

# Microscopie HiLo

La microscopie HiLo permet d'acquérir des images qui, comme un microscope confocal, rejette la lumière hors focus. Ceci est effectué en prenant deux images de l'échantillon avec différents types d'illumination et un traitement logiciel recombine ces images en une seule section optique<sup>1</sup>.

## Montage actuel

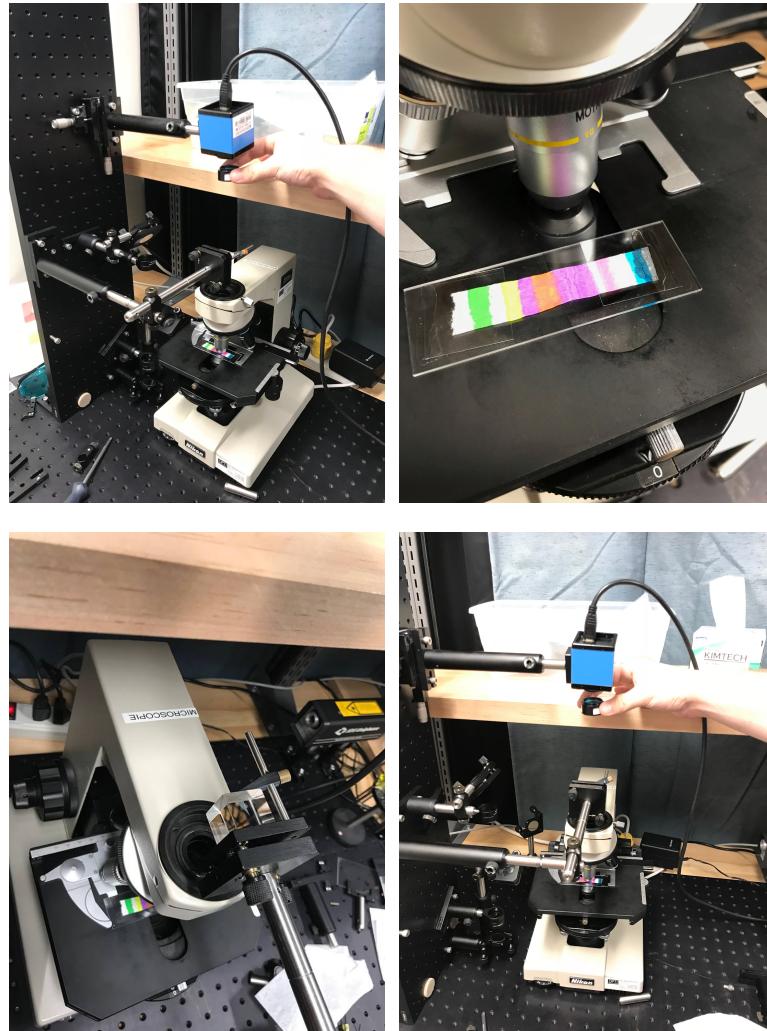


FIGURE 1 – Montage actuel du microscope HiLo

1. <http://biomicroscopy.bu.edu/research/hilo-microscopy>

La figure 1 montre le montage actuel pour le microscope HiLo. Premièrement, la plaque de verre qui redirigeait le faisceau vers l'intérieur du microscope a été changé pour un cube séparateur de réflectance 50%. Ce simple changement a drastiquement augmenté le signal à la sortie du microscope vers la caméra. Le cube a été placé sur une monture à vis, ce qui permet des ajustements rapide et précis de sa position. Celui-ci devrait toutefois être bien aligné avec le microscope et la caméra.

Ensuite, le plan image du microscope a été déterminé avec une feuille blanche afin de pouvoir placer le capteur de la caméra à cet endroit. Le signal visible à la caméra est uniquement des patrons d'interférence provenant de la source laser. Le microscope doit être utilisé en fluorescence, alors il faut réussir à bloquer le signal très puissant du laser et trouver un échantillon fluorescent.

Premièrement, l'option idéale est de remplacer le cube séparateur par un miroir dichroïque qui réfléchie toute la lumière de la source et qui laisse passer le signal de fluorescence. Étant donné que ces miroirs sont généralement imparfaits, il faut tout de même utiliser différents filtres afin de s'assurer de bien bloquer tout le signal du laser. Ces composantes sont toutefois utilisées dans d'autres expériences et ne sont disponibles qu'à la fin de la période. Le filtre passe-haut 650nm du microscope confocal ainsi que le filtre à 633nm de la spectroscopie Raman ont été emprunté et tenu à la main devant la caméra pour faire des tests de capture d'image.

Deuxièmement, afin de détecter du signal en fluorescence, un échantillon fluorescent a du être créé. Pour ce faire, des marqueurs fluorescents de différentes couleurs ont utilisé sur une feuille de papier. À l'aide du microscope confocal, il a été déterminé que le surligneur mauve est celui qui fluoresce le plus lorsqu'excitée par un laser à 633nm.

Avec un échantillon de surligneur mauve et des filtres pour bloquer le laser, une image en fluorescence a pu être captée à la caméra en ajustant le gain et le temps d'exposition, qui peut être observée à la figure 2.

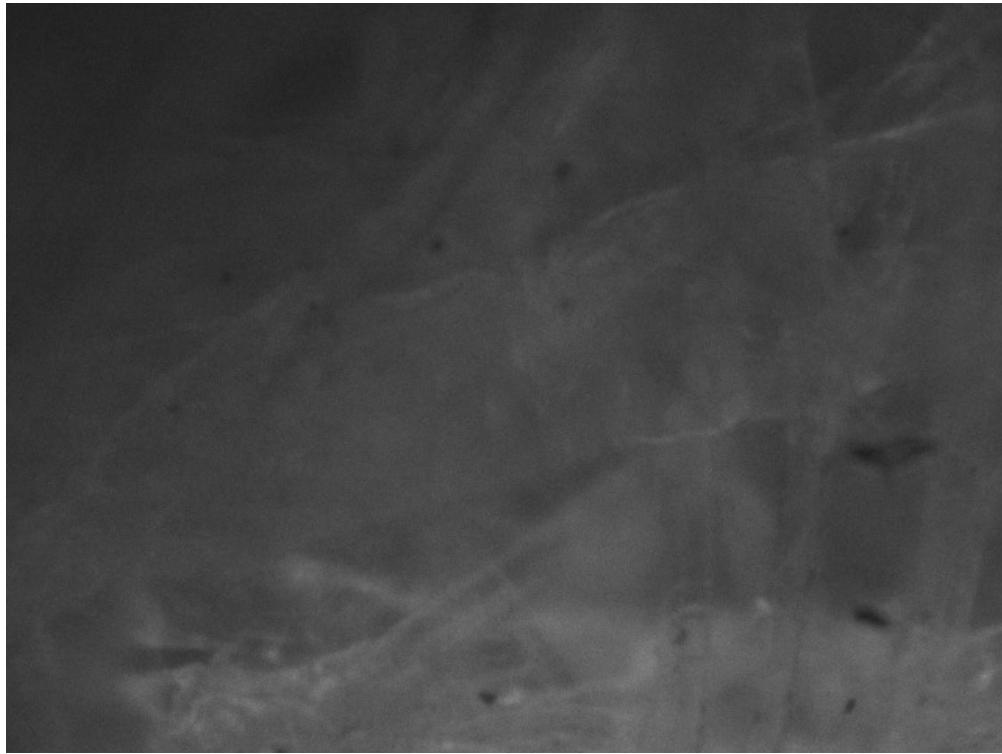


FIGURE 2 – Image en fluorescence captée par le microscope HiLo. Il est possible de distinguer les fibres du papier, surtout au bas de l'image.

Afin de résoudre les *speckles* du laser, ceux-ci doivent être visibles sur l'image et idéalement être 4-5 pixels par speckle. Or, dans l'image obtenue, aucun speckle n'est visible. Le faisceau va devoir grossir pour avoir des *speckles* de taille raisonnable.

## Prochaines étapes

1. Changer le cube séparateur pour un miroir dichroïque afin de maximiser le signal ;
2. Fixer l'ensemble de filtres qui permettent de bloquer le signal du laser sur le capteur (les filtres seront nécessaires malgré le miroir dichroïque) ;
3. Pour les deux étapes précédentes, il serait idéal d'acheter ces composantes pour ne pas dépendre sur les pièces des autres expériences ;
4. Augmenter la taille du faisceau (ou utiliser une autre méthode comme une fibre optique) pour grossir la taille des speckles jusqu'à ce qu'ils atteignent 4-5 pixels ;
5. Obtenir une image HiLo avec l'éclairage avec speckles et l'éclairage uniforme. L'éclairage uniforme est fait en agitant un diffuseur devant le faisceau laser et en intégrant quelques secondes pour faire disparaître les speckles.