LA MICROSCOPIE CONFOCALE

Philippe COCHARD, Directeur de recherche CNRS
Centre de Biologie du Développement
UMR 5547 CNRS/UPS
Université Paul Sabatier
Philippe.cochard@univ-tlse3.fr

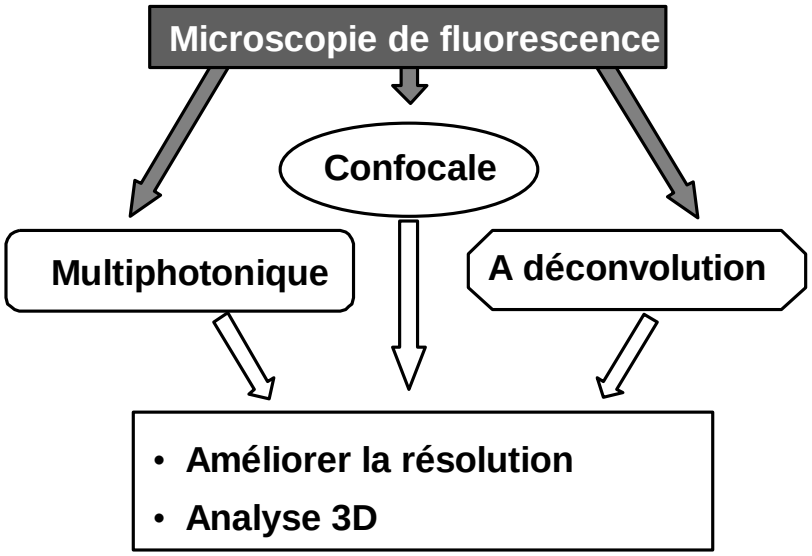
- Principe
- Fonctionnement
- Rôle du pinhole
- L'éclairage Laser
- Détection de multi-fluorochromes
- La résolution en microscopie confocale
- La numérisation des images
- Notions d'échantillonnage
- Avantages et limites de la microscopie confocale

I - INTRODUCTION

La microscopie de fluorescence moderne se conjugue en au moins trois techniques complémentaires :

- la microscopie confocale,
- la microscopie bi- ou multi-photonique
- la microscopie champ-large et à déconvolution

Bien que différentes de nature et de mise en œuvre, ces trois approches ont cependant deux objectifs communs : améliorer la résolution du microscope photonique et permettre une analyse tri-dimensionnelle des objets biologiques.



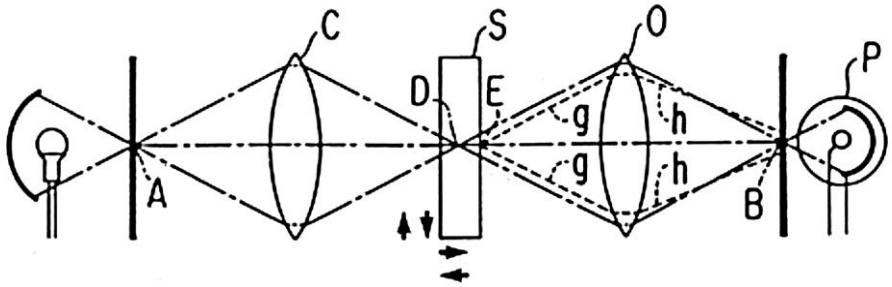
II - PRINCIPES DE LA MICROSCOPIE CONFOCALE

Fonctionnement du microscope confocal, inventé par Marvin MINSKY et breveté en 1957

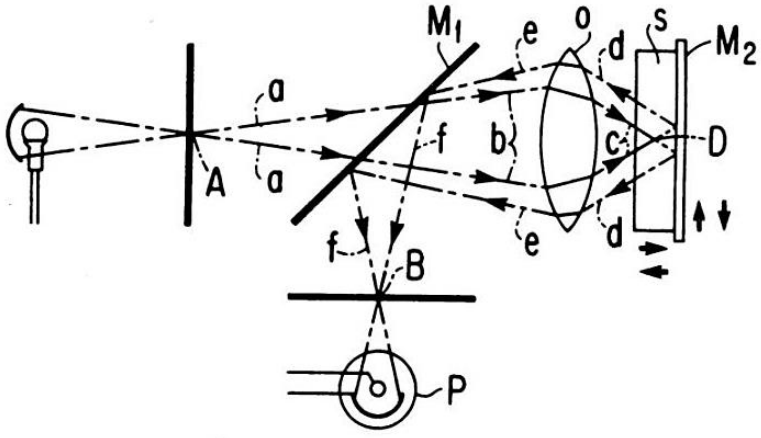
Le schéma du haut représente le principe pour un microscope équipé de deux lentilles. Celui du bas en est une simplification, avec une seule lentille. Le microscope confocal repose sur deux principes :

1. Eclairage ponctuel du spécimen « S » en « D ». Pour cela, un diaphragme très fermé est disposé devant la source de lumière. La lumière source ponctuelle « A » est focalisée par la lentille « C ».
2. La lumière émise par le spécimen éclairé est focalisée par la lentille « O » sur le détecteur « P » et passe entièrement au travers d'un autre diaphragme très fermé « B ».

Dans ces conditions, toute lumière parasite située hors du plan focal (exemple « E ») sera défocalisée sur le diaphragme « B » (trajet des rayons en « g » et « h ») et ne pourra atteindre le détecteur. Un déplacement progressif du spécimen (flèches verticales) permet de le scanner point par point.

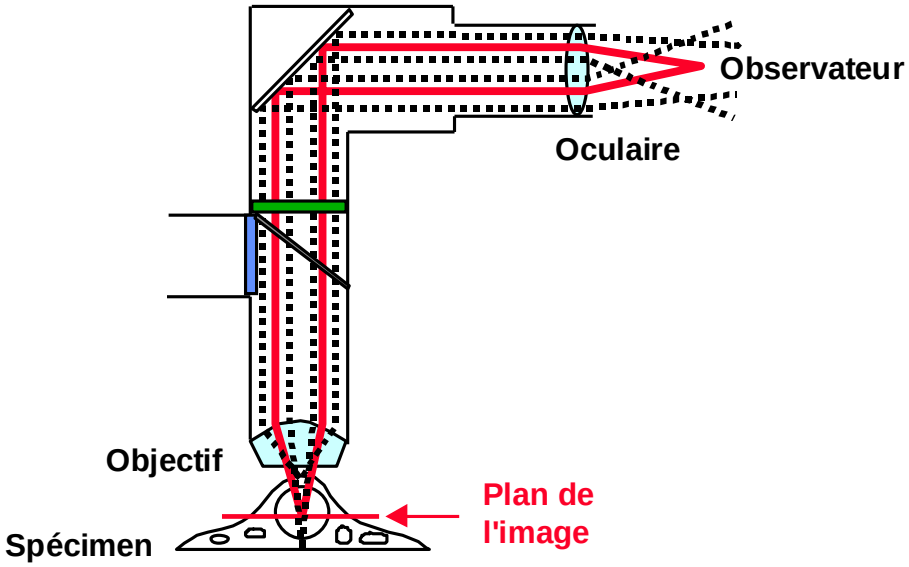


Dans le deuxième schéma, une seule lentille « O » permet à la fois de focaliser l'éclairage en « D » et de refocaliser la lumière émise par le spécimen sur le point « B » du diaphragme placé devant le détecteur. Dans ce deuxième modèle, il est nécessaire de disposer un miroir de renvoi « M2 » et un miroir dichroïque « M1 » permettant de séparer la lumière d'excitation « a » et la lumière d'émission « f ».

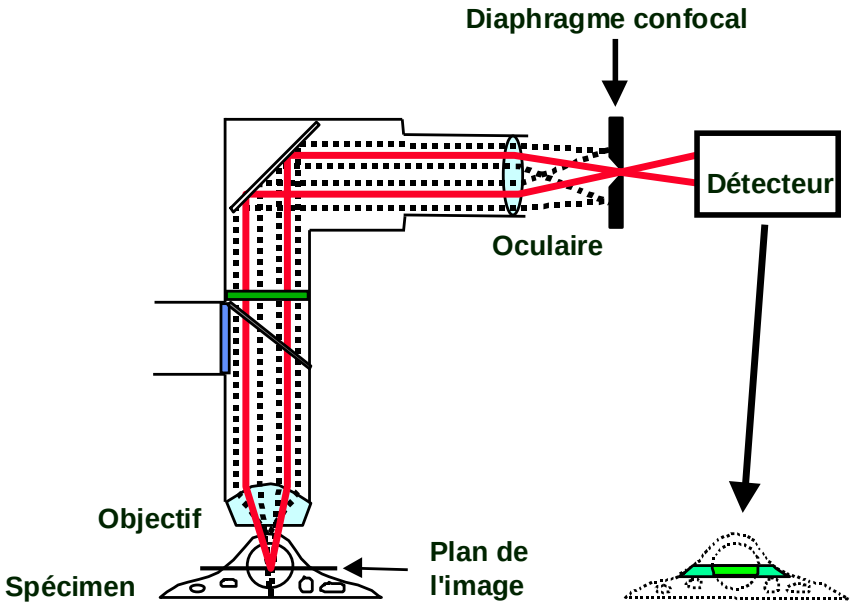


Il faut noter que le prototype de Minsky n'a pas été suivi d'une commercialisation, même si son principe a été repris dans les microscopes confocaux modernes.

En **microscopie conventionnelle**, l'image observée (traits rouges) est rendue floue par la lumière émise par les plans situés en dehors de la focale (traits pointillés).



En microscopie confocale, le diaphragme confocal, situé devant le détecteur, ne laisse passer que le flux lumineux émis au niveau du plan focal, éliminant ainsi la lumière parasite. **L'image observée est alors une véritable « tranche optique »** à l'intérieur du spécimen, tout comme dans un scanner.

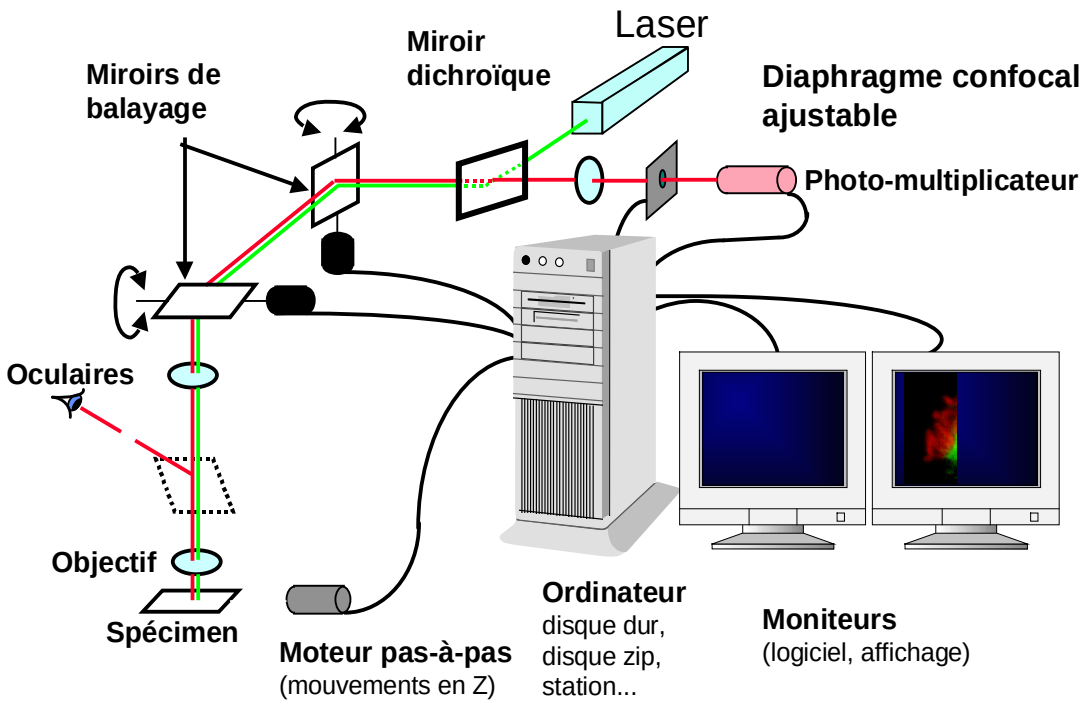


III - FONCTIONNEMENT DU MICROSCOPE CONFOCAL

Le microscope confocal nécessite une lumière d'excitation particulièrement intense et focalisée. La lumière laser comme source d'excitation s'est imposée dans la plupart des microscopes confocaux.

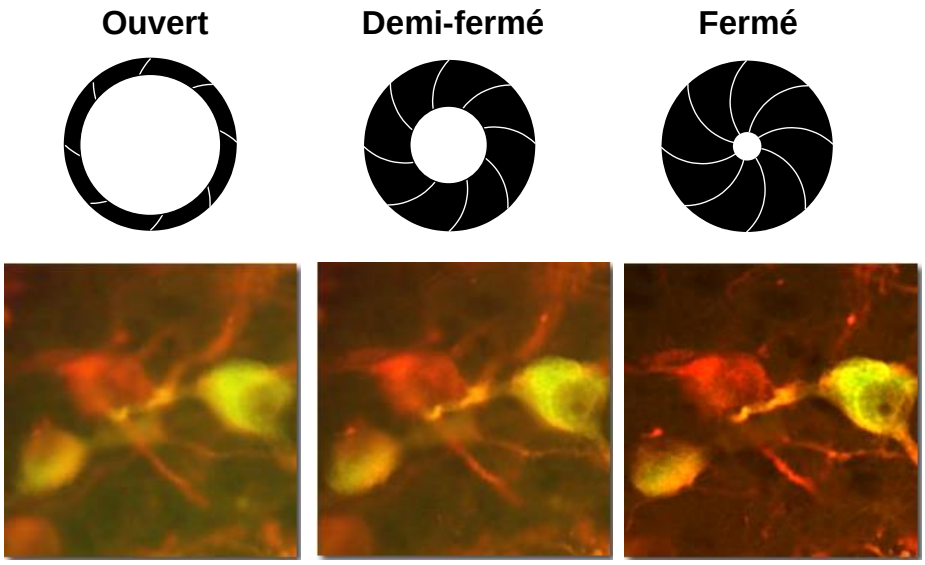
Dans la tête de scan, le faisceau laser d'excitation est réfléchi par un miroir dichroïque puis envoyé sur des miroirs galvanométriques (miroirs de balayage) qui, en pivotant sur leur axe, vont permettre le balayage rapide de l'ensemble du champ.

La lumière d'émission récupérée via l'objectif est déscannée suivant le même trajet, puis parvient au détecteur (tube photomultiplicateur) via successivement le miroir dichroïque, puis le diaphragme confocal. Le signal électrique émis par le photomultiplicateur est amplifié puis envoyé à l'ordinateur, où il est digitalisé, puis affiché sur le moniteur. L'ordinateur gère les miroirs de balayage, le moteur pas à pas (ou la platine galvanométrique) contrôlant le déplacement en z de la platine et l'ouverture du diaphragme confocal.

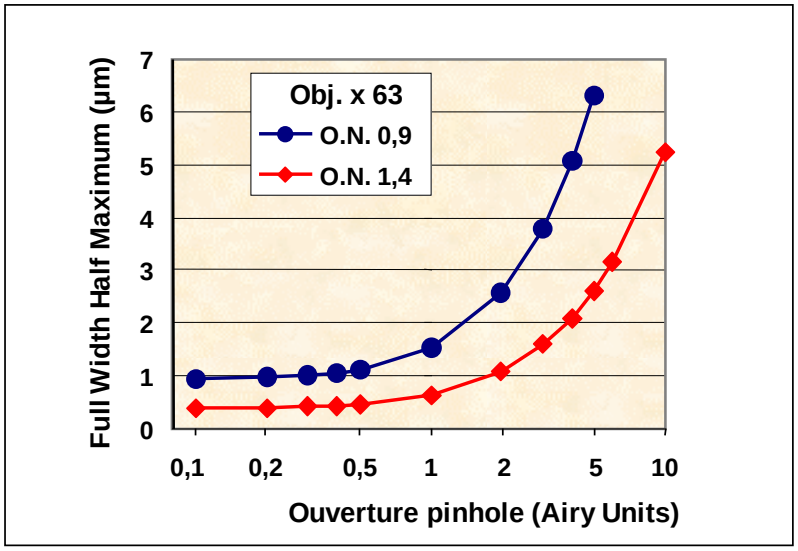


IV – IMPORTANCE ET ROLE DU PINHOLE :

Le diaphragme de détection, appelé en anglais « pinhole » (trou d'épingle) joue un rôle essentiel pour contrôler la résolution spatiale. Dans la plupart des appareils, il est constitué d'un diaphragme à iris permettant d'ajuster le volume analysé (l'épaisseur de la tranche optique). Ouvert au maximum, l'image est floue. La fermeture progressive du diaphragme confocal permet d'obtenir une image de plus en plus nette.



L'épaisseur de la tranche optique (en µm) varie ainsi en fonction de l'ouverture du diaphragme confocal. Noter qu'en dessous d'une certaine valeur (limite de la résolution axiale du système), la fermeture du diaphragme n'entraîne plus d'amélioration de la qualité de l'image, mais produit une perte d'intensité lumineuse. Pour un objectif de très bonne ouverture numérique (1,4), l'épaisseur minimale de la coupe optique est d'environ 0,5µm (500 nm).



V - L'ECLAIRAGE LASER :

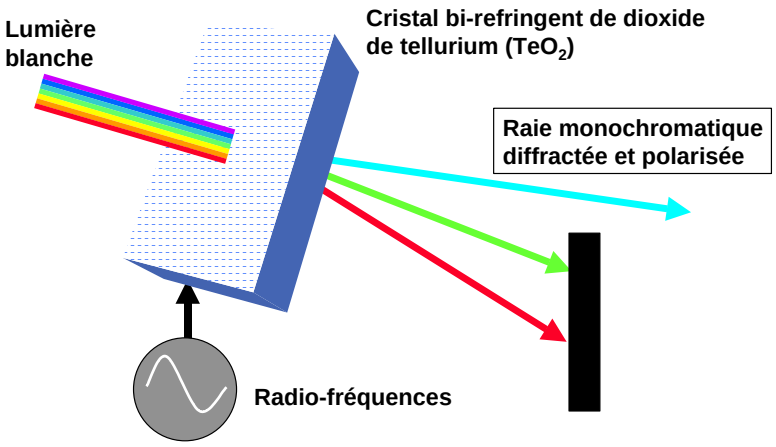
Initialement, les microscopes confocaux étaient équipés de différents types de lasers à gaz qui fournissent une lumière d'excitation ponctuelle (quelques dixièmes de millimètres de diamètre), intense et monochromatique (de longueur d'onde parfaitement définie). Actuellement, les lasers à gaz sont de plus en plus souvent remplacés par des diodes lasers, moins couteuses et de plus longue durée de vie. C'est le cas notamment pour les lasers UV, permettant d'exciter les fluorochromes spécifiques de l'ADN (Hoechst, DAPI) qui ne sont plus installés sur un confocal, en raison de leur coût élevé et de leur mise en œuvre délicate. Ils sont remplacés par une diode dans le proche UV à 405 nm. La plupart des microscopes confocaux actuels combinent plusieurs sources lasers différentes.

Sources Lasers

Laser	Abrev.	Raies d'excitation (nm)	Puissance (mW)
• Diode UV		405	20
• Argon	Ar	458 476 488 514	5 5 20 20
• Helium-Neon	He-Ne	543	1,2
• Diode	DPSS	561	10
• Helium-Neon	He-Ne	633	10

Sur les microscopes confocaux récents, la sélection des raies lasers et le réglage de leur intensité est assuré par un système électro-acoustique, l'AOTF. L'intérêt majeur de ce dispositif est de pouvoir contrôler quasi-instantanément le démarrage, l'arrêt et l'intensité d'illumination de n'importe quelle raie laser du système.

FONCTIONNEMENT DE L'AOTF
(Acousto Optical Tunable Filter)



Le tableau ci-dessous indique les raies lasers disponibles pour l'excitation de fluorochromes communément utilisés en Biologie. On notera que certains colorants spécifiques de l'ADN peuvent être utilisés aux deux extrêmités du spectre visible : Hoechst 33258 et DAPI (diode UV), chromomycine A3 (Argon 458) et ToPro3 (Helium-Néon 633)

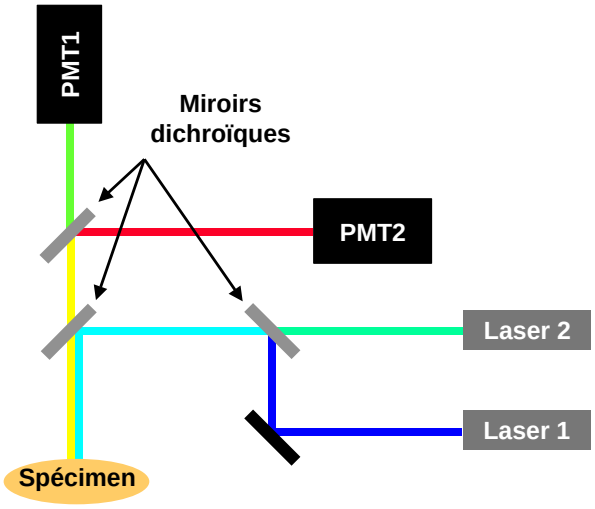
Spectres utiles en microscopie confocale

Fluorochrome	Excit.	Emiss.	UV laser diode	Argon				Diode DPSS	Helium/ Neon
			406	458	476	488	514	561	633
Hoechst 33258 or DAPI	350	450							
Alexa Fluor TM 430	431	541							
Chromomycin A3 (DNA)	445	580							
Fluo-3	480	520							
Alexa Fluor TM 488	495	519							
Calcein	495	500-550							
Cyanine Cy2 TM	489	505							
DiO (DiOC 18 (3))	484	501							
EGFP	498	510							
Fluoresceinisothiocyanat FITC	490	525							
Ethidiumbromid + DNA	510	595							
Ethidium homodimer	528	616							
EYFP (Enhanced YFP)	520	532							
Alexa Fluor TM 532	531	554							
TOTO-1 ® + DNA	509	533							
YFP (Yellow Fluor. Protein)	520	532							
Alexa Fluor TM 546	556	573							
Cyanine Cy3 TM	550	570							
Cyanine Cy 3.5 TM	580	598							
DiI (DiIC 18 (3))	549	565							
Propidium iodide	536	617							
Texas red	595	620							
Rhodamine isothiocyanate TRITC	540	580							
Cyanine Cy5 TM	649	670							
SYTO® 59 red fluorescent nucleic acid stain	640	660							
TO-PRO-3 ® + DNA	642	661							

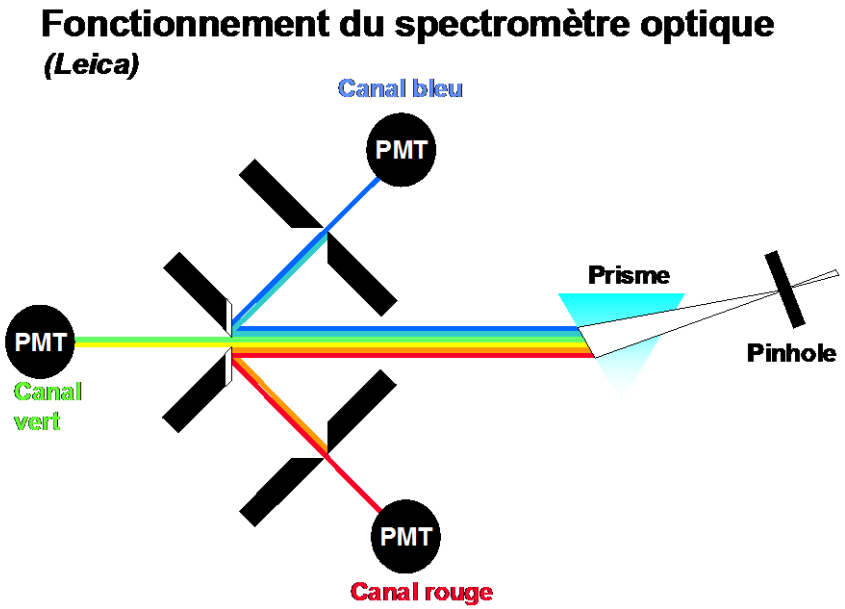
VI - DETECTION DE MULTI-FLUOROCHROMES :

L'examen de plusieurs sondes fluorescentes requiert la détection du signal de chaque sonde, ce qui nécessite à priori une différence entre les spectres d'excitation et d'émission. Des miroirs dichroïques aux caractéristiques appropriées sont placés sur les trajets optiques, permettant la séparation des différentes longueurs d'ondes. Cependant, la sélectivité des signaux récupérés est principalement assurée par la spécificité des filtres d'arrêt.

Détection de multi-fluorochromes

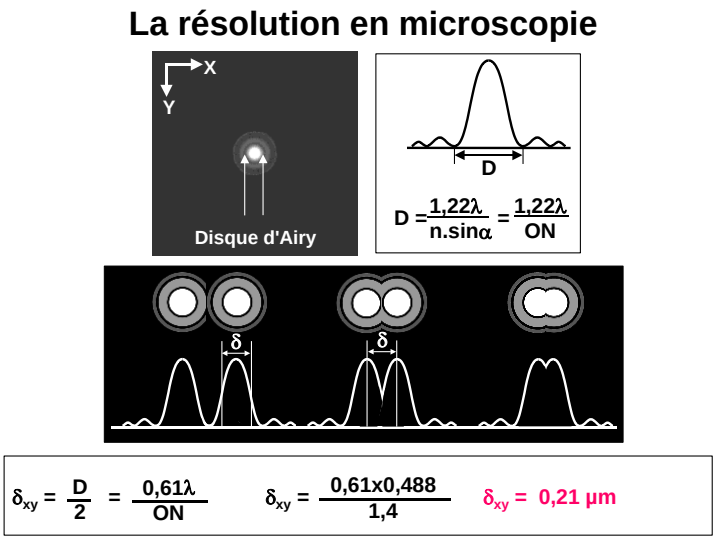


Les constructeurs proposent différentes solutions pour mieux séparer les signaux émis et analyser de manière fiable des préparations colorées simultanément par plusieurs sondes. Le spectromètre optique initialement développé par Leica puis implémenté par Zeiss sur certains de ses microscopes, transmet une bande spécifique du spectre grâce à l'utilisation d'un prisme, de fenêtres et de miroirs mobiles. Ainsi, on peut réaliser une analyse spectrale du fluorochrome étudié, ou limiter l'émission à une plage de longueur d'onde précise.

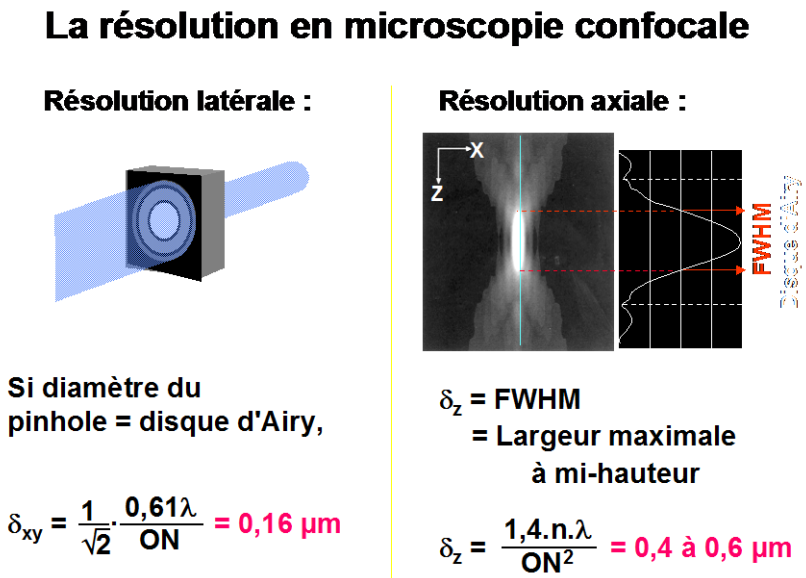


VII - LA RESOLUTION EN MICROSCOPIE CONFOCALE :

En microscopie conventionnelle, la résolution latérale est donnée par la loi d'Abbe :



En microscopie confocale, **la résolution latérale** est améliorée d'environ 30% par rapport à la microscopie conventionnelle.
La résolution axiale, non définissable en microscopie conventionnelle, est en microscopie confocale proportionnelle à l'ouverture numérique de l'objectif, mais aussi à l'indice de réfraction du milieu. C'est ainsi que pour une résolution axiale nominale, un objectif à sec d'ouverture numérique 0,95 (indice de réfraction = 1), donnera une résolution axiale de meilleure qualité qu'un objectif à huile d'ouverture numérique de 1 (indice de réfraction 1,54), bien que ce dernier ait une meilleure résolution latérale.



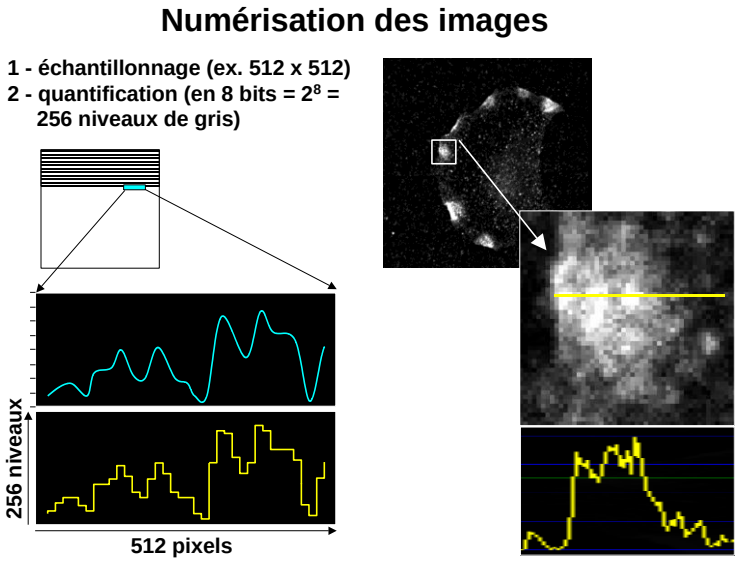
VIII - LA NUMERISATION DES IMAGES :

Le signal issu du tube photomultiplicateur (PMT) est transformé en signal vidéo. Ce signal peut être considéré comme une fonction continue S(x,y) qui représente l'intensité lumineuse au point de coordonnées x,y. Afin d'être traité par ordinateur, cette fonction doit être discrétisée, c'est à dire

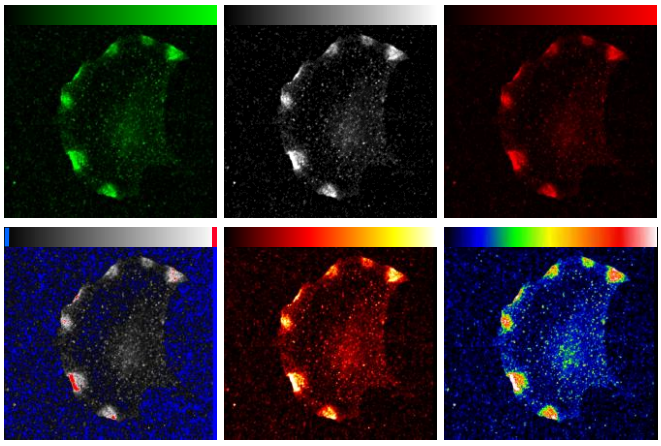
traduite par un tableau de nombres : c'est la **numérisation**, qui se décompose en deux sous-opérations : échantillonnage et quantification :

- **Echantillonnage** : le signal est découpé à intervalles de temps réguliers, soit par exemple en 256x256, 512x512 ou 1024x1024 points image élémentaires (pixels).

- **Quantification** : à chaque pixel est attribué une valeur numérique, proportionnelle à l'intensité lumineuse captée. La plupart du temps, cette opération est effectuée par un convertisseur analogique/numérique en 8 bits, ce qui permet de distinguer 256 niveaux de gris, répartis entre le noir absolu et le blanc pur.



L'échelle de niveaux de gris peut être artificiellement colorée en fausses couleurs pour mieux faire ressortir certains niveaux d'intensité ou pour pouvoir superposer deux images d'origine différentes. On utilise pour cela des tables « LUT » (Look-up tables)



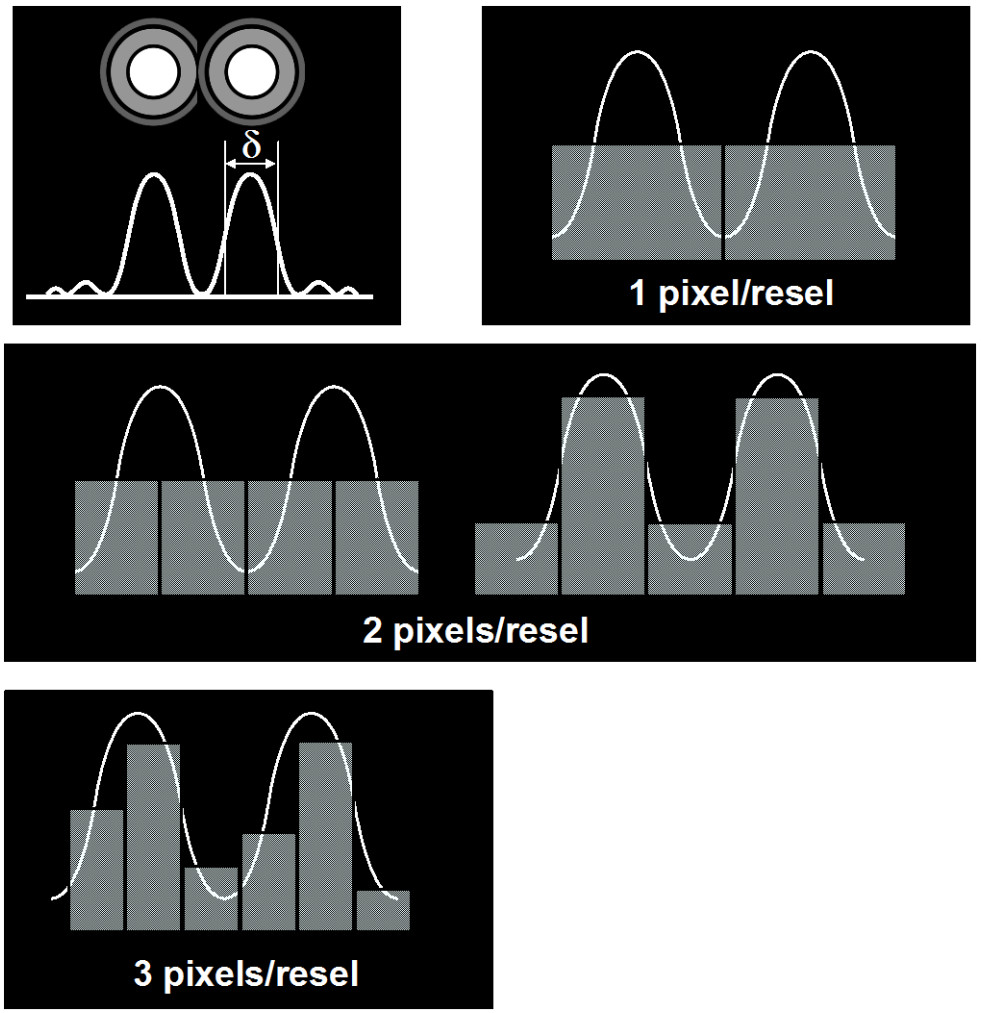
IX – NOTIONS D'ECHANTILLONNAGE :

La question qui se pose lors d'une numérisation d'image est celle de l'échantillonnage : ***quelle taille doit représenter un pixel pour obtenir une résolution maximale***, c'est à dire ne pas perdre d'information ?

- **Le** théorème de Nyquist **indique que pour pouvoir décrire un système, le** taux minimal d'échantillonnage doit être égal au moins à 2 fois la plus grande fréquence **(2,3 fois).**

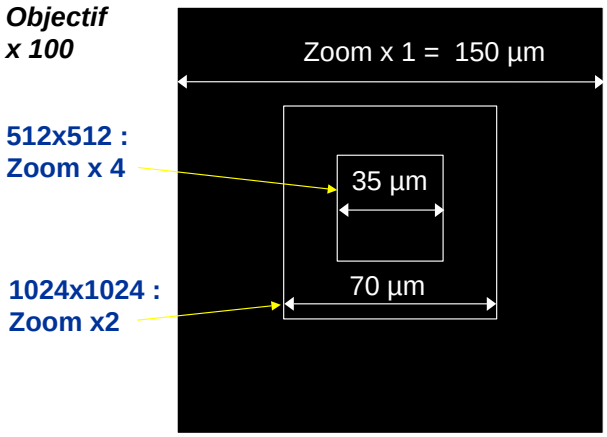
- En fait, la règle d'échantillonnage est déduite du **Théorème de Shannon**, dérivé du précédent, et qui stipule que **l'intervalle d'échantillonnage doit être inférieur à la moitié de la taille du plus petit objet à résoudre**

  Ainsi, en dessous de deux pixels par élément de résolution (*resel*), on ne peut décrire le système de manière fiable. A partir de **trois pixels par resel**, l'échantillon pourra être décrit avec la plus haute résolution. Cette notion permet de définir en x,y le zoom de balayage et en z le pas de déplacement du moteur qui doivent être impérativement adoptés pour conserver une résolution optimale.

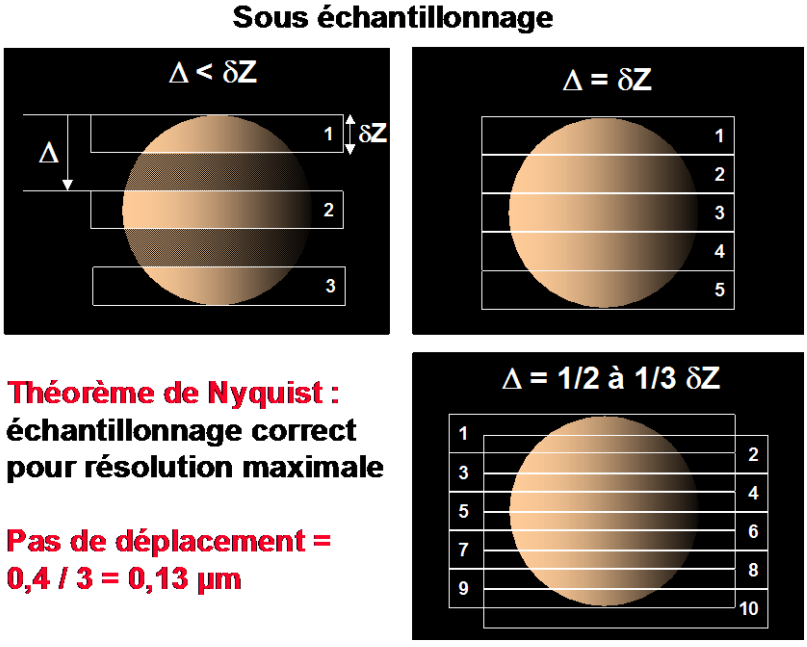


En ce qui concerne la résolution latérale (x,y), pour un objectif x63 ou x100 dont l'ouverture numérique est de 1,4 et qui possède donc une résolution confocale de 0,16 µm (voir plus haut), l'échantillonnage doit être au moins du tiers de cette valeur, soit 0,06 à 0,07 µm par pixel. Lors d'un scan sur 512x512 pixels, le champ couvert sera alors de 0,07 x 512 µm soit 35 µm. Ce calcul permet alors de définir le zoom auquel acquérir l'image. Par exemple, avec un objectif x100, qui couvre un champ de 150 µm à zoom x 1, il faudra acquérir à zoom x 4 (ou à zoom x 2 pour une acquisition en 1024x1024).

Si résolution objectif = 0,16 µm,
l'échantillonnage doit être de 0,06 à 0,07 µm par pixel,
soit 35 µm pour 512 pixels, ou 70 µm pour 1024 pixels



En ce qui concerne la résolution axiale, le même calcul est pratiqué pour définir le pas de déplacement du moteur. Exemple : meilleure résolution en z du système = 0,4 µm, donc pas de déplacement = 0,13 µm, soit 40 coupes optiques pour une épaisseur d'échantillon de 5 µm.



X - AVANTAGES ET LIMITES DE LA MICROSCOPIE CONFOCALE

AVANTAGES

- Résolution latérale (X-Y) accrue (30%) par rapport à la microscopie conventionnelle
- Résolution axiale (Z) restreinte (500 nm)
- Permet l'examen d'objet épais
- Permet le balayage en Z (impossible en microscopie conventionnelle)
- Obtention d'images 3D à haute résolution
- Ajustement électronique du grossissement (zoom de balayage)
- Diminution de la photoatténuation
- Analyse en temps réel de phénomènes dynamiques

LIMITES

- Photo-dommage cellulaire dans toute l'épaisseur de la préparation
- Photo-atténuation (« bleaching ») dans toute l'épaisseur de la préparation
- Pénétration relativement réduite dans l'épaisseur de la préparation
- Excitation > 450 nm (lasers UV peu fréquemment utilisés)