PLATEFORME D'INGÉNIERIE CELLULAIRE ET ANALYSES DES PROTÉINES

icroscope confocal

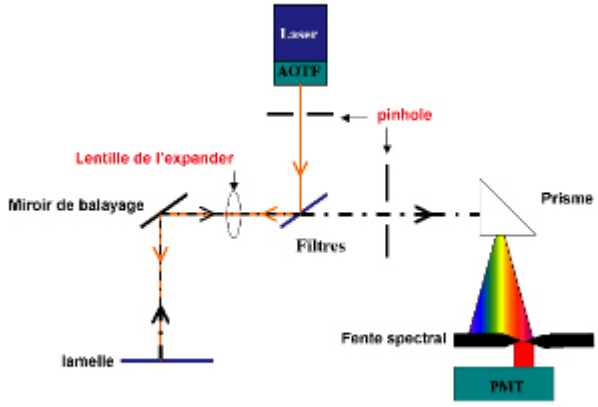
Accueil > Équipements > *Microscope confocal*

C'est en 1985 que la mise au point de la microscopie confocale à balayage laser a pu voir le jour grâce aux techniques acquises en laser. Le microscope confocal est l'une des grandes avancées en matière d'imagerie. En effet, l'optique ayant atteint (pour l'instant) ses limites, les grandes avancées se sont faites sur la lumière et notamment la microscopie à fluorescence mais celle-ci donne une perte de résolution due à l'émission de fluorescence défocalisée qui se superpose à l'image du plan focal. La microscopie confocale a permi de palier a cette inconvénient car seules les images provenant du plan focal sont acquises.

DEFINITION

Il provient de la combinaison des mots "conjugaison" et "focal". Il s'explique par le fait que ces deux trous d'aiguilles, placés soit pour l'illumination de l'objet, soit pour la détection de la lumière émise par l'objet, soient positionnés (conjugués) sur le même plan que le plan focal. Ils sont à égale distance du filtre.

PRINCIPE



L'émission: Le rayon laser est d'abord filtré par l'AOTF (filtre excitation actif, contrôle la puissance des lasers) puis traverse le pinhole d'entrée qui réduit la source à un point lumineux. Lefaisceau est ensuite réfléchi par un miroir (semi transparent, dichroïque…) passe par la lentille de l'expander pour ajuster son diamètre à l'objectif. Le galvanomètre va orienter le faisceau pour permettre le balayage de l'échantillon en X-Y, l'acquisition de série z se fait grâce a un moteur galvanométrique.

La réception : Le signal excité suit le trajet inverse de l'émission mais traverse le miroir (semi-transparent, filtre dicrhoïque) puis le pinhole de sortie pour ne laisser que la fluorescence du plan focal. Le signal est alors disperser en raies par le prisme puis les fentes spectrales vont sélectionner les bandes passantes des longueurs d'ondes de chaque

photomultiplicateur. le signal est alors converti en numérique puis affiché sur l'écran.

Le pinhole : Comme on peut le voir sur la figure le principe essentiel réside dans le "trou d'aiguille" ou pinhole qui n'autorise que la détection des signaux du plan focal (trait continu) et bloque le passage des faisceaux hors plan focal (trait pointillé). Le diamètre du pinhole aura une ouverture correspond à la première tache d'Airy.

Les avantages :
- Elimination du signal fluorescent provenant d'autres plans (out of focus) grâce au pinhole,
- Augmentation de la résolution latérale et axiale,
- Acquisition de séries de sections optiques permettant la reconstruction 3D,
- Observation simultanée de différentes sondes fluorescentes (de part son système de détection).

Les inconvénients :
- La puissance de l'émission laser (entre 1mW et 10mW) entraîne une dégradation des spécimens observés dans tous l'épaisseur,
- Difficulté pour l'observation du vivant dans certains cas,
- La photosensibilité limite le temps total d'exposition d'un spécimen au processus de balayage.

Le système acquis sur la plateforme est un microscope confocal Zeiss LSM780.
Il est équipé de quatres lasers et d'une chambre d'incubation.

Caractéristiques du microscope confocal Zeiss LSM780