

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Ferhat Abbas- Sétif 1

Institut : Optique et Mécanique de Précision

Département : Optique et mécanique de précision

Domaine : Sciences et Technologies

Filière : Optique et Mécanique de Précision

Spécialité : Métrologie

Mémoire de Master

Etude d'un microscope à fluorescence

Étudié par : M^{lle} KHENAT Amani

Dirigé Par : Dr. AZIL Kenza

Devant le jury :

(Président) : **Pr.Beloui**

(Examineur) : **Dr.Taallah.H**

AZIL Kenza



Soutenue le : / /2023

Table des matières

	Introduction générale.....	1
	chapitre I	
I.1.	Introduction.....	1
I.2.	Généralité sur la microscopie.....	1
	I.2.1. Historique	1
	I.2.2. Fondamentaux en microscopie optique.....	3
	I.2.2.1 Résolution ultime du microscope optique.....	6
I.3.	Les types des microscopes	7
	I.3.1. Les microscope électroniques	7
	I.3.2. Les microscope à sonde locale.....	9
	I.3.3. Le microscope optiques	10
	I.3.3.1. les microscopes à contraste de phase	10
	I.3.3.2. les microscopes à fond noir.....	11
	I.3.3.3. La microscopie confocale	12
	I.3.3.4. les microscopes à fluorescence	13
	chapitre II	
II.1.	Introduction	14
II.2.	La microscopie à fluorescence.....	14
	II.2.1. Historique	14
	II.2.2. Les caractéristiques de la fluorescence	18
	II.2.3. Les éléments clés du microscope à fluorescence	21
	II.2.3.4. Filtre.....	24
	II.2.5. Le principe du microscope à fluorescence.....	26
	II.2.6. Les types du microscope à fluorescence avec ses principes	28
	II.2.7. Les matériaux fluorescents	30
	II.2.8. Le rôle de la fluorescence et la microscopie à fluorescence dans la métrologie.....	32
	chapitre III	
III.1.	Introduction	34
III.2.	Matériels.....	34
	III.2.1. Le microscope à fluorescence	34
	III.2.1.1. les composants du microscope.....	35

III.2.1.2. Les caractéristiques du microscope	35
III.2.2. La caméra CCD et son logiciel	36
III.2.2.1. Les caractéristiques de la caméra.....	37
III.2.3. Photo-détecteur	37
III.2.5. Les matériaux fluorescents	38
III.3. Méthode.....	40
III.3.1. La calibration du microscope	41
III.4. Résultat et discussion	45
III.4.1. L'analyse quantitative	45
III.4.2. L'analyse qualitative	57
III.4.2.1. Visualisation et interprétation.....	57
III.4.3. Le traitement d'image	63
III.4.4. Interprétation générale.....	66
III.4.5. Les prescriptions pour des améliorations	66
III.5. Conclusion.....	67
Conclusion Générale	67

Liste des figures

Chapitre I

Figure.I. 1.Dates marquantes jusqu'à l'invention du microscope optique.....	2
Figure.I. 2.Les microscopes de Robert Hooke et Antoni Van Leeuwenhoek.....	3
Figure.I. 3.Composition d'un microscope (modèle Leica DMR-X à IPP)	4
Figure.I. 4.Modèle simplifié d'un microscope	5
Figure.I. 5. Schéma des dimensions angulaires d'un objet sans et à travers un objectif	6
Figure.I. 6. Le principe du microscope électronique MET.....	9
Figure.I. 7.Schéma du principe du MEB.....	9
Figure.I. 8.Le principe de microscope à contraste de phase	11
Figure.I. 9.Le principe du microscope à fond noir	12
Figure.I. 10.Le principe du microscope confocale	13

Chapitre II

Figure II. 1.a- George Sokes b- Nicolas Monardes	15
Figure II. 2.Diagramme de Perrin-Jablonski.....	16
Figure II. 3.Le déplacement de stokes	17
Figure II. 4.Le diagramme de Jablonski (simplifié)	18
Figure II. 5.différentes caractéristiques d'un objectif	21
Figure II. 6.Lampe à vapeur de mercure HBO et Xénon XBO]	24
Figure II. 7.Les différents types de filtres.....	26
Figure II. 8.Les filtres fluorescents	26
Figure II. 9.Schéma du trajet optique dans un microscope en épifluorescence à l'excitation (gauche) et à l'émission (droite).....	27
Figure II. 10.Le principe de la microscopie à réfraction interne totale.....	30

Chapitre III

Figure III. 1. Le microscope à fluorescence B-383FL[35].....	34
Figure III. 2.Les composants du microscope [36]	35
Figure III. 3.La caméra CMOS « Microkam »	36
Figure III. 4.Les lamelles et la seringue	38
Figure III. 5.Les longueurs d'onde des substances fluorescentes [37]	39
Figure III. 6.L'alimentation pour la fluorescence HBO	41
Figure III. 7.La focalisation du faisceau lumineux.....	41
Figure III. 8.La focalisation du faisceau lumineux.....	42
Figure III. 9.Les graduations millimétriques de la règle.....	42
Figure III. 10.Le zoom et la résolution.....	42
Figure III. 11.La calibration	43
Figure III. 12. Calibration.....	43
Figure III. 13. La barre d'échelle.....	44
Figure III. 14.L'affichage de la barre	44
Figure III. 15. L'échantillon de la goutte du café	45

Figure III. 16. L'intensité de café.....	46
Figure III. 17.L'échantillon du Vitamine B2.....	47
Figure III. 18. L'intensité de l'excitation	48
Figure III. 19.Les carotte en solution	49
Figure III. 20.Le zeste du carotte.....	50
Figure III. 21. l'intensité en fonction de l'échelle spaciale (Pixel).....	51
Figure III. 22. l'intensité en fonction de l'échelle spaciale (Pixel).....	51
Figure III. 23.L'intensité de carotte.....	52
Figure III. 24.La betterave en solution	53
Figure III. 25. La betterave en zeste	54
Figure III. 26.L'intensité en fonction de l'échelle spatiale (pixels)	55
Figure III. 27L'intensité en fonction de l'échelle spatiale (pixels).....	55
Figure III. 28. L'intensité de la betterave	56
Figure III. 29.Pain frais	Figure III. 30.pain moisi
Figure III. 31. Le pain frais	58
Figure III. 32. Le pain moisi	59
Figure III. 33.carotte fraiche	Figure III. 34.carotte pourri
Figure III. 35. La carotte purrie.....	60
Figure III. 36.Viande fraiche	Figure III. 37.Viande avarié
Figure III. 38. La viande fraiche	62
Figure III. 39. La viande pourrie.....	63
Figure III. 40.L'ouverture du programme.l'ouverture du programme	64
Figure III. 41.Les étapes suivies.....	64
Figure III. 42.Substruact.....	65
Figure III. 43.Le café sans traitement.....	65
Figure III. 44.Le café sous traitement	65
Figure III. 45.Betterave sans traitement	65
Figure III. 46.Betterave sous traitement.....	65

Liste des tableaux

Chapitre II

Tableau II. 1.Les propriétés des lentilles des objectifs	23
Tableau II. 2.Les auto-fluorescents	31
Tableau II. 3.Les colorants fluorescent.....	31

chapitreIII

Tabelau III. 1.Les critères des filtres du microscopes.....	36
Tabelau III. 2.Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission pour les substances auto-fluorescentes.....	39
Tabelau III. 3.L'intensité du café	46
Tabelau III. 4.L'intensité de vitamine B2.....	47
Tabelau III. 5.L'intensité du carotte	51
Tabelau III. 6. L'intensité de betterave.....	56

Résumer

Depuis plus d'un siècle, la microscopie de fluorescence est un outil couramment utilisé par les biologistes en raison de ses possibilités de détection des particules et de structures qui ne peuvent être visualisées en microscopie optique.

Dans cette mémoire on va expliquer son principe, ses différentes caractéristiques et son rôle dans la métrologie. En répondant à la question : quelle est la relation entre la microscopie à fluorescence et la métrologie ?

ملخص

على مدى أكثر من قرن، كانت مجهرية الفلورية أداة تستخدم بشكل شائع من قبل علماء الأحياء بسبب إمكانياتها في كشف دورها في: الجسيمات و الهياكل التي لا يمكن رؤيتها بواسطة المجهر الضوئي في هذه المذكرة سنشرح مبدأها و ميزاتها مجال علم الفيزياء و مزايا الجودة و نجيب على السؤال المطروح

ما العلاقة بين مجهرية الفلورية و علم الفيزياء؟

Summary:

For over a century, fluorescence microscopy has been a widely used tool among biologists due to its capabilities in detecting particles and structures that cannot be visualized using optical microscopy. In this thesis, we will explain its principle, various characteristics, and its role in metrology. By answering the question: what is the relationship between fluorescence microscopy and metrology?

Introduction
Générale

Introduction générale

Comme la plupart des primates, l'homme est essentiellement une espèce visuelle. Nos rétines captent la plupart des informations sensorielles que nous recueillons dans le monde et, par conséquent, la majeure partie de notre néocortex sensoriel est engagée dans le traitement des données visuelles. Il n'est donc pas surprenant que les techniques de visualisation soient au cœur des domaines de la science et de l'ingénierie.

La révolution qui a eu lieu à la fin du XVI^e siècle consistait à examiner les objets non pas directement, mais à travers une loupe qui agrandissait leur image. Cette avancée a donné naissance à la microscopie. Le terme lui-même provient des mots grecs "mikros" (petit) et "skopein" (examiner), ce qui renvoie à l'examen d'objets ou de détails à peine perceptibles ou invisibles à l'œil nu. Au fil du temps, la microscopie s'est imposée comme une technique essentielle d'observation pour étudier les propriétés de la matière, qu'elle soit inanimée ou vivante. Grâce à de nouveaux modes d'observation et à une perception de plus en plus fine, la microscopie a même permis d'explorer l'échelle atomique. En conséquence, elle a profondément bouleversé notre culture scientifique.

Ce mémoire est structuré de la manière suivante :

Dans un premier temps, nous aborderons le chapitre I intitulé "Généralités sur la microscopie". Ce chapitre fournira une introduction générale à la microscopie, en mettant en évidence certains types de microscopes qui jouent un rôle important dans le domaine microscopique.

Ensuite, nous nous concentrerons sur le cœur du mémoire, à savoir le microscope à fluorescence. Nous expliquerons en détail le principe de la fluorescence, en décrivant les composants impliqués et en mettant en évidence son rôle dans la métrologie.

Enfin, nous aborderons la partie expérimentale de notre étude. Cette section nous permettra de découvrir l'importance de la métrologie dans le domaine de la fluorescence, ainsi que les multiples aspects du monde microscopique de la fluorescence.