

KUBS FLEUR
CARBILLET FANNY

RAPPORT DE PROJET

Etude bibliographique des méthodes de caractérisation de systèmes optiques mises en œuvre en fonction des contraintes expérimentales. L'instrumentation du service d'imagerie cellulaire est disponible pour la réalisation des tests après formation sur les appareils. La solution proposée sera prise en compte pour l'évolution instrumentale du microscope confocal dans les prochains mois.

TUTEUR :
Dr D.DUMAS

Matériels mis à disposition:

- microscope à sectionnement optique conventionnel : Olympus IX70 + module Cellscan (Scanalytic's)
- microscope confocal à balayage laser monophotonique et multiphotonique SP2 Leica

Année universitaire 02/03

TABLE DES MATIERES

Introduction	4
Bases de l'étude	5
I_ Microscopie Confocale à Balayage Laser monophotonique ou multiphotonique :	5
a) CLSM = Microscopie optique :	5
b) CLSM = Microscopie de fluorescence :	5
c) CLSM = Microscopie quantitative :	6
d) CLSM = Principe confocalité :	6
e) CLSM = Imagerie 3D/Microscopie à sectionnement optique :	7
f) CLSM = Microscopie Monophotonique / Multiphotonique :	7
II_ Outils d'analyse	8
a) La PSF (ou Point Spread Function) :	8
Définition :	8
Restauration d'images :	10
b) CV (ou Coefficient de Variation) :	10
c) Conclusion :	11
Critères de caractérisation d'un système confocal :	12
I_ Présentation du système confocal :	12
II_ Critères conditionnant la performance et la sensibilité d'un microscope confocal	13
a) Test d'appréciation général de la qualité du système :	13
b) Alignement des canaux :	15
c) Détecteurs :	15
Tests de résolution latérale en mode monophotonique :	16
Test de résolution spatiale en mode monophotonique :	16
Influence du gain des PMT sur l'intensité :	17
d) Ouverture du pinhole :	18
Tests sur la résolution latérale :	18
Test de résolution spatiale en mode monophotonique et multiphotonique :	19
e) Source laser :	21
Puissance laser :	21
Importance de la stabilité de la source laser :	21
Illumination de l'échantillon :	21
f) Vitesse de balayage :	23
g) Zoom :	24
h) Conclusion :	25
Complexité du problème	26
I_ Exposition de la complexité des interactions entre les différents paramètres :	26
a) Opposition pinhole/gain des PMT :	26
b) Opposition puissance laser/ gain des PMT :	26
c) Opposition zoom/bleaching :	26
d) Opposition gain des PMT/moyennage par plan /bleaching :	26

II_ Autres paramètres relatifs à la technique :	27
a) Influence de l'ouverture numérique :	27
b) Brillance :	27
c) L'immersion :	28
d) Repositionnement du système de déplacement en Z nanométrique piézoélectrique :	29
e) Taille de champs / pixels :	29
f) Bruits intrinsèques :	29
g) Eclairage :	29
h) Erreurs informatiques :	30
III_ Paramètres externes :	30
a) Relatif à l'environnement :	30
b) Relatifs à l'échantillon :	30
IV_ Conseils d'utilisation :	31
a) Etapes à suivre quant aux réglages des paramètres d'acquisition :	31
b) Avant toute acquisition :	31
c) Contraintes de préparation :	31
d) Il est également conseillé de :	32
V_ Conclusion :	32
Conclusion	34

Introduction

En général, la plupart des microscopes sont évalués avec des échantillons biologiques de référence. Cependant de simples comparaisons d'images effectuées sur une lame biologique sont subjectives et ne permettent pas de détecter un mauvais fonctionnement, ni de déterminer la performance du système.

Bien que les microscopes confocaux à balayage laser (CLSM) impliquent l'utilisation de lasers, de composants électroniques, de composants d'optique, et bien évidemment un microscope, il n'existe pas de tests standardisés ni de spécifications constructeur pour la caractérisation (en terme de performance et de sensibilité) de ces systèmes.

De nombreux tests portant sur la caractérisation des CLSM ont pourtant été publiés.

Les objectifs de notre projet étaient les suivants :

- préparation préalable au stage de maîtrise
- débiter la formation sur le système SP2 Leica mis à notre disposition
- effectuer des tests de caractérisation du système
- rendre compte des manipulations effectuées
- et proposer des conditions optimales d'acquisition d'images de haute qualité

Après avoir rappelé les principaux phénomènes physiques de base et les propriétés de la technologie utilisée, nous avons présenté les différents outils d'analyse permettant l'exploitation de nos expérimentations. Ensuite, nous avons procédé à l'analyse des paramètres les uns indépendamment des autres afin de bien situer l'action de chacun sur la qualité des images réalisées. Puis nous avons dégagé les liens existant entre tous ces facteurs pour exposer la complexité de la caractérisation de tels systèmes.

Bases de l'étude

Dans un premier temps, nous avons jugé nécessaire de faire un rappel des phénomènes physiques de base et de la technique d'observation d'échantillons biologiques sur laquelle ont porté nos tests de caractérisation de système. Puis nous présentons les outils d'analyse dont nous avons usé pour interpréter les résultats de ces tests.

Microscopie Confocale à Balayage Laser monophotonique ou multiphotonique :

La définition de la Microscopie Confocale à Balayage Laser (CLSM pour Confocal Laser Scanning Microscope) monophotonique et/ou multiphotonique repose sur les six propriétés suivantes...

CLSM = Microscopie optique :

D'un point de vue général, la microscopie optique est basée sur la capacité de l'échantillon observé à absorber ou réfléchir des **photons** (contrairement à la microscopie électronique qui repose sur l'absorption d'électrons).

CLSM = Microscopie de fluorescence :

Dans le cas d'une observation en microscopie à fluorescence conventionnelle, les molécules de l'échantillon sont soumises à une source lumineuse (lampe à vapeur de mercure, lasers,...) et absorbent les photons suffisamment énergétiques (longueur d'onde λ_{exc}) : l'échantillon est dit « excité », il rentre alors dans un état énergétique instable et supérieur à son état énergétique fondamental.

Il tend à retourner à son état de repos en libérant l'énergie emmagasinée sous forme de chaleur et d'émission de photons appelés photons de fluorescence dont la longueur d'onde λ_{em} est supérieure à la longueur d'onde des photons d'excitation λ_{exc} .

Ces photons émis sont alors captés au niveau du système par des détecteurs de type Caméras CCD (Charged Coupled Device), Photomultiplicateurs, Photodiodes à avalanche,...

Remarques :

Les sources d'excitation utilisées en CLSM sont des lasers !

Les λ d'absorption, d'émission et d'excitation sont spécifiques pour chaque molécule de fluorophore.

CLSM = Microscopie quantitative :

Des valeurs d'intensité de fluorescence émise par une région de l'échantillon sont donc récupérées au niveau des détecteurs. L'intensité de fluorescence étant alors considérée proportionnelle à la quantité de molécules présentes excitées, la CLSM est une technique de microscopie quantitative de fluorescence.

CLSM = Principe confocalité :

En microscopie de fluorescence conventionnelle, les photons de fluorescence émis par l'échantillon proviennent du plan de mise au point (plan focal) ainsi que des plans adjacents. Il a été déterminé qu'environ 1% à 2% de l'information seulement provenait effectivement du plan focal.

Cette fluorescence "en volume" donne souvent de forts bruits de fond, diminuant ainsi le contraste et la résolution spatiale. Le but est donc :

- de limiter la taille de la zone illuminée
- de ne détecter que la fluorescence émise par le plan focal

Le principe essentiel de la CLSM réside donc dans la présence de deux diaphragmes (pinholes), un à l'excitation et l'autre à l'émission, n'autorisant ainsi que l'illumination d'une zone de faible diamètre et que la détection de signaux fluorescents provenant du plan focal (les photons en provenance des autres plans étant alors exclus physiquement).

L'image de fluorescence est alors beaucoup plus nette car la résolution du microscope optique est augmentée.

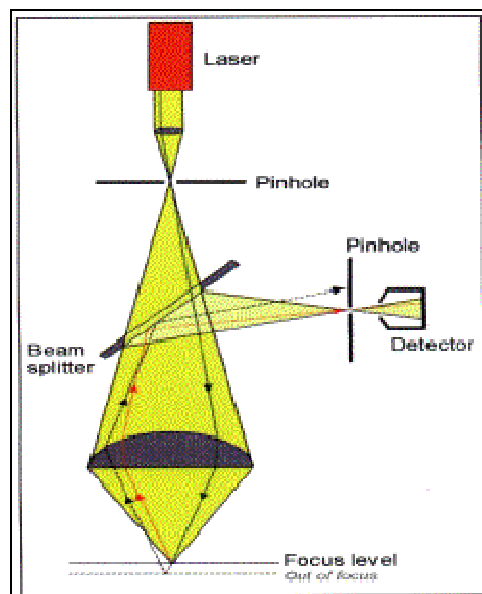


Illustration du principe de confocalité

CLSM = Imagerie 3D/Microscopie à sectionnement optique :

Le diamètre de la zone illuminée étant très petit, deux techniques sont utilisées afin d'être en mesure de constituer l'image totale tridimensionnelle de l'échantillon observé.

La CLSM utilise le balayage de la source d'excitation pour reconstruire en 2D des images « plan » (coupes XY) de l'objet et le déplacement axial en Z pour introduire la troisième dimension et réaliser ainsi des séries de coupes, qui traitées informatiquement, forment une image 3D.

Le balayage point par point est assuré par deux miroirs vibrants (galvanomètres) dans les deux directions (X et Y).

Le déplacement en Z est réalisé grâce à une sur-platine (quartz piézo-électrique), faisant varier le plan de mise au point, ce qui, associé au balayage, permet d'obtenir la série de coupes optiques. Un empilement par projection de ces sections optiques conduit facilement à une image reconstruite en 3D.

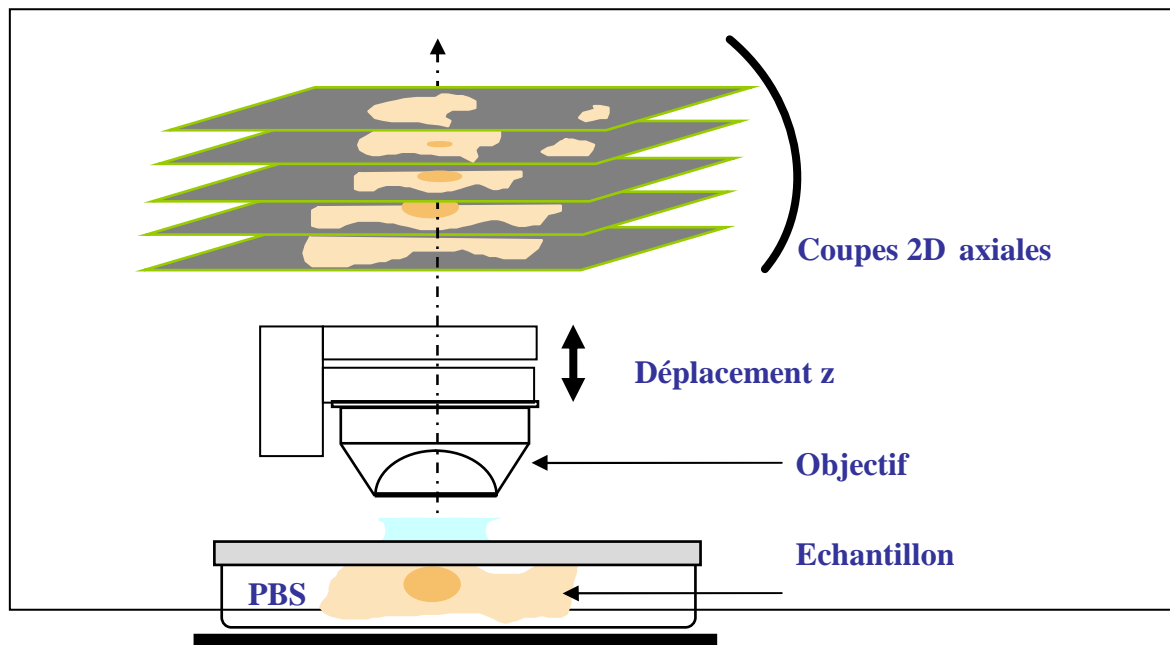


Illustration du principe de sectionnement optique

CLSM = Microscopie Monophotonique / Multiphotonique :

La différence entre CLSM monophotonique et CLSM multiphotonique repose sur le mode d'excitation de l'échantillon :

- en CLSM monophotonique, comme son nom l'indique, une molécule de fluorophore n'est excitée que par un seul photon suffisamment énergétique, c'est à dire de longueur d'onde définie (λ). Le laser est utilisé en mode continu.

- en CLSM multiphotonique, la même molécule de fluorophore serait excitée par l'absorption de deux photons de longueur d'onde définie $\lambda/2$. Si un photon ne possède pas l'énergie suffisante pour produire une excitation de la molécule, l'arrivée d'un second photon de même énergie dans un laps de temps très court conduit à l'excitation. L'émission reste inchangée. Le laser est quant à lui utilisé en mode pulsé (fréquence de pulse de 80MHz, largeur de pulse 0.1 femtoseconde).

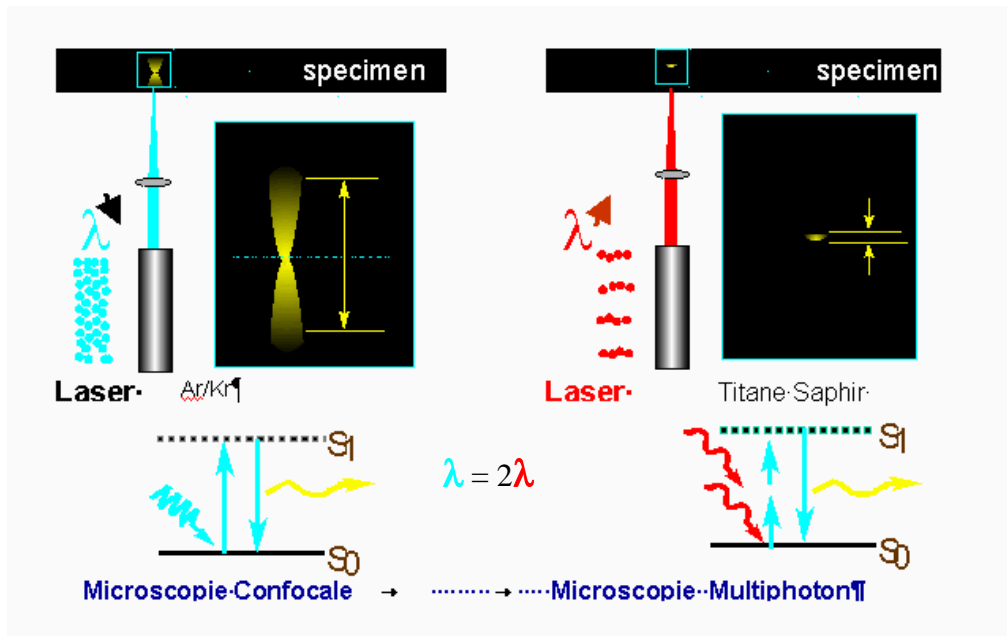


Illustration des différences entre excitation en mode monophotonique et en mode multiphotonique

Outils d'analyse

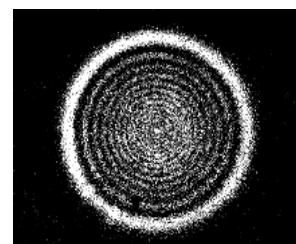
La PSF (ou Point Spread Function) :

Définition :

En raison de la nature ondulatoire de la lumière, l'image d'un point via un système optique n'est pas un point mais une tache diffuse dite "d'Airy", formée d'un point central brillant et d'anneaux dits de diffraction (ou cercles d'Airy).



X100/1.65



X100/1.30

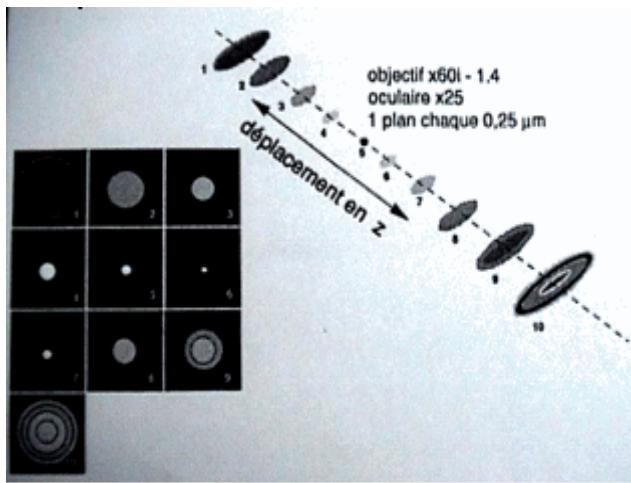
L'image classiquement obtenue présente un maximum d'intensité entouré d'anneaux de plus en plus sombres résultant de l'incapacité de la lentille à collecter la lumière dispersée au-delà d'un angle donné α .

La Fonction de Transfert Optique du microscope (ou point spread function, PSF) décrit mathématiquement la façon dont ce point est déformé par le système optique. Elle correspond à la réponse impulsionnelle du système et est donc directement dépendante des caractéristiques de chaque élément constitutif de ce système mais également de l'indice de réfraction des différents milieux, de la source (alignement, longueurs d'onde d'excitation,...)...

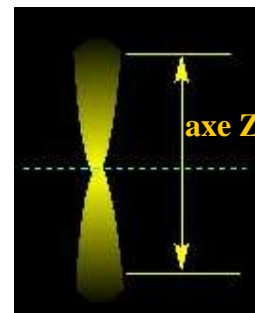
Pour finir, on peut dire que la PSF traduit en réalité la dégradation de l'image.

Cette déformation, due à la limite de diffraction du système, est estimée suivant un protocole bien défini dont voici le principe général :

- En théorie : utilisation de sources ponctuelles de diamètre inférieure à la limite de résolution du microscope et d'intensité la plus grande possible (type Dirac).
En pratique : le système confocal a une limite de résolution latérale de $0.2\mu\text{m}$ donc on a utilisé des billes fluorescentes PSF spécifiques (Molecular Probe) de diamètre $0.17\mu\text{m}$.
- Réalisation de coupes sériées traversant tout le volume de l'objet avec un incrément en Z de $0.25\mu\text{m}$ à $1\mu\text{m}$, supérieur à la profondeur de champs qui n'est autre que la distance le long de laquelle un point de l'échantillon reste net lorsque la focalisation est modifiée.
- Observation de la série en XZ :



Visualisation coupe par coupe d'une acquisition PSF



Représentation caractéristique d'une PSF telle qu'on peut l'observer en pratique sur un système « imparfait »

Remarque : La PSF d'une bille ronde sur système parfait serait bien évidemment une bille ronde.

La fonction de transfert optique est alors le reflet de la réponse du système dans sa globalité (alignement du système optique, qualité du confinement de l'excitation au niveau du plan focal,...) mais ce, pour des conditions données d'expérimentation.

Remarque :

La réponse en fréquence, ou fonction de transfert optique (OTF) est elle aussi fréquemment utilisée pour caractériser un système optique. L'OTF 3D correspond en fait à la transformée de Fourier en trois dimensions de la PSF.

Restauration d'images :

La détermination de la fonction de transfert optique permet pour les systèmes de microscopie de fluorescence conventionnels de faire de la restauration d'image.

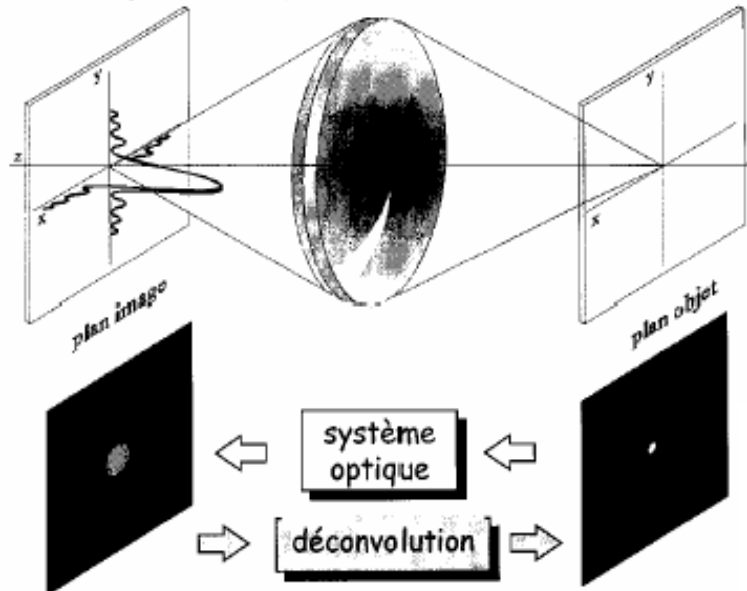


Illustration du principe de déconvolution

En théorie, seule la microscopie non confocale nécessite l'utilisation de traitements informatiques (algorithmes mathématiques) appelés « déconvolution » pour permettre de retrouver la scène originelle grâce à la PSF avec une résolution proche de celle de la microscopie confocale.

Cependant, l'utilisation d'algorithmes de restauration d'images sont couramment utilisés en microscopie confocale car même ce type de matériel d'acquisition ne permet pas d'obtenir de PSF « parfaite » !!!!

CV (ou Coefficient de Variation) :

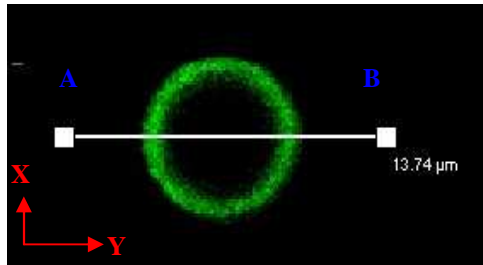
Lors de nos manipulations, nous avons utilisé le coefficient de variation (CV) comme outil mathématique pour être en mesure d'évaluer nos résultats.

Seulement, au lieu de se baser sur des milliers de billes, on a fait l'acquisition d'une bille en 2D ou 3D et établi des profils d'intensité. Les calculs de distribution et de CV ont été effectués sur la population de pixels (logiciel LEICA Confocal Software).

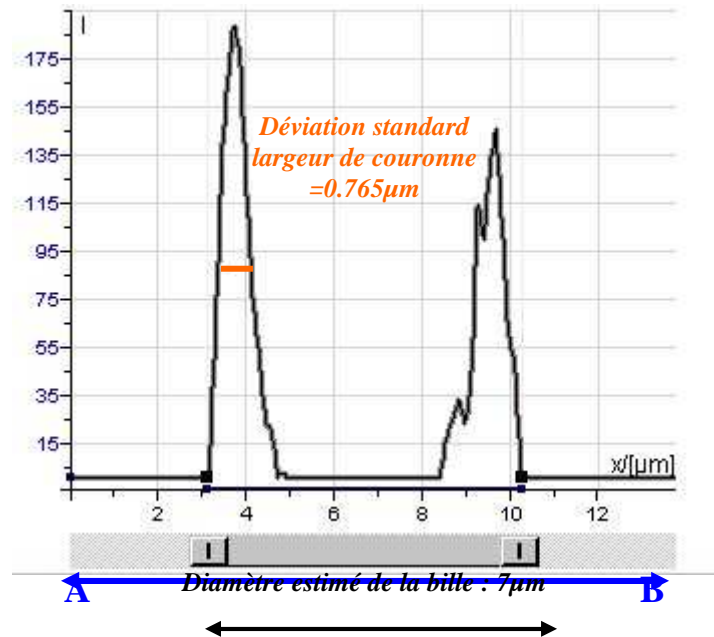
En pratique, on assimile le CV à la déviation standard d'intensité qui n'est autre que la largeur à mi-hauteur de pic.

Le CV qui est indépendant des unités de mesure, est défini comme étant le rapport σ/μ (avec σ = déviation standard d'intensité et μ = intensité moyenne) et constitue en fait la variation d'intensité des pixels au sein même de la bille. Il peut également être considéré comme la mesure directe du rapport signal sur bruit où μ représente le signal utile et σ le bruit de l'image : plus le CV est faible, meilleure est la qualité d'image !

Réalisation d'un profil d'intensité caractéristique d'une bille creuse dans le plan XY selon l'axe AB :



Bille creuse type Tétraspick, de diamètre 6μm/mode monophotonique/ ouverture de pinhole 100μm/gain du PMT 534.9/zoom 4.



Un tel outil nous permet donc de déterminer deux paramètres importants : la résolution latérale et la résolution axiale.

La résolution correspond au pouvoir séparateur, c'est-à-dire à la capacité d'un système optique à distinguer deux points distincts.

On parle de résolution latérale, lorsqu'il s'agit de distinguer deux points appartenant au plan XY et de résolution axiale ou spatiale, lorsqu'il s'agit de distinguer deux points selon l'axe Z (axe optique).

Pour un système confocal, la résolution latérale est meilleure que la résolution axiale.

résolution dans le plan XY = 0,15 μm.

résolution selon l'axe optique (Z) = 0,6 μm (ou 0,5 ou 0,4).

L'analyse du CV est alors utilisée pour déterminer la sensibilité relative et la performance d'un système confocal.

Le CV est par conséquent dépendant de nombreux facteurs : caractéristiques optiques, électroniques, mécaniques du système, paramètres d'acquisition,...

Conclusion :

Au cours de notre projet, nous avons surtout utilisé le CV pour déterminer les résolutions axiale et latérale et la PSF pour caractériser le système dans sa globalité.

Un système idéal serait donc un système présentant un CV faible et une PSF « parfaite ».

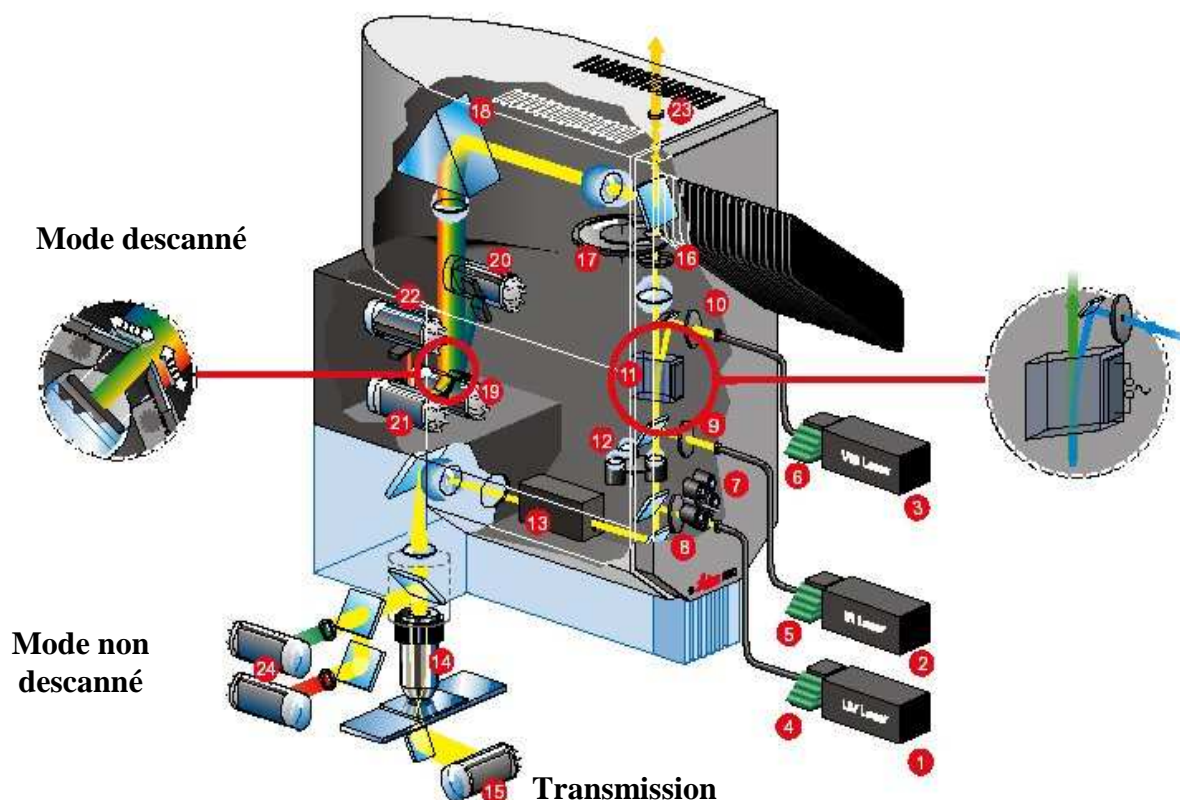
Critères de caractérisation d'un système confocal :

Le but d'une observation en microscopie confocale est d'obtenir un signal fluorescent **spécifique, non dégradé et suffisamment intense** respectant autant que possible les fonctions cellulaires. L'efficacité du système doit être constante dans le temps et globalement homogène dans l'espace pour que les intensités recueillies soient le reflet de la quantité de sondes fluorescentes, en d'autres termes pour la microscopie confocale à balayage laser soit une microscopie quantitative proprement dite.

On comprend donc qu'il est très important que le système fonctionne à son efficacité maximum pour produire des images de haute qualité car les intensités de fluorescence à recueillir sont très faibles.

Présentation du système confocal :

Nous avons jugé nécessaire la présentation, si succincte soit elle, du microscope confocal SP2 LEICA dont nous disposons au laboratoire pour effectuer nos manipulations.



1 : UV laser	12 : Adjustable pupil illumination
2 : IR laser	13 : "K"-scanner with rotator
3 : visible range lasers	14 : microscope & objectives
4 : UV AOTF (Acousto-Optical Tunable Filter ou Filtre Opto-acoustique Accordable)	15 : transmitted light detector
5 : IR EOM (Modulateur ElectroOptique)	16 : confocal detection pinhole
6 : Visible range AOTF	17 : analyser wheel
7 : UV Adaptation Optics	18 : spectrophotometer prism
8 : UV excitation pinhole	19 : photomultiplier channel 1
9 : IR excitation pinhole	20 : photomultiplier channel 2
10 : VIS excitation pinhole	21 : photomultiplier channel 3
11 : primary beam splitter	22 : photomultiplier channel 4
	23 : external optic port
	24 : non descanned reflected light detectors (MP)

Le système dispose de plusieurs lasers qui donne la possibilité au manipulateur d'exciter les échantillons avec des longueurs d'onde allant de l'ultraviolet à l'infrarouge.

Afin d'améliorer le taux de transmission du signal d'émission de fluorescence, le microscope SP2 Leica est pourvu d'un cristal (AOBS = Acousto-Optical Beam Splitter) au niveau de l'excitation laser et d'un prisme au niveau de la détection et non pas de filtres dichroïques, d'excitation et d'émission.

La longueur d'onde et l'intensité des raies d'un laser d'excitation peuvent être ajustées à tout moment grâce à l'AOBS.

Le signal émis peut alors être réduit à un point grâce à l'utilisation d'un pinhole (diaphragme de petit diamètre) situé dans le plan focal de l'objet afin d'exclure physiquement l'information provenant des plans adjacents au plan focal.

Un prisme est chargé de décomposer la lumière émise par l'échantillon et d'envoyer celle-ci vers différents détecteurs.

Le SP2 Leica est équipé de six détecteurs : 4 détecteurs de type PMT R6357 (Hamamatsu) pour le mode descanné et 2 détecteurs semblables pour le mode non descanné.

Il est également possible de travailler en lumière transmise : 1 détecteur est dédié à ce mode.

Le système de balayage est constitué de miroirs vibrants pour le balayage en XY et d'une surplatine montée sur un quartz piézo-électrique pour le déplacement en Z.

Critères conditionnant la performance et la sensibilité d'un microscope confocal

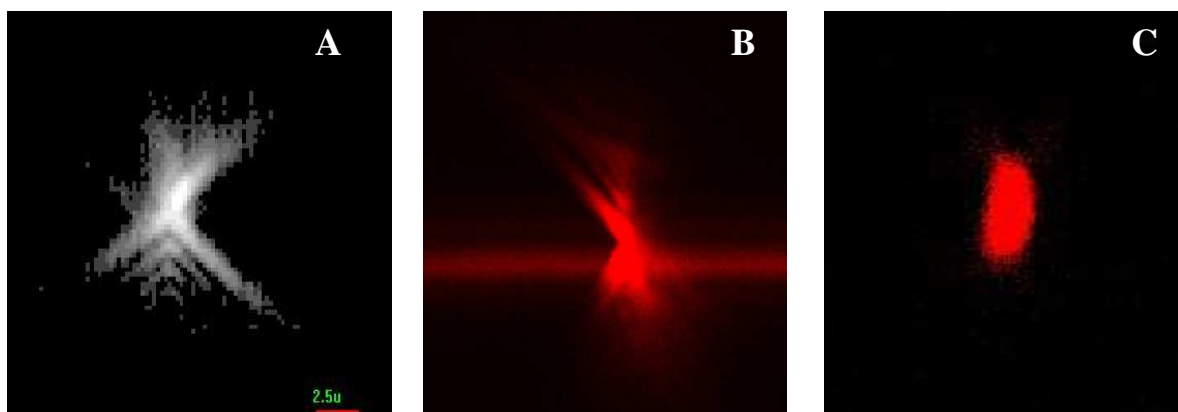
Au cours de notre projet, dans le but de caractériser le système, notre intérêt s'est plus particulièrement porté sur certains éléments constitutifs de ce système et certains paramètres, qui ont tous une influence directe et majeure sur la résolution du système et donc par conséquent, sur la qualité des images générées.

Test d'appréciation général de la qualité du système :

Comme nous venons de le dire, la qualité du système est primordiale car ses caractéristiques optiques (grossissement, corrections chromatiques et de sphéricité, ouverture numérique, alignement,...) et électroniques (PMT, système de balayage, pinhole...) ont une influence directe sur la qualité de l'image.

Le meilleur outil renseignant sur la qualité du système pris dans son ensemble est bien évidemment la PSF.

Nous avons voulu alors comparer la qualité globale en terme d'imagerie des différents systèmes disponibles au laboratoire. Nous avons donc procédé à la réalisation de PSF sur les trois systèmes suivants : microscope conventionnel à sectionnement optique Cellscan Scanalytic's (figure A), SP2 Leica mode monophotonique (figure B), et SP2 Leica mode multiphotonique (figure C). Les tests ont été effectués sur les mêmes billes fluorescentes (PSF, $0.17\mu\text{m}$).



*A_ Incrément en Z=0.25 μm /Bin1x1/filtre neutre 50%/temps d'intégration1.9s/Objectif 60x
B_Incrément en Z=0.25 μm /Beam expander3/Objectif 63x/ Zoom=8/ Moyennage par
plan=3/Pinhole=600 μm / PMTgain=457/vitesse de balayage=400Hz
C_Incrément en Z=0.25 μm /Beam expander3/Objectif 63x/ Zoom=8/ Moyennage par
plan=3/Pinhole=600 μm / PMTgain=899/ vitesse de balayage=400Hz*

On constate que la meilleure PSF est obtenue pour le système SP2 Leica en mode multiphotonique. En effet, la PSF (figure C) présente l'allure la plus proche de celle de la bille observée.

La PSF la moins bonne est celle effectuée sur le système Cellscan. Ceci est normal car au niveau des microscopes conventionnels à sectionnement optique, l'excitation n'est pas confinée au plan confocal car ils ne possèdent pas de pinhole à l'excitation.

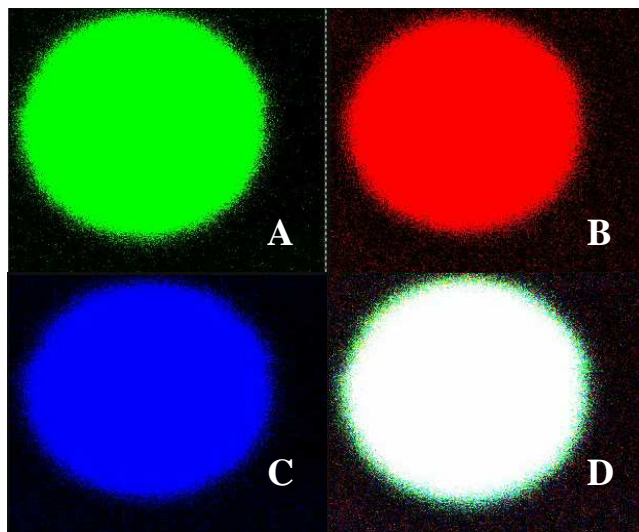
La PSF donne donc une idée générale des performances du système optique : le système le plus performant ici est donc le microscope confocal en configuration multiphotonique mais tous présentent des défauts (exemple, alignement du système optique,...).

La PSF ne renseigne en aucun cas sur la nature de ces défauts, des tests complémentaires seront donc nécessaires.

Mais on peut constater que pour autant, l'image d'une bille n'est tout de même pas une bille. On comprend ici tout l'intérêt des méthodes de restauration d'images... Seulement ces méthodes permettent de contourner le problème mais en aucun cas de corriger le système.

Alignement des canaux :

Pour générer des images de haute qualité, l'alignement des canaux est primordial. La réalisation d'images d'une même bille émettant par exemple dans le bleu, le vert et le rouge (« Multispeck », Molecular Probe) permet de tester cet alignement. En effet, si les clichés de la même bille effectués simultanément via trois PMT différents ne sont pas exactement superposables, le système n'est pas correctement aligné.



*Exemple de test d'alignement des canaux effectué en 2002 sur le microscope SP2 Leica
A_image de la bille fluorescente recueillie par le PMTn°1
B_image de la bille fluorescente recueillie par le PMTn°2
C_image de la bille fluorescente recueillie par le PMTn°3
D_superposition des trois canaux*

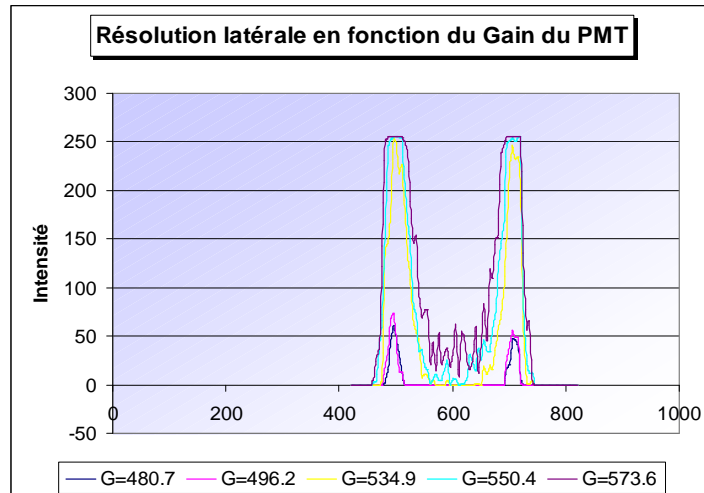
Ce test présente un intérêt majeur : les images réalisées dans le but d'études portant sur la colocalisation subcellulaire mèneront à des interprétations totalement erronées si le système n'est pas au préalable parfaitement aligné.

Détecteurs :

Le système de détection est constitué par des « PhotoMultiplificateurs Tubes » très sensibles. Le détecteur idéal doit présenter une linéarité sur une large bande de fonctionnement et doit être très sensible avec peu de bruit pour les longueurs d'onde mesurées. Les deux paramètres accessibles à l'utilisateur sont le gain et l'offset des PMT, nous avons alors testé l'influence du gain sur la résolution latérale et spatiale.

Tests de résolution latérale en mode monophotonique :

La méthode utilisée est celle explicitée en première partie de ce rapport (calcul du CV)



*Profils d'intensité dans le plan focal sur une bille fluorescente creuse de diamètre $4\mu\text{m}$ type Tétraspек (Molecular Probe) pour des valeurs de gain différentes (Offset=-47.8).
Objectif 63x/Beam expander 3/Zoom=3.29/Vitesse de balayage=400Hz/Moyennage par plan=2/ouverture de pinhole=100 μm*

Au vu des courbes, les informations ayant été « tronquées » pour des fortes valeurs de gain, nous ne pouvons exploiter ces courbes comme il se doit.

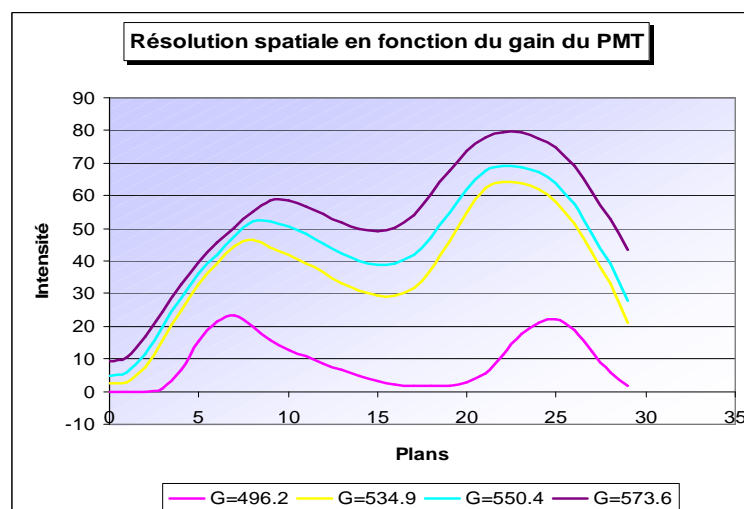
Il semblerait que plus le gain diminue, plus le CV est faible, ainsi meilleure est la résolution latérale.

Pour des gains trop faibles, on remarque que le signal n'a été détecté qu'en partie...l'information en terme d'intensité est donc erronée !

Par ailleurs, plus le gain des PMT est élevé, plus les valeurs de largeur de pics sont élevées et ceci se traduit par des images de plus en plus bruitées.

Test de résolution spatiale en mode monophotonique :

Acquisition de séries d'images d'une même bille pour des valeurs de gain de PMT différentes.



*Profils d'intensité des séries effectuées sur une bille creuse de type Tétraspек (Molecular Probe) de $4\mu\text{m}$ de diamètre.
Objectif 63x/Beam expander 3/Zoom=3.29/Vitesse de balayage=400Hz/Moyennage par plan=2/ouverture de pinhole=100 μm /Z-incrément=0.42 μm /30 plans par série*

Chaque courbe représente plan par plan, l'intensité totale de l'image du plan en fonction du gain du PMT. Tout comme pour la résolution latérale, on constate des pics qui sont moins prononcés mais qui représentent cette fois-ci la résolution axiale.

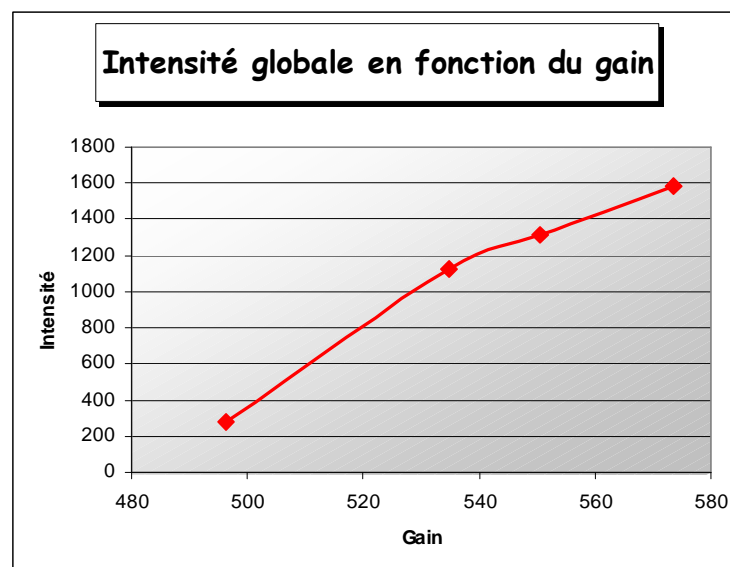
D'après le calcul de la déviation standard, on a obtenu les valeurs suivantes de diamètre estimé en Z de la bille :

Gain	496.2	534.9	550.4	573.6
Diamètre estimé (en μm)	8.9	9.53	17.48	19.35
Erreur relative	55%	58%	77%	79%

On constate que le diamètre estimé de la bille est largement supérieur au diamètre réel, et ce, même pour un gain de PMT faible. On se rend compte que les paramètres à l'acquisition n'ont pas été utilisés dans des conditions optimales pour obtenir un diamètre estimé correct.

Influence du gain des PMT sur l'intensité :

En effectuant l'intégrale de chacune des courbes précédentes, on peut exprimer l'intensité globale de la bille en fonction de chaque valeur de gain de PMT. Plus le gain des PMT est élevé, plus l'intensité globale est importante.



On observe alors une certaine linéarité entre l'intensité globale et le gain du PMT. Ce résultat nous semble normal car plus on augmente le gain du PMT plus il est sensible et donc plus il sera apte à détecter du signal.

On comprend bien l'intérêt qu'apportent ces courbes en terme d'information sur la résolution latérale (calcul de la déviation standard ou CV = largeur à mi hauteur de pic) ainsi qu'en terme de précision du système (calcul de la largeur de la couronne et du diamètre de la bille qui sont des paramètres connus).

On peut dire que plus on augmente le gain des PMT, plus l'image est bruitée (CV = mesure directe du rapport signal sur bruit). Cependant, il faut bien évidemment tenir compte de différents paramètres influençant la qualité des images et pouvant rendre fausses les mesures et les interprétations : le niveau d'irradiation, le phénomène de bleaching (diminution exponentielle lente et progressive de l'intensité de fluorescence = extinction), les mouvements de bille latéraux et axiaux...

Remarque :

Il est à noter que la place (physiquement parlant) des PMT dans le système conditionne également le CV. Ainsi pour une raie laser, un PMT peut être plus efficace que les autres : ceci dépend de la façon dont la lumière est réfléchi au sein du système SP2 Leica. (En utilisant le PMT le plus efficace, le CV de l'image est diminué plus on règle des valeurs de PMT faibles.)

Ouverture du pinhole :

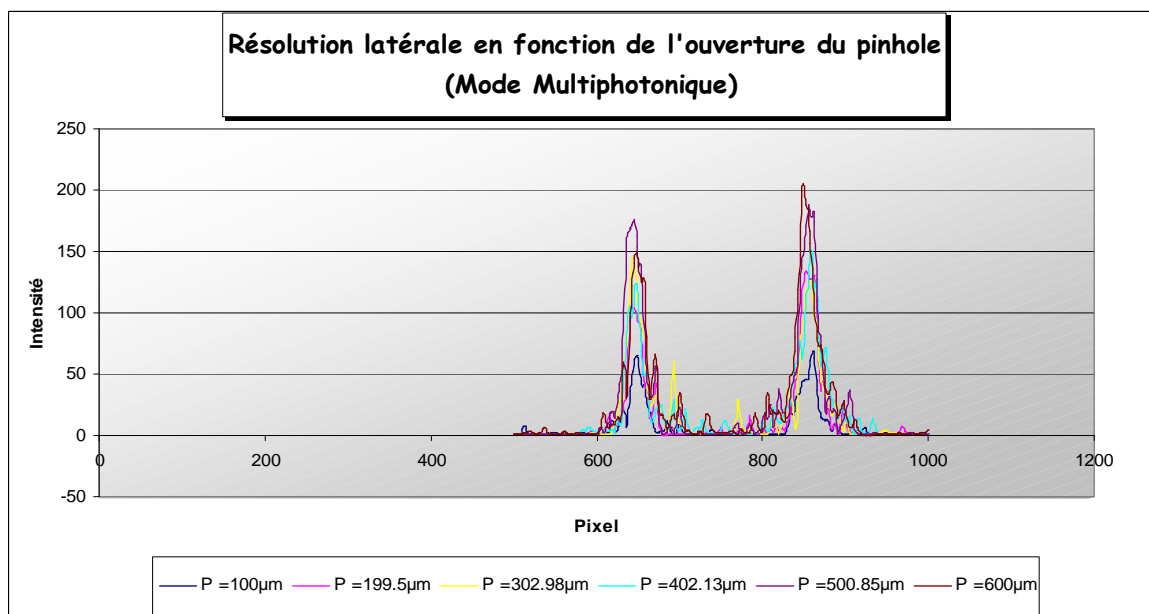
Les pinholes sont responsables de la réjection de la lumière axiale hors plan focal et de la réjection des phénomènes de diffraction latérale qui s'y ajoutent. Leur ouverture va conditionner en grande partie la qualité optique de l'image.

Nous avons testé en mode monophotonique ainsi qu'en mode multiphotonique l'effet de l'ouverture du pinhole sur la qualité de détection du signal émis par des billes fluorescentes de diamètre 6µm.

Nous avons effectué des tests similaires à ceux effectués pour l'étude de l'effet du gain des PMT sur la résolution axiale et latérale, sauf que bien évidemment le seul paramètre variant est l'ouverture du pinhole.

Tests sur la résolution latérale :

Les seules courbes exploitables que nous avons pu obtenir ont été réalisées en mode multiphotonique (même remarque que pour les courbes de gain des PMT, les courbes sont tronquées !).



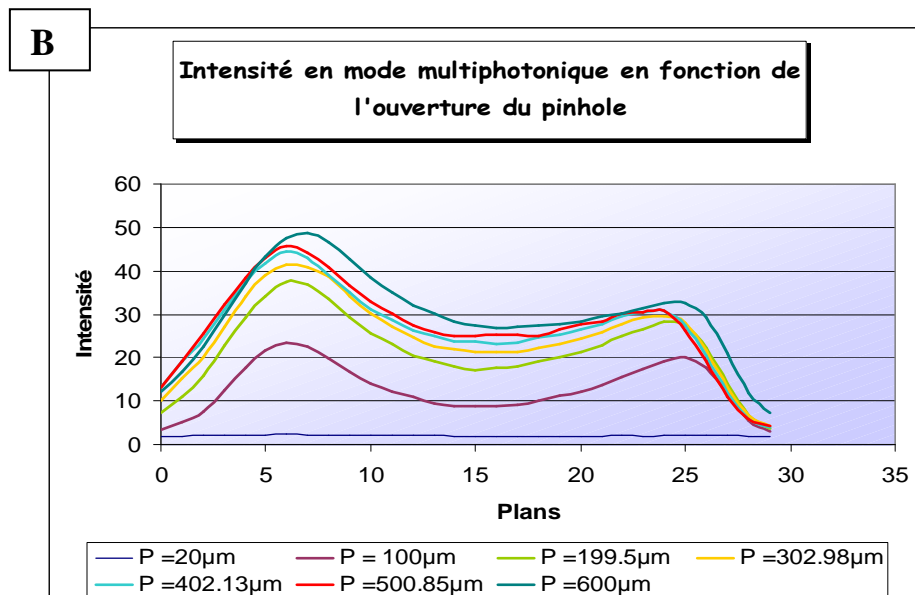
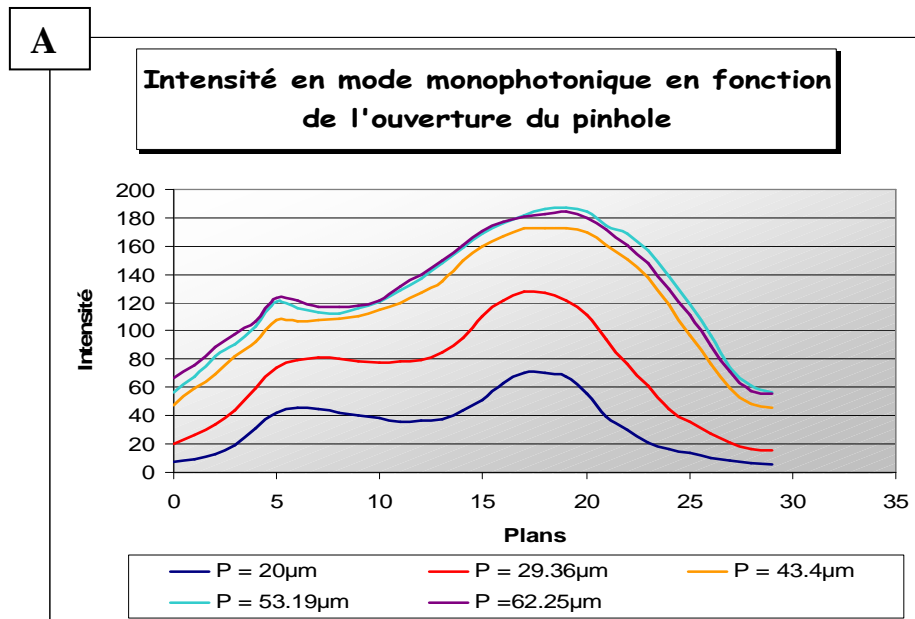
Profil d'intensité d'une bille de diamètre 6µm creuse de type Tétraspick (Molecular Probe) pour des valeurs d'ouverture de pinhole (P) différentes.

Objectif 63x/Beam expander 3/Zoom=3.3/Vitesse de balayage=400Hz/Moyennage par plan=2/PMTgain=418/PMTOffset=0

L'allure de la courbe est bien caractéristique d'une bille creuse pour les valeurs de pinhole supérieures à 400 μm . En dessous de cette valeur les données sont tronquées, conséquence de la restriction à la détection liée à la fermeture du pinhole (le signal émis n'est détecté qu'en partie). Au delà d'une certaine valeur d'ouverture de pinhole, ce qui est modifié, c'est l'intensité des pics mais pas réellement la largeur à mi hauteur de ces pics, donc la résolution latérale n'est pas affectée.

Le mode multiphotonique doit donc être mis en œuvre avec la plus grande ouverture de pinhole afin de ne pas affecter la précision des mesures effectuées.

Test de résolution spatiale en mode monophotonique et multiphotonique :



Profils d'intensité des séries effectuées sur la bille creuse de type Tétraspick (Molecular Probe) de 6 μm de diamètre en mode monophotonique (figure A, PMTgain=418, Puissance laser 20%) et en mode multiphotonique (figure B, PMTgain=720). Profils établis pour des valeurs d'ouverture de pinhole (P) différentes.

Objectif 63x/Beam expander 3/Zoom=3.3/Vitesse de balayage=400Hz/PMToffset=0/Moyennage par plan=2/Z-incrément=0.35 μm /30 plans par série

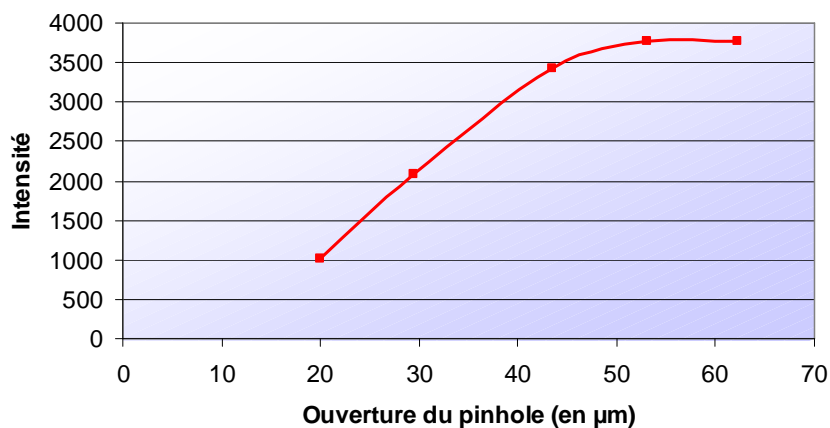
Ces courbes ont des profils d'intensité type de billes creuses mais ces profils sont dans nos deux cas asymétriques : cette anomalie peut être attribuée par exemple à une dissymétrie du marquage, ou au phénomène de bleaching...

En mode monophotonique, les contraintes liées à la saturation nous ont limités à prendre des séries pour des ouvertures de pinhole faibles. Afin de limiter cette saturation, il est possible de diminuer le gain du PMT mais nous ne sommes plus alors dans les mêmes conditions expérimentales et les séries ne sont alors plus comparables.

En effectuant l'intégrale de chacune des courbes précédentes, on peut exprimer l'intensité globale de la bille en fonction de l'ouverture du pinhole et voir s'il y a une corrélation directe ou pas.

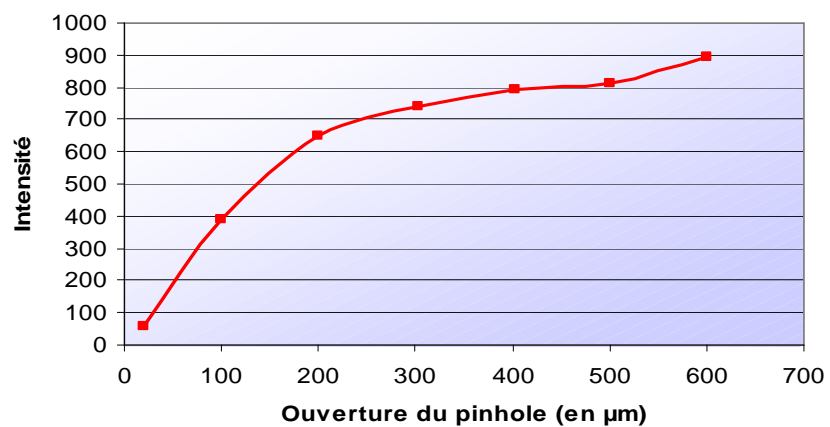
A

Intensité globale en fonction de l'ouverture du pinhole (Mode Monophotonique)



B

Intensité globale en fonction de l'ouverture du pinhole (Mode Multiphotonique)



Sur la figure A, pour des valeurs d'ouverture de pinhole inférieures à 50 μ m, l'intensité croît de façon linéaire, ceci est dû à la qualité intrinsèque du marquage de la bille.

Cependant, pour des valeurs d'ouverture de pinhole supérieures à 50 μ m, l'intensité tend à devenir constante. Ceci peut être expliqué par plusieurs facteurs : la bille subit des phénomènes d'extinction et/ou ceci est la preuve qu'il n'y a pas de relation directe entre la quantité de fluorescence recueillie et l'ouverture du diaphragme.

L'intérêt d'avoir fait cette courbe en mode multiphotonique est de pouvoir mettre en évidence les conditions optimales d'ouverture de pinhole en fonction du mode utilisé.

En effet, on remarque que la valeur d'intensité pour un pinhole totalement ouvert en mode multiphotonique correspond à la valeur d'intensité pour un pinhole très peu ouvert en mode monophotonique.

Ceci suggère que l'illumination multiphotonique apporte par le biais d'un confinement de l'excitation uniquement au plan focal, le même niveau de signal strict qu'en mode monophotonique.

Fermer davantage le pinhole en mode multiphotonique (2P) diminue d'autant plus le niveau d'intensité utile. Etant donné qu'en configuration 2P le signal recueilli n'est que du signal utile (ne provient que du plan focal), alors fermer le pinhole n'aura pour effet que de limiter le recueil de l'information utile, c'est à dire affecter la dynamique de la réponse.

Source laser :

Puissance laser :

Un CLSM doit disposer de suffisamment de puissance laser pour pouvoir exciter l'échantillon. Plus la puissance laser sera élevée, plus le signal de fluorescence émis par l'échantillon sera intense. Cela est dû au fait que l'on va exciter plus de molécules de fluorophore. En revanche, au-delà d'une certaine valeur de puissance laser, l'intensité du signal devient constante, ce qui est normal car cela signifie que la totalité des molécules de fluorophores sont excitées et qu'on ne peut en exciter davantage.

Importance de la stabilité de la source laser :

La puissance laser peut varier entre 3% et 30% en fonction du moment et des conditions expérimentales. Il est important de caractériser cette variation car elle introduit des artefacts de mesure d'intensité dans les expériences réalisées.

De plus, la comparaison de performance entre systèmes n'est possible que si la puissance laser est maintenue constante.

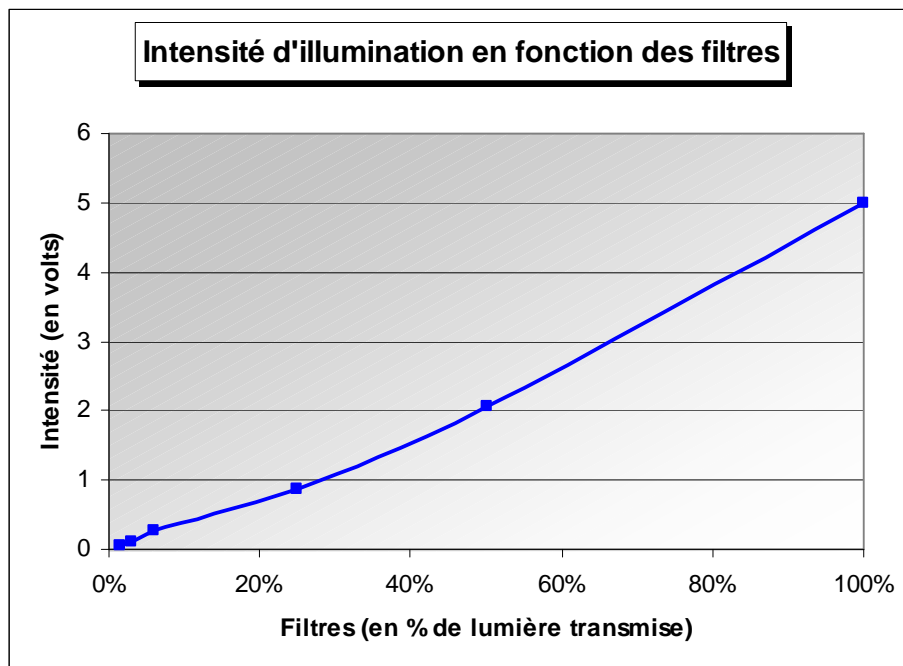
Illumination de l'échantillon :

Tout d'abord, il est intéressant de disposer de l'ordre de grandeur de la puissance laser reçue effectivement par l'échantillon en fonction des raies utilisées et de pouvoir évaluer la puissance maximale que peuvent supporter les échantillons biologiques vivants.

Mais surtout, la maîtrise d'irradiance (énergie reçue par unité de surface, en J.cm²) est nécessaire dans certaines études telles que : études des photosensibilisants, recherches en PDT (thérapie photodynamique),...

Donc il est indispensable de mettre en évidence l'existence d'une relation linéaire entre le pourcentage de puissance laser fixé par l'utilisateur et la puissance effectivement délivrée au niveau de l'échantillon et ce, pour chaque raie laser.

Dans un premier temps, nous avons effectué des mesures d'intensité d'illumination sur le microscope à sectionnement optique conventionnel disponible au laboratoire (Cellscan, (Scanalytic's)) à l'aide d'une photodiode PN (BPW20R, Vishay) couplée à un multimètre. Ce microscope est en réalité équipé d'une lampe à vapeur de mercure de 100W et ne pouvant faire varier directement l'intensité de la lampe, nous avons utilisé des filtres neutres de différentes valeurs (2 filtres de 50% et 1 filtre de 6%).



*Paramètres : filtre WU, diaphragme ouvert au 1/6^{ème}.
Décteur placé sur la platine.*

Cette courbe montre bien la linéarité entre le pourcentage de lumière transmise et l'intensité d'illumination de l'échantillon.

Les valeurs d'intensité sont données en volts (photodiode) et non pas en J.cm². Cependant ces valeurs peuvent être converties à l'aide d'une autre méthode, l'actinométrie, car les travaux ont déjà été effectués sur le microscope utilisé.

L'intérêt ici de l'établissement d'une telle correspondance est direct : la méthode d'actinométrie est une méthode complexe à mettre en œuvre alors que les relevés que nous avons effectués ne nécessitent de disposer que d'une photodiode.

Remarque :

Nous avons tenté d'effectuer des tests similaires sur le microscope confocal SP2 Leica en mode monophotonique avec la même photodiode puis avec un détecteur faible puissance (Newport, 818ST) mais il nous a été impossible de faire l'acquisition de valeurs de puissance laser stables.

En effet, les valeurs affichées par l'un et l'autre des détecteurs ne se stabilisaient pas : augmentation progressive des valeurs pendant plusieurs minutes puis diminution des valeurs lente et progressive. Nous avons alors émis plusieurs hypothèses à ce problème. Les paramètres qui pourraient influencer ces mesures sont :

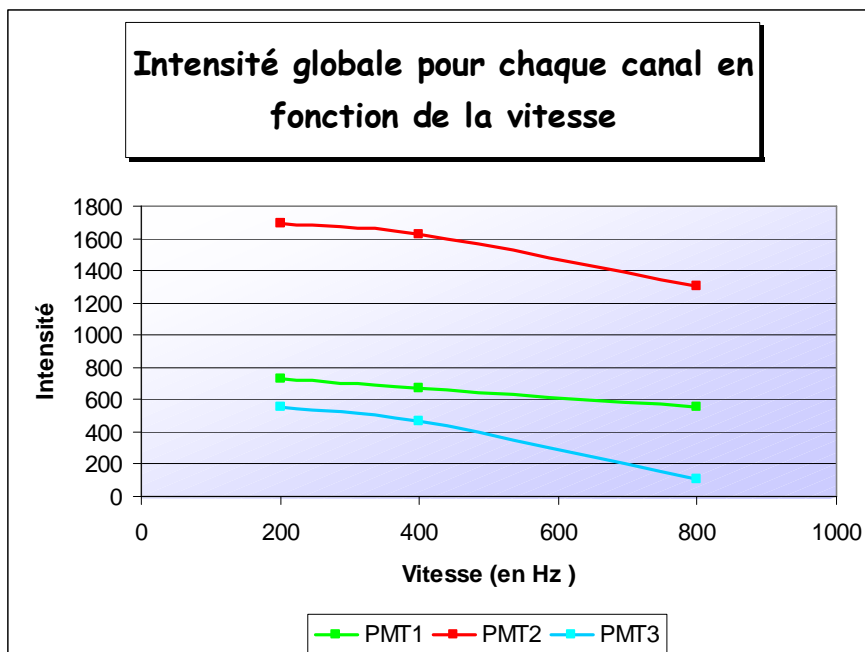
- fréquence d'échantillonnage du détecteur
- accumulation progressive de charges au niveau du détecteur
- modification de la réponse du détecteur par échauffements
- balayage

Vitesse de balayage :

Un paramètre auquel nous avons également accès est la vitesse de balayage.

En mode monophotonique, pour montrer l'influence de ce facteur, nous avons dans un premier temps réalisé des séries de coupes sur une même bille fluorescente de diamètre $4\mu\text{m}$ et ce, pour des valeurs de vitesse de balayage croissantes.

A partir de ces courbes, nous avons établi les profils d'intensité en Z (= courbe des intensités plan par plan) et avons procédé à l'intégration de chacune de ces courbes.



Intégrale de chaque courbe réalisée selon les paramètres suivants :

Objectif 63x/Beam expander 3/Zoom=3.82/Moyennage par plan=1/Z-incrément=0.35 μm /30 plans par série/Overture du pinhole=200 μm /PMT1gain341/PMT1offset=-0.8/PMT2gain= 352/PMT2offset= 11.3/PMT3gain= 545/PMT3offset= -41.9

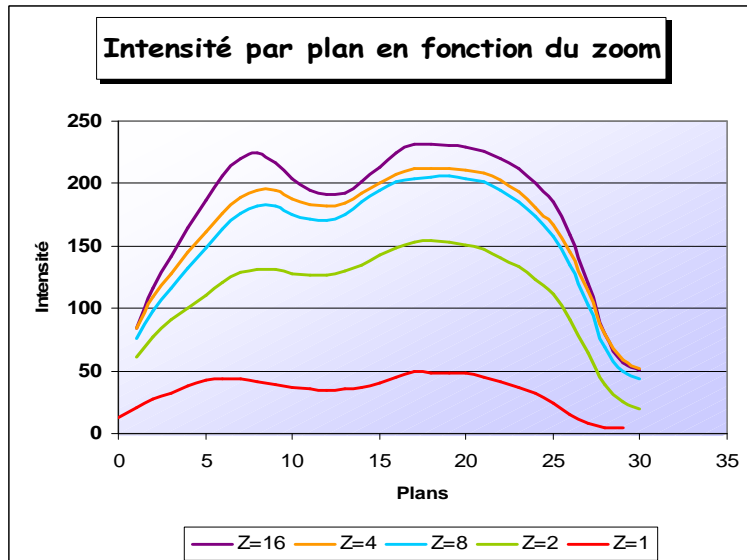
On constate que plus la vitesse de balayage est importante, plus l'intensité recueillie diminue. On prend moins le temps de recueillir le signal plus on augmente la vitesse de balayage donc, le temps de recueil par ligne influe sur la qualité de restitution de l'information.

Cependant peut survenir le phénomène d'Aliasing, c'est à dire une erreur de construction générée par un taux de balayage trop faible par rapport à la fréquence du signal.

La courbe du PMT1 n'est pas superposable sur les autres courbes. Cette différence pourrait peut-être bien aller dans le sens de la réflexion faite précédemment quant à la place physiquement parlant de chaque PMT au sein du système.

Zoom :

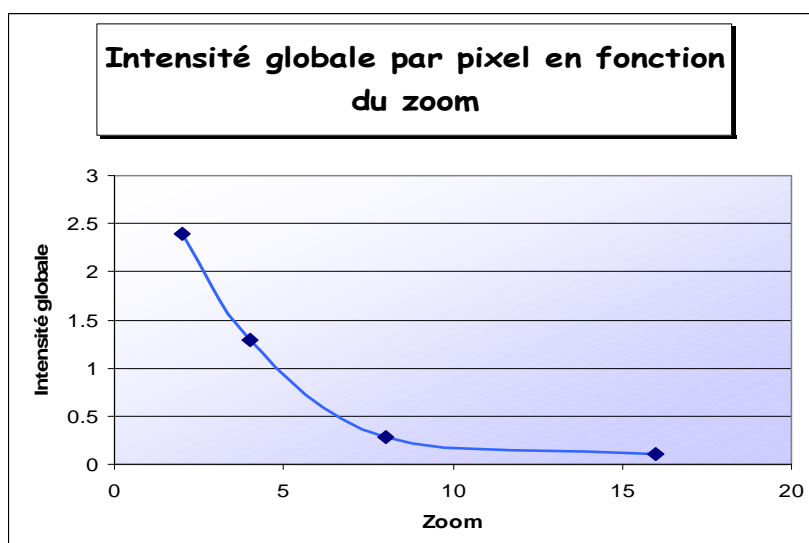
Nous avons utilisé des billes fluorescentes de diamètre $6\mu\text{m}$ et avons, de même que pour l'étude de la vitesse de balayage, effectuer des coupes sériées pour différentes valeurs de zoom en mode monophotonique.



*Objectif 63x/Beam expander 3/Vitesse de balayage=400Hz/Moyennage par plan=2/
Z-incrément=0.35 μm /30 plans par série/Overture du
pinhole=200 μm /PMT1gain495/PMT1offset=-47*

Normalement, les courbes devraient être des droites parallèles à l'axe des abscisses. Le zoom ne devrait donc avoir aucun effet sur l'intensité globale captée, il n'existe pas de relation entre le zoom et la quantité de fluorescence émise et détectée. Cependant comment expliquer ces variations d'intensité si n'est autrement qu'en évoquant la possibilité d'une éventuelle sursaturation des pixels lorsque le zoom est faible ?

Nous avons ensuite effectuer l'intégration de chaque courbe et avons ramener l'intensité globale par unité de surface (=pixel).



Augmenter le zoom revient à augmenter le nombre de pixels constituant l'image. Donc en rapportant l'intensité globale (intégrale de chaque courbe) par unité de surface, il est normal de constater que l'intensité moyenne par pixel est moindre, considérant que l'intensité globale reste la même quelque soit le zoom.

Conclusion :

Pour obtenir une meilleure qualité d'image, nous avons vu que :

- les valeurs du gain de PMT doivent être faibles et la détection doit être linéaire
- le pinhole doit être ouvert à son maximum en mode multiphotonique et à des valeurs inférieures à 100 μ m en mode monophotonique
- le système doit être aligné correctement
- la puissance laser d'excitation doit être maîtrisée, connue et stable
- la vitesse de balayage doit être réduite
- il faut également tenir compte du zoom

La liste des paramètres est loin d'être exhaustive...

De plus aucun de ces facteurs ne peut être considéré indépendamment des autres. En effet, tous les paramètres sont liés de façon plus ou moins directe et c'est ce que nous nous proposons de traiter en troisième partie.

Complexité du problème

Exposition de la complexité des interactions entre les différents paramètres :

Opposition pinhole/gain des PMT :

La fermeture du pinhole diminue le nombre de photons arrivant aux détecteurs, le système est alors moins efficace et moins sensible. Pour compenser le principe de confocalité, on peut augmenter la tension des PMT mais dans ce cas, on introduit plus de bruit (rapport signal sur bruit diminue).

Ces deux facteurs sont donc diamétralement opposés car la lumière émise par l'échantillon doit être réduite pour permettre le principe de confocalité mais doit être maximale pour réduire le bruit du système.

Opposition puissance laser/ gain des PMT :

Tout d'abord la puissance laser doit être suffisante pour pouvoir exciter l'échantillon. La réduction de la puissance laser d'excitation peut générer un problème de visualisation : pour compenser ce problème, il faut alors augmenter le gain des PMT pour pouvoir visualiser l'échantillon. Le rapport signal sur bruit sera donc là aussi diminué !

Par conséquent, seul un système optique qui est à son maximum d'efficacité (correctement aligné et qui fonctionne bien) peut autoriser l'utilisation de faibles puissances laser avec des gains de PMT faibles.

Opposition zoom/bleaching :

Le bleaching augmente en fonction du carré du zoom car le balayage s'effectue sur une surface plus petite. Donc pour grossir, il vaut mieux changer d'objectif pour minimiser les phénomènes de photodégradation.

Opposition gain des PMT/moyennage par plan /bleaching :

Pour des valeurs de PMT fixes, augmenter le moyennage par plan permet une amélioration du contraste et une amélioration du CV, donc des résolutions axiale et latérale. Cependant, ceci consiste à augmenter les temps d'exposition ce qui peut engendrer des phénomènes de bleaching.

Des valeurs élevées de gain de PMT augmentent le bruit. Pour compenser ceci on peut moyennner mais cela peut également bleacher l'échantillon.

Autres paramètres relatifs à la technique :

Influence de l'ouverture numérique :

Le cône de lumière entre le foyer et la lentille définit l'ouverture numérique (O.N), dont la valeur est fonction de l'indice de réfraction et de l'angle d'ouverture de l'objectif :

$$\text{O.N.} = n \sin\alpha$$

α : demi-angle d'ouverture de l'objectif (cône)

n : indice de réfraction du milieu

D : profondeur de champ

Influences de l'ouverture numérique :

A partir de profils d'intensité (selon l'axe Z ou dans le plan XY) en fonction de différentes valeurs d'ouverture numérique, on peut comprendre l'influence de cette dernière sur la résolution du système qui est déterminée, comme nous l'avons vu précédemment, en « mesurant » la largeur à mi hauteur de pic :

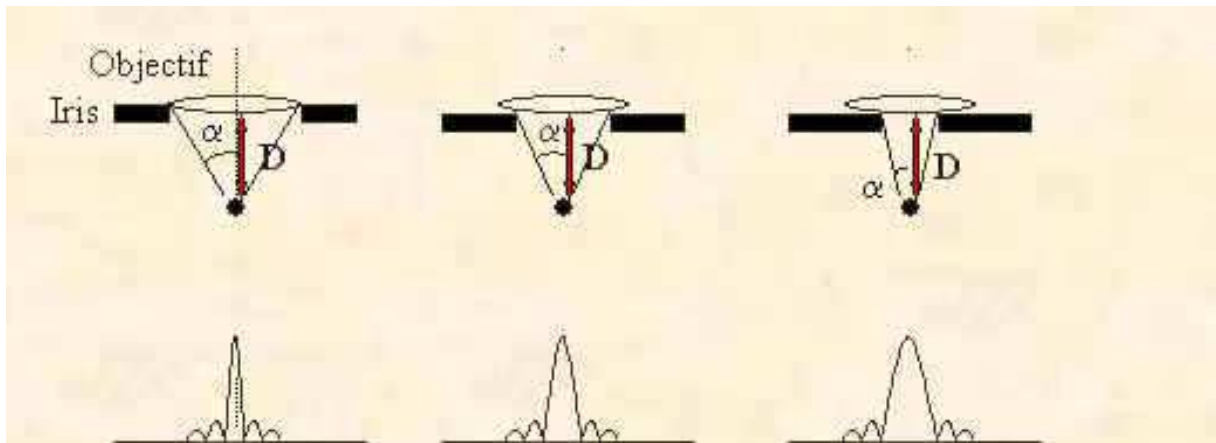


Schéma montrant l'influence de l'ouverture numérique sur la résolution latérale.
(D : profondeur de champ)

$$R_{\text{latérale}} = 0,4 \lambda / \text{O.N.}$$

$$R_{\text{axiale}} = 1,4 n \lambda / \text{O.N.}^2$$

λ est la longueur d'onde

n est l'indice de réfraction du milieu

O.N : ouverture numérique de l'objectif

Brillance :

L'ouverture numérique influence également la brillance de l'image, c'est à dire la densité de photons émis par unité de surface et traduit la capacité de l'objectif à concentrer la lumière. Plus α augmente, plus la brillance est grande, et meilleure est la qualité de l'image.

L'immersion :

Les milieux traversés (lamelle, milieu de montage, spécimen) par le rayonnement lumineux émis par l'échantillon doivent avoir des indices de réfraction les plus proches possibles afin d'éviter que le phénomène de réfraction* soit tel que ce faisceau ne parvienne pas jusqu'à l'objectif.

L'immersion optimise la collecte de l'information par l'objectif et la résolution en permettant de limiter la déviation des rayons lumineux émis par l'échantillon :

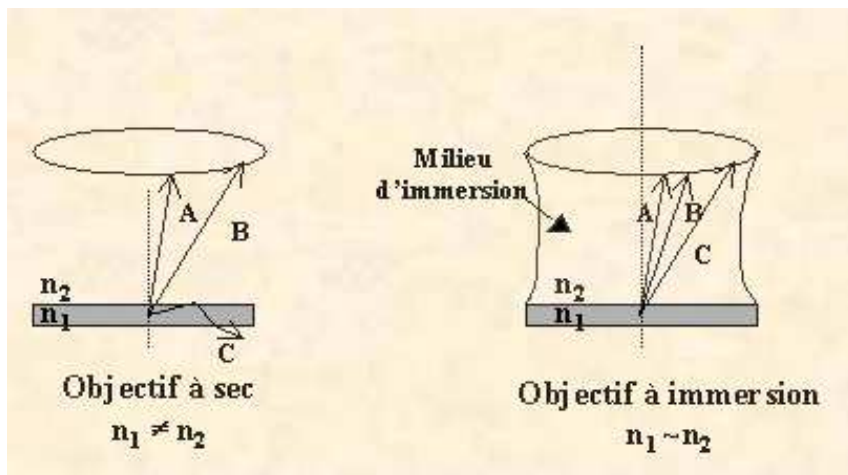


Illustration de l'influence de la différence entre les indices de réfraction (n_1 et n_2) sur le trajet lumineux.

En pratique, l'harmonisation des indices de réfraction des milieux traversés ne peut pas toujours être obtenue : exemple un milieu de montage aqueux et un objectif à huile ont des indices de réfraction différents.

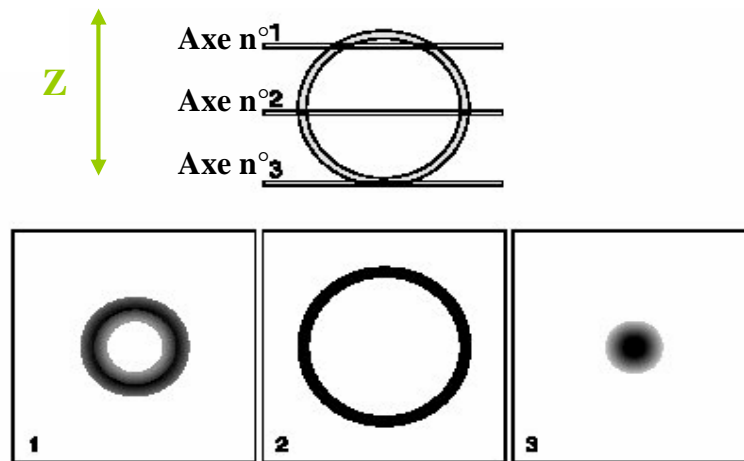
Remarque :

Les objectifs sont conçus pour opérer à une certaine distance de travail, pour une épaisseur de lamelle donnée (0.17 mm), avec des indices de réfractons précis, avec un liquide d'immersion ou pas,... Si les conditions ne sont pas respectées, la pile de sections optiques apparaîtra soit étirée, soit tassée selon l'axe Z.

* Réfraction : changement de direction d'un faisceau lumineux lorsque celui-ci passe d'un milieu A à un milieu B ayant des indices de réfraction différents.

Repositionnement du système de déplacement en Z nanométrique piézoélectrique :

Il est indispensable de s'assurer de la précision et de la reproductibilité des déplacements selon l'axe Z de la sur-platine car ce facteur peut énormément influencer les images de fluorescence, les profils d'intensité,...exemple :



Lors d'acquisition en coupes sériées, si la platine se repositionne mal (exemple : axe n°1 au lieu de axe n°2), on comprend d'après les schémas que l'image et l'intensité globale seront différentes.

Taille de champs / pixels :

La qualité de l'image dépend bien sûr du nombre et de la taille des pixels, de leur sensibilité et de leur profondeur (8 à 16 bits), même si la diffraction limite la résolution de l'imagerie optique.

La taille du champ (nombre de pixels contenus dans l'image) influence donc la résolution latérale.

Bruits intrinsèques :

Le système composé surtout d'optiques et d'électronique, crée de part sa nature un bruit de fond diminuant le rapport signal sur bruit de l'image ainsi obtenue :

- courant d'obscurité de la caméra,
- bruit électronique dans le système de mesures,
- lumière parasite d'excitation,
- lumière parasite due à des « fuites » dans le système optique,
- autofluorescence de l'optique...

Eclairage :

En dehors des paramètres cités dans la deuxième partie concernant la source d'excitation, on peut également citer :

- longueur d'onde d'excitation

- homogénéité de l'éclairage du champ de mesure (en terme d'intensité)
- centrage de la source au niveau du champ de mesure

Erreurs informatiques :

Les erreurs informatiques sont essentiellement des erreurs de reconstruction mathématique 3D.

Paramètres externes :

Relatif à l'environnement :

La température

La température influence les détecteurs qui pourraient produire des électrons venant de réactions thermiques (dus à la température) et non pas des électrons venant des photons émis par l'échantillon.

L'indice de réfraction varie lui aussi en fonction de la température : il est important de travailler dans une pièce à température constante ou mieux, dans une pièce climatisée à 21°C car les indices de réfraction sont définis pour une température de 21°C.

Elle engendre également des mouvements de convection des fluides (influe sur l'immobilité de l'échantillon).

Les poussières fluorescentes sur l'optique du microscope.

Le taux d'hydrométrie.

Les vibrations.

Relatifs à l'échantillon :

Le photobleaching qui caractérise la perte de fluorescence du spécimen pendant l'excitation.

Le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes proches.

Les longueurs d'onde d'émission et d'excitation de l'échantillon.

L'autofluorescence.

La quantité de marqueur utilisé quand il y a lieu d'être.

La fréquence du signal émis.

La répartition non-uniforme de la sonde dans le champ de mesure due à :

- concentration de la sonde
- milieu de montage
- déplacements axiaux et latéraux de la bille

Conseils d'utilisation :

Pour obtenir une bonne image confocale, il est nécessaire de suivre deux principes :

- ajuster l'ouverture du pinhole, qui est la première des choses à régler afin de produire une image confocale proprement dite
- ajuster les autres paramètres (la puissance laser, la tension des PMT, le moyennage, vitesse de balayage, le zoom) afin de produire une image avec le moins de lumière possible venant frappé l'échantillon afin d'amoinrir la photodégradation des sondes fluorescentes.

Etapas à suivre quant aux réglages des paramètres d'acquisition :

- 1. Grande ouverture de pinhole si expérience effectuée en mode multiphotonique.**
- 2. Ouverture de pinhole <100µm si expérience effectuée en mode monophotonique.**
- 3. Diminuer la vitesse de balayage (ce qui revient à augmenter le moyennage par plan puisque le faisceau laser reste plus longtemps sur chaque pixel)**
- 4. Diminuer les temps d'exposition**
- 5. Augmenter la puissance laser**
- 6. Réduire les gains des PMT**
- 7. Taille de champ et zoom afin d'obtenir la résolution latérale désirée (dans les limites du système)**
- 8. Régler la position en Z pour être au plan focal**
- 9. Supprimer toute lumière extérieure parasite / minimiser certains éclairages**

Ces réglages doivent être effectués en tenant compte des interactions des paramètres vues précédemment quant à la qualité de l'image.

Avant toute acquisition :

- respecter le temps de préchauffage du système
- laisser le temps à l'échantillon de se déposer contre la lamelle (pour des milieux de montages fluides)
- vérifier l'alignement des canaux
- vérifier les réglages des gains et offsets des PMT utilisés pour éviter toute saturation.

Contraintes de préparation :

- préservation de la structure 3D des échantillons (fixation, perméabilisation)
- absence de mouvement des cellules (cellules immobilisées)
- absence de compression lors de la mise au point
- addition d'« anti-fading »
- quantité de fluorophore connue avec précision
- qualité du milieu de montage et du prélèvement de l'échantillon

Il est également conseillé de :

- disposer d'une table anti-vibration pour éviter les vibrations mécaniques.
- mesurer le CV initial et d'observer régulièrement la façon dont change le CV afin de savoir ou de pouvoir décider d'éventuels remplacement de pièces, parce que les PMT se dégradent au fur et à mesure du temps.
- déterminer la résolution axiale à nouveau à chaque changement de pièces.
- effectuer des contrôles et des réajustements d'alignement réguliers de plus la tête de balayage
- travailler dans une pièce climatisée à 21°C

Conclusion :

La complexité de la caractérisation d'un système prend place en ce que les paramètres sont nombreux, variés, et « interconnectés ».

Les facteurs déterminant la qualité d'une expérience sont donc de différentes natures. On comprend qu'il ne suffit pas de disposer d'un système performant et sensible, ni d'être un bon technicien ou un bon biologiste. Ces trois conditions doivent être remplies pour la réalisation d'images de très haute qualité.

La maîtrise de tous ces paramètres est difficilement accessible et seule l'expérience permet d'avoir le recul nécessaire pour l'établissement des tous les compromis à effectuer pour la réalisation d'images, pas simplement « belles » mais surtout de très haute qualité !

Conclusion

Le but de la caractérisation d'un système est d'évaluer son degré de sensibilité et de performance, éléments directement influencés par de nombreux paramètres.

Certains de ces paramètres sont opérateurs dépendant (réglages lors de l'acquisition) et donc leur influence est minimisable, d'autres ne sont que le constat de l'efficacité ou de l'inefficacité du système ou même la résultante de la technique proprement dite (champ d'illumination plus petit = meilleur confinement en mode multiphotonique) et dans ce cas, pour s'affranchir de ces paramètres, le système doit être corrigé ou une autre méthode doit être utilisée. Or ceci nécessite bien souvent l'intervention du service de maintenance constructeur (contrats de maintenance).

On comprend bien tout l'intérêt de l'assurance qualité sur un CLSM. Elle est essentielle pour assurer la performance du système et la production de données justes, précises et reproductibles.

L'assurance qualité se traduit notamment par la réalisation de caractérisations régulières du système et par la formation du personnel.

Cependant la caractérisation d'un système n'est pas à la portée de tout utilisateur et nécessite donc des compétences particulières, ainsi qu'un certain recul.

Nous avons pu nous même le constater lors des expérimentations que nous avons réalisées !

Bibliographie

Combining 2-photon excitation with fluorescence lifetime imaging.

H.C.Gerritsen, J.M.Vroom, C.J.De Graun (1999)

Comparizon of wide-field/deconvolution and confocal microscopy for 3D imaging.

P.J.Shaw (1995)

**Comparizon of wide-field/deconvolution and confocal microscopy in bioengineering.
Interest of multi-photon microscopy in the study of articular cartilage.**

D.Dumas, L.Grossin, G.Cauchos, M.Gentils, R.Santus, J.F.Stoltz.

Computational Deblurring of fluorescence Microscope Images

Peter J. Shaw (1998)

Evaluation of Confocal Microscopy System Performance

Robert M. Zucker and Owen Price (2001)

Fluorescent imaging in living systems.

Nigel.J.Emptage (2001)

Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM).

T.W.J.Gadella, Microscopy Center (1997)

Fluorescence lifetime imaging microscopy : instrumentation and application.

Theodorus W.J.Gadella Jr (1999)

Microscopie 3D de fluorescence

Cours d'IUP Licence/ D.Dumas (2001-2002)

Modèles généraux de formation d'images et leurs solutions itératives.

Thèse : Déconvolution 3D orientée vers la reconstruction d'objets biologiques observés en microscopie optique de fluorescence.

Statistical Evaluation of Confocal Microscopy Images

Robert M. Zucker and Owen T. Price (2001)

TCSPC Laser scanning microscopy.

Becker & Hickl GmbH (2002)

Webographie

confocal.medecine.uhp-nancy.fr

newport.com

vishay.com

probes.com