des gouttelettes (peut prendre jusqu'à 1 heure, des lames ont été préparées à l'avance pour vous permettre de poursuivre immédiatement avec les acquisitions d'images au microscope).
7. Pendant ce temps, décongeler le milieu de montage (ProLong™ Gold Antifade Mountant, Thermo Fisher Scientific P36930), éventuellement soniquer pour éliminer les bulles.
8. Rincer les lames de microscopie dans de l'Ethanol 100% et les essuyer avec du papier optique. Laisser sécher complètement à l'air.
9. Déboucher le tube de Prolong, et déposer 12ul de ce milieu de montage au centre de chaque lame. NB : Le Prolong est très visqueux. Il est recommandé d'utiliser une pipette P20, de couper le bout du cône et de pipetter extrêmement lentement, sans quoi vous risquez sinon de créer des bulles. Notez que la présence d'une ou deux bulles peut parfois être avantageuse, car elles permettent de plus facilement faire le focus sur la fine couche de milieu de montage qui contient les billes.
10. Placer sur chaque lame une lamelle avec les billes côté Prolong. Eventuellement, placer une feuille de papier lentille dessus, appliquer une très légère pression pour faire sortir l'excès de milieu de montage et retirer la feuille délicatement pour ne pas entraîner la lamelle avec.
11. Fixer la lamelle, soit avec du vernis à ongle, soit avec du Twinsil22 (Figure 18), en les appliquant à cheval sur les bords de la lamelle et la lame. Pour le vernis à ongle, utiliser le pinceau du bouchon, pour le Twinsil22, utiliser un cône de pipette P10 ou P20 (demande un peu d'entraînement). Le Twinsil22, après mélange des deux composants jaune et bleu, durcit très vite. Si vous avez beaucoup de lames à monter, il est conseillé de refroidir à l'avance les deux composants à 4°C et de sceller les lames dans une chambre froide.



Figure 18 : les deux composés du Twinsil

12. Placer une lame sur le microscope. La lamelle doit être côté objectif (vers le haut pour microscope droit, vers les bas pour microscope inversé).
13. Effectuer la mise au point des billes aux oculaires. Placer des billes au centre du champ d'observation.
14. NB : Demandez l'aide de la personne qui assiste le TP pour la manipulation du microscope si vous ne connaissez pas le modèle ou le logiciel.
15. S'assurer que les billes dans le champ d'observation sont suffisamment distantes les unes des autres pour que leurs halos de diffraction (Figure 19) ne se chevauchent pas lorsqu'elles sont en dehors du plan focal.

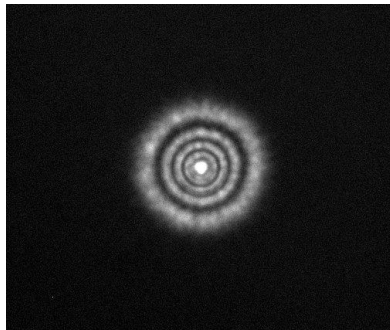


Figure 19 : Halo de diffraction d'une bille lorsqu'elle n'est pas en focus.

16. Adapter l'intensité de la source d'illumination et le temps d'acquisition (éviter le photoblanchiment) et, le plus important, les conditions de Nyquist en xyz. Par exemple : pour un objectif 63x à ouverture numérique 1,4, programmez une distance entre plans en z de 200nm sur un total de 8 μ m minimum.
17. Acquérir une pile d'images de l'échantillon.
18. Plusieurs paramètres peuvent être étudiés grâce à ces lames : le rôle du milieu de montage, l'impact de la longueur d'onde, etc. Le temps du parcours étant restreint, il vous faudra décider du paramètre qui vous intéresse le plus. Si vous voulez mesurer l'impact de la longueur d'onde, prenez les piles d'images dans deux canaux différents de billes de couleurs différentes. Si vous voulez étudier l'effet du milieu de montage, prenez les piles d'images avec une lame montée avec Prolong Gold puis avec une lame montée avec Prolong Glass. Toujours acquérir au moins 3 piles d'images d'au moins 3 billes différentes

dans chaque condition. Chaque pile d'image de chaque bille donnera des valeurs légèrement différentes, notamment en raison du bruit et du centrage du signal de la bille par rapport aux pixels de la caméra. Plus le nombre de mesures est grand, plus la précision sera grande.

19. Analyser les PSF avec MetroloJ.

Parcours 4 : Aberrations et chromatisme en imagerie

Optique en pratique & Fabrique des images

Voir parcours 1.

Application : Alignement et corrections

Objectifs : Mesurer le décalage entre canaux dû à l'objectif (corrections chromatiques), aux dichroïques, ou aux caméras. Montrer qu'un alignement n'est jamais parfait. Apprendre à préparer une lame test (billes multi-couleurs TetraSpeck).

Outils mis à disposition : microscope champ large avec un objectif qui corrige peu les aberrations chromatiques et un qui les corrige mieux, billes TetraSpeck en solution, milieux de montage, lames de billes préparées par l'équipe, lames, lamelles de différentes épaisseurs (1 et 1.5), silicone dentaire.

Etapes de réalisation :

1. Préparer des billes TetraSpeck pour réaliser des mesures de co-alignement
Les opérations a. et b. ont été déjà réalisées pour vous pour gagner du temps durant le TP
 - a. Immerger les lamelles dans une solution de HCl 1M et agiter doucement pendant 30 minutes (8.3 ml d'une solution à 37% de HCl à diluer dans 100ml volume final).
 - b. Rincer les lamelles deux fois à l'eau distillée et les immerger dans de l'Ethanol 100%. Les lamelles peuvent être conservées ainsi plusieurs mois.
2. Attraper une lamelle avec une pincette, l'égoutter, absorber les plus grosses gouttes avec du papier pour lentille et laisser sécher à l'air. Les lamelles sont d'épaisseur 1.5 de haute qualité (1.5h, de 170um +/- 5um). Dans un but pédagogique, vous pouvez aussi prendre des lamelles d'épaisseur 1 (150um +/- 20um) pour étudier les effets de l'épaisseur des lamelles sur les aberrations chromatiques.
3. Centrifuger le tube de billes (TetraSpeck 200nm, 1um ou 4um, Thermo Fisher Scientific T7280, T7282 ou T7283) quelques secondes pour collecter toute la solution au fond du tube puis vortexer pendant 2 à 3 minutes.
4. Diluer les billes : 200nm ou 1um 2500 fois, ou 4um 250 fois, en deux étapes :
 - a. Faire une première dilution au 100^{ème} (pour 200nm et 1um, sinon au 10^{ème} pour 4um) en mélangeant 5ul de la solution mère à 495ul (pour 200nm et 1um, sinon au 49,5ul pour 4um) d'eau distillée. Vortexer 1 minute.
 - b. Diluer la solution obtenue au 25^{ème} en mélangeant 20ul de la première dilution à 480ul d'eau distillée. Vortexer 1 minute.
5. Avec une pipette P10, prélever 10ul de la solution et les déposer sous forme de toutes petites gouttelettes (5 à 10 en tout) sur les lamelles. Chaque goutte correspond environ à 1 à 2ul.
6. Laisser sécher les lamelles à l'air libre et l'obscurité jusqu'à disparition totale des gouttelettes (peut prendre jusqu'à 1 heure, des lames ont été préparées à l'avance pour vous permettre de poursuivre immédiatement avec les acquisitions d'images au microscope).

7. Pendant ce temps, décongeler le milieu de montage (ProLong™ Gold Antifade Mountant, Thermo Fisher Scientific P36930), éventuellement soniquer pour éliminer les bulles.
8. Rincer les lames de microscopie dans de l'Éthanol 100% et les essuyer avec du papier optique. Laisser sécher complètement à l'air.
9. Déboucher le tube de Prolong, et déposer 10ul de ce milieu de montage au centre de chaque lame. NB : Le Prolong est très visqueux. Il est recommandé d'utiliser une pipette P20, de couper le bout du cône et de pipetter extrêmement lentement, sans quoi vous risquez sinon de créer des bulles. Notez que la présence d'une ou deux bulles peut parfois être avantageuse, car elles permettent de plus facilement faire le focus sur la fine couche de milieu de montage qui contient les billes.
10. Placer sur chaque lame une lamelle avec les billes côté Prolong. Eventuellement, placer une feuille de papier lentille dessus, appliquer une très légère pression pour faire sortir l'excès de milieu de montage et retirer la feuille délicatement pour ne pas entraîner la lamelle avec.
11. Fixer la lamelle, soit avec du vernis à ongle, soit avec du Twinsil22, en les appliquant à cheval sur les bords de la lamelle et la lame. Pour le vernis à ongle, utiliser le pinceau du bouchon, pour le Twinsil22, utiliser un cône de pipette P10 ou P20 (demande un peu d'entraînement). Le Twinsil22, après mélange des deux composants jaune et bleu, durcit très vite. Si vous avez beaucoup de lames à monter, il est conseillé de refroidir à l'avance les deux composants à 4°C et de sceller les lames dans une chambre froide.
12. Annoter vos lames. Placer une lame sur le microscope. La lamelle doit être côté objectif (vers le haut pour microscope droit, vers les bas pour microscope inversé).
13. Effectuer la mise au point des billes aux oculaires. Placer une bille au centre du champ d'observation.
14. NB : Demandez l'aide de la personne qui assiste le TP pour la manipulation du microscope si vous ne connaissez pas le modèle ou le logiciel.
15. S'assurer que les billes dans le champ d'observation sont suffisamment distantes les unes des autres. Placer la bille d'intérêt au centre du champ. Nous allons ici prendre des mesures au centre du champ. Vous pouvez, dans un second temps prendre des billes à la périphérie pour connaître les aberrations chromatiques des côtés de votre champ d'acquisition
16. Régler la taille des voxels au plus proche des conditions de Nyquist en xyz (Par exemple : pour un objectif 63x à ouverture numérique 1,4, utilisation d'un pas en z de 200nm sur un total minimum de 4um (pour les billes de 200nm ou 1um) ou 8 µm (pour les billes de 4 um de diamètre)
17. Acquérir une pile d'images de l'échantillon dans les 4 canaux (de type « DAPI », « GFP », « RFP », « Rouge lointain »).
18. Plusieurs paramètres peuvent être étudiés grâce à ces lames :
 - Option 1 : Effectuer l'acquisition des deux lamelles de billes aux épaisseurs différentes (1 et 1.5)
 - Option 2 : Choisir un objectif sans correction des aberrations chromatiques (ou moins corrigé) et renouveler l'acquisition
 - Option 3 : Prendre des billes situées sur la périphérie pour connaître les aberrations sur les côtés du champ d'acquisition. Acquérir au moins 3 piles d'images d'au moins 3 billes différentes dans chaque condition. Chaque pile d'image de chaque bille donnera des valeurs légèrement différentes, notamment en raison du bruit et du centrage du signal de la bille par rapport aux pixels de la caméra. Plus le nombre de mesures est grand, plus la précision sera grande.
19. Analyser les co-alignements avec avec MetroloJ.