



UNIVERSITÉ  
LAVAL

Faculté des sciences et de génie  
Travaux pratiques orientés biophotonique (GPH-4102)  
Automne 2018

---

## MESURE EXPÉRIMENTALE RAPIDE DE LA RÉOLUTION D'UN MICROSCOPE CONFOCAL À BALAYGE LASER

Date de l'expérience : 16 octobre et 23 octobre 2018

Réalisé par

**SÉBASTIEN JERCZYNSKI**

sebastien.jerczynski.1@ulaval.ca

**MARC-ANDRÉ VIGNEAULT**

marc-andre.vigneault.2@ulaval.ca

Date de remise : 6 novembre 2018

---

La détermination rapide de la résolution d'un microscope est cruciale afin de prendre des mesures quantitatives sans perdre de temps. Une méthode d'estimation rapide, décrite dans ce rapport, se base sur la mesure de la largeur de la fonction d'étalement du bord (ESF) afin d'estimer la proximité de la résolution optique avec la résolution optimale qu'est la limite de diffraction. Sur le microscope confocal utilisé dans cette étude, le critère de Rayleigh théorique, qui est la définition standard, est de 422nm. La ESF expérimentale est de  $(840 \pm 90)$ nm pour un grossissement de  $\times 8$ . Une ESF théorique a été déterminée à partir de la fonction d'étalement du point (PSF) théorique. L'écart de 94.4% avec la valeur théorique indique la PSF du système pourrait être fortement amélioré par l'atténuation de l'effet des aberrations. Finalement, il a été conclu qu'une variation de l'ESF par la modification du zoom mécanique est un indicateur d'une limitation numérique, plutôt qu'optique, de la résolution du système. Finalement, le *théorème de Nyquist* a été démontré utile dans la détermination des contraintes requises à l'optimisation de la résolution totale du système.

# Table des matières

<b>1 INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>2 EXIGENCES THÉORIQUES</b>	<b>1</b>
<b>3 MÉTHODOLOGIE</b>	<b>3</b>
<b>4 RÉSULTATS</b>	<b>4</b>
4.1 Résolution en xy . . . . .	4
4.2 Résolution en z . . . . .	5
4.3 Fluorescence . . . . .	6
<b>5 DISCUSSION</b>	<b>7</b>
5.1 Résolution en xy . . . . .	7
5.1.1 Variation de la largeur de la ESF . . . . .	7
5.1.2 Comparaison avec la ESF théorique . . . . .	8
5.2 Résolution en z . . . . .	9
5.3 Fluorescence . . . . .	10
<b>6 CONCLUSION</b>	<b>11</b>
<b>Annexe A Calcul de ESF théorique</b>	<b>12</b>
<b>Annexe B Calcul d'incertitude</b>	<b>13</b>
<b>Annexe C Images de l'expérience</b>	<b>14</b>

# 1 INTRODUCTION

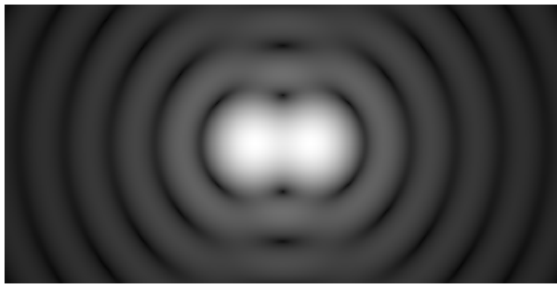
Lorsque vient le temps de choisir, de comparer, d'utiliser ou d'acheter des systèmes d'imagerie, le temps nécessaire à l'étude du système peut être long. Les différentes conventions et les protocoles pour déterminer la résolution ne sont pas toujours évidents. Le rapport ci-contre décrit l'utilisation de la fonction d'étalement du bord (ESF) afin de décrire la résolution d'un système de microscopie confocale. L'influence du zoom mécanique sur la résolution, ainsi que les limites physiques du système sont discutées.

## 2 EXIGENCES THÉORIQUES

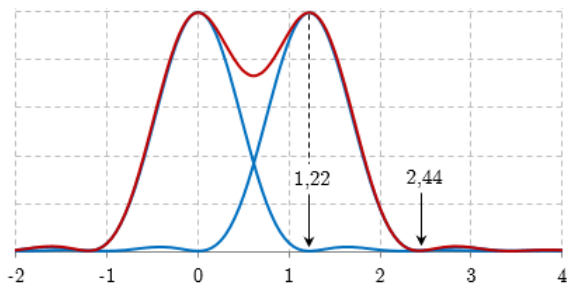
La microscopie confocale est très répandue et son fonctionnement très simple. Tel qu'illustré à la figure 3, un laser d'excitation est balayé sur un échantillon fluorescent. La lumière d'émission est récoltée par le même chemin que l'excitation, puis passe par des filtres qui isole la lumière fluorescente et l'envoie sur un capteur PMT. Un sténopé assure le contrôle de la taille de la section optique. La résolution numérique du système est déterminée par la rotation des galvanomètres et la résolution optique par la PSF du système. La *Fonction d'étalement du point (PSF)* d'un système optique peut être décrite comme la réponse spatiale à une impulsion spatiale lumineuse. Dans un microscope confocal, le faisceau d'excitation, ayant la forme d'un disque d'Airy, est focalisé sur le spécimen qui réémet de la lumière sous la même forme. Ainsi, le système de détection et le système d'excitation influencent la PSF.

La résolution d'un système est habituellement décrite à l'aide du critère de Rayleigh. Ce critère, illustré à la figure 1 impose la distance minimale acceptable entre deux points lumineux qui permet de différencier ces points. Il est décrit comme la superposition du premier zéro du patron d'Airy avec le pic d'intensité de l'autre tache. Cela se résume à la distance entre le pic d'intensité et le premier zéro d'une fonction de Bessel. Connaissant la PSF du système, il est ensuite possible de retrouver la résolution de ce système. De façon théorique, la résolution est donnée par [1]-[3], soit

$$\Delta r \approx 1.22 \frac{\lambda}{D} L \approx \frac{0.6\lambda}{\text{NA}}$$



(a) Simulation 2D de la superposition de 2 disques d'Airy selon le critère de Rayleigh. Contraste exagéré.



(b) Représentation graphique 1D du critère de Rayleigh

FIGURE 1 – Représentation du critère de Rayleigh en 1D et en 2D.

Cependant, cette convention n'est pas le standard absolu dans le monde de la microscopie. Souvent, le disque d'Airy n'est pas visible si le système n'est pas proche de la limite de la diffraction et l'intensité des pics secondaires est généralement de plusieurs ordres inférieurs à celle du pic central. La largeur à mi-hauteur ou *FWHM* (*Full Width Half Max*) est très souvent utilisée comme mesure de la résolution ou de la largeur d'un faisceau. Sachant que l'image obtenue dans un microscope à balayage est l'équivalent d'une convolution entre la PSF du système et l'objet, la PSF peut être retrouvée en déconvoluant l'image et l'objet, comme l'objet peut être retrouvé en déconvoluant l'image avec la PSF [5].

Dans le cas d'un objet imitant un échelon parfait, l'image obtenue représente ce qu'on appelle *ESF* (*Edge Spread Function*) [6], tel qu'illustré à la figure 2. Il s'agit d'une convolution entre un objet échelon et le faisceau d'excitation. La mesure de la largeur de la transition de la ESF se fait habituellement entre 10% et 90% de l'intensité et comme [8] l'explique, la ESF peut être utilisée comme critère de résolution, car elle est beaucoup plus facile à mesurer que la PSF et est plus contraignante.

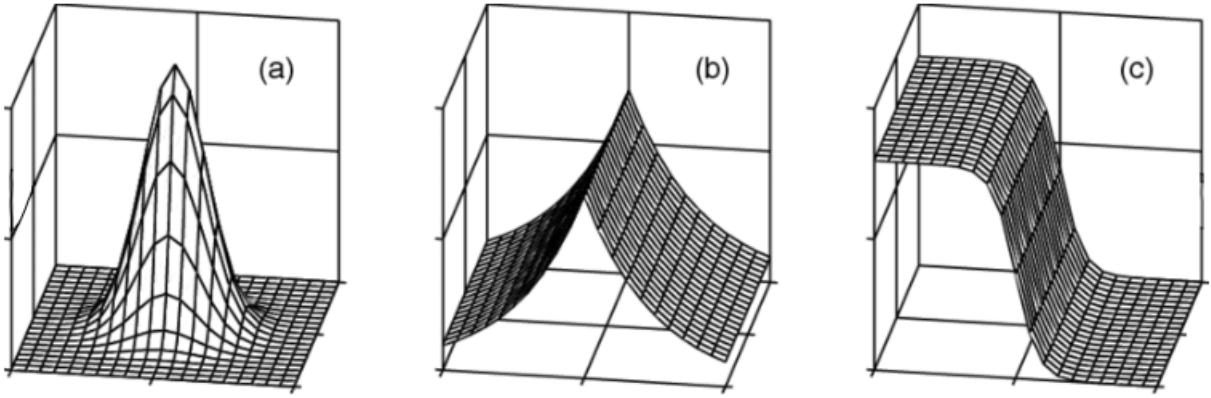


FIGURE 2 – en (a) PSF, (b) LSF et (c) ESF [7]

Le lien unissant ces trois fonctions d'étalement est simple. Tel qu'indiqué par Dr. Schowengerdt [8], la LSF est l'intégration de la PSF dans l'orientation désirée. Pour une PSF symétrique, la LSF est la même dans toutes les orientations. Ensuite, la ESF est l'intégration de la LSF.

$$LSF_x(x) = \int_{-\infty}^{\infty} PSF(x, y) dy \quad (1)$$

$$ESF_x(x) = \int_{-\infty}^x LSF_x(\alpha) d\alpha \quad (2)$$

En microscopie confocale, ce qu'on appelle section optique est la portion en profondeur de d'échantillon de laquelle la lumière est récoltée. Plusieurs méthodes existent afin de mesurer la résolution axiale selon [1]. Cependant, la résolution axiale n'est pas l'avantage majeur du microscope confocal, mais plutôt son sectionnement optique effectué par le sténopé. Généralement, la section optique est plus petite que la résolution axiale, alors elle n'est pas très importante en microscopie confocale.

Les calculs des valeurs théoriques sont présentés en annexe A.

### 3 MÉTHODOLOGIE

Le montage général utilisé pour l'expérience effectué est montré à la figure 3. Un laser est dirigé vers deux galvanomètres qui orientent le faisceau à travers un système 4f. Celui-ci grossit la taille du faisceau afin qu'il recouvre l'entièreté de la lentille de l'objectif. Le laser peut ensuite balayer l'échantillon. La lumière réémise, soit par fluorescence ou par réflexion, est renvoyée dans le système jusqu'à un sténopé qui bloque la lumière qui ne provient pas du plan focal. La lumière restante se dirige jusqu'à un photo-multiplicateur (PMT) connecté à une carte d'acquisition qui permet la récolte de données à l'aide du logiciel ScanImage. Pour cette expérience, un miroir dichroïque est également utilisé pour séparer le signal fluorescent du signal du laser. Toutefois, ce miroir n'est pas parfait et une partie de la lumière du laser peut passer à travers. Un second filtre est donc utilisé avant le sténopé. Cette imperfection permet également de prendre des mesures de résolution du microscope.

En effet, pour mesurer la résolution, une cible de résolution USAF 1951 est observée en réflectance et à l'aide de la fraction de la lumière qui va atteindre le PMT, il est possible d'étudier la transition entre les éléments de la cible pour déduire la résolution qui est représentée par la largeur de cette transition. Pour différentes valeurs de zoom, un élément approprié de la cible est sélectionné pour remplir le plus possible le champ de vue et bien voir la fonction d'étalement du bord. Pour la résolution en  $z$ , le point focal du microscope est premièrement trouvé, puis l'échantillon est balayé verticalement de part et d'autre de ce point focal et le profil d'intensité moyenne peut être analysé pour trouver la résolution en  $z$ . Finalement, pour minimiser le bruit, cinq images sont moyennées pour toutes les images capturées.

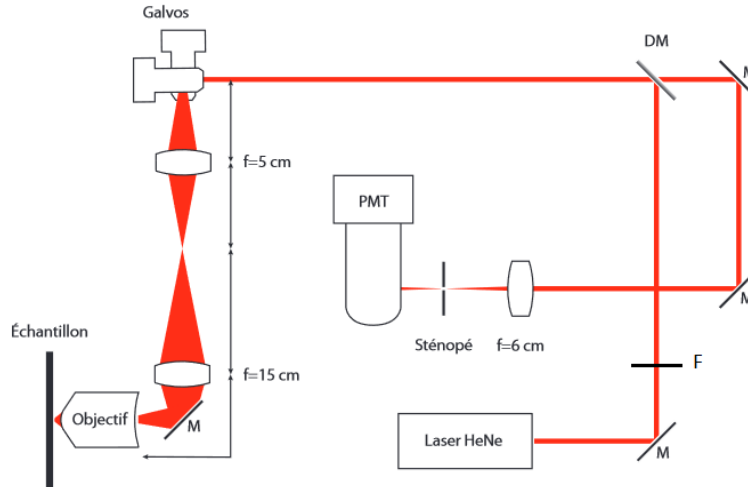


FIGURE 3 – Montage de base vu de côté utilisé pour l'expérience [?]

## 4 RÉSULTATS

Tout d'abord, il est important de déterminer quelle définition de la résolution est utilisée. Par exemple, il serait possible d'utiliser le critère de Rayleigh pour obtenir la plus petite distance où deux objets sont discernables. Il existe également d'autres critères semblables qui ont le même but. Pour cette expérience, une définition un peu plus simple sera utilisée. Lorsque la cible USAF 1951 sera observée avec le microscope, la transition entre les zones réfléchissantes et les zones transparentes (la ESF) sera analysée et la résolution obtenue sera la distance nécessaire pour que l'ESF passe d'une intensité de 10% à 90%. Une image capturée par le microscope confocal et utilisée pour la mesure de la résolution est montrée en annexe C.

### 4.1 Résolution en xy

TABLE 1 – Comparaison des dimensions obtenues en laboratoire et des dimensions réelles

Zoom	Champ de vue [ $\mu\text{m} \times \mu\text{m}$ ]	Résolution en x [ $\mu\text{m}$ ]	Résolution en y [ $\mu\text{m}$ ]
$\times 2$	$(128 \pm 2) \times (128 \pm 2)$	$(1.5 \pm 0.2)$	$(1.5 \pm 0.2)$
$\times 3$	$(86 \pm 1) \times (86 \pm 1)$	$(1.2 \pm 0.1)$	$(1.2 \pm 0.1)$
$\times 4$	$(64 \pm 1) \times (64 \pm 1)$	$(1.0 \pm 0.1)$	$(1.0 \pm 0.1)$
$\times 5$	$(47.9 \pm 0.6) \times (47.9 \pm 0.6)$	$(0.9 \pm 0.1)$	$(0.9 \pm 0.1)$
$\times 6$	$(42 \pm 1) \times (42 \pm 1)$	$(0.9 \pm 0.1)$	$(0.9 \pm 0.1)$
$\times 7$	$(37.6 \pm 0.8) \times (37.6 \pm 0.8)$	$(0.86 \pm 0.09)$	$(0.86 \pm 0.09)$
$\times 8$	$(33 \pm 1) \times (33 \pm 1)$	$(0.84 \pm 0.09)$	$(0.84 \pm 0.09)$

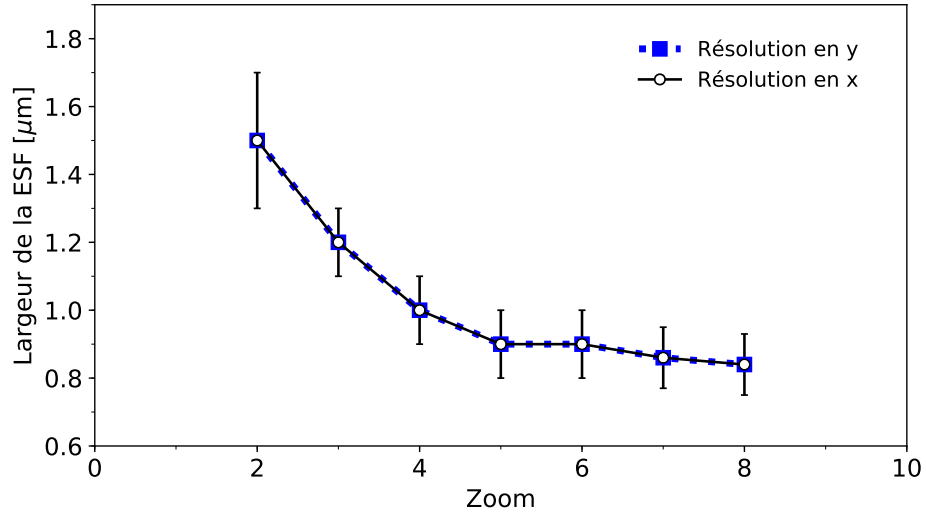


FIGURE 4 – Résolution en  $x$  et en  $y$  du microscope confocal en fonction du zoom utilisé. Cette résolution est définie comme étant la distance requise pour que l'ESF passe de 10% à 90%. Un déplacement en  $z$  positif signifie que l'échantillon se rapproche de l'objectif du microscope

À l'aide du tableau et du graphique ci-dessus, plusieurs observations peuvent être effectuées sur la résolution du microscope confocal ainsi que son comportement lorsque le zoom est utilisé.

En premier lieu, il est possible de constater que plus le zoom augmente, plus la résolution du microscope est améliorée. La largeur entre une intensité de 10% du maximum et 90% de la ESF en  $x$  est passée de  $(1.5 \pm 0.2)\mu\text{m}$  en zoom  $\times 2$  jusqu'à  $(0.84 \pm 0.09)\mu\text{m}$  avec un zoom  $\times 8$ , ce qui représente une amélioration de 56%. Toutefois, cette augmentation n'est pas linéaire. Les gains en résolution sont beaucoup plus importants à des valeurs de grossissement plus petites et un plateau semble se former à partir du grossissement  $\times 5$ .

En deuxième lieu, il est important d'adresser les incertitudes des mesures. Pour les mesures de résolution en  $xy$ , l'incertitude provient du nombre limité de pixels sur la ESF. Il est donc difficile de déterminer exactement à quelle distance le 10% et le 90% d'intensité de la ESF se situe. Cette difficulté de trouver une valeur précise de déplacement en pixels est également pourquoi les valeurs en  $x$  et en  $y$  concordent parfaitement, car les légères différences entre les valeurs en  $x$  et en  $y$  sont plus petites que les incertitudes. Un exemple de calcul d'incertitude est situé dans l'annexe B. Toutefois, chaque image possède un grossissement différent et une largeur d'ESF différente, donnant à chaque mesure une incertitude qui lui est propre. De plus, l'incertitude diminue plus le zoom augmente, passant d'une incertitude relative de 13% au zoom  $\times 2$  à 10.7% à un zoom  $\times 8$ . Malgré cette diminution, l'incertitude reste assez élevée. Différents changements à la méthode pour diminuer cette incertitude seront décrits dans la section Discussion.

## 4.2 Résolution en $z$

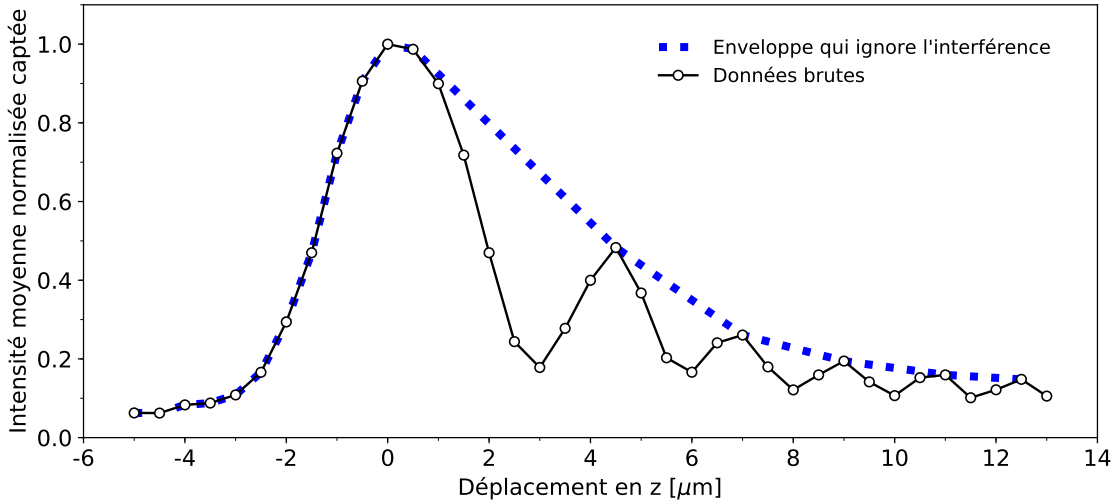
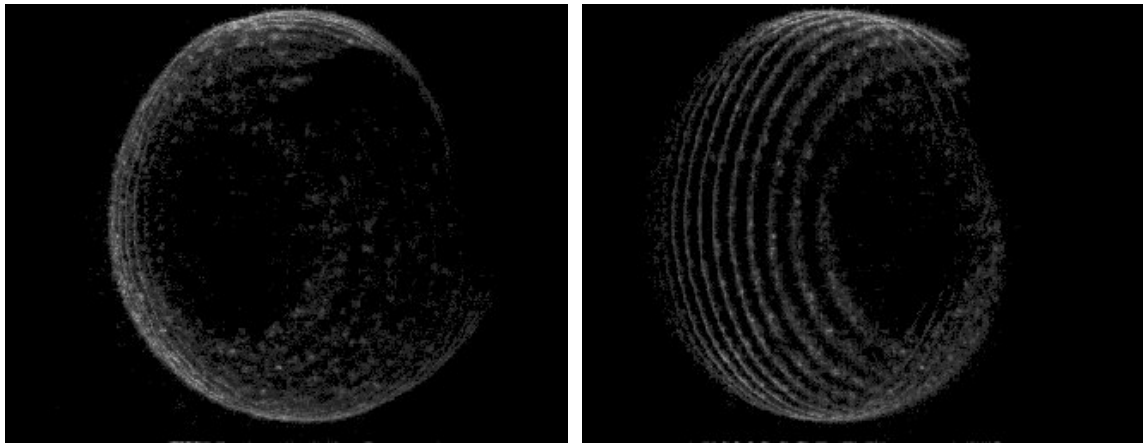


FIGURE 5 – Intensité du signal capté en fonction du déplacement de l'échantillon par rapport au plan focal. Les creux dans la courbe de données mesurées sont dus au fait que la cible n'était pas tout à fait sur le plan  $xy$  et de l'interférence est apparue. La position sur l'axe des  $x = 0$  représente le point focal du laser.

La partie négative de la figure 5 montre des résultats attendus. En effet, la cible USAF 1951 n'étant pas au plan focal, très peu de lumière est captée et le signal augmente graduellement en forme de gaussienne jusqu'à ce que le plan focal soit atteint et que l'intensité lumineuse soit maximisée. Toutefois, la seconde partie du graphique montre un profil très différent. Premièrement, plusieurs creux sont présents dans la deuxième partie et ceux-ci apparaissent à des intervalles réguliers d'environ  $2\mu\text{m}$ . Leur origine sera expliquée dans la section Discussion. Toutefois, même si ceux creux sont ignorés et que l'enveloppe de la courbe est étudiée, la deuxième moitié du graphique est asymétrique par rapport à la première, semblant beaucoup plus étalée. Néanmoins, une résolution en  $z$  a été calculée à l'aide de la FWHM de la courbe du graphique, ce qui donne une résolution de  $6\mu\text{m}$ .

### 4.3 Fluorescence



(a) Vue de face de l'ovocyte reconstruit en 3D avec le microscope confocal. Le trou circulaire provient du manque de signal provenant du dessus de la cellule. (b) Vue de côté de l'ovocyte ou les différentes couches utilisées pour la reconstruction 3D sont visibles.

FIGURE 6 – Différentes vues de la reconstruction 3D d'un ovocyte à l'aide d'un microscope confocal.

Après avoir caractérisé le microscope, celui-ci a pu être utilisé afin d'observer un ovocyte en fluorescence. Les figures 6(a) et 6(b) montrent la reconstruction 3D effectuée. La qualité des images obtenues n'est toutefois pas exceptionnelle. En effet, la quantité de signal est très limitée et la distance entre les couches du modèle 3D est relativement grande, donnant l'apparence d'un empilement espacé d'anneaux plutôt que d'une cellule. Ces problèmes ainsi que des solutions potentielles seront abordés dans la discussion.



## 5 DISCUSSION

### 5.1 Résolution en xy

#### 5.1.1 Variation de la largeur de la ESF

Selon la figure 4, la largeur mesurée de la ESF s'améliore lorsque le grossissement mécanique augmente ; c'est-à-dire lorsque l'angle d'incrémentation des galvanomètres diminue, ce qui diminue la taille d'un pixel numérique. Vers un zoom 6x, la largeur de la ESF semble se stabiliser. Or, lorsque le faisceau balaye le bord et produit une ESF, la largeur de la ESF ne devrait pas changer si la taille du laser n'est pas modifiée. Cela indique donc une limitation numérique.

Selon [9], le *théorème de Nyquist* indique que la fréquence d'échantillonnage doit être plus grande qu'environ 2x à 3x la largeur de bande du signal, afin qu'il soit possible de reconstruire l'image originale à partir des données captées. Une fréquence d'acquisition sous ce seuil produirait des données sous-échantillonnées, alors qu'une valeur supérieure, sur-échantillonnée : il est préférable d'être en sur-échantillonnage.

On peut rapporter ce théorème en terme de taille de pixel. L'espace entre deux points de l'échantillon s'apparente à une fréquence spatiale. On peut dire que la taille de pixel nécessaire pour ne pas limiter la résolution du système est de

$$\text{Taille Minimale du Pixel} \leq \frac{\text{Résolution Optique}}{2.5} = \frac{422 \text{ nm}}{2.5} = 168 \text{ nm}$$

Afin de savoir si le système est vraiment limité par la résolution numérique, la taille des pixels pour chaque zoom a été calculée. Le microscope utilisé ne permettait pas de changer le nombre de pixel dans l'image. Ainsi, la taille du pixel pouvait changer, mais cela venait au coût d'une diminution du champ de vue.

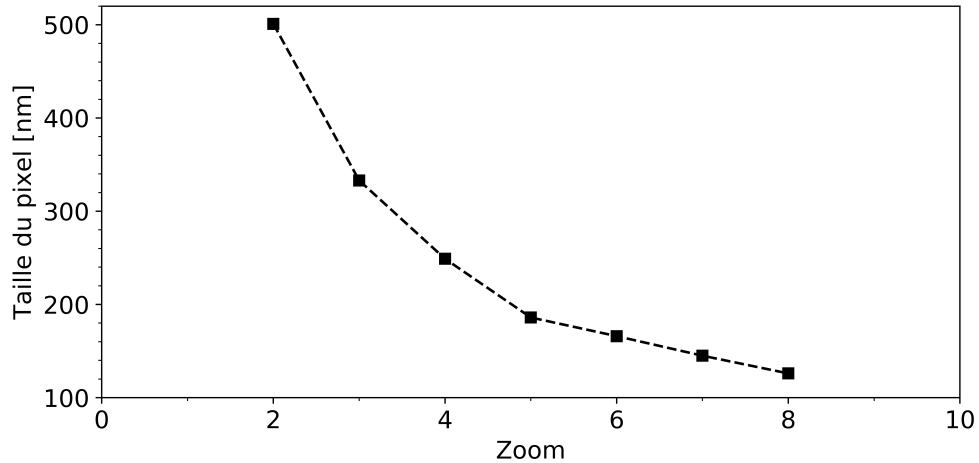


FIGURE 7 – Taille des pixels en fonction du grossissement sur le microscope confocal utilisé pour des images à taille fixe de 256x256 pixels.

La taille de pixel obtenue avec un grossissement de 6x est de 164nm. Selon la figure 4, la largeur de la ESF observée se stabilise également vers un grossissement de 6x. On peut donc déduire que le théorème de Nyquist est également applicable pour des fréquences spatiales et permet de calculer la résolution numérique nécessaire dans le microscope confocal afin de s’assurer de ne pas limiter la résolution. On remarque que sur la moitié des grossissements utilisés, la résolution numérique n’était pas optimale. Cela pose un désavantage, puisque le champ de vision se voit alors limité à  $42\mu\text{m} \times 42\mu\text{m}$  pour avoir une résolution maximale. Afin de remédier à ce problème, les galvanomètres pourraient être changés. Une fréquence de balayage plus élevée et une incrémentation angulaire plus fine des galvanomètres pourraient permettre de garder un champ de vue acceptable tout en gardant une résolution optimale.

### 5.1.2 Comparaison avec la ESF théorique

La largeur de la ESF expérimentale avec un zoom de 8x est de  $(840 \pm 90)$  nm, comparativement à la valeur théorique de 432 nm. L’écart significatif de 94.4% entre les deux valeurs peut être le résultat de multiples causes. Les aberrations optiques d’un système peuvent avoir un impact important sur les propriétés du faisceau.

Il y a deux types d’aberrations : monochromatiques et chromatiques. Cependant, l’utilisation d’un laser monochromatique prévient les aberrations chromatiques importantes. Les aberrations monochromatiques comprennent toutes les aberrations géométriques telles que l’aberration sphérique, de coma, l’astigmatisme, la courbure de champ, la distorsion, etc.

Les lentilles du microscope confocal utilisé n’étaient que des lentilles simples, corrigées pour les approximations paraxiales, c’est-à-dire pour les rayons près du centre de la lentille. Cependant, comme le microscope confocal à balayage nécessite un balayage du laser, le faisceau se propage également par les rebords des lentilles, qui n’étaient pas corrigées pour des rayons voyageant hors-axe. Des rayons hors-axes sur des lentilles non-corrigées entraînent souvent des aberrations sphériques. Habituellement, des lentilles spéciales sont utilisées dans un microscope à balayage. Elles se nomment *lentille de scan* et *lentille du tube*. La propriété importante de ces lentilles est que la correction n’est pas limitée à l’axe optique, ce qui minimise les aberrations géométriques telle que l’aberration sphérique.

Si l’on estime que l’aberration la plus importante est l’aberration sphérique, il est possible d’estimer la grosseur théorique du faisceau avec cette équation[11] :

$$\text{Taille Tache Focale} = \frac{4\lambda M^2 f}{\pi D} + \frac{kD^3}{f^2}$$

Comme la diffraction n’est significative qu’à l’objectif, mais que l’aberration sphérique affecte possiblement le faisceau dans les lentilles de tube et de scan, l’utilisation de cette formule afin d’estimer la taille du faisceau serait trop complexe pour l’analyse souhaitée dans ce rapport. Cependant, de façon qualitative, on peut observer sur la figure 8 que l’influence de l’aberration sphérique sur un faisceau peut augmenter de façon considérable la taille de la tâche focale, donc la taille de notre PSF. Donc, la résolution n’est pas limitée par la limite de diffraction à cause de la présence d’aberrations.

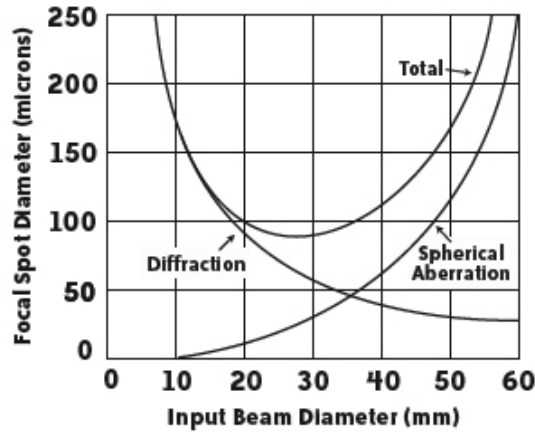


FIGURE 8 – Influence de l’aberration sphérique et de la diffraction sur la taille de la tache focale. Figure tirée de [11]

Comme discuté dans la section *Résultats*, les incertitudes obtenues sont assez importantes. En effet, le petit nombre de pixels qui constitue la transition dans l’ESF rend une mesure précise de sa largeur impossible. Pour réduire ces incertitude, il faut appliquer quelques changements à la méthode. En effet, afin de mesurer la résolution en x et en y avec une seule image, une image comprenant les deux ensembles de lignes d’un sous-groupe de la cible USAF 1951 a été capturée. Cela a également permis de calculer le champ de vue du microscope. Toutefois, cela a diminué le nombre de pixels disponibles pour voir la transition aux bords des motifs. Il aurait donc été préférable de prendre un deuxième ensemble grossis sur un seul bord. La transition de bord aurait pu comprendre beaucoup plus de pixels et l’incertitude aurait été diminuée.

## 5.2 Résolution en z

Comme expliqué dans la section Résultats, la figure 5 montre une courbe d’intensité non-symétrique qui possède des creux avant le point focal. Tout d’abord, il a été conclu que les baisses d’intensité proviennent de l’interférence destructive. En effet, en observant les images utilisées pour le calcul d’intensité moyenne (un exemple est présenté à l’annexe C), il est possible de constater que le signal ne se dissipe pas uniformément. Celui-ci semble former des régions sombres et les séries d’images semblent suggérer que ces régions se déplacent vers le coin inférieur droit de l’échantillon. Ceci est le genre de comportement qu’il serait possible d’observer en présence d’asymétrie et d’interférence. La source de cette interférence est probablement le fait que l’échantillon n’est pas tout à fait horizontal et qu’une fraction de la lumière est réfléchi sur la lentille de l’objectif. La position non-horizontale de l’échantillon modifie légèrement le parcours optique de la lumière et provoque de l’interférence destructive à certains endroits. Une façon de diminuer l’impact de cette interférence est de changer la zone d’intérêt dans l’image utilisée pour moyenner l’intensité afin qu’elle inclue seulement du signal sans zones sombres, ou de s’assurer que l’échantillon soit parfaitement horizontal.

Toutefois, même si l’échantillon est parfaitement horizontal et qu’aucune interférence n’est observée, la courbe n’est pas symétrique, tel que l’enveloppe de la courbe le montre.



FIGURE 9 – Propagation d’un faisceau gaussien dans sa région focale en présence de diffraction et d’aberration sphérique positive. Le point focal semble tiré plus près de l’objectif (à gauche) à cause des rayons hors-axe dont la focalisation est trop prononcée. Figure tirée de [12].

L’aberration sphérique positive, tel que montrée à la figure 9, montre un décalage du point focal vers l’objectif. Visuellement, on comprend que ce phénomène a une influence sur la distribution axiale de l’intensité du faisceau au point focal. Toutefois, une analyse quantitative de ce phénomène ne sera pas effectuée. L’hypothèse finale à ce sujet est que les aberrations, dont majoritairement la sphérique, contribuent à l’asymétrie de la distribution d’intensité sur l’axe optique.

### 5.3 Fluorescence

La figure 6 montre un ovocyte marqué par un fluorophore qui a été reconstruit avec le microscope confocal. La forme sphérique de la cellule est bien visible et il est même possible de déceler un pli dans la membrane de la cellule. Toutefois, l’utilisation du microscope confocal en fluorescence fait apparaître des situations qui ne sont pas présentes en réflectance. Premièrement, étant donné que la fluorescence est un phénomène qui émet de la lumière dans quasiment toutes les directions, il n’y aura généralement pas de interférence et de détection d’impuretés dans l’image. La quantité de lumière émise en fluorescence est cependant beaucoup moins importante. Il devient donc très important de faire de longues acquisitions afin de maximiser la lumière reçue et de minimiser le bruit. Le photoblanchiment du fluorophore peut également entrer en jeu. Ce phénomène provoque une perte de l’intensité de fluorescence après une exposition excessive de l’échantillon à la lumière. Il faut donc s’assurer de ne pas trop exposer l’échantillon à de la lumière trop intense. Un marqueur qui ne photoblanchit pas comme le point quantique est également une solution au problème du photoblanchiment.

La méthode utilisée aurait d’ailleurs pu être améliorée. Premièrement, comme discuté plus haut, la limite de résolution optique est uniquement atteinte vers un zoom  $\times 6$ . Or, pour avoir un champ de vision qui englobe la cellule en entier, un zoom de  $\times 1.5$  a dû être utilisé. Pour avoir une résolution optimale, différentes sections des couches de la cellule auraient pu être observées afin de reconstruire un modèle à résolution maximale. De plus, comme il est remarquable dans la figure 6b, la prise de couches à de plus petits intervalles aurait permis un modèle plus complet de l’ovocyte.

## 6 CONCLUSION

Cette expérience a permis de mesurer la résolution optique et numérique d'un microscope confocal à balayage laser. La mesure de la variation de la largeur de l'ESF a permis de remarquer que le système était limité par la résolution numérique, plutôt que par la résolution optique. Également, pour un zoom de 8x, où la résolution numérique est moins contraignante, la largeur de la ESF mesurée est de  $(840 \pm 90)$  nm, soit en moyenne 94.4% plus large que la prédiction théorique de 432 nm de large. L'hypothèse principale entourant cet écart important estime que le passage de la lumière dans la périphérie des lentilles cause des aberrations sphériques qui seraient la cause de l'élargissement de la tache focale, un des symptôme classique de ce type d'aberration. L'étalement asymétrique de la puissance sur l'axe optique du faisceau focalisé semble être également dû aux aberrations géométriques. Finalement, afin d'améliorer la résolution du système, le théorème de Nyquist peut être utilisé afin de déterminer la taille minimale des pixels afin de s'assurer que la résolution numérique ne soit pas le limitation du système. Ensuite, la comparaison de la ESF théorique et expérimentale permet de savoir si la résolution optique est près de la limite de diffraction. Le système étudié n'était pas limité en diffraction et les étapes décrites dans ce rapport permettent l'amélioration de la résolution totale du système.

## A Calcul de ESF théorique

Si on approxime la PSF à une gaussienne dont 99,99% de la puissance est contenue dans le rayon du premier disque d’Airy (5 écart-type).

$$\text{Premier zéro Airy} = \frac{0,6\lambda}{\text{NA}} = \frac{0,6 \cdot 633 \times 10^{-9}}{.9} = 422 \text{ nm}$$

Le rayon de la gaussienne est donc de 422 nm, on peut donc dire que  $5\sigma = 2 \cdot 422 \text{ nm}$ . La LSF est en fait l’intégration de la PSF 3D, qui revient à un coupe vue de côté de la PSF. Une gaussienne 2D, centrée à  $x = 0$  avec  $5\sigma = 844$  a pour équation :

$$\text{LSF} = \frac{e^{-\frac{1}{2}(\frac{5x}{844})^2}}{(\frac{844}{5})\sqrt{2\pi}}$$

C’est cette fonction représente la LSF qu’on intègre selon l’équation 2 afin d’obtenir la ESF.

L’intégration de la gaussienne donne une fonction erreur :

$$\text{ESF} = \frac{1}{2} \left[ 1 + \text{erf} \left( \frac{5x}{844\sqrt{2}} \right) \right]$$

Cette fonction évaluée à 0.1 et à 0.9 nous permet de trouver la largeur de 432nm.

La ESF est plus large que la PSF.

## B Calcul d'incertitude

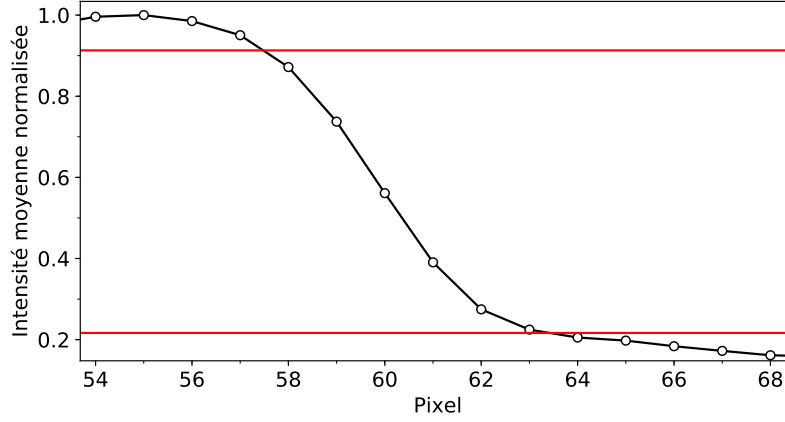


FIGURE 10 – ESF entre l’élément 7-6 de la cible USAF dans la direction  $x$  avec un grossissement  $\times 8$ . Les lignes horizontales rouge représente les seuils de 10% et de 90%.

La figure 10 montre un profil d’étalement de bord typique lors de l’analyse des données. Il est possible de constater que les valeurs de 10% et 90% n’arrivent pas à des valeurs de pixels précises. De plus, les seuils de pourcentages ont été déterminé avec le minimum et maximum de l’image alors ces valeurs ne sont peut-être pas tout à fait exacte également. Néanmoins, il est acceptable d’affirmer que la distance pour passer de 90% et 10% se situe entre 6 et 7 pixels. La distance choisie sera donc de  $6.5 \pm 0.5$  pixels.

La mesure d’une paire de ligne, c’est-à-dire une bosse et un creux complet, a également été effectué et son incertitude fixée à  $\pm 1$  pixel. Dans le cas du zoom  $\times 8$  dans la direction  $x$ , la paire de ligne a été mesurée à  $34 \pm 1$  pixels. Sachant que les lignes mesurées appartiennent au groupe et sous-groupe 7-6, il est possible de déduire que cette paire de ligne mesure en fait  $4.38 \mu\text{m}$  [10]. La distance réelle par pixel peut donc être calculée comme suis en utilisant la méthode des minimums/maximum pour les incertitudes :

$$\frac{4.38}{(34 \pm 1)} = (0.129 \pm 0.004) \mu\text{m} / \text{pixel}$$

On peut finalement obtenir la résolution en  $x$  comme suis en utilisant l’addition des incertitudes relatives :

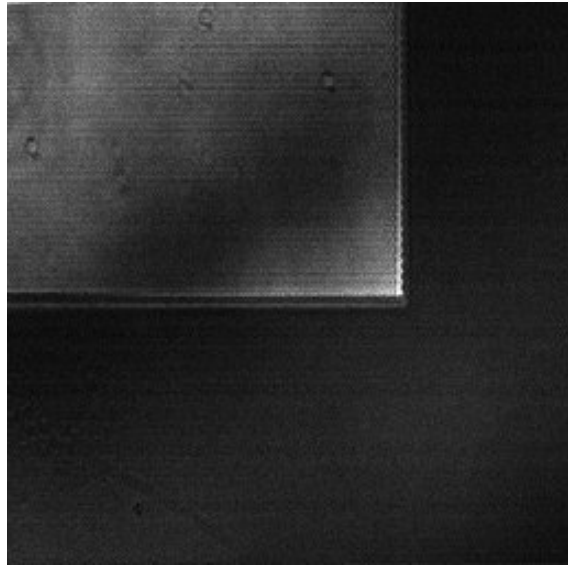
$$\text{Res}_x = (0.129 \pm 0.004) \times (6.5 \pm 0.5) = (0.84 \pm 0.09) \mu\text{m}$$

Il est également possible de calculer l’incertitude du champ de vision en multipliant la valeur de  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  obtenue par 256 ce qui donne  $(33 \pm 1) \mu\text{m} \times (33 \pm 1) \mu\text{m}$ .

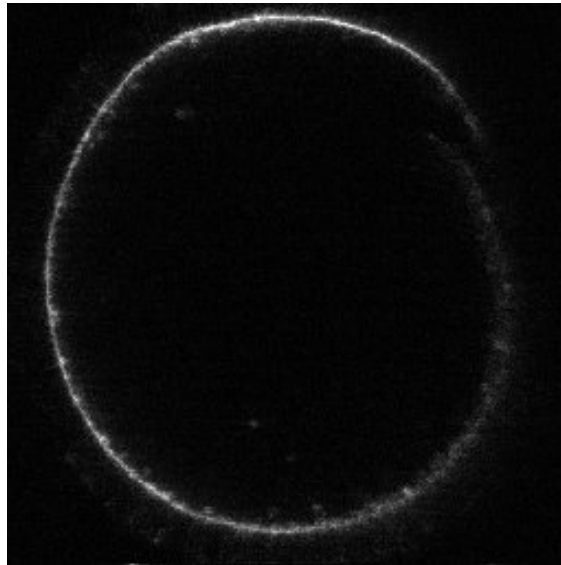
## C Images de l'expérience



(a) Exemple d'image utilisée pour le calcul de résolution en x et en y.



(b) Exemple d'image utilisée pour le calcul de la résolution en z. La section plus foncée représente une zone d'interférence destructive.



(c) Exemple de couche utilisée pour la reconstruction 3D de l'ovocyte.

FIGURE 11 – Exemples d'images utilisées pour les différentes étapes du laboratoire.



## Références

- [1] Kenneth R. Spring, Thomas J. Fellers, Michael W. Davidson  
*Resolution and Contrast in Confocal Microscopy*  
<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/resolutionintro/>
- [2] Wikipédia, *Fonction d'étalement du point*, [https://fr.wikipedia.org/wiki/Fonction\\_d%27%C3%A9talement\\_du\\_point](https://fr.wikipedia.org/wiki/Fonction_d%27%C3%A9talement_du_point)
- [3] Authours Unknown, Microscopy Courses, *Resolution in a confocal system*  
<http://microscopy.berkeley.edu/courses/TLM/clsm/resolution.html>
- [4] Richard W Cole, Tushare Jinadasa Claire M Brown, *Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control*  
Published online 10 November 2011 ; doi :10.1038/nprot.2011.407
- [5] FUMIKO YANO AND SETSUO NOMURA,  
*Deconvolution of Scanning Electron Microscopy Images*  
SCANNING Vol. 15, 19-24 (1993) , Received November 3, 1992
- [6] Williams, Charles S. (2002).  
*Introduction to the Optical Transfer Function.*,  
SPIE - The International Society for Optical Engineering. ISBN 0-8194-4336-0.
- [7] Geoffrey Rogers, The Point Spread Function and Optical Dot Gain, [https://www.researchgate.net/figure/A-typical-a-PSF-b-LSF-and-c-ESF\\_fig2\\_316213923](https://www.researchgate.net/figure/A-typical-a-PSF-b-LSF-and-c-ESF_fig2_316213923)
- [8] DR. ROBERT A. SCHOWENGERDT,  
ECE 425 CLASS NOTES – 2000, DIFFRACTION OPTICS,  
<http://www2.engr.arizona.edu/~dial/ece425/notes9.pdf>
- [9] Leica Microsystems inc., Confocal Application Notes, <http://www.bio.brandeis.edu/CIL/Applications%20notes/Leica%20tutorials/Zoom%20and%20Resolution.pdf>
- [10] Wikipédia, *1951 USAF resolution test chart*, [https://en.wikipedia.org/wiki/1951\\_USAF\\_resolution\\_test\\_chart](https://en.wikipedia.org/wiki/1951_USAF_resolution_test_chart)
- [11] 2-6 Infrared inc. , *Determining Spot Size*, [http://www.iiviinfrared.com/resources/determine\\_spot\\_size.html](http://www.iiviinfrared.com/resources/determine_spot_size.html)
- [12] Wikipédia, *Spherical aberration*, [https://en.wikipedia.org/wiki/Spherical\\_aberration](https://en.wikipedia.org/wiki/Spherical_aberration)