

ELIMINATION DU BACKGROUND AVEC METAMORPH

En microscopie, les ennemis premiers sont la poussière et les mauvaises manipulations. L'un comme l'autre salit ou endommage l'optique, ayant pour conséquence l'apparition d'un background indésirable sur les images.

Pour ceux qui font toujours la même chose avec leurs échantillons, voici une façon rapide pour éliminer le background de vos images. Il s'agit de faire une image du background dû seulement à l'équipement : microscope et caméra (c'est-à-dire sans lame ni pétri dans le trajet lumineux) une seule fois par session pour chaque mode d'observation. C'est-à-dire ne faire qu'une image de background en transmise et une (ou plusieurs) pour chaque fluorophore, lesquelles serviront pour tous les échantillons de la même session de microscopie. Ce background sera soustrait automatiquement dès l'acquisition. Retenir par contre que les paramètres d'acquisition de l'image finale doivent être en tout point les mêmes que celle du background.

Notions de base à retenir concernant le background

Le background change avec:

- la source lumineuse (fluo ou transmise)
- l'objectif utilisé
- le mode d'éclairage (cubes de filtres, fond clair, contraste de phase, DIC)
- le temps d'exposition et autres paramètres d'acquisition tel le binning (le scaling n'influence pas)
- le support utilisé pour votre échantillon (plastique, verre, épaisseur du couvre-objet, milieu de montage)

Procédure :

Alors sur vos images, pour **éliminer le background dû aux défauts du trajet optique** (les fameuses poussières indélégeables) en tenant compte de tous les points ci-haut mentionnés sauf celui du support utilisé pour votre échantillon:

1. **Koehler au 10x** - Ajuster le microscope en Koehler avec un échantillon en place (en utilisant l'objectif 10x ou 20x en fond clair).
2. **Grossissement désiré** - Engager l'objectif nécessaire pour vos observations.
3. **Source lumineuse** – Choisir la lumière blanche (transmise) ou la fluorescence.
4. **Type de microscopie** - fond clair, DIC, contraste de phase ou cube de filtre pour la fluorescence
5. **Logiciel d'imagerie, choisir un temps d'exposition** - Dans *Metamorph*, déterminer un temps d'exposition valable qui puisse être commun, dans ce mode d'éclairage, pour tous les échantillons de votre expérience. La caméra a une grande marge de manœuvre (dynamic range), ce qui laisse le choix de divers temps d'exposition possibles pour le même échantillon – donc choisir un temps d'exposition qui pourra être commun dans ce mode d'éclairage à tous vos échantillons.

NB : A noter que chaque fluorophore aura une image de background différente, et que l'image du background en transmise ne peut en aucun cas servir pour une image en fluorescence. De même, chaque temps d'exposition nécessite son image de background. L'image à corriger et l'image du background doivent avoir été prises avec le même temps d'exposition.

6. **Enlever le spécimen** - Retirer votre échantillon du trajet lumineux (enlever la lame ou le pétri au complet).

7. **Acquisition d'une image de background dû à l'équipement seulement** - Dans *Metamorph*, faire une image du background à partir du module d'acquisition :

- Menu « Acquire » ,
- Fenêtre du module « Acquire »
- Onglet « Correct »
- Section « Shading Correction »
- Cochez la case « Image »
- Appuyer sur « Acquire Shading Reference »
- Si vous voulez voir l'image produite, cliquez sur « Display Shading Image »
- Sauvez cette image. Ex. : « Shading 60x DIC 300 ms »
- Au coin inférieur gauche de la fenêtre Acquire, Sauvegardez ces paramètres d'acquisition « Settings » sous un nom, par exemples : « 60x DIC 300 ms » pour vos futures images à prendre en DIC avec ce temps d'exposition là. Enregistrer un « settings » pour chaque mode d'observation en utilisant le « Save as... » pour ne pas effacer les settings précédemment sauvegardés, par ex. « 20x DAPI 20 ms », « 20x GFP 500 ms », « 100x fond clair 10 ms », etc.

8. **Remettre le spécimen** et ajuster la mise au point si nécessaire

9. **Acquisition d'une image du spécimen sans les défauts du trajet optique** – Cliquer sur le bouton « Acquire » (la case « Image » dans la section « Shading Correction » doit restée cliquée pour que la correction se fasse dès l'acquisition).

10. Si vous alternez entre différents mode d'observation, vous n'avez qu'à rappeler les settings correspondant à ce mode :

- Choisir le nom dans la case sous « Settings » , Ex. « 60x DAPI 50 ms »
- Cliquer sur Load...
- Et automatiquement l'image de Shading correspondante à l'observation avec le cube DAPI sera « re-loadée » pour corriger le background correspondant au trajet lumineux pour le DAPI avec un temps d'exposition de 50 ms

Cependant, ne pas oublier que pour être dans les règles de l'art, il faut aussi éliminer le background causé par le support utilisé pour vos cellules (lames, pétris, plaques multi-puits, milieu de montage) et que ce dernier varie d'une lame à l'autre, ou d'un pétri à l'autre. Donc ce dernier demande une 2^e image de background, une par lame et non une par session de travail tel que décrit plus haut.

La technique proposée ci-haut élimine 4 des 5 facteurs pouvant influencer le background et génère une image corrigée satisfaisante.