

PHS2223

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL
GÉNIE PHYSIQUE

Expérience 1 : Microscopie Confocale

Auteur :
Guillaume Sheehy
Fabien Picot
Tien Nguyen

Sous la responsabilité de
Pr. Frédéric LEBLOND

Table des matières

1	Introduction	2
2	Théorie	3
2.1	Microscopie	3
2.2	Microscopie confocale	3
2.3	Résolution axiale	5
3	Expérience à réaliser	5
4	Travail Préparatoire (première partie du rapport)	6
5	Rapport final	7

1 Introduction

En microscopie classique, on utilise une source de lumière et un condenseur pour illuminer de façon uniforme un échantillon placé au plan focal d'un objectif. Un système de lentilles permet ensuite de relayer l'image jusqu'à un détecteur de lumière. Ce type de microscope permet d'imager un échantillon biologique avec une très bonne résolution, à condition qu'il soit coupé en tranches très fines. Lorsque la tranche est trop épaisse, la diffusion présente dans le tissu fait en sorte que l'on détecte des photons provenant aussi des plans adjacents au plan focal, ce qui compromet la résolution spatiale. Une alternative pour observer des échantillons plus épais est d'utiliser la microscopie confocale. Cette dernière permet de «sélectionner optiquement» une tranche fine d'un échantillon, sans avoir à le trancher. Au lieu d'utiliser un condenseur pour l'illumination, on utilise un objectif permettant de restreindre la zone d'illumination à un seul point dans l'échantillon. On utilise également un sténopé (trou de très petit diamètre) au niveau de la détection afin de sélectionner seulement les photons provenant du plan focal. En balayant le point imposé longitudinalement (en x et en y) une image bidimensionnelle peut être formée. De plus, il est possible de reconstruire un volume tridimensionnel de l'échantillon en faisant varier la hauteur de ce dernier (balayage en z). Cette technique d'imagerie intrinsèque peut être combinée avec l'imagerie confocale en fluorescence, ce qui permet d'obtenir à la fois de l'information structurelle et fonctionnelle de tissus biologiques.

2 Théorie

2.1 Microscopie

La microscopie conventionnelle, ou optique, consiste en l'imagerie d'un échantillon en faisant passer la lumière transmise au travers ou réfléchie à la surface de celui-ci par un système optique (microscope). L'image formée ainsi sur la rétine de l'observateur, ou sur une caméra, subit un grossissement optique important qui permet l'observation des structures microscopiques. Cette technique, à priori simple, fut au cœur de plusieurs développements scientifiques cruciaux en biologie et médecine. Aujourd'hui, les microscopes optiques peuvent atteindre une résolution limitée en diffraction d'approximativement $0.2 \mu\text{m}$ correspondant à une limite de grossissement de $\sim 1500\times$. Cependant, la résolution réelle atteignable en pratique est limitée par la lumière hors-focus provenant des points de l'échantillon résidant à l'extérieur du plan focal de l'instrument (Figure 1A).

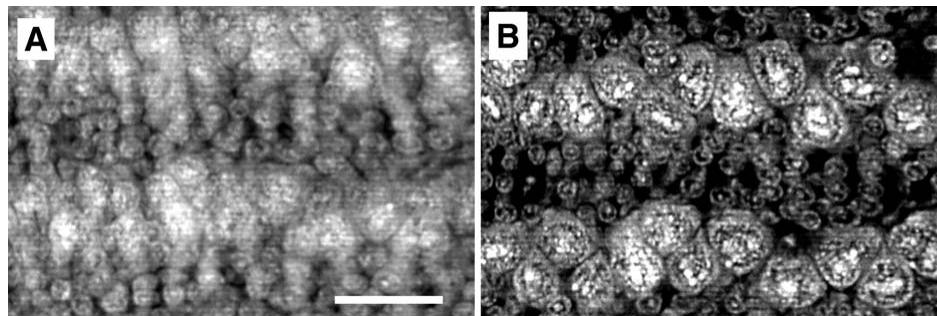


FIGURE 1 – Microscopie d'une aile de papillon (*Precis coenia*) colorée à l'iodure de propidium A) image conventionnelle B) image confocale.

2.2 Microscopie confocale

Inventée par Marvin Minsky au MIT en 1957 (histoire fascinante), la microscopie confocale repose sur l'ajout d'un sténopé (*pinhole*) à une position stratégique dans un microscope conventionnel (Figure 2). Ici, le sténopé a pour but de bloquer les rayons de lumière qui ne proviennent pas du plan focal afin de considérablement augmenter la résolution latérale (plan $\hat{x}\hat{y}$) de celui-ci (Figure 1B).

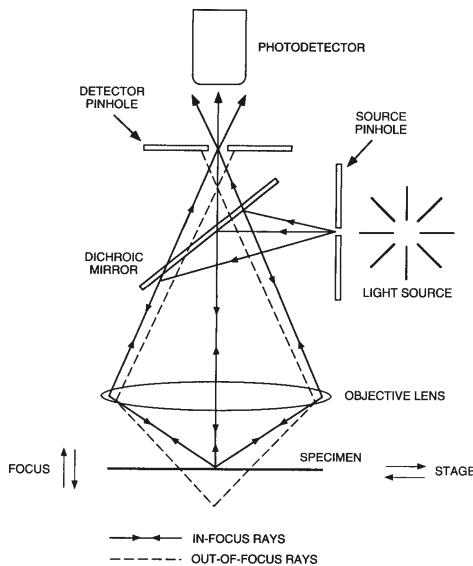


FIGURE 2 – Système confocal de base.

Malheureusement, l'ajout du sténopé a aussi pour effet de significativement réduire la quantité de lumière se rendant au détecteur, ce qui rend **impossible l'utilisation à l'oeil nu**. À la place, les microscopes confocales sont généralement munis de photodétecteurs très sensibles comme des tubes photomultipliés (*Photomultiplier tube, PMT*). Comme ces détecteurs ne permettent pas la formation d'images directement, l'échantillon est balayé dans le plan transverse ($\hat{x}\hat{y}$) afin de former une image 2D appelée *z-scan*. Ce balayage peut ensuite être répété pour plusieurs positions axiales (\hat{z}) afin de produire un scan 3D complet de l'objet en empilant plusieurs z-scans. Les systèmes de microscope confocal par balayage utilisent généralement des sources laser (*laser confocal scanning microscopy, LCSM*) afin de maximiser le signal mesuré. Un tel système est présenté à la Figure 3. Finalement, il est aussi possible d'utiliser la microscopie confocale en fluorescence (Figure 4) afin d'en améliorer la spécificité cellulaire/moléculaire. Dans ce cas, plusieurs images 3D sont mesurées, chacune à différente longueurs d'onde. Chaque longueur d'onde mesurée (appelé canaux) correspond généralement aux différentes bandes de fluorescence d'intérêt et peuvent être associées à différentes structures cellulaires (noyaux, squelette cellulaire, cellules cancéreuses, etc.)

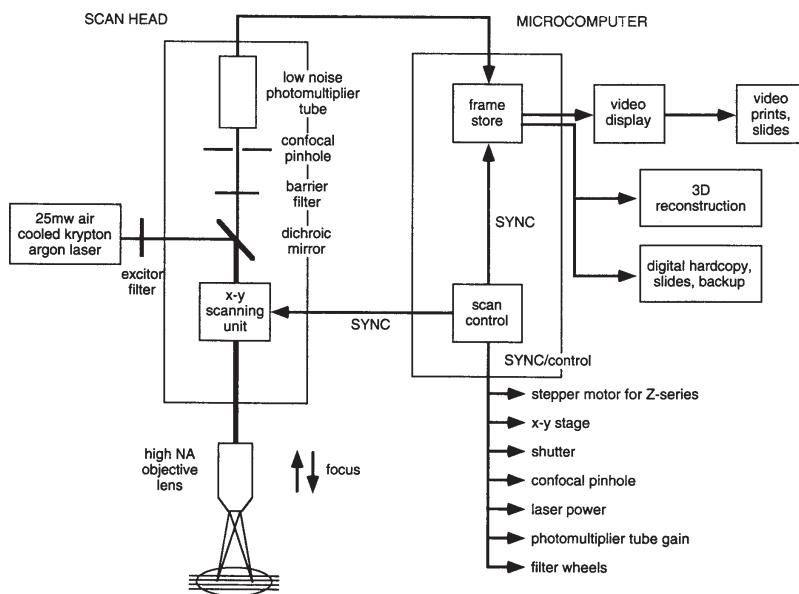


FIGURE 3 – Système de microscopie confocale par balayage laser.

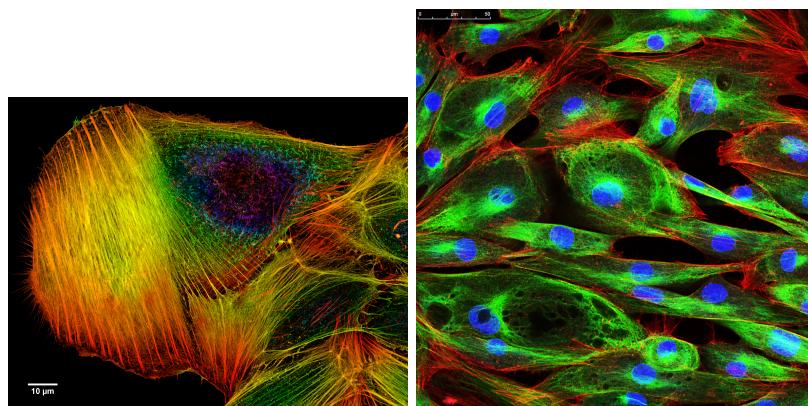


FIGURE 4 – Examples d'images de microscopie confocale par balayage laser. Gauche ; filaments d'actine, colorés à la phalloïdine, dans une lignée cellulaire d'ostéosarcome. Droite ; microscopie confocale par fluorescence de cellules dendritiques.

2.3 Résolution axiale

La résolution axiale d'un système de microscopie confocale est dépendante de la taille du sténopé et du système de lentille utilisé. Il est possible d'en obtenir une estimation en calculant l'épaisseur focale δ_z du système confocal (Figure 5). Ce calcul dépend de la taille de l'ouverture du sténopé (d) ainsi que de la longueur focale des lentilles utilisées (f_1 et f_2).

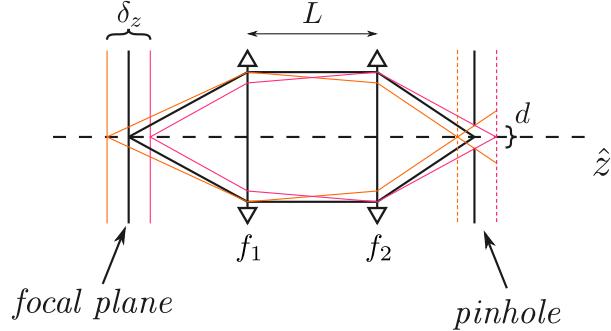


FIGURE 5 – Illustration de l'épaisseur focale δ_z d'un système confocal simple.

3 Expérience à réaliser

Le but de cette expérience est de mesurer la résolution axiale (δ_z) d'un système confocal. Pour ce faire, vous allez mesurer expérimentalement la courbe d'intensité axiale du système avec et sans sténopé. Le système à assembler et aligner est illustré à la Figure 6.

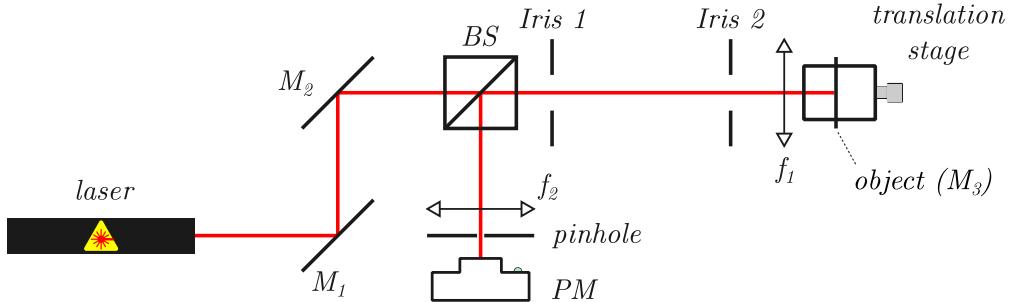


FIGURE 6 – Schéma du montage confocal à réaliser.

Le matériel nécessaire pour cette expérience consiste en ;

- 1 laser et source d'alimentation
- 3 miroirs avec vis d'alignement (M_i)
- 1 cube séparateur de faisceau (*beam splitter (BS)*)
- 2 iris (pour l'alignement)
- 2 lentilles ($f_1 = f_2 = 35$ mm)
- 1 monture de translation \hat{z}
- 1 monture de translation XY (*thorlabs ST1XY-S(/M)*)
- 1 sténopé ($\phi 75\mu\text{m}$)
- 1 puissance mètre (*power meter (PM)*)

Une fois le montage aligné, ajustez la position des montures de translation afin de maximiser la puissance mesurée et notez cette puissance. Vous allez maintenant utiliser la vis de contrôle de la monture de translation \hat{z} afin de progressivement décaler l'objet imagé (M_3) tout en notant la distance décalée ainsi que la nouvelle puissance mesurée. Répétez cette procédure en notant plusieurs décalages et puissances

afin de pouvoir tracer une courbe Puissance vs Position. Retirez le sténopé du système et effectuez la même procédure afin d'obtenir la courbe Puissance vs Position pour le montage sans sténopé.

4 Travail Préparatoire (première partie du rapport)

Vous devez remettre la première moitié de votre rapport de laboratoire **avant le début de la séance**. Cette première partie devra être constituée des sections ; introduction, théorie, méthodologie et hypothèse. La grille d'évaluation suivante sera utilisée pour noter cette partie du rapport.

Partie 1			
Sections	Eléments		
Introduction		/1	
Théorie		0/3	
	microscopie confocale	/1	
	modèle de calcul de résolution	/2	
Méthodologie		0/2	
	présentation du montage	/1	
	explications	/1	
Hypothèse		0/4	
	résolution vs pinhole	/1	
	résolution vs lentilles	/1	
	résolution vs distance f1-f2	/1	
	code python (Annexe)	/1	
Total		0/10	

Écrivez une courte introduction dans laquelle vous présentez le but de l'expérience, ce que vous allez mesurer ainsi que comment vous allez le mesurer. Présentez un résumé de vos attentes ainsi que du contenu global du rapport. Entrez directement dans le vif du sujet et n'écrivez pas une introduction trop longue (max 1/2 page).

Pour la section théorie, vous devrez reprendre les éléments pertinents qui vous permettent d'élaborer le modèle que vous utiliserez pour faire vos prédictions (hypothèses). Expliquez le fonctionnement d'un système confocal et développez la physique nécessaire (optique géométrique) que vous utiliserez afin de déterminer la résolution d'un système confocal simple (Figure 5).

Pour la méthodologie, une présentation du montage ainsi qu'une explication des manipulations suffisent. Vous pouvez récupérer les figures de ce document (avec inkscape par exemple), mais assurez-vous de citer vos sources correctement.

Pour votre section hypothèse, vous devez développer un programme python (nous vous suggérons de travailler dans un *jupyter notebook*) vous permettant de calculer la résolution axiale (δ_z) du système confocal simple (Figure 5). Vous devez mettre votre code en annexe et expliquer son fonctionnement dans le rapport. Utilisez cette solution/fonction afin de tracer les graphiques suivants,

1. Courbes résolution axiale vs taille sténopé ($\delta_z(d)$).
Utilisez $L = f$ et $f_1 = f_2 \in [25, 35, 50, 100, 150]$ mm
2. Courbes résolution axiale vs focale des lentilles ($\delta_z(f)$).
Utilisez $L = f$ et $d \in [50, 75, 100, 150]$ μm
3. Courbes résolution axiale vs distance entre les lentilles ($\delta_z(L)$).
Utilisez $d = 75$ mm et $f_1 = f_2 \in [25, 35, 50, 100, 150]$ mm

5 Rapport final

Vous devez remettre la seconde moitié de votre rapport de laboratoire une semaine après la séance. Cette seconde partie devra être constituée des sections ; résultats, discussion et conclusion. La grille d'évaluation suivante sera utilisée pour noter cette partie du rapport.

Partie 2			
Sections	Eléments		
Résultats		0 / 4	
	estimation de résolution	/ 2	
	manipulation d'image 3D	/ 2	
Discussion		0 / 5	
	analyse des causes d'erreur	/ 1	
	Q1	/ 1	
	Q2	/ 1	
	Q3	/ 1	
	Q4	/ 1	
Conclusion		/ 1	
Total		0 / 10	

Pour votre section Résultats, vous devez tracer vos données expérimentales sur deux graphiques (système avec et sans sténopé). Ajoutez des barres d'erreurs pour les deux axes. Vous devrez ensuite déterminer la bonne fonction à utiliser¹ (justifiez votre choix) pour faire un *fit* approprié sur vos données. Utilisez la largeur à mi-hauteur de votre ajustement de courbe pour estimer la résolution axiale.

Ensuite, vous aurez à procéder à l'analyse de données expérimentales d'un scan de LSCM en fluorescence (référez-vous au fichier *Demo - confocal microscopy.ipynb*, <https://github.com/SheehyG/PHS2223>). L'acquisition confocale a été prise avec un microscope confocal *Leica TCS SP5 MP* sur des cellules de prostate RWPE-1. La plupart des cellules visibles lors de cette acquisition sont des cellules du cancer de la prostate PC3. Présentez une figure comparant l'image qui aurait été mesurée par un système non-confocal à celle de la tranche centrale de l'image 3D (identifiez ce que chaque canal représente à l'aide d'une légende). Présentez une autre figure illustrant le volume de quelques cellules ($\sim 50 \times 50 \times 16$ pixels) en trois coupes ($\hat{x}\hat{y}$, $\hat{x}\hat{z}$ et $\hat{y}\hat{z}$).

Pour votre discussion, commencez par expliquer les différences que vous avez observé entre la résolution axiale mesurée expérimentalement et celles que vous avez calculées dans votre hypothèse. Ensuite, abordez les questions suivantes,

1. Expliquez le fonctionnement de base de la microscopie confocale par fluorescence. D'où viennent les couleurs des images de LSCM en fluorescence ? À quoi correspond chaque canal de l'image ?
2. Donnez une estimation de la résolution du système basé sur l'image 3D à votre disposition et de l'information que vous pouvez trouver dans la littérature scientifique en lien avec les cellules du cancer de la prostate (citez bien vos sources).
3. Quel est l'effet de la taille du pinhole sur les images mesurées ? Pourquoi ne pas utiliser un sténopé aussi petit que possible ? Quel serait le sténopé le plus petit que l'on pourrait utiliser avec un système parfait utilisant un profil de faisceau gaussien et opérant à 600 nm ?²
4. Expliquer comment un système confocal permet d'augmenter la résolution latérale d'un système de microscopie ainsi que le contraste des images mesurée. Donnez un exemple à partir des données confocales fournies. Quels sont les désavantages d'un système confocal ?

1. Considérez un profil spatial gaussien pour le faisceau du laser.
2. Peut être utile - https://en.wikipedia.org/wiki/Gaussian_beam