



**POLYTECHNIQUE  
MONTRÉAL**

UNIVERSITÉ  
D'INGÉNIERIE

## **PHS2223 – INTRODUCTION À L'OPTIQUE MODERNE**

**Équipe : 04**

---

### **Expérience 1**

Microscopie confocale

---

**Présenté à**  
Guillaume Sheehy  
Esmat Zamani

**Par :**  
Émile **Guertin-Picard** (2208363)  
Laura-Li **Gilbert** (2204234)  
Tom **Dessauvages** (2133573)

4 octobre 2024  
Département de Génie Physique  
Polytechnique Montréal

## Table des matières

<b>1</b>	<b>Résultats</b>	<b>1</b>
1.1	Estimation de la résolution . . . . .	1
1.2	Analyse de données de LSCM en fluorescence . . . . .	2
<b>2</b>	<b>Discussion</b>	<b>3</b>
2.1	Retour sur l'hypothèse . . . . .	3
2.2	Analyse des causes d'erreurs . . . . .	3
2.3	Question 1 . . . . .	4
2.4	Question 2 . . . . .	4
2.5	Question 3 . . . . .	5
2.6	Question 4 . . . . .	6
<b>3</b>	<b>Conclusion</b>	<b>6</b>

## 1 Résultats

### 1.1 Estimation de la résolution

Les figures 1 et 2 présentent, sous la forme de graphique, les données brutes recueillies lors du laboratoire.

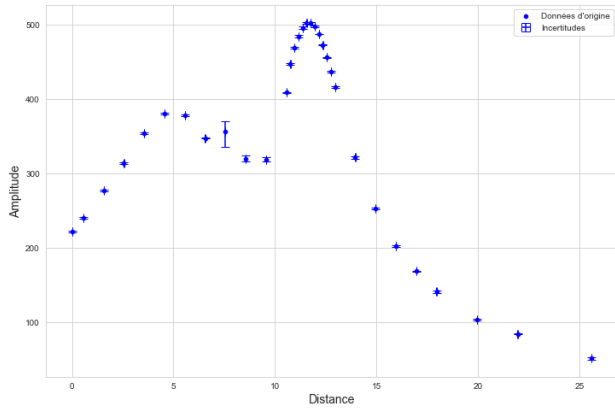


Figure 1 : Données brutes obtenues pour le système avec pinhole

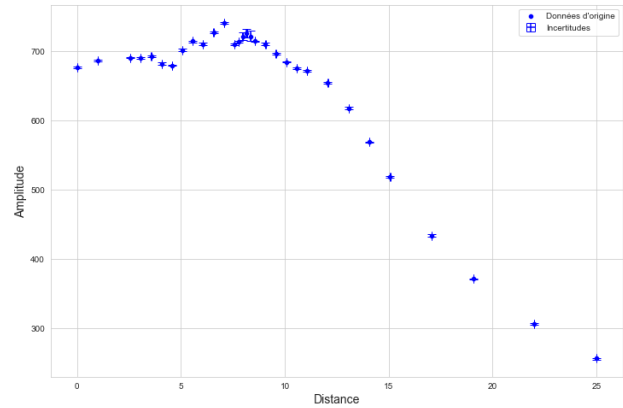


Figure 2 : Données brutes obtenues pour le système sans pinhole

En observant l'allure de ces données, la fonction utilisée pour la courbe de tendance est une somme de fonctions gaussiennes centrées selon les positions des différents maximums d'amplitude. L'utilisation de la librairie *lm.fit* de python permet de déterminer les valeurs optimales de ces courbes de tendances et de les représenter. Les figures 3 et 4 présentent, sous la forme de graphiques, les fonctions de tendance obtenues pour les deux jeux de données brutes différentes.

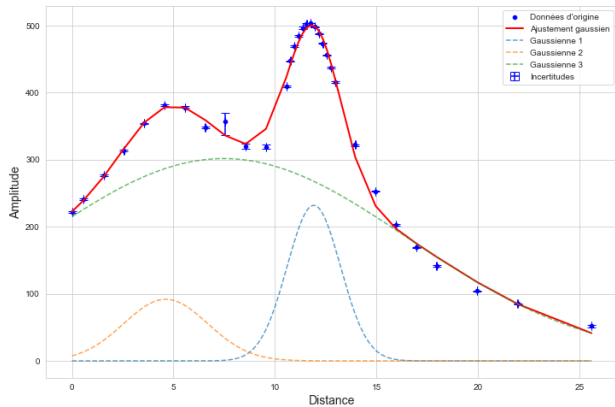


Figure 3 : Partie réelle et imaginaire du signal brut pour 10ms

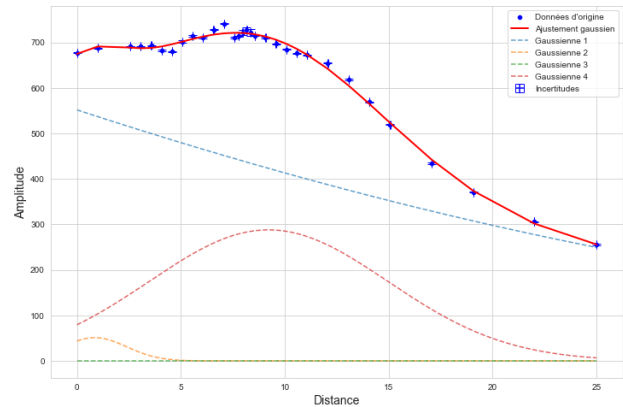


Figure 4 : Phase du signal brut pour 10ms

Ces représentations du signal, sous la forme de somme de courbes gaussiennes, permettent de mettre en évidence deux maximums d'amplitude pour chacune des séries de données. L'amplitude représentative de la résolution du système est celle de valeur maximale. Cette résolution, représentée comme étant la largeur de la courbe à mi-hauteur de l'amplitude maximale, peut, elle aussi, être estimée à l'aide de *lm.fit*. Le tableau 1 représente les résolutions obtenues ainsi que les erreurs qui leur sont associées en fonction de la série de données.

	Largeur à mi-hauteur	Erreur
Avec pinhole	1.317578	0.092557
Sans pinhole	5.742349	0.943043

Table 1 – Largeur à mi-hauteur et erreurs en fonction du jeu de données

Les approximations sur la résolution du système ont été faites en se basant sur l'estimation de la largeur à mi-hauteur des courbes gaussiennes représentatives du maximum d'amplitude, en bleu pour le jeu de données avec pinhole et en rouge pour celui sans. Les valeurs des différentes erreurs liées à ces approximations ont été obtenues à l'aide de *lm.fit*.

## 1.2 Analyse de données de LSCM en fluorescence

Une image 3D acquise en microscopie confocale par un microscope *Leica TCS SP5 MP* est analysée. Les données acquises au préalable sont des cellules de prostate *RWPE-1*, avec plusieurs cellules de cancer de la prostate *PC3* présentes. La figure 5 présente côte à côte une image de ces cellules pour comparer l'image d'un système non-confocal à l'image d'un système confocal.

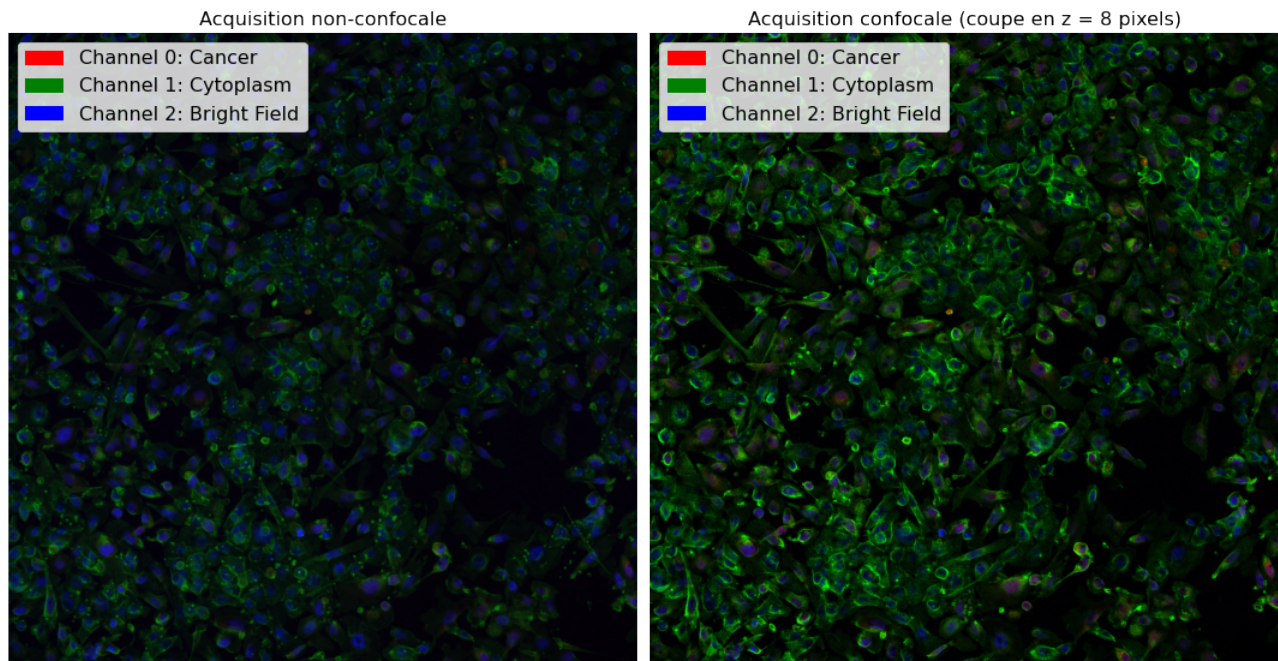


Figure 5 : Comparaison de l'imagerie obtenue d'un système non-confocal (à gauche) à celle d'un système confocal (à droite).

Il est possible de voir une meilleure résolution sur l'acquisition confocale, ce qui résulte en des contours plus définis. Ensuite, la figure 6 présente trois coupes de l'image 3D autour du même point dans l'espace

afin de représenter le volume de quelques cellules.

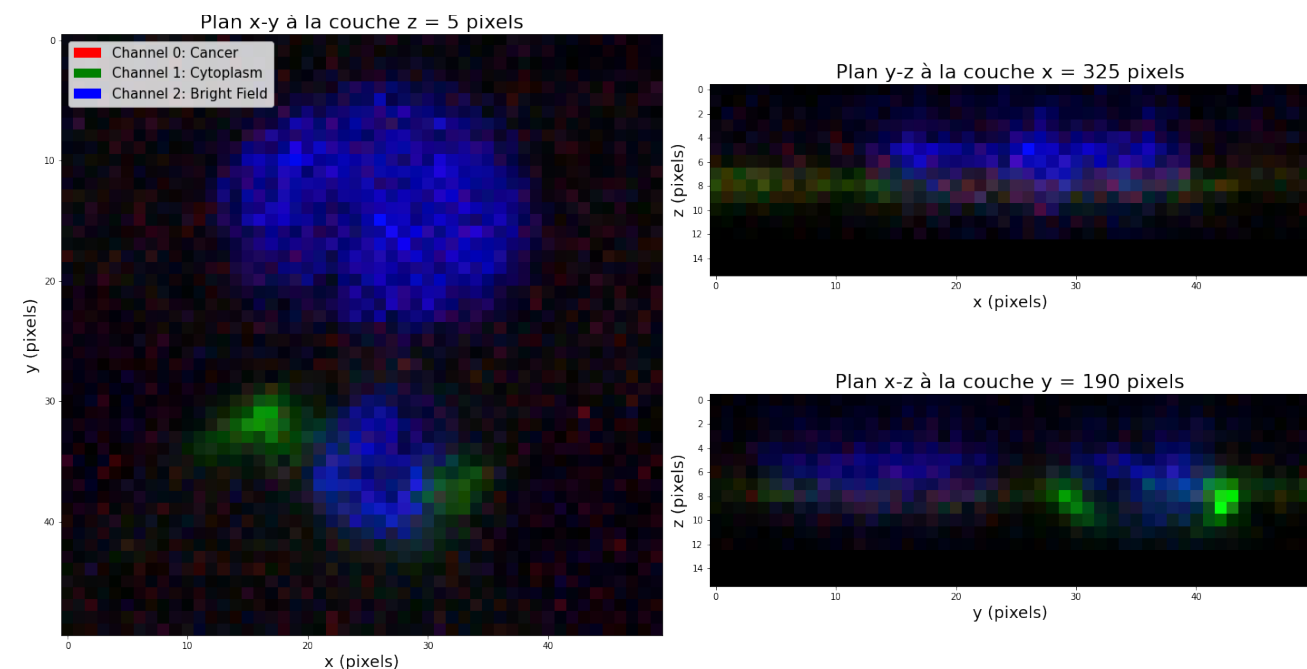


Figure 6 : Volume de deux cellules bien visibles par LSCM en fluorescence présenté en trois plans.

## 2 Discussion

### 2.1 Retour sur l'hypothèse

### 2.2 Analyse des causes d'erreurs

Les erreurs liées aux données récoltées trouvent leur causes dans de nombreux éléments du systèmes optiques et des différents procédés d'analyse. À commencer par les incertitudes relatives aux appareils de mesure utilisés. Les figures 1 et 2 représentent, comme présenté en partie 1, les résultats de mesures obtenues pour les deux systèmes et permettent aussi de mettre en évidence les erreurs relatives à chaque mesure. Les erreurs liées aux échelles de mesures de la monture de translation sont représentées par les barres horizontales et celles du power-meter sont représentées par les barres verticales. Le tableau 2 présente les incertitudes de chacun de ces composants optiques.

	Incertitude
Monture de translation	10 microns
Power-Meter	2.61

Table 2 – Incertitudes sur les mesures de la monture de translation et du power-meter

L'incertitude de 10 microns liée à la monture de translation est donnée par le constructeur du dispositif. Dans le cas du power-meter, ces erreurs ont été calculées en prenant les valeurs maximales, minimales et moyenne des données recueillies, puis en faisant une moyenne des écarts à gauche et à droite.

De plus, sur chacun des graphiques obtenus, un autre maximum d'amplitude se dessine, révélé par les courbes gaussiennes de couleur jaune. Le fait que ces deux anomalies soient présentes quelque soit le jeu

de données indique une défaillance au niveau de la source de lumière du système, soit le laser. C'est cette défaillance qui oblige à utiliser une somme de courbe gaussienne et qui induit donc des erreurs lors de l'estimation de la résolution. De façon générale, l'utilisation de bibliothèques comme *lm.fit* induit des sources d'erreurs lors de l'étude d'un jeu de données discrètes. Cependant, le fait de devoir sommer des courbes gaussiennes, en les considérant adéquates, force à relier la résolution estimée à une solution qui ne la représente que indirectement (la courbe bleue du jeu de données avec pinhole n'étant pas exactement la courbe représentative du système dans un cas idéal).

D'autres erreurs, plus pratiques, liées à l'alignement du système sont aussi à noter, notamment lors des étapes d'alignement des *back* réflexions. Néanmoins, le suivi en temps réel des valeurs de puissance recueillies a permis d'ajuster l'alignement du pinhole et ainsi maximiser l'amplitude du système.

### 2.3 Question 1

Le fonctionnement de base de la microscopie confocale par fluorescence repose sur l'utilisation de la fluorescence afin de visualiser des points spécifiques de l'échantillon (Source 1). En d'autres termes, l'échantillon est balayé, point par point, par un laser focalisé dans le but de produire les différentes profondeurs de l'image. Les fluorophores placés à certains points de l'échantillon sont alors excités par le faisceau laser, produisant une fluorescence. Cette lumière passe, ensuite, dans le sténopé, permettant l'élimination des rayons lumineux hors-focus, et est détectée par le capteur ; l'image est, ainsi, créée.

Les couleurs des images dans la microscopie LSCM par fluorescence proviennent des fluorophores utilisés pour marquer les points de l'échantillon. Ces fluorophores correspondent à des protéines fluorescentes qui ont deux longueurs d'ondes importantes : la longueur d'onde d'absorption et la longueur d'onde d'émission. Les protéines, lorsqu'elles absorbent la lumière, émettent une lumière à une longueur d'onde supérieure à celle absorbée. De ce fait, lorsque l'échantillon est balayé par le laser, les fluorophores excités retransmettre une lumière à une certaine longueur d'onde. Celle-ci est, ensuite, captée par le détecteur et crée ainsi la gamme de couleurs retrouvées (Source 2). Comme ces protéines sont fabriquées spécialement pour se joindre à des parties spécifiques des cellules, la fluorescence permet l'observation ciblée de différents éléments de la matière observée, à l'aide de canaux différents.

En ce qui a trait aux différents canaux de l'image, le premier canal correspond aux cellules cancéreuses de l'échantillon, soit les parties anormales à détecter. Le deuxième canal correspond au cytoplasme, soit la partie gélatineuse du contenu de la cellule. Celle-ci se trouve entre la membrane plasmique et le noyau (Source 3). Finalement, le dernier canal de l'image correspond au *bright field*. Ce canal représente une image en lumière blanche traditionnelle, la lumière est transmise à travers l'échantillon et le contraste est généré par l'absorption de celle-ci dans les zones denses. Donc, ce canal permet d'offrir une visualisation générale de la cellule (Source 4).

### 2.4 Question 2

Pour trouver une estimation de la résolution du système, la taille réelle d'une cellule cancéreuse de prostate est d'abord trouvée. De cette manière, le diamètre d'une cellule réelle est d'environ  $16.6 \pm 2.9 \mu\text{m}$  avec une épaisseur d'environ  $15.1 \pm 2.6 \mu\text{m}$  (Source A). Ensuite, à partir de l'image 3D donnée, le nombre de pixel pour le diamètre de la cellule est évaluée. Donc, pour la cellule sur la figure 6, un diamètre d'environ  $25 \pm 1$  pixels et une épaisseur de  $12 \pm 1$  sont comptés. Avec ces données, il est possible de calculer la résolution latérale et axiale. Donc, la résolution est donnée par l'équation suivante :

$$R = \frac{\text{Diamètre de cellule réelle}}{\text{Nb de pixels}} \quad (1)$$

La résolution latérale correspond au plan  $xy$ , ainsi le résultat de celle-ci est de :

$$R_L = \frac{16.6 \mu\text{m}}{25 \text{ Pixels}} = 0.66 \frac{\mu\text{m}}{\text{Pixels}} \quad (2)$$

En utilisant la même équation pour la résolution axiale, correspondant au plan  $z$ , le résultat obtenu est de :

$$R_A = \frac{15.1 \mu\text{m}}{12 \text{ Pixels}} = 1.3 \frac{\mu\text{m}}{\text{Pixels}} \quad (3)$$

Pour les deux valeurs obtenues, les incertitudes sont calculées à l'aide de la formule suivante :

$$\Delta R = \sqrt{\left(\frac{\Delta V_R}{V_R}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_P}{V_P}\right)^2} \quad (4)$$

Où  $\Delta V_R$  est l'incertitude de la valeur réelle de la cellule,  $V_R$  est la valeur réelle de la cellule,  $\Delta V_P$  est l'incertitude de la valeur comptée, et  $V_P$  est la valeur comptée. Ainsi, les valeurs estimées de résolution avec leur incertitude sont les suivantes :

$$R_L = 0.66 \pm 0.2 \mu\text{m} \quad R_A = 1.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$$

## 2.5 Question 3

Le rôle d'un sténopé dans un système optique est d'éliminer les faisceaux lumineux ne provenant pas du plan focal, permettant d'améliorer la définition et la netteté des images. Cependant, la taille de ce diaphragme est important dans le balancement de la résolution et de la quantité de lumière admise par le système. En effet, si la taille du sténopé est trop petite, la quantité de lumière provenant du plan focal lui-même est réduite, engendrant une perte de puissance. De plus, puisque la quantité de lumière atteignant le détecteur est réduite, le rapport entre le bruit et les signaux diminue, ce qui rend le bruit de fond plus apparent. De cette manière, les images peuvent apparaître moins définies et plus sombres (Source 5).

Par exemple, pour un système parfait utilisant un profil de faisceau gaussien et opérant à une longueur d'onde de 600 nm, la taille du sténopé le plus petit qu'il serait possible d'utiliser peut être calculée à l'aide de la formule suivante (Source X) :

$$\theta = \frac{\lambda}{n\pi\omega_0} \quad (5)$$

Où  $\lambda$  est la longueur d'onde, soit de 600 nm,  $\omega_0$  est la taille du faisceau, et  $n$  est l'indice de réfraction. La taille du sténopé peut être estimée à partir de la taille du faisceau. En effet, dans un système parfait, la taille du faisceau est approximativement proportionnelle à celle du sténopé. Donc, pour trouver la valeur de  $\omega_0$ , il faut estimer la valeur de l'angle de divergence du faisceau. Pour trouver cet angle, l'angle de convergence de la dernière lentille est calculé.

$$\theta = 2 \tan \left( \frac{\phi/2}{f} \right) \quad (6)$$

En utilisant les valeurs numériques données dans le procédurier, un angle de 0.7 radians est trouvé. Ainsi, en isolant la valeur recherchée dans l'équation 5 et en calculant numériquement, la taille la plus petite pour le sténopé est de :

$$\omega_0 = \frac{\lambda}{n\pi\theta} = 272.84 \text{ nm} \quad (7)$$

## 2.6 Question 4

La résolution latérale correspond à la capacité d'un système à distinguer les points d'un objet qui sont situés à proximité l'un de l'autre alors que le contraste, étroitement lié à la résolution, est défini comme la quantité de photons collectés à partir de l'échantillon ([Source 6](#)). Les systèmes confocaux permettent d'améliorer ces deux paramètres avec l'ajout d'un diaphragme optique. Comme mentionné, l'ajout de ce sténopé permet de limiter les faisceaux lumineux, ce qui élimine les rayons en provenance des plans non-focaux. Puisque la lumière atteignant le détecteur ne provient que du plan focal de l'échantillon, le bruit créé par les rayons extérieurs est réduit. De cette manière, le flou créé par ces rayons est éliminé et la différence de luminosité entre les structures est mieux définie, offrant ainsi une amélioration dans la résolution et dans le contraste ([Source 7](#)).

Par exemple, dans la figure 6 utilisant le système confocal, il est possible d'observer, en ce qui a trait au contraste, que des différences de luminosité entre les canaux. En effet, les détails des divers canaux, soient le rouge, le bleu et le vert, peuvent être distingués clairement les uns des autres. Cependant, dans le cas de celui qui n'utilise pas le système confocal, soit le suivant :

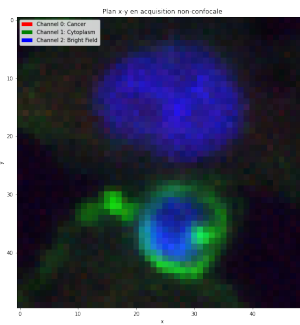


Figure 7 : Image de la cellule sans le système confocal.

Les détails sont légèrement moins marqués que pour ceux de la figure 6, particulièrement dans les zones où les couleurs se chevauchent. De plus, pour l'image confocale, celle est mieux définie avec des contours plus nets autour des structures, facilitant la distinction des composantes. Ainsi, avec ces exemples, il est possible de visualiser l'augmentation de la résolution et du contraste lorsqu'un système confocal est utilisé.

Bien que les systèmes confocaux font preuve de plusieurs avantages, ceux-ci comportent quelques désavantages. Un premier désagrément est la vitesse d'acquisition des données. Puisque les points sont balayés individuellement, l'acquisition des données est trop lente pour obtenir des informations sur des systèmes biologiques rapide ([Source 8](#)). De plus, les microscopes confocaux n'utilisent qu'un seul photon pour exciter les fluorophores, ce qui peut résulter à plus grande dispersion de la lumière dans l'image que, par exemple, des systèmes multiphotoniques ([Source 9](#)).

## 3 Conclusion

En conclusion, l'objectif de cette expérience consistait à mesurer la résolution axiale d'un système confocal à travers l'analyse d'une courbe d'intensité axiale d'un système avec et sans l'utilisation d'un sténopé. De cette manière, après avoir amassées les données d'intensité, des courbes de tendance ont pu être créées. À partir des courbes d'intensité, l'amplitude représentative de la résolution a pu être calculée à l'aide de la



largeur à mi-hauteur de la valeur maximale. Cette estimation de la largeur a permis d'offrir les résultats approximatifs de la résolution. Pour justifier les divergences entre les hypothèses théoriques précédentes, quelques causes d'erreur ont été notées telles que les incertitudes relatives aux appareils, une défaillance au niveau de la source lumineuse, et l'alignement du système. Or, malgré la légère divergence de résultat, l'expérience a permis de visualiser l'influence d'un sténopé dans la limitation des faisceaux non-focaux et l'amélioration de la qualité d'imagerie, offrant ainsi des perspectives intéressantes sur les techniques d'imagerie de performance et un approfondissement des connaissances en optique, autant pratiques que théoriques.

```
1 print("l'exam d'optique etait deg")
```