



UNIVERSITÉ
LAVAL

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

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

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

Réalisé par

SÉBASTIEN JERCYNSKI

sebastien.jercynski.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 résolution. Sur le microscope confocal utilisé dans cette étude, le critère de Rayleigh théorique, qui est la définition standard, est de $(XX \pm XX)$ nm. La ESF expérimentale est de $(XX \pm XX)$ nm. Une ESF théorique a été déterminée à partir de la fonction d'étalement du point (PSF) théorique. L'écart de $-XX\%$ avec la valeur théorique indique que le système pourrait être fortement amélioré. Finalement, il a été trouvé qu'une variation de l'ESF avec la modification du zoom mécanique est un indicateur d'une limitation numérique, plutôt qu'optique, de la résolution du système. Le microscope a ensuite été utilisé afin de capter des images en fluorescence. La même limitation a été observée.

Table des matières

1 INTRODUCTION	1
2 EXIGENCES THÉORIQUES	1
3 MÉTHODOLOGIE	3
4 RÉSULTATS	5
4.1 Résolution en xy	5
4.2 Résolution en z	6
4.3 Fluorescence	7
5 DISCUSSION	7
6 CONCLUSION	7
Annexe A Calcul de ESF théorique	8
Annexe B Calcul d’incertitude	8
Annexe C Images de l’expérience	8

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. L'influence du zoom mécanique sur la résolution, ainsi que les limites physiques du système sont discutés.

2 EXIGENCES THÉORIQUES

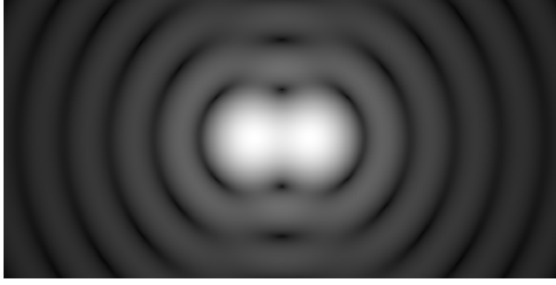
La microscopie confocale est très répandue et son fonctionnement très simple. Tel qu'illustré à la figure 3, un laser d'excitation est balayé sur un échantillon fluorescent. La lumière d'émission est récoltée par le même chemin que l'excitation, puis passe par des filtres qui isole la lumière fluorescente et l'envoie sur un capteur PMT. Un pinhole 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 diffraction de la lumière est le principe fondamental derrière le calcul de la résolution d'un système optique. Dans des systèmes sans aberrations, seule la diffraction intervient [2]. La lumière cohérente utilisée dans de tels systèmes génère des patrons de diffractions lorsqu'elle interfère avec elle-même. Comme toute lumière est *finie*, la limitation géométrique d'un système est ce qui cause cette diffraction. Les lentilles étant fabriquées de manière circulaires et symétriques, les patrons de diffraction dans les systèmes contenant de l'optique circulaire se présentent sous la forme d'une «Tache d'Airy».

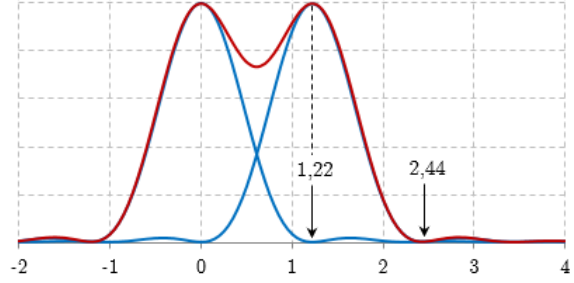
La *Fonction d'étalement du point (PSF)* d'un système optique peut être décrite comme la réponse spatiale à une impulsion spatiale lumineuse. Dans un microscope confocal, le faisceau d'excitation, ayant la forme d'un disque d'Airy, est focalisé sur le spécimen qui réémet de la lumière sous la même forme. 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 différentier 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 proche de la limite de la diffraction et l'intensité des pics secondaires est de plusieurs ordre inférieure à celle du pic central. La largeur à mi-hauteur ou *FWHM* (*Full Width Half Max*) est très souvent utilisé 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.

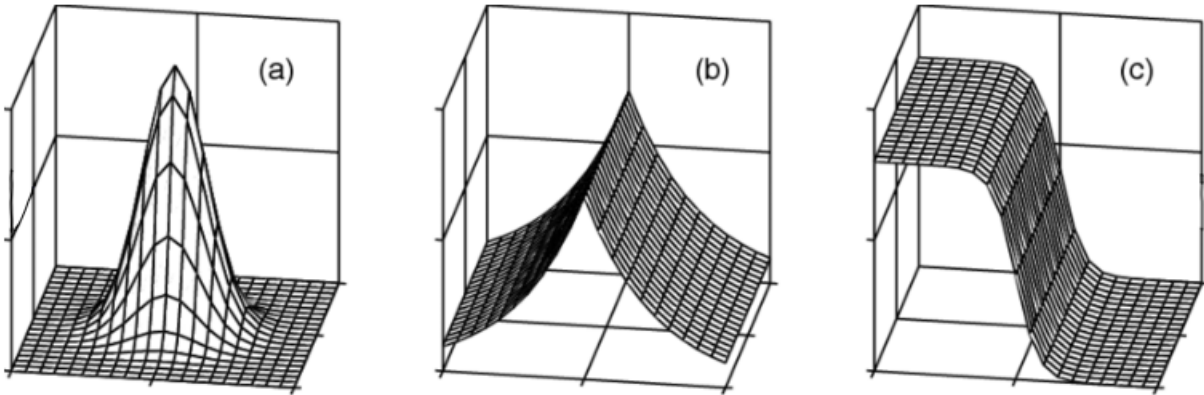


FIGURE 2 – en (a) PSF, (b) LSF et (c) ESF [7]

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.

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

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

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],

A variety of equations are presented in the literature that pertain to different models for calculating axial resolution for various microscope configurations. The ones most applicable to fluorescence emission are similar in form to the expressions evaluating depth of field [...]

La formule de la résolution axiale théorique utilisée sera celle décrite par [1], soit

$$\Delta r_{axiale} = \frac{1,4\lambda n}{NA^2}$$

La forme de la distribution d'intensité sur l'axe optique, pour une excitation gaussienne, est telle que le décrit la littérature : FIGURE

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.

Le lien qui unit la taille de la section optique au diamètre du sténopé est expliqué par XXXXXXXXXX. Le principe est illustré à la figure ??.

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 va grossir la taille du faisceau afin qu'il recouvre l'entièreté de la lentille de l'objectif. le laser pourra ensuite balayer l'échantillon. La lumière réémise, soit par fluorescence ou par réflexion, est renvoyée dans le système jusqu'à un sténopé qui va bloquer la lumière hors du focus du laser. La lumière restante se dirige jusqu'à un photo-multiplicateur (PMT) connecté à une carte d'acquisition qui va permettre 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 sera observée en réflectance et à l'aide de la fraction de la lumière qui va atteindre le PMT, il sera possible d'étudier la transition entre les éléments de la cible pour déduire la résolution.

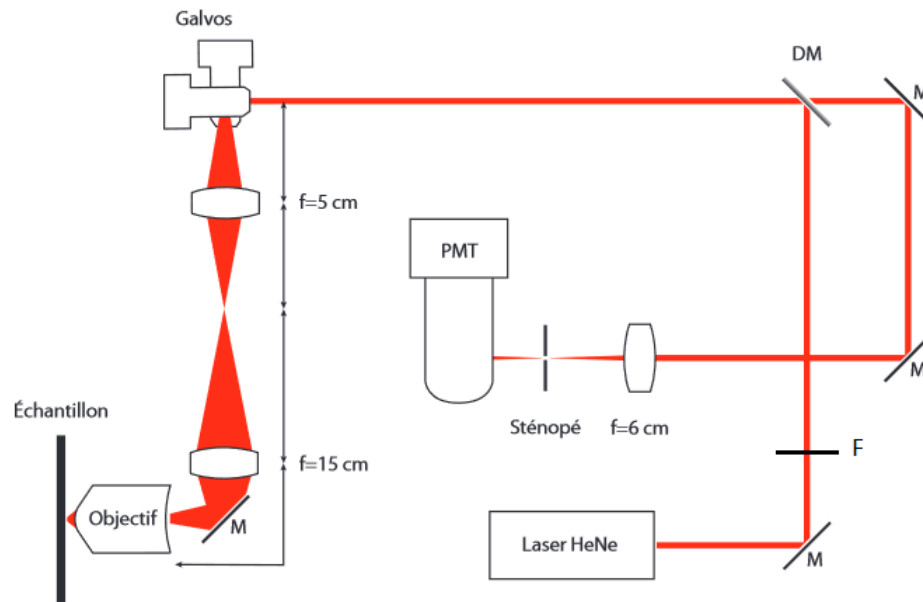


FIGURE 3 – Montage de base vu de côté utilisé pour l'expérience [?]

4 RÉSULTATS

Tout d'abord, il est important de déterminer quelle définition de la résolution sera utilisée. Par exemple, il serait possible d'utiliser le critère de Ryleigh 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 [μm]	Résolution en y [μm]
$\times 2$	128.3×128.3	1.3	1.2
$\times 3$	85.2×85.2	1.0	1.0
$\times 4$	63.8×63.8	0.92	0.90
$\times 5$	47.7×47.7	0.86	0.80
$\times 6$	42.5×42.5	0.78	0.75
$\times 7$	37.3×37.3	0.77	0.74
$\times 8$	32.3×32.3	0.76	0.73

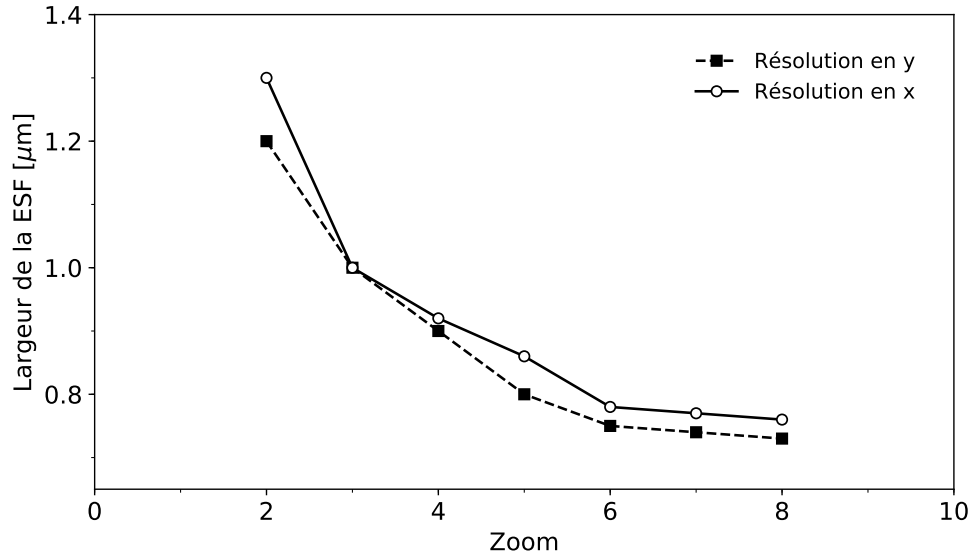


FIGURE 4 – Résolution en x et en y du microscope confocal en fonction du zoom utilisé. Cette résolution est définie comme étant la distance requise pour que l'ESF passe de 10% à 90%.

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 1.3 en zoom $\times 2$ jusqu'à 0.76 avec un zoom $\times 8$, ce qui représente une amélioration de quasiment 60%. 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 $\times 6$.

En deuxième lieu, une tendance qui est visible à tous les grossissements est que la résolution en y est légèrement supérieure à celle en x d'un facteur d'environ 3%. Cette variation est plus variable pour de plus petites valeurs de zoom mais elle se stabilise lorsque le zoom atteint $\times 6$.

4.2 Résolution en z

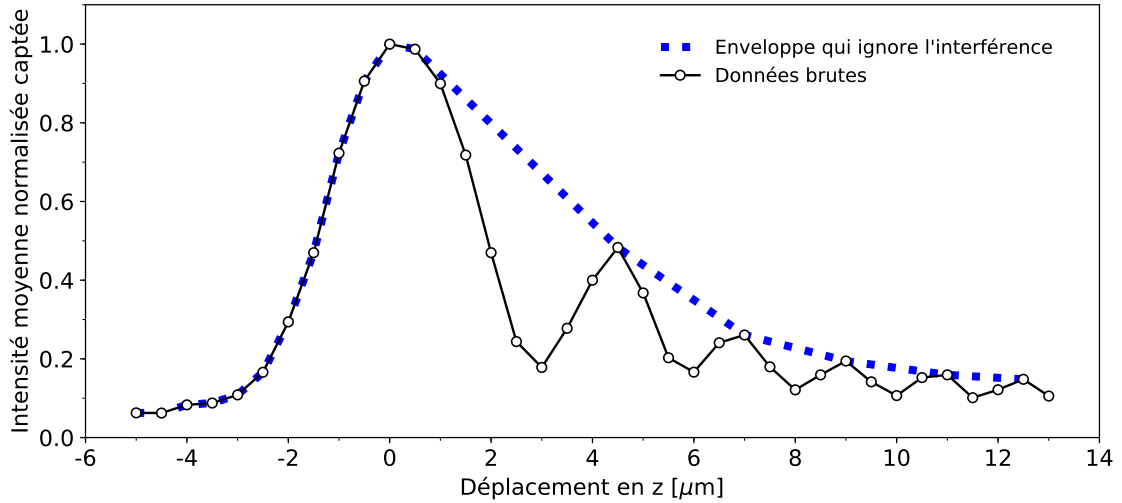
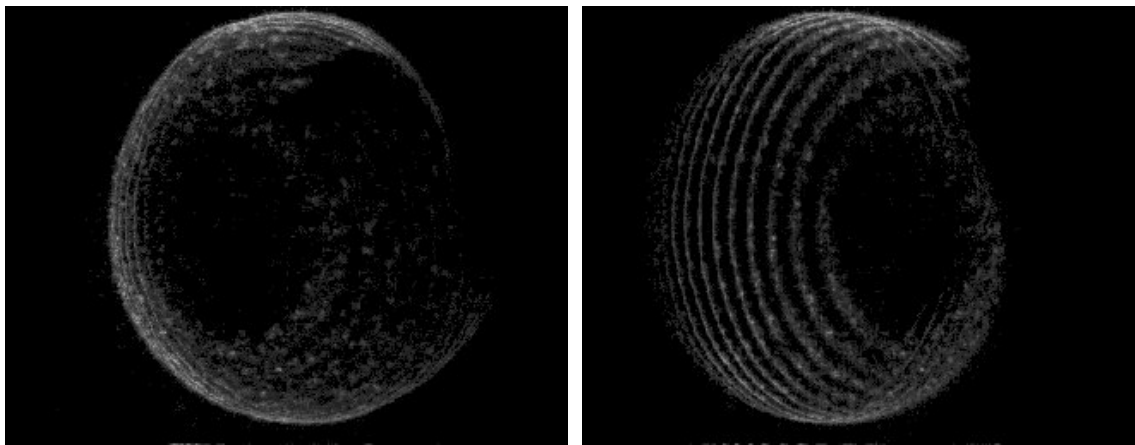


FIGURE 5 – Intensité du signal capté en fonction du déplacement de l'échantillon en z . Les creux dans la courbe de données mesurées sont dus au fait que la cible n'était pas tout à fait sur le plan xy et de l'interférence est apparue. La position sur l'axe des $x = 0$ représente le point focal du laser.

La partie négative de la figure 5 montre des résultats attendus. En effet, la cible USAF 1951 n'étant pas au focus, très peu de lumière est captée et le signal augmente graduellement en forme de gaussienne jusqu'à ce que le focus 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 ces creux sont ignorés et que l'enveloppe de la courbe est étudiée, la deuxième moitié du graphique est hautement non-symétrique à la première, semblant beaucoup plus étalée. Néanmoins, une résolution en z a été calculée à l'aide de la FWHM de la "bosse" 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 où 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 en 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 couche 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 abordées dans la discussion.

5 DISCUSSION

Afin de pousser l'analyse de la comparaison entre la limite théorique et les résultats pratique, il pourrait être intéressant de trouver une manière rapide d'approximer les aberration du système afin de connaître l'impact de ceux-ci sur la résolution du système et afin de s'assurer que ceux-ci sont la cause principale de la différence entre la résolution pratique et la résolution théorique du microscope confocal. Ce la apporterait peut-être une manière rapide et efficace de connaître les moyens efficaces pour améliorer le plus possible la résolution.

To be continued...

6 CONCLUSION

- A Calcul de ESF théorique
- B Calcul d'incertitude
- C Images de l'expérience

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
- [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
- [8] DR. ROBERT A. SCHOWENGERDT,
ECE 425 CLASS NOTES – 2000, DIFFRACTION OPTICS,
<http://www2.engr.arizona.edu/~dial/ece425/notes9.pdf>