

Microscope

Travail préparatoire

PHS3910 – Techniques expérimentales et instrumentation

Équipe L3

Émile Guertin-Picard
2208363

Maxime Rouillon
2213291

Marie-Lou Dessureault
2211129

Philippine Beaubois
2211153

Résumé – Modélisation préliminaire d'un microscope capable de déterminer la taille de particules. La magnification et la PSF d'une particule sont simulées. Son déplacement est simulé à l'aide du mouvement brownien, et le coefficient de diffusion est extrait de la courbe du MSD de la particule. Le microscope choisi possède un objectif ayant une magnification de 60 et une ouverture numérique de 0.85, utilise un faisceau laser entrant de 405 nm et une lentille tube de longueur focale de 150 mm.

I. INTRODUCTION

Ayant reçu un contrat d'un gouvernement local nécessitant d'examiner les microparticules contaminantes proches d'une usine, l'équipe est mandatée de concevoir un microscope capable de déterminer la taille de particules. En préparation à la conception du produit final, une simulation du mouvement d'une particule, tel qu'elle serait perçue à travers le microscope, ainsi qu'une analyse de son déplacement est développée. En simulant la magnification et la fonction d'étalement de la particule (*PSF*), ainsi qu'en soumettant celle-ci à un mouvement brownien, il est possible de retrouver le coefficient de diffusion à partir de la pente de la courbe de son déplacement moyen au carré (*MSD*). La taille de la particule peut directement être extraite de ce résultat, caractérisant ainsi les contaminants. Cette démarche préliminaire permettra d'estimer l'erreur sur la taille en fonction de la longueur d'onde de la lumière passant à travers le système, de l'objectif utilisé et de la taille de la particule observée.

Les résultats de l'analyse ont entraîné les choix suivants : une magnification de 60, une ouverture numérique de 0.85, une longueur focale pour la lentille tube de 150 mm et un faisceau laser de 405 nm. Le rapport ci-contre expliquera en détail les méthodes de simulation utilisées pour obtenir les résultats souhaités, présentera les tailles et les erreurs respectives pour chaque ensemble de paramètres et développera les raisonnements justifiant les choix de l'équipe.

II. MÉTHODES

Le système optique utilisé pour la conception du microscope est illustré de manière simplifiée dans la figure 1 ci-dessous.

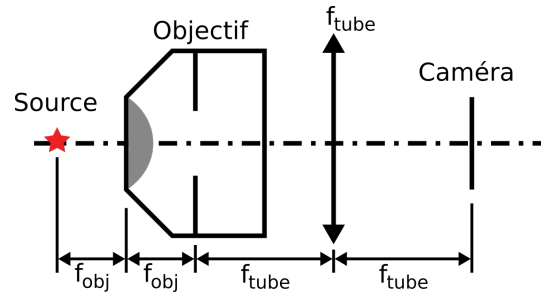


Figure 1 : Système optique simplifié du microscope.

Afin de simuler les observations et les analyses qui seront faites avec le microscope, une modélisation du mouvement d'une particule a premièrement été effectuée sur un scripte Python. Pour les fins du projet, une seule particule a été suffisante pour évaluer les paramètres à optimiser, puisque l'objectif est d'estimer une caractéristique propre à une particule, sa taille, et non à un regroupement de particules. En guise d'équivalence à la magnification réelle du microscope, une taille de pixel effective P a eu besoin d'être posée. Le calcul de cette taille P est obtenu à partir du grossissement M de l'objectif ainsi qu'avec la focale de la lentille de tube f_{tube} . Le grossissement est défini tel que :

$$M = \frac{f_{tube}}{f_{obj}}, \quad (1)$$

où f_{obj} est la longueur focale de la lentille dans l'objectif. Le grossissement M connu des lentilles suit un standard de la *Royal Microscopical Society* (RMS) où f_{tube} à 160 mm [1]. Ce n'est pas le cas ici. Ainsi, pour avoir le grossissement réel M_r , il faut convertir avec la formule suivante :

$$f_1 = \frac{160 \text{ mm}}{M} \Rightarrow M_r = \frac{f_{tube} M}{160 \text{ mm}}. \quad (2)$$

La taille réelle d'un pixel de caméra p_r , d'une valeur de 3.45 μm pour la caméra Zelux CS165MU mise à disposition pour ce contrat [4], peut être convertie en taille effective avec le grossissement réel :

$$P = \frac{p_r}{M_r} = \frac{p_r}{f_{tube} M} \cdot 160 \text{ mm}. \quad (3)$$

Pour créer un environnement plus fidèle à la réalité, un fond de bruit a été rajouté, où les photons émis suivent une distribution de Poisson avec *np.random.poisson*. En raison de la diffraction causée par le système optique, la particule a dû être simulée tel qu'elle serait perçue par la caméra dans le montage réel. En fonction des composantes optiques utilisées, la PSF (*Point Spread Function*) de la particule sur le capteur est décrite par :

$$PSF(r) = \left(\frac{2J_1\left(\frac{2\pi NA r}{\lambda}\right)}{\frac{2\pi NA r}{\lambda}} \right)^2, \quad (4)$$

où NA est l'ouverture numérique de l'objectif, λ est la longueur d'onde de la lumière passant à travers le microscope et r est la distance radiale par rapport à la position de l'émetteur [2]. Ici, J_1 est une fonction de Bessel. L'émission des photons dans le temps s'effectue selon une distribution de Poisson :

$$P(X = k) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!}, \quad (5)$$

où k est le nombre d'évènements et λ est le nombre moyen d'évènements survenus au cours d'un intervalle de temps défini (le temps d'acquisition). Numériquement, ceci correspond à effectuer un nombre de simulations d'émission choisie avec *np.random.poisson* et une valeur $\lambda = 400$ arbitraire. La position de chaque photon émis durant la simulation est déterminée à l'aide de la distribution de probabilité imposée par la *PSF*.

Pour simuler le mouvement d'une particule, on utilise le principe du mouvement brownien. Le centre d'une gaussienne est placé à la position exacte de la particule, et son écart-type correspond à la probabilité de présence de la particule sur une position x et y , relativement proche de la position initiale, après un certain intervalle de temps Δt . L'écart-type de la gaussienne possède la forme suivante :

$$\sigma_{diffusion} = \sqrt{2D\Delta t} = \sqrt{2 \left(\frac{k_B T}{2\pi\eta r} \right) \Delta t}, \quad (6)$$

où D est le coefficient de diffusion, k_B la constante de Boltzmann, T la température en Kelvin, η la viscosité en Pa·s, r le rayon de la particule en mètre et Δt le temps entre chaque déplacement en secondes. Avec une fonction Python, il est possible de placer la particule à sa nouvelle position en tenant compte de ces probabilités. Cette opération est répétée successivement pour observer le déplacement de la particule, et est testée pour des particules de diamètre de 1 et 10 μm . Un exemple d'une simulation complétée est présenté dans la figure 2.

Après avoir simulé le mouvement d'une particule, l'analyse a pu être effectuée en utilisant une procédure similaire à

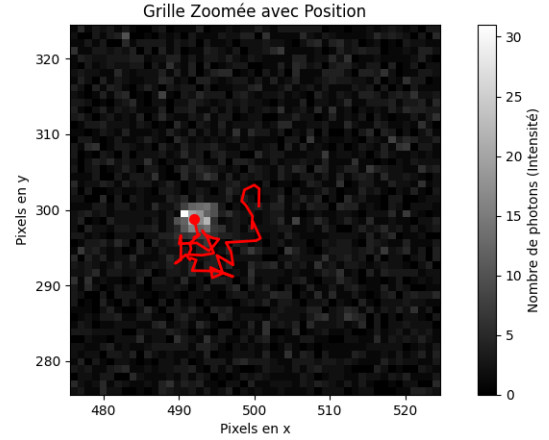


Figure 2 : Exemple d'une simulation du déplacement d'une particule par mouvement Brownien.

celle qui sera utilisée pour le système réel. Pour chaque image capturée lors de l'acquisition, un *fit* d'une gaussienne 2D a été effectué avec la librairie *lmfit*. La fonction gaussienne 2D est définie par :

$$f(x, y) = A \cdot \exp \left(- \left[\frac{(x - x_0)^2}{2\sigma_x^2} + \frac{(y - y_0)^2}{2\sigma_y^2} \right] \right) + B, \quad (7)$$

où A est l'amplitude et B est le décalage de la gaussienne. À partir de la fonction obtenue, les moyennes en x et en y (x_0, y_0) de la gaussienne sont obtenues pour estimer la position de la particule à cet instant. En effectuant ce processus pour chaque image de l'acquisition, on a pu obtenir le déplacement général de la particule pour un certain laps de temps.

Une fois les positions obtenues, il est possible de trouver la valeur du coefficient de diffusion de la particule. Pour ce faire, il est nécessaire d'effectuer le calcul du déplacement quadratique moyen. On réalise ce calcul en faisant la moyenne des déplacements de même intervalle. Par exemple, la première moyenne sera calculée avec toutes les distances séparant deux positions éloignées d'un intervalle de $\Delta t = 1$. De la même manière, la deuxième moyenne sera calculée avec toutes les distances entre deux points placés à $\Delta t = 2$ d'intervalle. On peut modéliser ce calcul par la formule suivante :

$$MSD = \frac{1}{N_{\Delta t}} \sum_{i=0}^{N_{\Delta t}-1} (\mathbf{r}(i + \Delta t) - \mathbf{r}(i))^2, \quad (8)$$

$$\mathbf{r}(i) = x(i)\hat{x} + y(i)\hat{y} \quad (9)$$

où $N_{\Delta t}$ est le nombre de paires i disponibles pour un intervalle Δt et Δt qui varie de 1 jusqu'au nombre de positions (nombre d'images) moins une. Une fois les valeurs des MSD trouvés pour chaque déplacement de même intervalle, il est possible de générer un graphique des MSD

en fonction de la valeur de l'intervalle Δt . Sur ce graphique, seuls les premiers points seront sélectionnés, c'est-à-dire pour des Δt faibles. Cette procédure est nécessaire pour observer le comportement réel du mouvement, car plus Δt est petit, plus il existe de paires disponibles. Une régression linéaire est effectuée sur ces points ; c'est la pente de cette régression qui donnera la valeur du coefficient de diffusion D et ainsi la taille de la particule r estimée par notre microscope :

$$\langle MSD(t) \rangle = 4Dt + 4\sigma_{\text{diffusion}}^2 \quad (10)$$

où $D = k_B T / 2\pi\eta r$. Les valeurs obtenues par cette procédure comportent toutes une incertitude. L'incertitude sur chaque position x et y est donnée par l'écart-type de sa gaussienne :

$$\Delta x = \Delta y = \sigma_{\text{position}} \quad (11)$$

Une fois l'incertitude déterminée pour chaque valeur, il faut pouvoir déterminer l'incertitude sur chaque valeur de la MSD. Pour ce faire, on propage l'incertitude, par la formule suivante, de chaque position sur la valeur de la MSD correspondante :

$$\begin{aligned} \alpha &= A + B \quad (12) \\ A &= \sqrt{(2(x(i + \Delta t) - x(i)) \cdot \Delta x(i + \Delta t))^2 + (2(x(i + \Delta t) - x(i)) \cdot \Delta x(i))^2} \\ B &= \sqrt{(2(y(i + \Delta t) - y(i)) \cdot \Delta y(i + \Delta t))^2 + (2(y(i + \Delta t) - y(i)) \cdot \Delta y(i))^2} \\ \Delta MSD &= \frac{1}{N_{\Delta t}} \sqrt{\sum_{i=0}^{N_{\Delta t}-1} \alpha}, \quad (13) \end{aligned}$$

Il est possible de tracer une régression linéaire, où l'incertitude sur la valeur de la pente est donnée par l'équation (14). Celle-ci considère qu'il n'y a des incertitudes que sur les valeurs en y (MSD) et que cette incertitude n'est pas constante pour chaque point.

$$\Delta D = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\Delta MSD_i)^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (14)$$

Où N est le nombre d'intervalles considéré. Afin de déterminer quels objectifs de microscope considérer pour le produit final, la définition de la résolution est nécessaire pour la vérification du théorème d'échantillonnage de Nyquist. Soit d , la limite de diffraction pour une source ponctuelle au travers d'une ouverture [3] :

$$d = \frac{\lambda}{2NA}, \quad (15)$$

où λ est la longueur d'onde éclairant l'échantillon observé et NA est l'ouverture numérique de l'objectif. Cette limite de diffraction est la résolution du système. Ainsi, selon le théorème de Nyquist, la taille effective d'un pixel de la caméra P dans le plan de l'objet observé doit respecter :

$$P \leq \frac{d}{2} = \frac{\lambda}{4NA}. \quad (16)$$

Ainsi, pour un système avec f_{tube} et M connus (voir équation 3), il est possible de déterminer si le théorème (16) est respecté pour une longueur d'onde donnée. Cela a permis de déterminer quelles combinaisons de lentille tube, d'objectif de microscope et de source de lumière qui ne sont pas sujettes au phénomène d'*aliasing*, conséquence du non-respect de Nyquist où l'information réelle sur l'image est perdue.

Les paramètres déterminants qui seront pris en compte pour la simulation se résument à la longueur d'onde du faisceau d'entrée, la magnification et l'ouverture numérique de l'objectif, la longueur focale de la lentille tube, la taille de la particule ainsi que le coefficient de diffusion. Les variations des paramètres ainsi que les équations développées ont permis de poser l'hypothèse que les paramètres ne s'influencent pas entre eux et qu'ils peuvent être traités indépendamment.

III. RÉSULTATS

rajouter viscosité Le tableau I présente les calculs de chaque côté de l'inégalité (16) pour chaque combinaison de paramètres possibles avec le matériel mis à disposition par le gouvernement local. Quatre objectifs, tous ayant une paire de M et NA , ainsi que deux sources de lumière pour faire émettre des photons par les fluorophores dans les échantillons sont disponibles. La valeur de f_{tube} est fixée à 150 mm, sachant que les lentilles offertes sont limitées à cette longueur focale.

Tableau I – Résultats des calculs pour P et $d/2$ en fonction des paramètres possibles.

λ (nm)	M	NA	P (μm)	$d/2$ (μm)
405	10	0.25	0.368	0.810
	20	0.4	0.184	0.506
	40	0.65	0.092	0.312
	60	0.85	0.061	0.238
375	10	0.25	0.368	0.750
	20	0.4	0.184	0.469
	40	0.65	0.092	0.288
	60	0.85	0.061	0.221

Les résultats obtenus avec la simulation pour certains paramètres sont présentés dans le tableau II ci-dessous. Les valeurs des paramètres λ , M et NA sont les mêmes que ceux présentés dans le tableau I. Encore une fois, f_{tube} est

fixée à 150 mm pour les simulations. La taille correspond au diamètre de la particule.

Tableau II – Valeurs obtenues pour le coefficient de diffusion D et la taille de la particule pour certains paramètres de simulation.

Paramètres					Résultats	
λ (nm)	M	NA	Taille réelle (μm)	D_{vrai} ($\mu m^2/s$)	D_{est} ($\mu m^2/s$)	Taille estimée (μm)
405	10	0.25	1	0.10981691	0.065 ± 0.004	0.60 ± 0.04
405	20	0.4	1	0.10981691	0.087 ± 0.002	0.79 ± 0.02
405	40	0.65	1	0.10981691	0.066 ± 0.002	0.60 ± 0.02
405	60	0.85	1	0.10981691	0.105 ± 0.002	0.96 ± 0.02
375	20	0.4	1	0.10981691	0.085 ± 0.003	0.78 ± 0.03
405	20	0.4	10	0.010981691	0.0166 ± 0.0008	15.1 ± 0.7

IV. DISCUSSION

Les résultats des deux dernières colonnes du tableau I laissent conclure que les paramètres choisis respectent tous le critère de Nyquist. De plus, l'impact des paramètres sur la résolution semblait indiquer qu'un plus grand M (et NA) ainsi qu'une plus petite longueur d'onde étaient à préconiser pour minimiser d . La simulation suivant le modèle mathématique a vérifié cela. Cette conclusion n'élimine donc aucun objectif et tous les paramètres du tableau II peuvent être considérés pour les prochaines analyses.

Les simulations effectuées pour la deuxième et la cinquième rangées du tableau II, soit pour un faisceau entrant ayant une longueur d'onde de 405 nm ou de 375 nm, ont mené à une incertitude relative sur la taille de la particule de $21 \pm 2 \%$ et $22 \pm 3 \%$, respectivement. Ceci correspond à une différence extrêmement minime, surtout en considérant l'ordre de grandeur des erreurs. Leurs incertitudes sont proportionnelles à celles obtenues pour la taille de la particule et sont aussi très similaires. Les valeurs de $d/2$ obtenues dans le tableau I soutiennent le fait qu'une longueur d'onde plus petite améliore la résolution, mais cette corrélation n'est pas évidente dans les résultats obtenus avec la simulation. Par conséquent, la complication de l'alignement associée à l'usage d'une LED dans le domaine ultraviolet, beaucoup plus importante, renforce plutôt le choix d'utiliser un faisceau de $\lambda = 405$.

Les quatre premières rangées du tableau II permettent de comparer l'effet de la magnification et de l'ouverture numérique sur la taille estimée et son incertitude associée. Pour les paires de $[M, NA]$ suivantes : $[10, 0.25]$, $[20, 0.4]$, $[40, 0.65]$ et $[60, 0.85]$, les erreurs relatives obtenues pour la taille de la particule sont respectivement : $40 \pm 4 \%$, $21 \pm 2 \%$, $40 \pm 2 \%$ et $4 \pm 2 \%$. L'erreur relative

presque négligeable sur la taille obtenue avec un objectif ayant $[60, 0.85]$ semble prédire qu'une augmentation de la magnification et de l'ouverture numérique améliore fortement la performance du microscope. Il est aussi important de noter qu'une magnification trop grande pourrait porter problème et affecter la justesse des résultats si le champ de vision résultant est réduit au même ordre de grandeur que les particules observées. Le cas échéant, la particule pourrait facilement se déplacer hors du cadre de l'image, ce qui rendrait l'analyse de son déplacement beaucoup plus difficile. Cependant, pour l'objectif $[60, 0.85]$, la magnification est encore beaucoup trop petite pour considérer cet enjeu. L'objectif choisi est donc $[60, 0.85]$.

Il est aussi important de s'assurer que l'analyse du déplacement soit aussi performante pour des tailles de particules variées, d'où l'utilité du test effectué pour une particule de $10 \mu m$. L'erreur relative pour cette simulation est de $85 \pm 7 \%$. En comparant cette erreur à celle obtenue pour le test ayant les mêmes paramètres mis à part la taille (deuxième rangée du tableau II), on voit que l'erreur est beaucoup plus importante pour la particule ayant un plus grand diamètre. Cette différence peut être due à des variations dans le *fit* gaussien utilisé pour localiser la particule à chaque image. Puisque la particule est plus large, la fonction gaussienne s'étale, ce qui augmente la possibilité que le centre de celle-ci ne s'aligne pas avec le centre réel de la particule. L'analyse a tout de même retrouvé une taille estimée du même ordre de grandeur que la taille réelle, ce qui est convenable pour le contexte du projet.

RÉFÉRENCES

- [1] Travis GOULETTE, Charles D. HOWARD et Michael W. DAVIDSON. *Infinity Optical Systems*. URL : <https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/infinity-optical-systems%7D>.
- [2] Jean PROVOST, Lucien WEISS et Jérémie VILLENEUVE. *Mandat 3 - Suivi des particules*. 2024. URL : <https://moodle.polymtl.ca/mod/resource/view.php?id=659197%7D>.
- [3] TELEDYNE PHOTOMETRICS. *MIntroduction to Super-Resolution Localization Microscopy*. 2018. URL : <https://www.youtube.com/watch?v=8SSr7416I94%7D>.
- [4] THORLABS. *CS165MU - Zelux® 1.6 MP Monochrome CMOS Camera, 1/4"-20 Taps*. URL : <https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=CS165MU%7D>.

V. ANNEXES

A. Preuve de correction par Antidote

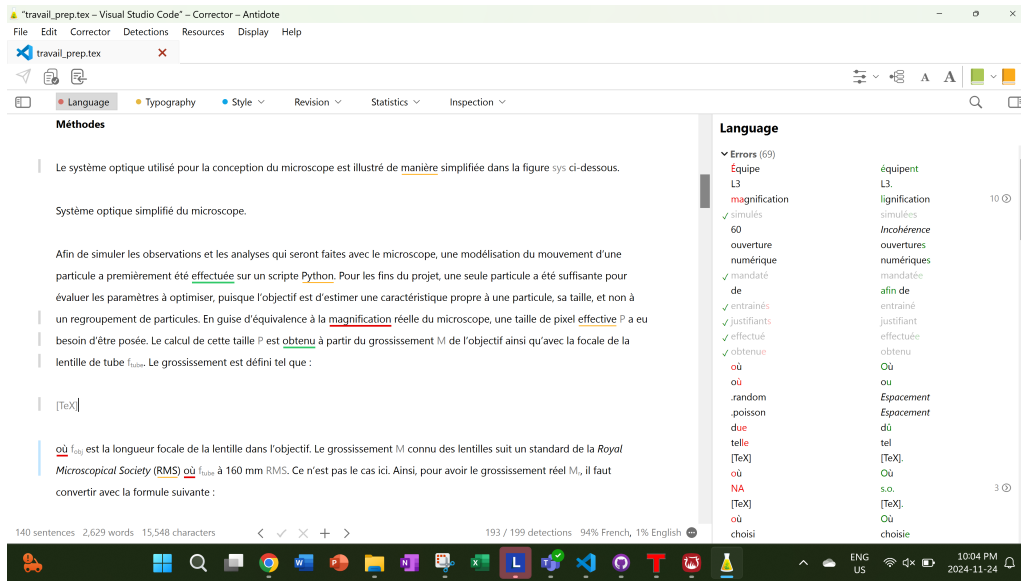


Figure 3 : Correction par Antidote

Codes