

Microscopie photonique : modalités et principe de la fluorescence

Wassim Chikhi

Master 2 Vision et Machine Intelligente – 2025/2026

1. Objectifs du TP

Ce TP a pour but d'illustrer les différentes **modalités de microscopie photonique** utilisées en imagerie biomédicale. Les quatre configurations abordées sont :

- Microscopie en champ clair (transmission)
- Microscopie à contraste de phase
- Microscopie à fluorescence (champ large)
- Microscopie confocale à balayage

Chaque schéma est importé depuis les images du dossier `images/`.

2. Microscopie photonique : schémas explicatifs

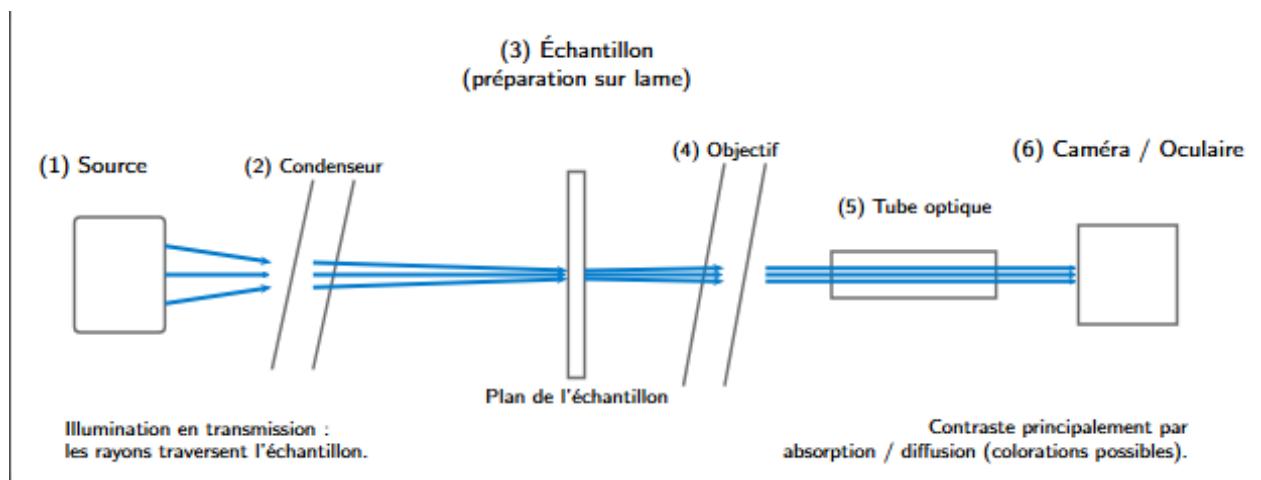


FIGURE 1. Microscopie en champ clair : illumination en transmission, contraste par absorption/diffusion.

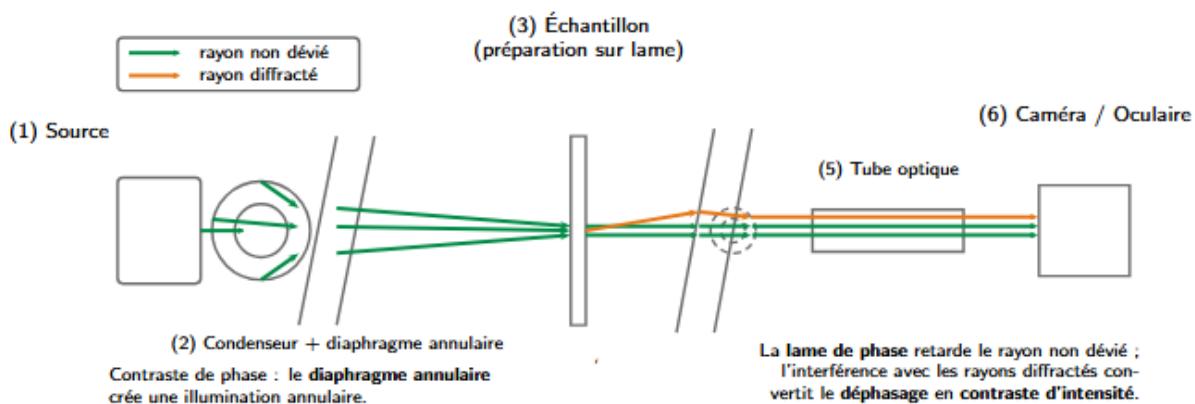
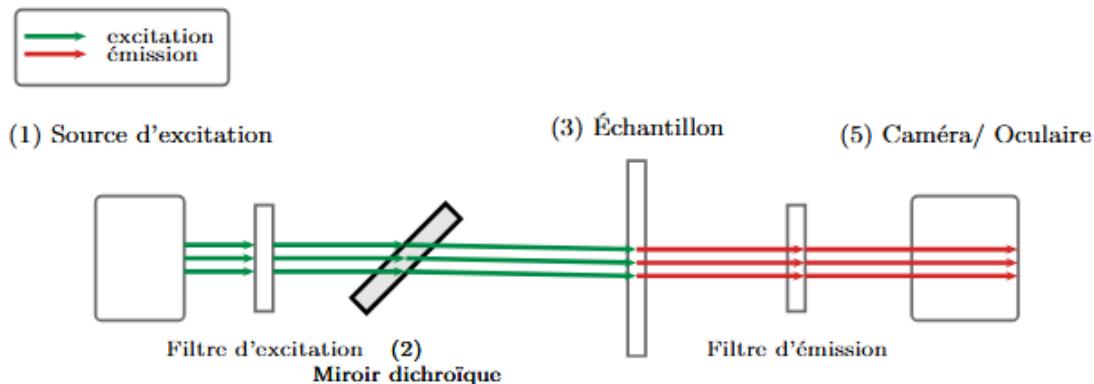


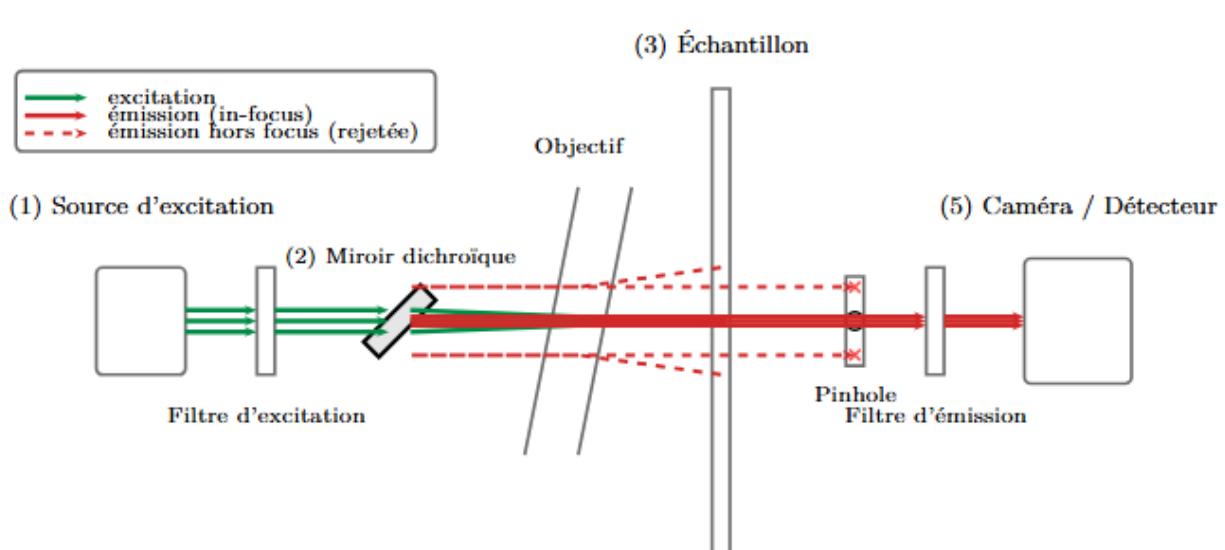
FIGURE 2. Contraste de phase : diaphragme annulaire + lame de phase, conversion du déphasage optique en intensité.



Le miroir dichroïque réfléchit l'excitation (courte) vers l'échantillon et transmet l'émission (longue).

En champ large, la caméra collecte la fluorescence de tous les plans (défocuser possible). Le filtre d'émission bloque l'excitation résiduelle.

FIGURE 3. Fluorescence (champ large) : miroir dichroïque 45°, filtres excitation/émission.



Le **pinhole** au plan conjugué du foyer laisse passer l'émission **in-focus** et bloque la lumière **hors focus**.

Le miroir dichroïque (45°) réfléchit l'excitation et transmet l'émission. L'optique confocale fournit une section optique.

FIGURE 4. Microscopie confocale : rejet de la lumière hors-focus via le pinhole, section optique.

3. Analyse d'image et photoblanchiment

On calcule ici l'intensité moyenne d'une séquence cell2D_timelapse.tif :

$$I_{\text{moy}}(t) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N I_i(t)$$

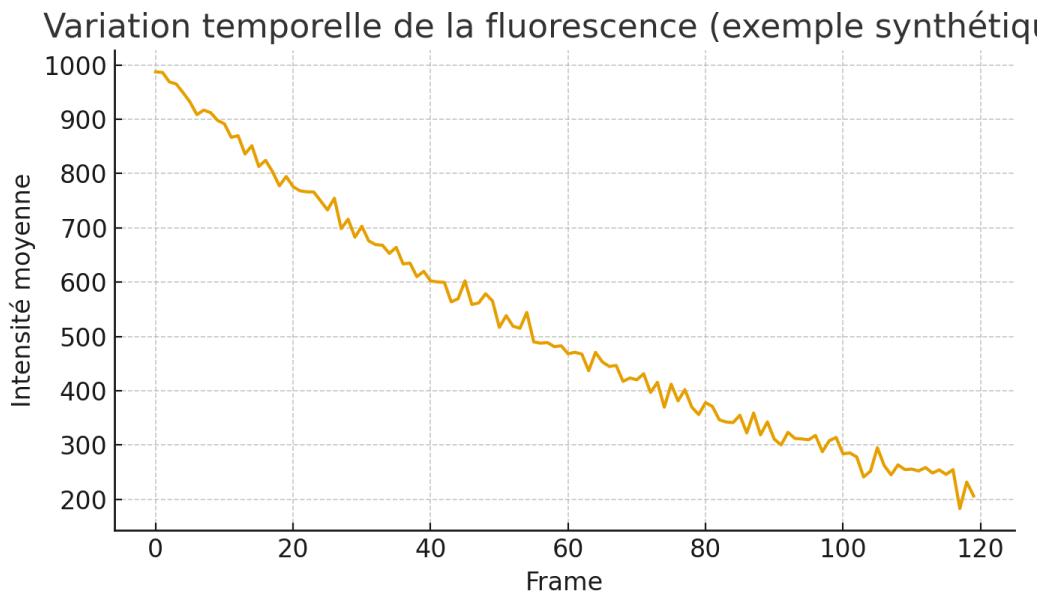


FIGURE 5. Variation temporelle de la fluorescence (intensité moyenne par frame).

Une décroissance progressive de l'intensité correspond à un **photoblanchiment** : la destruction des fluorophores sous illumination prolongée.

4. Conclusion

Ce TP a permis de réviser les principes physiques des quatre modalités de microscopie photonique. Les schémas importés traduisent la logique optique de chaque système. L'analyse d'une séquence temporelle a mis en évidence le **photoblanchiment**, phénomène majeur limitant la durée d'observation en microscopie de fluorescence.