

## Caractérisation du montage

### IV.1 – Résolution spatiale

Dans un premier temps, il est indispensable de s'intéresser aux performances spatiales de notre dispositif, afin de déterminer le grossissement et la résolution de notre montage.

#### IV.1.1 - Résolution latérale

Nous quantifions d'abord la résolution latérale du dispositif. C'est une étape importante qui nous permet de déterminer la taille de ce que l'on observe et de connaître les limites de notre dispositif. Nous commençons par imager une mire avec les deux voies de détection. Cette mire USAF est fournie par Edmund avec la taille de tous les motifs. Ceux imagés sur la figure 3-22 sont les plus petits, avec un nombre de paires de lignes par mm de respectivement 228, 203 et 181.

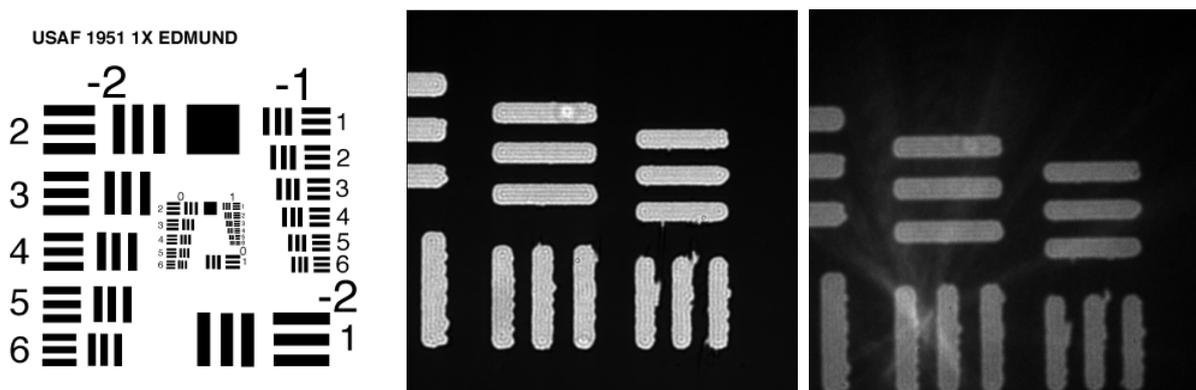


Figure 3-22 : mire utilisée dans les mesures de calibration. A gauche, schéma du constructeur, au centre, image obtenue sur l'EMCCD, à droite, image obtenue sur la CCD après le HRI.

A partir de ces images, il nous est possible de mesurer le grandissement. Nous trouvons qu'un pixel de la caméra EMCCD correspond à 91 nm dans le plan objet, et qu'un pixel de la caméra CCD (après le HRI) correspond à 87 nm. Nous nous assurons rapidement, que dans les deux cas, cette valeur est proche de celle que l'on peut retrouver par le calcul.

Pour l'EMCCD, un pixel mesure 16  $\mu\text{m}$  de côté, et on trouve un grandissement de  $\frac{16}{0,091} \approx 176$  ;

et pour la CCD, un pixel mesure  $6,45 \times 2 = 12,90 \mu\text{m}$  de coté (à cause du binning), et par conséquent on trouve :  $\frac{12,9}{0,087} \approx 150$ . Or l'objectif est un 60x et le télescope que nous avons

construit a un grandissement d'environ 3, ce qui au total fait un grandissement effectif autour de 180. Les valeurs mesurées nous paraissent donc cohérentes, étant donné que nous ne connaissons le grandissement effectif ni de l'objectif, ni de nos télescopes. Nous disposons dès lors d'une calibration spatiale pour toutes nos images, en intensité ou en durée de vie.

Ensuite, nous mesurons la réponse percussionnelle de notre dispositif. Pour cela, nous observons des microsphères Invitrogen de 100 nm excitées à 505 nm et qui fluorescent à 515 nm. Nous les observons avec le cube GFP (filtre pour l'excitation centré à 472 nm avec une largeur de 30 nm, filtre pour la détection centré à 520 nm avec une largeur de 35 nm). Il est intéressant de constater que, dans les deux cas, l'image de cette bille couvre plus d'un pixel. Ceci signifie que, grâce au télescope x3, la résolution est limitée par l'objectif et non pas par l'intensificateur, même si ce dernier la dégrade un peu.

Sur l'EMCCD, nous trouvons que la largeur à mi-hauteur de l'image vaut (en moyenne pour 20 mesures)  $350 \pm 20$  nm dans le plan objet. Sur la CCD, la résolution est un peu moins bonne puisque nous trouvons une largeur à mi-hauteur moyenne (pour 20 mesures) de  $395 \pm 20$  nm (une des 20 mesures réalisées est rapportée figure 3-23).

D'après la théorie (chapitre 1, p 27), le rayon de la réponse percussionnelle mesure  $\frac{0,61 \times \lambda}{ON} = \frac{0,61 \times 515}{1,45} = 217 \text{ nm}$ . Etant donnée la forte ouverture numérique de l'objectif, et le

nombre d'éléments optiques nécessaires à sa fabrication pour atténuer les nombreuses aberrations, notamment chromatiques, nous ne sommes pas étonnés de ne pas être limités par la diffraction. De plus, des éléments supplémentaires ajoutés sur le trajet optique (et notamment une lentille de tube incluse dans le bâti et totalement inconnue) peuvent dégrader cette résolution. De même, on s'aperçoit que la présence de l'intensificateur altère de manière sensible la résolution latérale. Pour l'observation d'échantillons biologiques comme des cellules, cette résolution latérale est néanmoins suffisante.

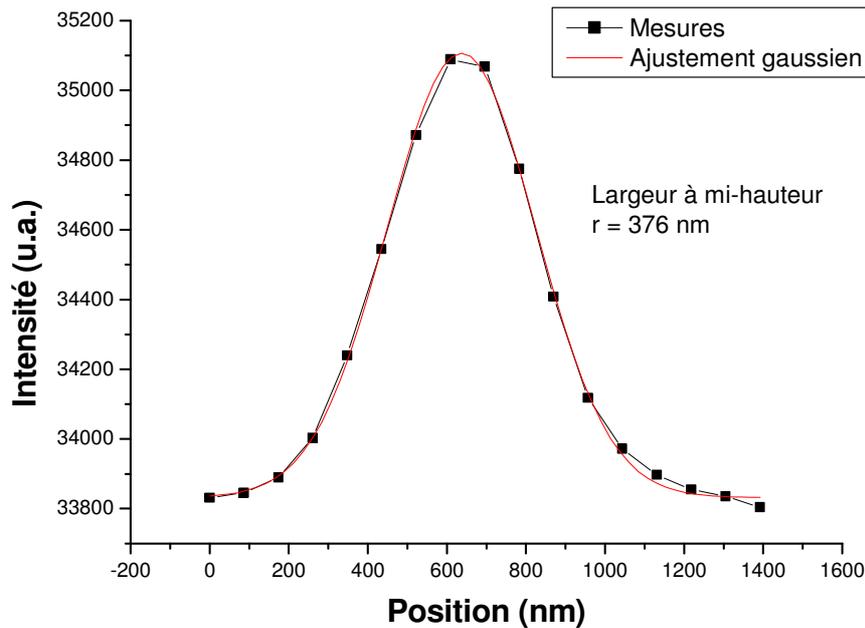


Figure 3-23 : profil d'intensité d'une bille de 100 nm observée sur la voie résolue en temps (HRI+CCD). La mesure de la largeur à mi-hauteur (376 nm dans ce cas) nous donne la réponse percussionnelle latérale de notre dispositif d'imagerie.

### Sectionnement optique et résolution axiale

Nous nous intéressons dorénavant à la résolution axiale (ou en profondeur) de notre microscope TIRFLIM. Pour commencer, nous présentons les premières images TIRF en intensité sur des cellules vivantes (figure 3-24), pour montrer la qualité des images obtenues avec cette technique.

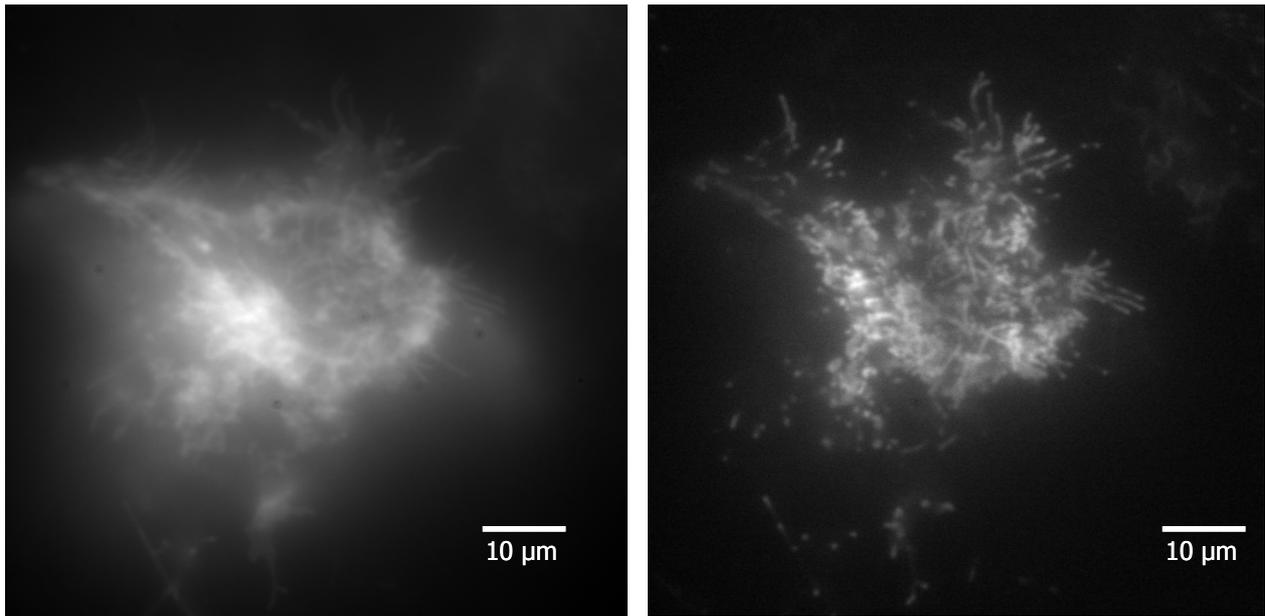


Figure 3-24 : image en épifluorescence classique (à gauche) et en TIRF (à droite) de cellules HEK-293 avec une transfection stable CB1R-GFP. Images obtenues avec la caméra EM-CCD.

Nous observons ici une lignée de cellules HEK 293 (Human Embryonic Kidney), qui ont été transfectées avec des récepteurs cannabinoïdes de type I marqués à la GFP (CB1R-GFP) de manière stable (voir le quatrième chapitre sur les applications). Ceci signifie que cette lignée exprime de manière perpétuelle les CB1R-GFP. Ces cellules, qui nous ont été fournies par les chercheurs du Laboratoire de Neurobiologie et Diversité Cellulaire de l'ESPCI à Paris avec qui nous collaborons, sont pour nous un outil indispensable pour l'amélioration de notre système. En effet, des échantillons comme les billes en latex fluorescentes ou les solutions de colorant sont utiles pour cerner le comportement de notre montage, mais l'optimisation du dispositif est réalisée grâce aux échantillons biologiques.

On voit d'ailleurs sur ces photographies qu'avec ce type d'échantillons, il est très facile de savoir si les observations se font en épifluorescence classique ou en TIRF. Les structures plus fines collées à l'interface sont plus apparentes en TIRF. En excitant uniquement les premières dizaines de nanomètres (environ 150 nm) de l'échantillon, nous nous affranchissons complètement de la fluorescence des plans supérieurs et notamment du cytoplasme, ce qui au final améliore le contraste des entités cellulaires proches de la lamelle.

Sur notre montage actuel, nous ne pouvons pas mesurer la profondeur de pénétration du champ évanescent. Cependant, il est possible de l'estimer, en utilisant la formule démontrée en introduction, qui relie la profondeur de pénétration  $d$  à la longueur d'onde d'excitation, aux indices des deux milieux de part et d'autre de l'interface, et à l'angle d'incidence :

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi \times \sqrt{n_i^2 \sin^2(\theta_i) - n_t^2}} .$$

A l'interface lamelle - échantillon biologique, nous avons  $n_i = 1,50$

et  $n_t = 1,38$ , ce qui correspond à un angle critique légèrement inférieure à  $67^\circ$ . Dans le cas de la GFP, l'excitation est réalisée à 480 nm, ce qui nous donne une profondeur de pénétration  $d(67^\circ, 480\text{nm}) = 835 \text{ nm}$ . La plus petite profondeur de pénétration accessible est limitée par l'ouverture numérique de l'objectif. A la limite, c'est-à-dire lorsque nous profitons de l'ouverture numérique de 1,45, l'angle d'incidence maximal à l'interface vaut  $75^\circ$ , ce qui correspond à une profondeur  $d(75^\circ, 480\text{nm}) = 86 \text{ nm}$ . Dans le tableau 3-1 sont reportées les profondeurs de pénétration obtenues pour la gamme d'angles accessible avec notre objectif.

Angle incident (deg)	Profondeur de pénétration (nm)
67	835
68	221
69	161
70	133
71	117
72	106
73	98
74	91
75	86

Tableau 3-1 : profondeur de pénétration du champ évanescent suivant l'angle d'incidence. Les résultats ont été obtenus par le calcul, en considérant une longueur d'onde d'excitation de 480 nm.

Ainsi, en estimant l'angle de rotation du miroir  $M_T$ , il est possible d'avoir une valeur approchée de l'angle d'incidence, et donc une estimation de la profondeur de pénétration du champ évanescent. Cette estimation n'est pas très précise, mais vues les faibles variations de la profondeur en fonction de l'angle incident (pour des valeurs supérieures à  $69^\circ$ , ce qui est vraisemblablement notre cas), cette estimation nous donne une idée assez précise de la profondeur de pénétration du champ évanescent pour nos premières expériences. Cependant, il apparaît indispensable de quantifier plus précisément cette grandeur, ce qui fait partie de nos perspectives d'amélioration du montage.

## IV.2 – Influence des paramètres d'acquisition sur les temps de vie mesurés

Dans cette partie, nous nous intéressons aux différents paramètres d'acquisition sur la voie de détection résolue en temps, pour quantifier l'influence de chacun sur la mesure des temps de vie de fluorescence, et pour pouvoir optimiser cette détection. Les expériences que nous avons réalisées, ainsi que les résultats qui en ont découlé figurent dans l'annexe 2. Ici nous allons juste souligner le rôle des paramètres les plus influents, et définir les conditions d'acquisition dans lesquelles nous allons travailler dans la suite.

Avant de réaliser des mesures de temps de vie de fluorescence, nous devons nous assurer que les éléments de détection utilisés ont une réponse qui varie linéairement avec l'intensité incidente. Cette précaution est indispensable si on souhaite interpréter les variations d'intensité mesurées comme des diminutions de la fluorescence des entités dans l'échantillon, et donc comme un déclin de la fluorescence, et non comme des artefacts dus aux détecteurs. Pour chacun de ces paramètres, une valeur par défaut a été définie (valeurs les plus souvent utilisées ou centrales), qui sert de référence. Ainsi lors de l'étude de l'influence d'un paramètre, les autres paramètres prennent cette valeur par défaut. Toutes les valeurs choisies pour l'étude sont consignées dans le tableau 3-2.

Paramètre	CCD			HRI	
	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur par défaut	<b>10</b>	<b>250</b>	<b>0</b>	<b>400</b>	<b>460</b>
Valeurs prises pour l'étude	1	1	50	200	260
	5	100	100	300	360
	10	200	150	400	460
	15	250	200	500	560
	20	300	250	600	660
	30	400		700	760
		1000		800	850
				900	
			1000		
			5000		

Tableau 3-2 : valeur des paramètres pour l'étude de la linéarité des détecteurs.

Nous avons ainsi vérifié que le nombre d'images moyennées pour obtenir une image finale, le gain et le temps d'exposition de la caméra CCD ne perturbaient pas la mesure d'intensité, tant que la saturation du détecteur n'était pas atteinte. Pour l'intensificateur, nous avons vérifié que l'allure du gain était conforme à ce qui est attendu lorsque l'on travaille avec un tube photomultiplicateur, que l'intensité du signal détecté variait linéairement avec la largeur des portes temporelles et nous avons mesuré expérimentalement leur largeur.

Cette première série de mesures étant réalisée, nous avons par la suite étudié l'influence de ces cinq mêmes paramètres sur les temps de vie de fluorescence mesurés sur des échantillons de référence. Pour toutes ces mesures, nous avons utilisé le même algorithme, qui est notre algorithme de référence (nous le noterons  $A_{ref}$ ) et qui est défini dans le tableau 3-3 (les temps sont exprimés en ps). Dans cet algorithme, nous réalisons 13 acquisitions pour échantillonner le déclin. Pour limiter l'influence de la persistance de notre système de détection, l'acquisition se fait en remontant le déclin. Au début du déclin, les acquisitions sont plus proches. Nous exploitons la relative basse cadence de la source en prenant un point 10 ns après l'impulsion. Cet algorithme permet de mesurer proprement des temps de vie aux alentours de 2 ns (pour mesurer des temps de vie plus courts ou plus longs de manière optimale, il faut revoir la position des différents instants d'échantillonnage). Il est important de signaler ici que chacune des valeurs de temps de vie moyen rapportées a été obtenue avec une unique mesure à chaque fois, c'est-à-dire qu'elle correspond à une moyenne sur l'ensemble d'une image, sur les 672x512 pixels de notre caméra CCD, et l'écart type de chaque mesure est également l'écart type obtenu sur ces mêmes 344064 pixels.

1ère acquisition	$t_0 + 10000$
2ème acquisition	$t_0 + 8000$
3ème acquisition	$t_0 + 6000$
4ème acquisition	$t_0 + 5000$
5ème acquisition	$t_0 + 4000$
6ème acquisition	$t_0 + 3000$
7ème acquisition	$t_0 + 2500$
8ème acquisition	$t_0 + 2000$
9ème acquisition	$t_0 + 1500$
10ème acquisition	$t_0 + 1000$
11ème acquisition	$t_0 + 750$
12ème acquisition	$t_0 + 350$
13ème acquisition	$t_0 + 0$

 Tableau 3-3 : algorithme  $A_{ref}$  (temps exprimés en ps).

Concernant le rôle des paramètres d'acquisitions de la caméra CCD sur la mesure du temps de vie de fluorescence, nous constatons une influence comparable du nombre d'images utilisées pour moyennner et du temps d'exposition. En effet, l'écran à phosphore de l'intensificateur souffre d'un scintillement aléatoire des pixels, et notre chaîne de détection connaît une certaine persistance. Dès lors, en augmentant le nombre d'images utilisées pour faire la moyenne ou en augmentant le temps d'exposition, ces deux artefacts deviennent moins gênants, mais le temps total d'acquisition augmente. Par conséquent, il faut trouver un compromis pour avoir des valeurs de temps de vie pertinentes avec un écart type faible, tout en ne rallongeant pas trop la durée de l'acquisition. Un

bon optimum (pour un niveau de signal comparable à ce que l'on obtient pour de la fluorescence dans les cellules) semble être de travailler avec 10 images pour obtenir la moyenne, et un temps d'exposition de 250 ms. Le gain de la CCD quant à lui n'a une influence que très minime sur le temps de vie mesuré.

Pour l'intensificateur, nous observons une faible augmentation du temps de vie mesuré avec la largeur des portes, et ceci essentiellement pour les portes les plus larges. Par contre, l'écart type diminue logiquement lorsque la largeur des portes augmente, c'est-à-dire lorsque le signal est intégré pendant plus longtemps. Nous décidons dans toute la suite de ce travail d'échantillonner les déclin de fluorescence avec des portes de 800 ps, qui permettent de collecter un signal assez important pour réduire l'écart type sans perturber la mesure du temps de vie. L'influence du gain du HRI sur l'écart type est la même : en augmentant ce dernier, nous réduisons l'écart type. Il ne semble pas influencer de manière notable sur les temps de vie mesurés. Concernant ce paramètre, il est important de l'ajuster pour bénéficier de la plus grande dynamique possible sur la caméra CCD.

En plus de ces paramètres concernant directement les détecteurs, nous avons mis en évidence le rôle prépondérant d'autres facteurs liés à l'échantillonnage du déclin réalisé. Tout d'abord, la position du début de l'acquisition est très importante (ou autrement dit, l'instant d'acquisition de la première image du déclin dans le sens du temps, c'est-à-dire la plus intense, par rapport à l'impulsion excitatrice). Si l'échantillonnage commence trop tôt, nous constatons une fâcheuse tendance à surestimer le temps de vie de fluorescence, alors que s'il commence trop tard, nous allons le sous-estimer. Il est par conséquent primordial de repérer précisément le maximum d'intensité (qui correspond au début du déclin et qui en plus varie suivant la largeur de portes). Avec l'algorithme  $A_{ref}$ , nous obtenons les meilleurs résultats en commençant l'acquisition 300 ps après la position du maximum d'intensité. Ensuite, notre système de détection dans son intégralité a une persistance qui peut induire des erreurs significatives. Pour obtenir des mesures correctes, il faut commencer par acquérir les images de fin du déclin (comme le fait l'algorithme  $A_{ref}$ ). On minimise les effets de cette persistance en utilisant des temps d'acquisition sur la caméra longs, et en réalisant beaucoup d'acquisitions pour faire la moyenne et obtenir une image. Avec  $A_{ref}$  en moyennant sur 10 images et en utilisant des temps d'acquisition sur la caméra de 250 ms, nous obtenons des résultats corrects. Cette persistance semble essentiellement due à des problèmes de synchronisation entre la ligne à retard et l'acquisition, qui est gérée par notre logiciel développé en Labview. Nous avons constaté qu'il est également indispensable de positionner la porte temporelle loin après l'impulsion avant l'acquisition, pour bien partir d'un niveau de signal correspondant au bruit de fond.

### **IV.3 - Reproductibilité**

Maintenant que nous avons fixé certains paramètres et que nous avons pu évaluer l'influence des autres, il faut s'assurer de la reproductibilité des mesures. Avant de travailler avec des échantillons plus complexes, nous devons être sûrs que, pour un échantillon fluorescent stable, lorsque l'on mesure le temps de vie de fluorescence dans les mêmes conditions (avec la même excitation, la même quantité de signal de fluorescence, les mêmes paramètres d'acquisitions pour nos détecteurs et l'utilisation du même algorithme), nous obtenons toujours le même temps de vie. Pour cela, nous observons différentes solutions de rhodamine B diluée dans de l'éthanol : les concentrations sont assez élevées mais ne sont pas connues précisément. Un tel échantillon est

stable, car d'une part il est homogène, et de plus, même si nous détériorons certains fluorophores, leur mouvement brownien dans la solution nous garantit la stabilité globale de l'échantillon.

Nous réalisons 20 mesures dans chaque cas avec l'algorithme  $A_{ref}$  et comme pour toutes nos expériences, chaque mesure correspondant déjà à une moyenne sur l'ensemble de l'image, c'est-à-dire sur les 672x512 pixels.

Nous travaillons d'abord avec une première solution et un niveau de signal de fluorescence « moyen », c'est-à-dire comparable à celui obtenu lors de l'observation des cellules HEK-C9. Les paramètres de l'acquisition sont reportés dans le tableau 3-4.

Paramètre	CCD			HRI	
	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	10	100	0	600	680

Tableau 3-4 : paramètres d'acquisition.

Nous faisons ensuite les mêmes mesures avec une autre solution et cette fois un signal de fluorescence très faible, à la limite de sensibilité de la détection (tableau 3-5). Les résultats obtenus figurent dans le graphe de la figure 3-25.

Paramètre	CCD			HRI	
	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	10	100	0	1000	850

Tableau 3-5 : paramètres d'acquisition.

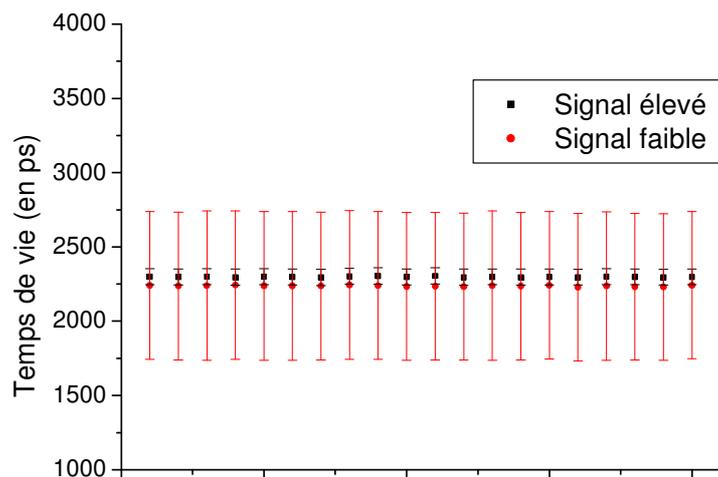


Figure 3-25 : séries de 20 mesures pour deux niveaux de signaux différents pour mettre en évidence la reproductibilité.

Dans le premier cas, nous obtenons une moyenne pour l'ensemble des 20 mesures de 2298 ps avec un écart type de 2,70 ps, la moyenne des écarts types est de 53,8 avec un écart type de 0,62. Dans le second cas, nous avons une moyenne de 2237 ps avec un écart type de 4,15 ps, la moyenne des écarts types est de 498 ps avec un écart type de 2,81 ps.

Il est donc intéressant de constater ici que, quel que soit le niveau de signal, pour un échantillon stable, nous avons une grande reproductibilité, tant pour la mesure de la moyenne que pour l'évaluation de l'écart type sur l'image. On remarque aussi que, pour des signaux plus faibles, l'écart type augmente, ce qui était bien entendu prévisible : en diminuant le rapport signal à bruit pour chacune des images d'intensité, l'ajustement est plus délicat pour chaque pixel, et les valeurs de temps de vie trouvées sont plus disparates.

Les valeurs absolues trouvées ne sont pas nécessairement exploitables, puisque pour cette étude, nous ne connaissons pas la concentration en fluorophore de l'échantillon qui n'est pas d'excellente qualité.

Maintenant que nous avons une idée précise de ce que nous mesurons, et du rôle de tous les paramètres d'acquisitions, il semble pertinent de comparer, toujours sur des échantillons de référence très stables, les temps de vie mesurés avec notre dispositif TIRFLIM avec ceux obtenus sur un microscope confocal commercial équipé d'une carte d'acquisition TCSPC.

#### IV.4 - Comparaison avec un système commercial

Pour cette étude, nous utilisons le dispositif d'imagerie multimodale commercial dont est équipé le laboratoire : cette instrumentation commerciale, installée et calibrée par des professionnels est pour nous une référence. Il s'agit d'un microscope confocal Leica TCS SP5 [Leica 2006], d'une carte d'acquisition Picoquant PicoHarp 300 [Picoquant 2006], et d'un laser impulsif titane saphir femtoseconde Coherent Chameleon XR [Coherent 2004].

Nous observons ici deux solutions de rhodamine B dans différents solvants : de l'eau et de l'éthanol. Nous avons choisi ces échantillons car ils sont stables (un colorant en solution), ils ont des temps de vie autour de 2 ns (comme la plupart des fluorophores qui vont nous intéresser par la suite), et le changement de solvant doit provoquer un changement de temps de vie que nous espérons pouvoir mettre en évidence [Magde 1999].

Avec notre dispositif TIRFLIM, nous utilisons pour l'excitation un filtre centré à 531 nm avec une largeur de 40 nm, et pour la détection, un filtre centré à 593 nm avec une largeur de 40 nm. Nous réalisons ces mesures de temps de vie en configuration d'épifluorescence classique. Vu la reproductibilité mise en évidence précédemment sur des échantillons comparables, nous ne réalisons qu'une mesure dans chaque solution avec l'algorithme  $A_{ref}$  et les paramètres d'acquisition du tableau 3-6.

Paramètre	CCD			HRI	
	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	10	100	0	800	580

Tableau 3-6 : paramètres d'acquisition.

Dans ces conditions nous trouvons pour la solution de rhodamine B diluée dans l'éthanol un temps de vie moyen (sur une image 672x512 pixels) de 2,22 ns avec un écart type de 29 ps. Pour la rhodamine B diluée dans l'eau, nous trouvons un temps de vie plus court d'une valeur de 1,79 ns avec le même écart type.

Avec le dispositif commercial, nous excitons l'échantillon à deux photons à une longueur d'onde de 830 nm. Nous obtenons des temps de vie de fluorescence de 2,23 et 1,79 ns pour le colorant dilué respectivement dans l'éthanol et dans l'eau. L'écart type (pour une image 512x512 pixels) est évalué à 80 ps pour une moyenne de 1900 coups par pixel.

	Ethanol		Eau	
	Temps de vie (ns)	Ec. Type (ps)	Temps de vie (ns)	Ec. Type (ps)
TIRFLIM	2,22	29	1,79	29
Système commercial	2,23	80	1,79	80

Tableau 3-7 : temps de vie mesurés sur les solutions de rhodamine avec notre dispositif et le dispositif commercial.

Ces résultats sont tout à fait satisfaisants (tableau 3-7), puisque sur notre dispositif nous obtenons les mêmes valeurs que sur le dispositif commercial à 10 ps près. L'écart type que nous obtenons est un peu plus faible, mais en augmentant le nombre de coups par pixel avec la méthode TCSPC

(en augmentant la puissance d'excitation ou le temps d'acquisition), nous pourrions obtenir des valeurs comparables voire inférieures...

Par rapport à la référence citée précédemment [Magde 1999] (temps de vie entre 1,52 ns et 1,68 ns dans l'eau, et entre 2,45 ns et 2,93 ns dans l'éthanol suivant la forme chimique du colorant), les temps de vie trouvés sont quelque peu différents, mais les conditions expérimentales ne sont pas les mêmes. Notamment, nous ne travaillons pas avec la même concentration de colorant en solution, ni avec des solvants ayant la même viscosité (la température n'est pas la même), or ces deux paramètres ont une grande influence sur le temps de vie de fluorescence mesuré [Moog 1982].

## V – Premières mesures sur des échantillons biologiques

Nous pouvons dorénavant travailler avec des échantillons biologiques, en étant confiants dans les valeurs de temps de vie trouvées.

Pour terminer cette partie, nous présentons ici les cartes de durée de vie de fluorescence obtenues avec différents fluorophores transfectés dans des cellules HEK-293. Nous reviendrons dans la partie 4 sur les différentes protéines membranaires utilisées ici et leur rôle au sein de la cellule. Nous rapportons ces images ici pour montrer les performances de notre système sur des échantillons vivants, en terme de résolution axiale, de mesure de temps de vie, et aussi d'accordabilité grâce à la souplesse de la source supercontinuum (il suffit de changer les filtres à l'excitation et à la détection pour travailler avec différents fluorophores).

Tout d'abord, nous observons des cellules HEK 293 transfectées avec la protéine APP (Amyloid Precursor Protein) marquée à la CFP. Pour imager proprement ce fluorophore, nous utilisons pour l'excitation un filtre centré à 438 nm avec une largeur de 24 nm, et pour la détection, un filtre centré à 483 nm avec une largeur de 32 nm. La puissance moyenne incidente est ajustée autour de 450  $\mu$ W. En mesurant l'angle d'incidence du faisceau exciteur sur la lentille qui permet de focaliser dans le plan focal arrière de l'objectif, nous estimons que la profondeur de pénétration du champ évanescence est comprise entre 160 et 190 nm. Nous utilisons l'algorithme  $A_{ref}$  et les paramètres d'acquisition sont reportés dans le tableau 3-8.

Pour mettre en évidence le gain en résolution axial de notre dispositif, nous comparons sur une même cellule les images d'intensité et de durée de vie en TIRF et en épifluorescence classique (figure 3-26).

Paramètre		CCD			HRI	
		Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	Epi	10	100	0	800	590
	TIRF	10	250	0	800	750

Tableau 3-8 : paramètres d'acquisition.

Comme nous avons pu le voir sur les premières images de cellules présentées précédemment, lorsque l'on souhaite observer la membrane d'une cellule, nous obtenons un bien meilleur contraste avec l'excitation par onde évanescence. Les fluorophores qui se situent dans tout le reste de la cellule et essentiellement dans le cytoplasme ne contribuent pas au signal collecté

puisque ces entités ne sont pas excitées : nous n'imagesons que les fluorophores situés dans la membrane ou très proches de cette dernière.

Les cartes de temps de vie de la CFP en épifluorescence classique et en TIRF sont respectivement reportées figure 3-26b) et 3-26d). Les temps de vie moyens obtenus pour la cellule entière valent 2180 ps avec un écart type de 68 ps en épifluorescence et 2100 ps avec un écart type de 168 ps en TIRF. La petite différence observée sur la moyenne peut être expliquée par un possible amortissement de la fluorescence (quenching) provoqué par la proximité de l'interface, ce qui aurait tendance à réduire le temps de vie en TIRF (cf. chapitre III, p 113).

Comme prévu, l'écart type est plus bas en épifluorescence puisque le signal de fluorescence collecté est nettement supérieur.

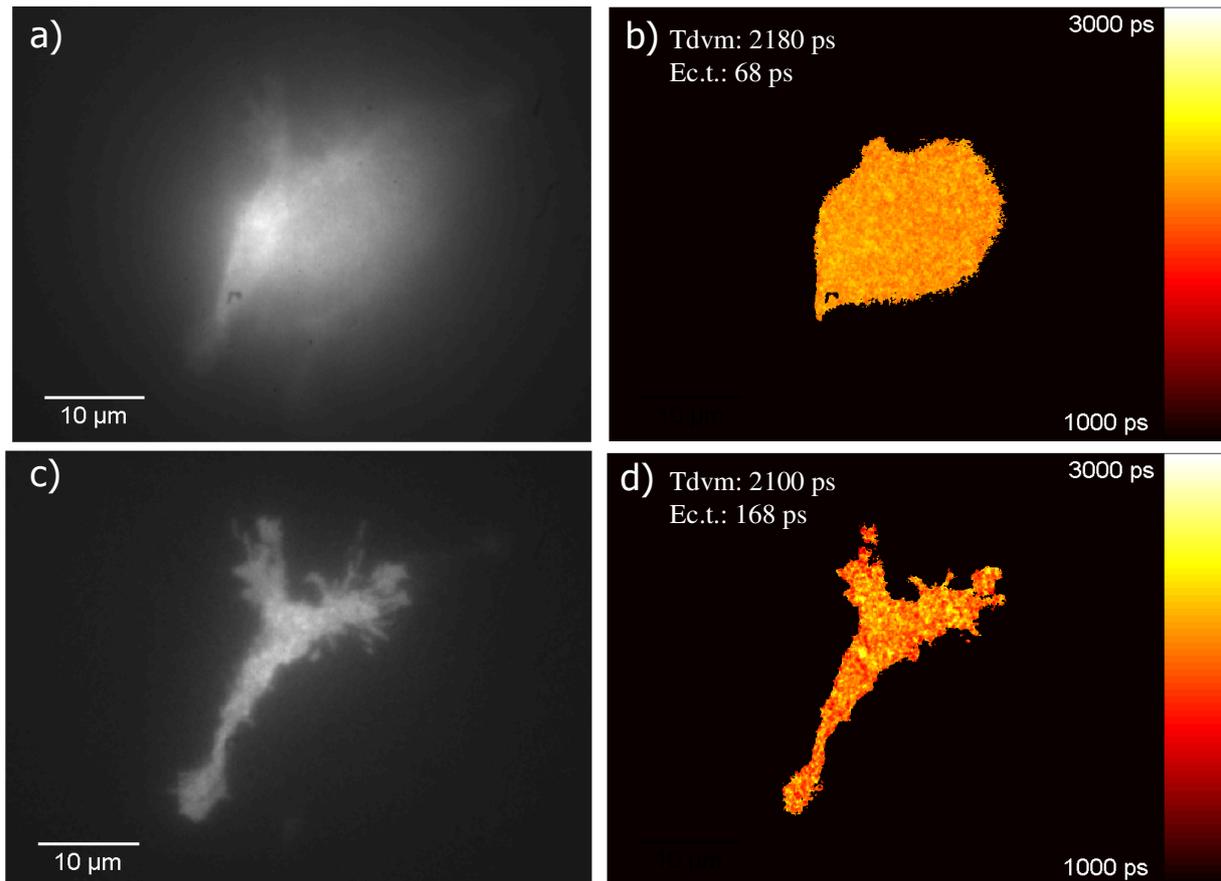


Figure 3-26 : images en intensité (a,c) et carte des temps de vie (b,d) d'une cellule HEK-293 transfectée avec APP-CFP. Comparaison des résultats obtenus en épifluorescence (a,b) et en TIRF (b,d).

Nous avons rapporté le déclin en un pixel représentatif (figure 3-27a) de la carte de temps de vie en TIRF. Nous pouvons voir un bon accord entre les données obtenues expérimentalement et l'ajustement par un déclin monoexponentiel. Nous avons également tracé l'histogramme correspondant, qui montre une distribution assez homogène du temps de vie de fluorescence de la CFP à travers toute la cellule.

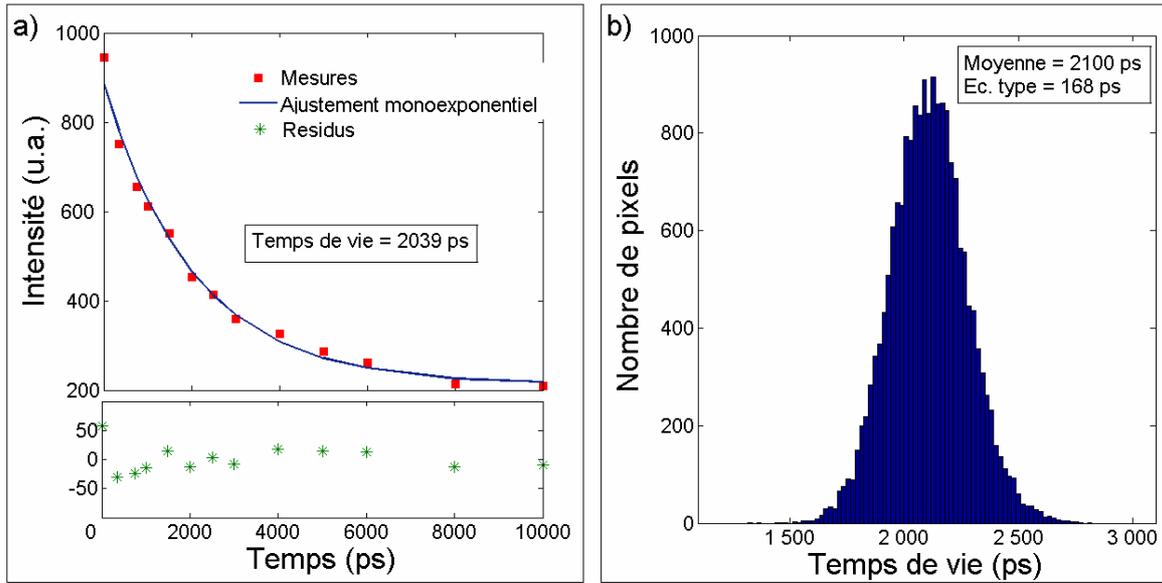


Figure 3-27:(a) déclin de fluorescence pour un pixel de la carte des temps de vie obtenue en TIRF (2d), ajusté avec un modèle de déclin monoexponentiel, et (b) histogramme des temps de vie calculés pour toute la carte.

Ensuite, nous observons les cellules HEK-293 avec la transfection stable CB1R-GFP. Pour ces mesures, nous utilisons un filtre à l'excitation centré à 472 nm avec une largeur de 30 nm, et pour la détection, un filtre centré à 520 nm avec une largeur de 35 nm. Les paramètres d'acquisition figurent dans le tableau 3-9. Nous mesurons une puissance incidente de 510  $\mu$ W. Pour cette mesure, nous obtenons un temps de vie moyen de 2430 ps avec un écart type de 100 ps (figure 3-28).

		CCD			HRI	
Paramètre		Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	GFP	10	250	0	800	650
	YFP	10	250	0	800	750
	mChe.	10	250	0	800	710

Tableau 3-9 : paramètres d'acquisition.

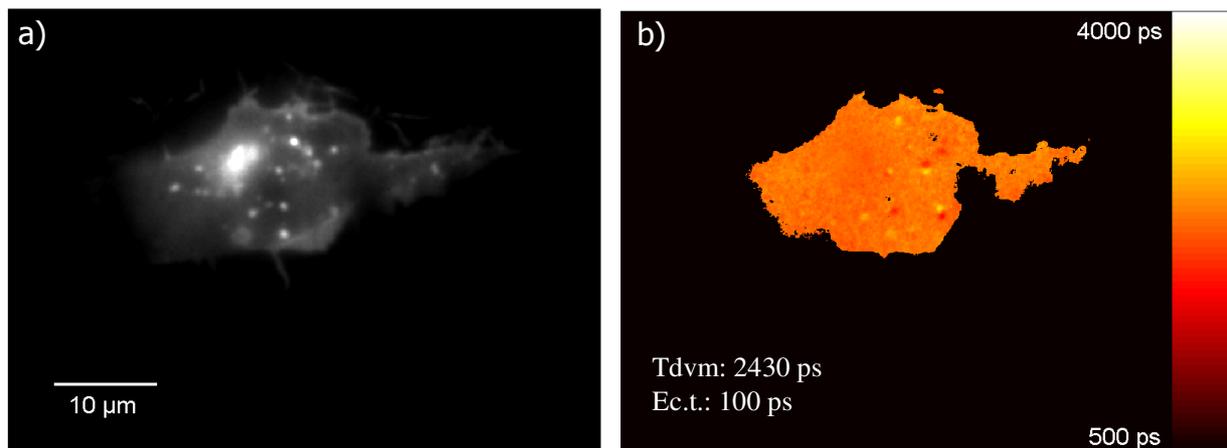


Figure 3-28 : Images TIRF en intensité (a) et en temps de vie (b) d'une cellule HEK-293 avec une transfection stable CB1R-GFP.

Enfin, nous observons toujours des cellules HEK-293 mais cette fois cotransfectées avec APP-YFP et CB1-mCherry (paramètres d'acquisition dans le tableau 3-9). Pour changer de

fluorophore imagé, il suffit de changer le jeu de filtres. Concernant la protéine fluorescente YFP (excitation :  $\lambda=482$  nm,  $\Delta\lambda=35$  nm; détection :  $\lambda=536$  nm,  $\Delta\lambda=40$  nm, puissance incidente autour de  $650 \mu\text{W}$ ), nous mesurons un temps de vie de fluorescence moyen de 2592 ps avec un écart type de 159 ps (figure 3-29).

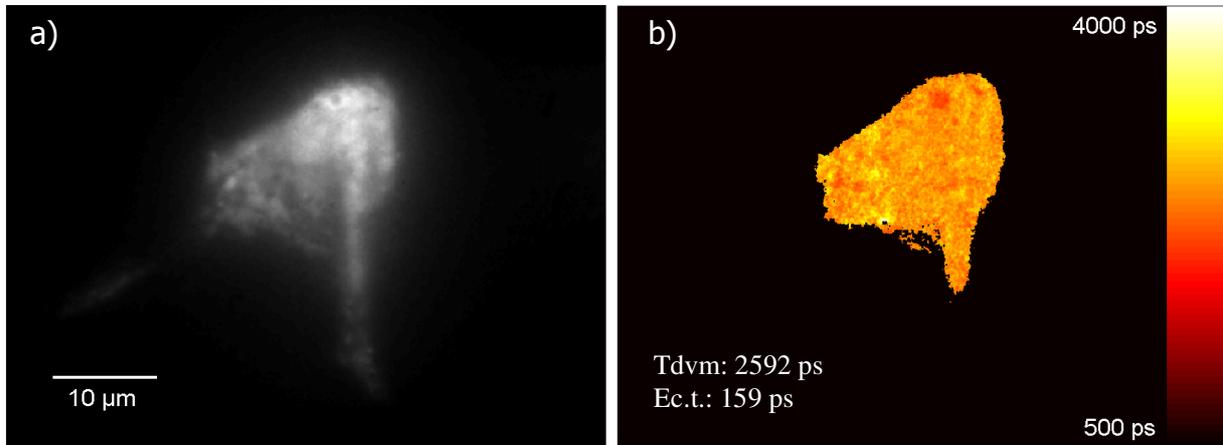


Figure 3-29 : Images TIRF en intensité (a) et en temps de vie (b) de la protéine fluorescente YFP dans une cellule HEK-293 cotransfectée avec APP-YFP et CB1-mCherry.

Pour la mCherry, (excitation :  $\lambda=531$  nm,  $\Delta\lambda=40$  nm; détection :  $\lambda=607$  nm,  $\Delta\lambda=36$  nm; puissance moyenne autour de  $600 \mu\text{W}$ ) un temps de vie moyen de 1358 ps avec un écart type de 57 ps est obtenu (figure 3-30).

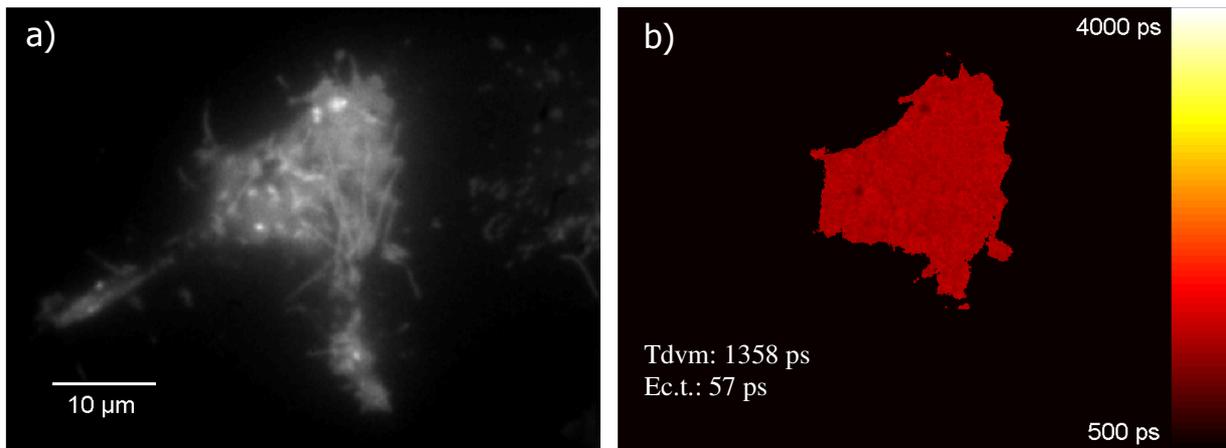


Figure 3-30 : Images TIRF en intensité (a) et en temps de vie (b) de la protéine fluorescente mCherry dans la même cellule que la figure 3-29.

Les écarts types pour ces trois mesures sont quelque peu différents, car le signal de fluorescence collecté dépend du fluorophore observé, et aussi de la position de la protéine marquée dans la cellule. Pour ces trois mesures, l'angle d'incidence n'a pas été modifié, et par conséquent la profondeur de pénétration du champ évanescent n'est affectée que par le changement de longueur d'onde du faisceau excitateur.

L'ensemble de ces mesures est récapitulé dans le tableau 3-10.

Fluorophore	Excitation (nm)	Détection (nm)	Temps de vie (ps)	Ec. type (ps)
CFP	438	483	2100	168
GFP	472	520	2430	100
YFP	482	536	2592	159
mCherry	531	607	1358	57

Tableau 3-10 : récapitulatif des temps de vie mesurés pour les différents fluorophores étudiés.

Ces valeurs sont tout à fait comparables à ce que l'on peut trouver dans la littérature : pour la CFP, les temps de vie mesurés varient entre 2,2 et 2,6 ns [Grailhe 2006], [Tramier 2006], [Chen 2004], pour la GFP les valeurs rapportés sont entre 2,51 [Chen 2004] et 2,64 ns [Tramier 2006], pour la YFP, les valeurs semblent être proches de 2,8 ns [Chen 2004], [Becker 2004], et enfin, pour la mCherry, les temps de vie mentionnés sont plus courts autour de 1,4 ns [Merzlyak 2007].

## **VI - Conclusions**

En utilisant les propriétés du champ évanescent, la microscopie TIRF permet d'imager la première centaine de nanomètres d'un échantillon. Une telle résolution axiale sublongueur d'onde trouve de nombreuses applications, notamment en imagerie cellulaire. Avec cette technique il est possible d'observer précisément la membrane en s'affranchissant de la fluorescence du reste de la cellule. En utilisant cette technique d'imagerie couplée à de la fluorescence résolue en temps, nous sommes capables de faire de l'imagerie fonctionnelle très localisée.

L'originalité de notre montage réside dans l'utilisation d'une source supercontinuum pour l'excitation, d'une géométrie de TIRF basée sur l'utilisation d'un objectif à grande ouverture numérique et d'une détection temporelle réalisée en plein champ grâce à un intensificateur.

Au niveau des performances de notre système d'imagerie, nous avons pu mesurer expérimentalement la résolution spatiale latérale. Pour la résolution axiale, nous ne pouvons actuellement donner qu'une estimation de la profondeur de pénétration du champ évanescent. Concernant la mesure de temps de vie de fluorescence, nous avons cerné l'influence des différents paramètres d'acquisition. Ceux qui semblent les plus importants sont la position du début de l'échantillonnage (l'optimum semble être 300 ps après le maximum d'intensité) et la position de la dernière prise d'image avant acquisition (à cause de la persistance de l'intensificateur). En accord avec les niveaux de signal que nous avons dans les cellules, nous avons décidé de fixer à 10 le nombre d'acquisitions moyennées pour obtenir une image, de prendre un temps d'exposition sur la caméra de 250 ms et une largeur de porte temporelle de 800 ps. Le gain de l'intensificateur est ajusté suivant les niveaux de signal.

Nous nous sommes ensuite assurés de la reproductibilité de nos mesures, et nous avons comparé les résultats obtenus sur notre dispositif à ceux obtenus sur un système commercial. Il semble que nous disposions d'un dispositif robuste, qui donne des valeurs de temps de vie de fluorescence correctes.

Nous avons ensuite présenté plusieurs images de cellules transfectées avec différents fluorophores, pour montrer l'accordabilité en longueur d'onde de notre dispositif, et aussi les performances que l'on pouvait atteindre en terme de résolutions spatiale et temporelle.

Dans la partie suivante de ce manuscrit, nous allons nous intéresser plus intensément aux échantillons biologiques, en accord avec une problématique biomédicale précise.

Ainsi, nous disposons d'un dispositif tout à fait utilisable en l'état pour travailler sur des échantillons biologiques. Néanmoins, certaines améliorations sont envisageables pour perfectionner cet outil.

La principale semble être la maîtrise de la profondeur de pénétration du champ évanescent. Comme nous l'avons vu, pour l'instant nous pouvons estimer cette profondeur d'après une

mesure de l'angle d'incidence du faisceau excitateur sur la lentille de focalisation. Nous ne mesurons pas assez précisément cet angle pour nous assurer de la reproductibilité. Et surtout, nous ne pouvons pas actuellement mesurer expérimentalement la profondeur de pénétration du champ et la relier à un « réglage » précis. Pour remédier à cela, nous avons envisagé plusieurs pistes, la plus intéressante étant selon nous de placer le rail avec les optiques (miroir et lentille de focalisation dans le plan arrière de l'objectif) sur une platine de translation motorisée pilotable. Ainsi, au lieu de tourner le miroir (ce qui en plus induit une asymétrie sur le faisceau), il suffirait de translater l'ensemble du rail, ce qui translaterait la tâche dans le plan focal arrière de l'objectif. Nous pourrions dès lors ajuster finement la position de ce point de focalisation et s'assurer de la reproductibilité. Pour la mesure expérimentale de la profondeur de pénétration du champ, nous travaillons en collaboration avec Emmanuel Fort, Yannick Goulam Houssen et Karla Balaa du Laboratoire Matériaux et Phénomènes Quantiques de l'Université Paris Diderot. Cette équipe est capable de réaliser des dépôts de divers matériaux en escalier avec des marches très fines de quelques nanomètres et de recouvrir ces marches de fluorophores (figure 3-31). Ainsi avec un matériau d'indice proche de celui de l'eau, on peut se placer dans des conditions de réflexion totale comparables à celles que l'on a en travaillant sur des échantillons biologiques. Et en déposant des petites sphères fluorescentes (20 nm), nous allons pouvoir retrouver le déclin monoexponentiel du champ évanescent suivant l'augmentation de la distance à l'interface, et ainsi mesurer la profondeur de pénétration du champ.

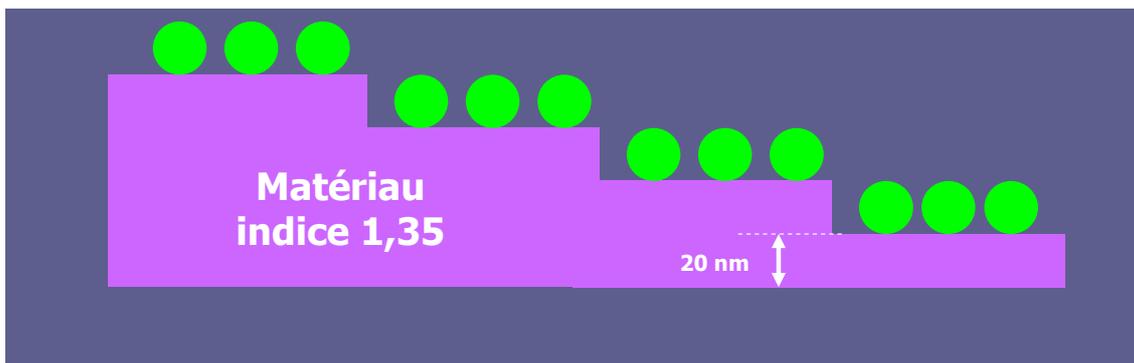


Figure 3-31 : schéma des échantillons pour mesurer la résolution axiale du dispositif de TIRF.

L'intérêt d'une telle calibration serait de cerner précisément la partie de l'échantillon que nous imageons. Puisque les membranes plasmiques ont une épaisseur d'environ une dizaine de nanomètres, il semble intéressant d'évaluer plus précisément la contribution de la fluorescence de la membrane au signal collecté. Pour les applications (en tout cas celles actuellement en cours au laboratoire), nous n'avons cependant pas besoin d'avoir une précision à 10 nm près. Mais d'un point de vue plus fondamental, une telle précision serait d'un grand intérêt pour étudier expérimentalement l'influence de la distance à l'interface sur le temps de vie de fluorescence mesurée.

Toujours en terme de résolution, des mesures complémentaires sont à faire sur la résolution latérale, et notamment sur la dégradation introduite par l'intensificateur

Pour l'instant, nous n'avons pas non plus tiré partie de la polarisation sur notre montage. Comme on l'a vu en introduction, la polarisation du champ évanescent a des caractéristiques très particulières qui sont reliées à l'état de polarisation incident. Il semblerait intéressant de voir l'influence de la polarisation sur les images obtenues.

Pour améliorer notre dispositif, nous voulons aussi agrémenter notre microscope d'une bague piézoélectrique permettant de déplacer finement l'objectif suivant l'axe optique. D'un point de vue expérimental, un tel ajout permettrait tout d'abord de mesurer la réponse percussionnelle

dans la direction parallèle à l'axe optique. Couplée aux échantillons évoqués ci-dessus, cette bague nous permettra de calibrer axialement notre dispositif.

Nous souhaitons également ajouter un dispositif d'imagerie qui peut séparer le signal collecté suivant deux voies, et de collecter les deux signaux sur la même caméra. Ainsi nous pourrions en parallèle détecter deux longueurs d'ondes d'émission différentes, ce qui est très utile lorsque l'on souhaite observer des phénomènes de transfert énergétique par FRET, ce qui est notre cas pour les applications neurobiologiques sur lesquelles nous travaillons (voir le chapitre suivant). Il est également envisageable de séparer avec ce dispositif deux polarisations orthogonales du signal de fluorescence, ce qui s'avère indispensable pour pouvoir faire de l'anisotropie de fluorescence.

Concernant la mesure de temps de vie de fluorescence, nous devons améliorer les performances essentiellement en retravaillant le logiciel. Le problème de persistance de la détection doit pouvoir être résolu. D'une manière simple, nous pensons essayer dans un premier temps augmenter le nombre d'acquisitions utilisées pour obtenir une image moyenne, et s'affranchir des premières acquisitions pour le calcul (par exemple, on réalise 12 acquisitions pour chaque position de la porte temporelle, et la moyenne est calculée uniquement sur les 10 dernières, ce qui permet de se débarrasser du signal due à la persistance et qui fausse uniquement les premières images d'intensité). Il est également envisageable d'utiliser une autre carte de synchronisation plus fiable que la carte National Instruments gérée par le logiciel Labview, permettant de déclencher très précisément les différents éléments de détection, plutôt que de se baser uniquement sur les séquences d'acquisition écrites en Labview.

**Annexe 1 : Fiches techniques du matériel utilisé**

Caractéristiques de l'objectif PLAPON 60XOTIRFM

**OLYMPUS** Your Vision, Our Future

UIS2 series : Objectives  
**PLAPON 60XOTIRFM**

UIS2 series  
Biological Microscope  
OBJECTIVES

- ▶ UPLSAPO
- ▶ PLAPON
- ▶ UPLFLN
- ▶ UPLFLN-PH
- ▶ PLN
- ▶ PLN-PH
- ▶ PLN-CY & PLFLN-CY
- ▶ PLN-P & ACHN-P
- ▶ LUCPLFLN
- ▶ CPLFLN-PH
- ▶ LUCPLFLN-PH
- ▶ CPLFLN-RC
- ▶ LUCPLFLN-RC
- ▶ CPLN-PH
- ▶ LCACHN-PH
- ▶ CPLN-RC
- ▶ LCACHN-RC
- ▶ UPLFLN-PHP
- ▶ CAACHN-PHP
- ▶ LCACHN-PHP

**MIRROR UNITS**

- ▶ Ultraviolet excitation
- ▶ Violet excitation
- ▶ Blue Violet excitation
- ▶ Blue excitation
- ▶ Green excitation
- ▶ Yellow excitation
- ▶ CFP, GFP, YFP, RFP

**OPTIONS**

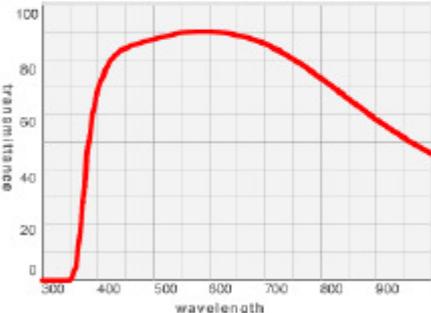
- ▶ Low Auto-fluorescence
- ▶ Immersion Oil

Discontinued



BF DIC PO FL UV FL F.N. 26.5

Transmittance / Wavelength



Main specifications

N.A.	W.D.	F.N.
1.45	0.1	26.5

Dimensions

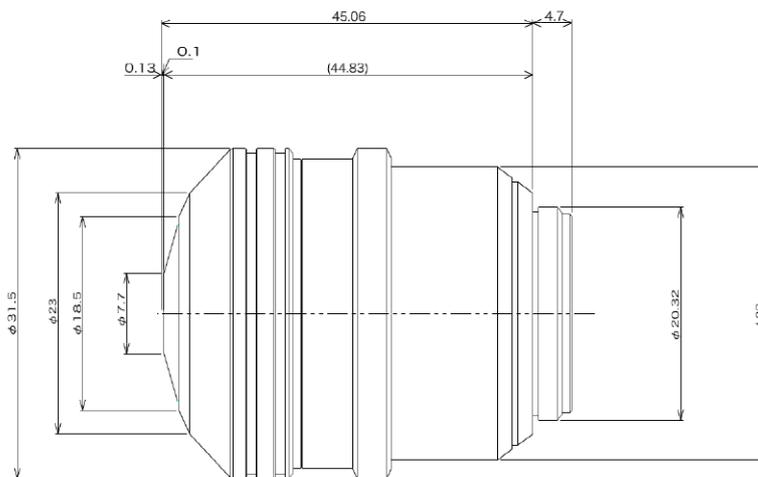


Click To Popup

Specifications

N.A.	W.D. (mm)	F.N.	Cover Glass Thickness (mm)	Immersion	Spring
1.45	0.1	26.5	0.13-0.19	Oil	Yes
<b>Correction Ring</b>	<b>Iris Diaphragm</b>	<b>Waterproof &amp; Oil proof function</b>	<b>Ultra Wide anti-reflection coating</b>	<b>Super apochromatic</b>	
Yes	-	Yes	Yes	-	
<b>DIC</b>	<b>Phase-Contrast</b>	<b>Relief Contrast</b>	<b>Polarized Light</b>	<b>Brightfield</b>	<b>Darkfield</b>
Excellent	N/A	N/A	Good	Excellent	N/A
				<b>Fluorescence (B, G Excitation)</b>	<b>UV Fluorescence (at 365nm)</b>
				Excellent	Good

Copyright 2004 OLYMPUS CORPORATION All Rights Reserved.



Copyright 2004 OLYMPUS CORPORATION All Rights Reserved.

resizable

Caractéristiques de la caméra EMCCD

ImagEM<sup>TM</sup>  
EM-CCD Camera C9100-13



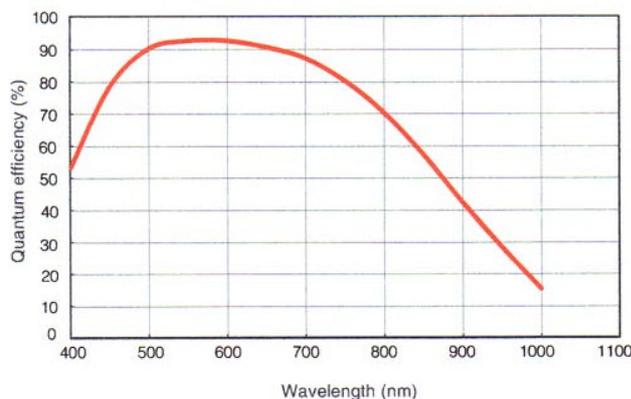
Electron Multiplier CCD Camera



The ImagEM camera evolved from the popular C9100-12 electron multiplier CCD camera. This new generation camera incorporates the latest Hamamatsu engineering and technology to provide a high speed readout rate of 32 frames per second at full spatial resolution and 16 bit digitization. With QE over 90 % and cooling down to -90 °C, both low noise and high gain are realized in one camera. ImagEM includes dual readout modes to take advantage of these features. In the EM-CCD readout mode, the on-chip gain provides high speed imaging at very low light levels. In the normal CCD readout mode, the low noise readout and deep cooling provide exceptional images even in long integration situations. High dynamic range, high resolution, high signal to noise ratios and high speed are all hallmarks of this new generation EM-CCD camera. In addition, Photon Imaging mode enables ultra low light detection.

Other new features included in the ImagEM are real-time image processing (Background subtraction, Shading correction, and a Recursive filter) plus special internal and external synchronization features. It is now possible to optimize frame synchronization for spinning disk confocal microscopes at up to 32 frames per second with the synchronous readout trigger (Patent Pending).

**SPECTRAL RESPONSE**



★ This is typical, not guaranteed.

**FEATURES**

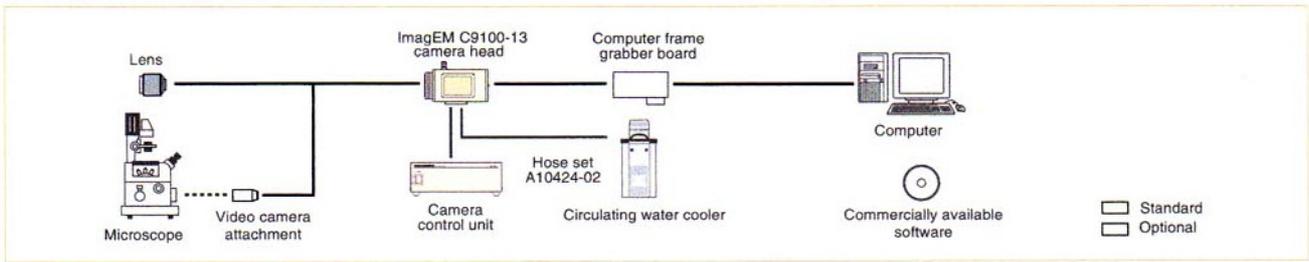
- High quantum efficiency of 90 % at the peak wavelength
- -90 °C cooling with hermetic sealed head (requires water cooling at +10 °C)
- Dual readout mode (EM-CCD readout / NORMAL CCD readout)
- High EM gain (1200 times)
- Real time (32 frame/s) readout at full resolution (512 × 512)
- Ultra low light detection in Photon Imaging mode
- Flexible external synchronization modes
- Synchronous readout trigger mode (Patent pending)
- Both fan and water cooling are included (selectable)
- Image reversal function in the EM-CCD readout
- Anti-reflection coating on both sides of input window

**APPLICATIONS**

- Real time imaging of low light fluorescence
- Intracellular ion measurement
- Single molecule fluorescence imaging with TIRF microscopy
- Real time confocal microscopy
- Luciferase reporter gene assay
- Luminescence imaging

**HAMAMATSU**

**SYSTEM CONFIGURATION**



**SPECIFICATIONS**

Type number		C9100-13
Camera head type		Hermetic vacuum-sealed air/water-cooled head <sup>①</sup>
Imaging device		Back-thinned Frame Transfer CCD
Effective no. of pixels		512 (H) × 512 (V)
Cell size		16 μm (H) × 16 μm (V)
Effective area		8.192 mm (H) × 8.192 mm (V)
Pixel clock rate	EM-CCD	11 MHz, 2.75 MHz, 0.69 MHz
	NORMAL CCD	2.75 MHz, 0.69 MHz
Electron multiplication gain (typ.)		1 or 4 to 1200 times <sup>②</sup>
Ultra low light detection		Photon Imaging mode
Fastest readout speed		31.9 frame/s to 404.4 frame/s
Readout noise (r.m.s.) (typ.)	EM-CCD	gain 4 times
		25 electrons (at 11 MHz)
		20 electrons (at 2.75 MHz)
	gain 1200 times	8 electrons (at 0.69 MHz)
		1 electron max. (at 11 MHz)
		1 electron max. (at 2.75 MHz)
NORMAL CCD	1 electron max. (at 0.69 MHz)	
	17 electrons (at 2.75 MHz)	
		8 electrons (at 0.69 MHz)
Full well capacity (typ.) <sup>③</sup>		370 000 electrons (Max. 800 000 electrons)
Analog gain		1/2 times to 5 times
Cooling method / temperature	Forced-air cooled	-65 °C stabilized (0 °C to +30 °C)
	Water cooled <sup>④</sup>	-80 °C stabilized (Water temperature : +20 °C)
		-90 °C (Water temperature : lower than +10 °C) <sup>⑤</sup>
Dark current (typ.)	Forced-air cooled (-65 °C)	0.01 electron/pixel/s
	Water cooled (-80 °C)	0.001 electron/pixel/s
Exposure time <sup>⑥</sup>	Internal sync mode	30.5 ms or more
	External trigger mode	10 μs or more
A/D converter		16 bit
Output signal / External control		CameraLink
Sub-array		Yes
Binning		2×2, 4×4 (8×8, 16×16) <sup>⑦</sup>
External synchronization <sup>⑧</sup>		Edge trigger, Level trigger, Start trigger, Synchronous readout trigger
Trigger output <sup>⑧</sup>		Yes
Image processing features (real-time)		Background subtraction, Shading correction, Recursive filter
Lens mount		C-mount
Power requirements		AC 100 V to 240 V 50 Hz / 60 Hz
Power consumption		Approx. 140 V A
Ambient storage temperature		-10 °C to +50 °C
Ambient operating temperature		0 °C to +40 °C
Performance guaranteed temperature		0 °C to +30 °C
Ambient operating/storage humidity		70 % max. (with no condensation)

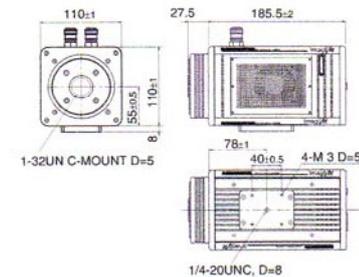
**● Fastest Readout Speed** (Internal synchronization mode, Unit : frame/s typ.)

Binning	Effective vertical width (Sub-array)					
	512	256	128	64	32	16
1 × 1	31.9	59.6	105.0	169.7	245.2	315.4
2 × 2	60.9	107.1	172.4	248.0	317.7	369.6
4 × 4	111.5	178.1	253.9	322.5	372.8	404.4

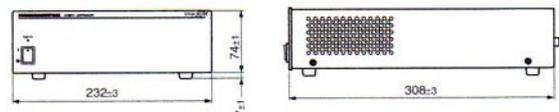
- ① The hermetic sealed head maintains a high degree of vacuum 10<sup>-8</sup> Torr, without re-evacuation.
- ② Even with electron multiplier gain maximum, dark signal is kept low level for low light imaging.
- ③ Linearity is not assured when full well capacity is more than 370 000 electrons.
- ④ Water volume 1.2 liter/min.
- ⑤ Image smearing may appear when the exposure time is short.
- ⑥ C-MOS 3.3 V with reversible polarity.
- ⑦ 8 × 8 and 16 × 16 binning are available on special order. Please consult with our sales office.
- ⑧ The maximum cooling temperature may vary subject to set-up environment.

**DIMENSIONAL OUTLINES** (Unit : mm)

■ Camera head (Approx. 3.7 kg)



■ Camera control unit (Approx. 3.0 kg)



**OPTIONS**

- Commercially available software
- Circulating water cooler
- Hose set A10424-02

★ Windows is registered trademark of Microsoft Corporation in the U.S.A.

★ Product and software package names noted in this documentation are trademarks or registered trademarks of their respective manufacturers.

• Subject to local technical requirements and regulations, availability of products included in this promotional material may vary. Please consult with our sales office.

• Information furnished by HAMAMATSU is believed to be reliable. However, no responsibility is assumed for possible inaccuracies or omissions.

Specifications and external appearance are subject to change without notice.

© 2006 Hamamatsu Photonics K.K.

**HAMAMATSU**

HAMAMATSU PHOTONICS K.K., Systems Division

812 Joko-cho, Hamamatsu City, 431-3196, Japan, Telephone: (81)53-431-0123, Fax: (81)53-433-8031, E-mail:sales2@sys.hpk.co.jp

U.S.A. and Canada: Hamamatsu Photonic Systems: 360 Foothill Road, Bridgewater, N.J. 08807-0910, U.S.A., Telephone: (1)908-231-1116, Fax: (1)908-231-0852, E-mail: usa@hamamatsu.com

Germany: Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH: Arzbergerstr. 10, D-82211 Herrsching am Ammersee, Germany, Telephone: (49)8152-375-0, Fax: (49)8152-2658, E-mail: info@hamamatsu.de

France: Hamamatsu Photonics France S.A.R.L.: 19, Rue du Saule Trapu, Parc du Moulin de Massy, 91882 Massy Cedex, France, Telephone: (33)1 69 53 71 00, Fax: (33)1 69 53 71 10, E-mail: infos@hamamatsu.fr

United Kingdom: Hamamatsu Photonics UK Limited: 2 Howard Court, 10 Tewin Road, Welwyn Garden City, Hertfordshire, AL7 1BW, U.K., Telephone: (44) 1707-294888, Fax: (44) 1707-325777, E-mail: info@hamamatsu.co.uk

North Europe: Hamamatsu Photonics Norden AB: Smidesvägen 12, SE-171-41 Solna, Sweden, Telephone: (46)8-509-031-00, Fax: (46)8-509-031-01, E-mail: info@hamamatsu.se

Italy: Hamamatsu Photonics Italia S.R.L.: Strada della Moia, 1/E 20020 Arese (Milano), Italy, Telephone: (39)02-935 81 733, Fax: (39)02-935 81 741, E-mail: info@hamamatsu.it

Homepage Address <http://www.hamamatsu.com>

Cat. No. SCAS0022E03  
NOV/2006 HPK  
Created in Japan (PDF)

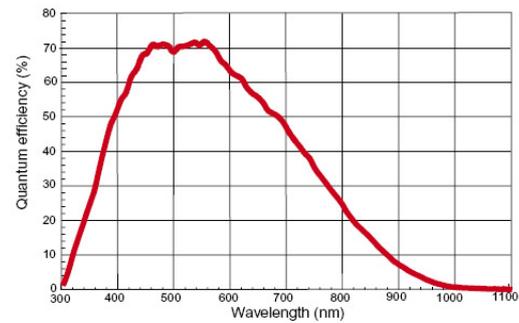
Caractéristiques de la caméra CCD

**HAMAMATSU**  
DATA SHEET

**High Resolution Digital  
B/W CCD Camera  
ORCA-ER**



**SPECTRAL RESPONSE CHARACTERISTICS**



\* This is typical, not guaranteed.

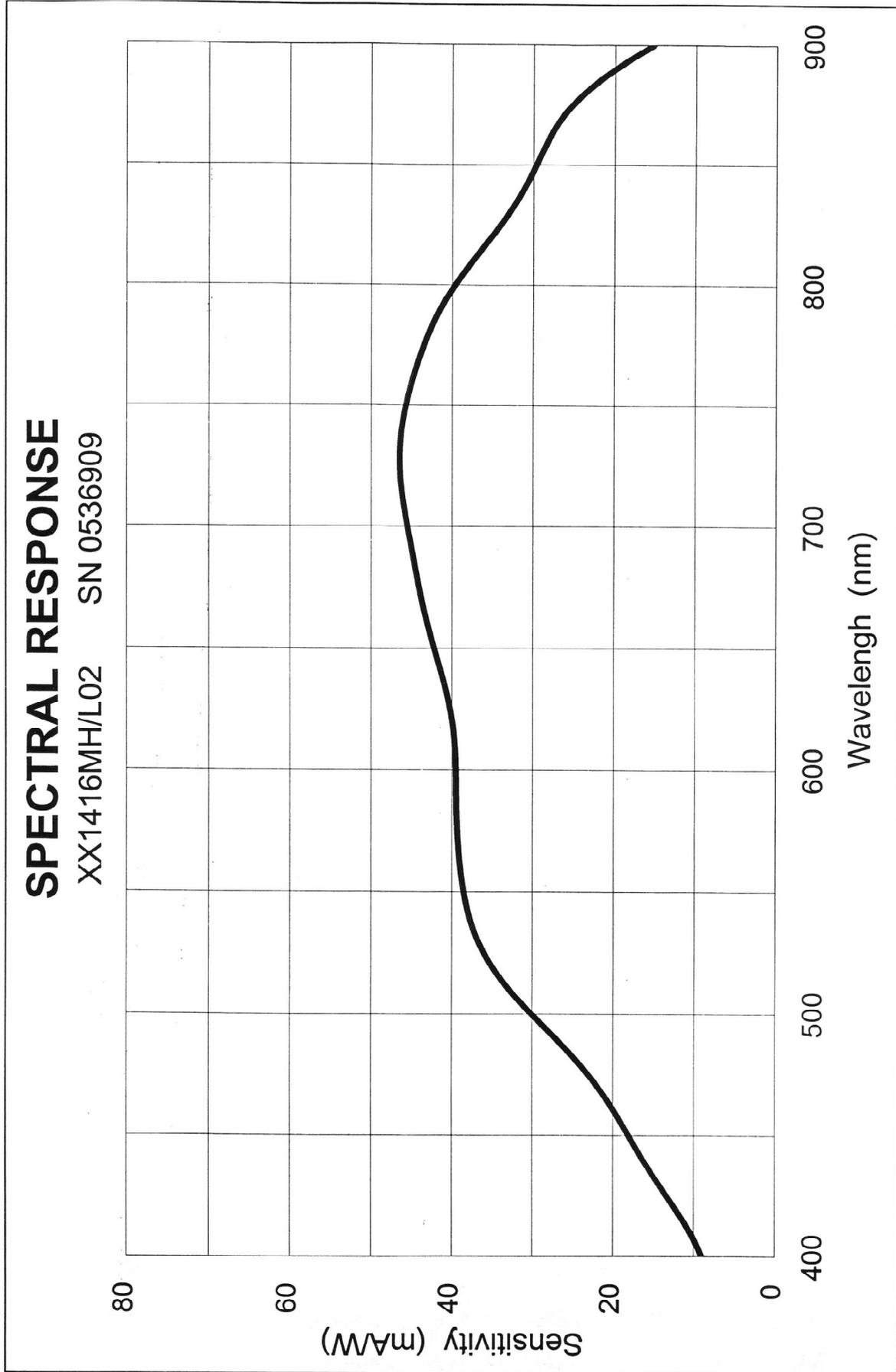
**SPECIFICATIONS**

Imaging device	Progressive scan interline CCD with micro-lens
Effective no. of pixels	1344 (H) × 1024 (V)
Cell size	6.45 μm × 6.45 μm (square format)
Effective area	8.67mm × 6.60 mm (2/3-inch format)
Pixel clock rate	14.75MHz/pixel
Frame rate	8.3 Hz
2 × 2 binning	16.4 Hz
4 × 4 binning	29.0 Hz
8 × 8 binning	45.3 Hz
Readout noise (r.m.s.)	8 electrons
Full well capacity	18,000 electrons
Dynamic range*	2250 :1
Cooling method	Peltier cooling with hermetic vacuum sealing
Cooling temperature	- 20 °C at 20 °C ambient temperature
Dark current	0.1 electron/pixel/sec
A/D converter	12 bit
Output signal (digital output)	RS-422A 12-bit parallel output
External control	RS-232C (full remote for all camera functions)
Sub array**	yes
External trigger	yes
Contrast enhancement	Analog Gain (10 times max.) and Offset functions
Power consumption	70 VA
Ambient storage temperature	-10 to +50 °C
Ambient operating temperature	0 to +40 °C
Ambient operating/storage humidity	70% max. (no condensation)

\* Calculated from the ratio of the full well capacity and average readout noise.

\*\* Note: Includes 1280 × 1024 image size software compatibility with ORCA and ORCA II series.

Réponse spectrale de l'intensificateur HRI



## Annexe 2 : influence des différents paramètres d'acquisition

### A2.1 – Influence des paramètres d'acquisition sur les intensités mesurées

#### A2.1.1 - Linéarité des détecteurs

Dans cette série de mesures, nous avons regardé l'influence de différents paramètres sur l'intensité mesurée en fonction de la puissance laser incidente. Pour la caméra, nous avons fait varier le nombre d'images pour faire la moyenne, le temps d'exposition, et le gain. Pour la porte temporelle, l'influence de la largeur des portes et celle du gain ont été observées.

Pour chacun de ces paramètres, une valeur par défaut a été définie (valeurs les plus souvent utilisées ou centrales), qui sert de référence. Ainsi lors de l'étude de l'influence d'un paramètre, les autres paramètres prennent cette valeur par défaut. Toutes les valeurs choisies pour l'étude sont consignées dans le tableau 3-A1-1. Pour réaliser ces mesures, nous plaçons un miroir en argent dans le plan d'observation, et la réflexion du faisceau (très fortement atténué) par le miroir est envoyée sur le système de détection. Nous enregistrons les résultats pour des puissances lasers incidentes sur le microscope de 5, 20, 60, 100, 140 et 220  $\mu\text{W}$ .

Paramètre	CCD			HRI	
	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur par défaut	<b>10</b>	<b>250</b>	<b>0</b>	<b>400</b>	<b>460</b>
Valeurs prises pour l'étude	1	1	50	200	260
	5	100	100	300	360
	10	200	150	400	460
	15	250	200	500	560
	20	300	250	600	660
	30	400		700	760
		1000		800	850
				900	
				1000	
				5000	

Tableau 3-A1-1 : valeur des paramètres pour l'étude de la linéarité des détecteurs.

La caméra CCD fonctionnant sur 12 bits, les valeurs d'intensité mesurées sur la caméra vont de 0 à 4096.

Concernant la caméra, nous retrouvons la linéarité attendue pour les trois paramètres.

Tout d'abord, l'intensité sur la caméra en fonction de la puissance laser incidente à nombre d'images fixé est parfaitement linéaire. De plus, l'intensité sur la caméra en fonction du nombre d'images est constante à puissance laser fixée (figure 3-A1-1).

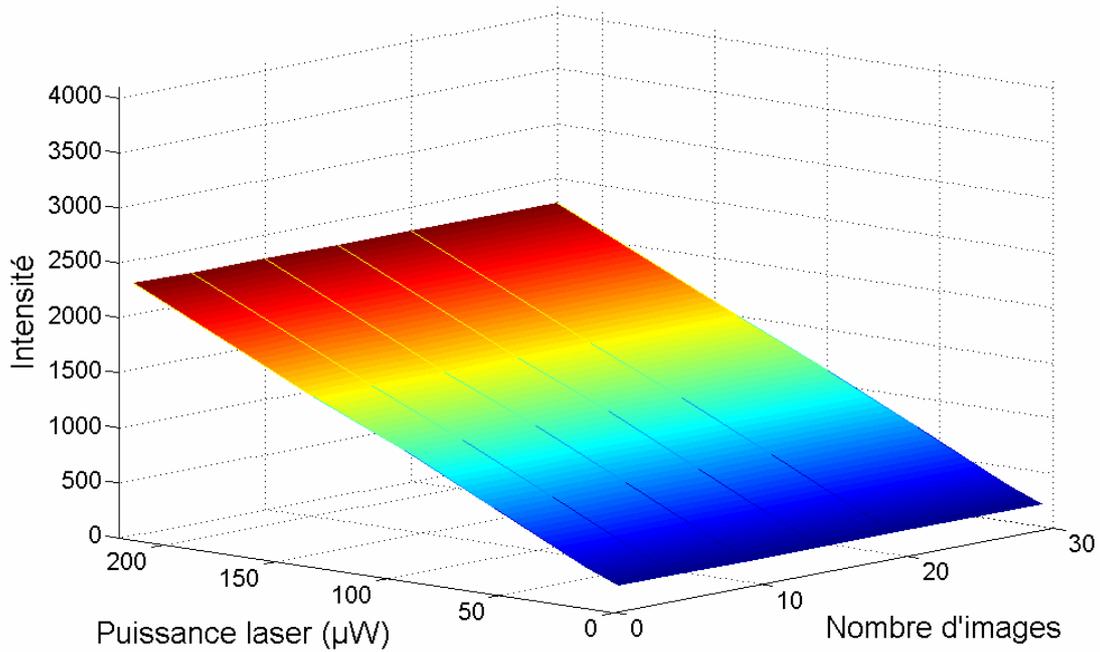


Figure 3-A1-1 : influence du nombre d'images utilisées pour faire la moyenne sur l'intensité détectée pour une image moyennée (la valeur d'intensité minimale est représentée en bleu et la maximale en rouge).

Ensuite, l'intensité sur la caméra en fonction de la puissance laser pour un temps d'exposition fixé est linéaire tant que l'intensité mesurée a des valeurs inférieures à 3500. Pour des valeurs supérieures, on voit apparaître une saturation. Il en va de même pour l'intensité en fonction du temps d'exposition à puissance laser fixée (figure 3-A1-2).

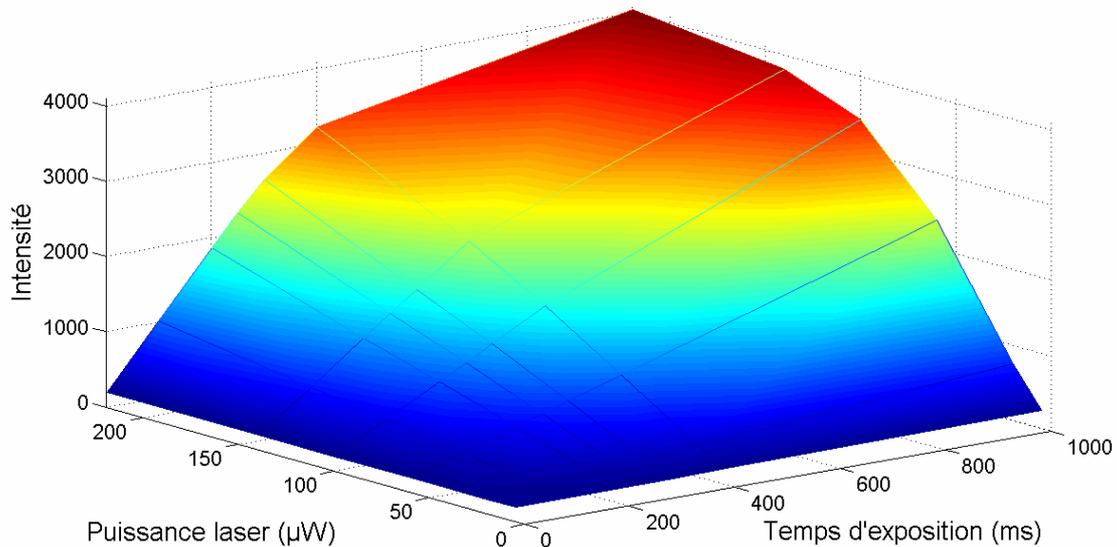


Figure 3-A1-2 : influence du temps d'exposition sur la caméra CCD sur l'intensité détectée pour une image moyennée.

Enfin, en-dehors de la zone de saturation, c'est-à-dire pour des valeurs d'intensité pas trop proche du maximum, l'intensité sur la caméra en fonction de la puissance à gain fixé et l'intensité sur la caméra en fonction du gain à puissance fixée sont linéaires (figure 3-A1-3).

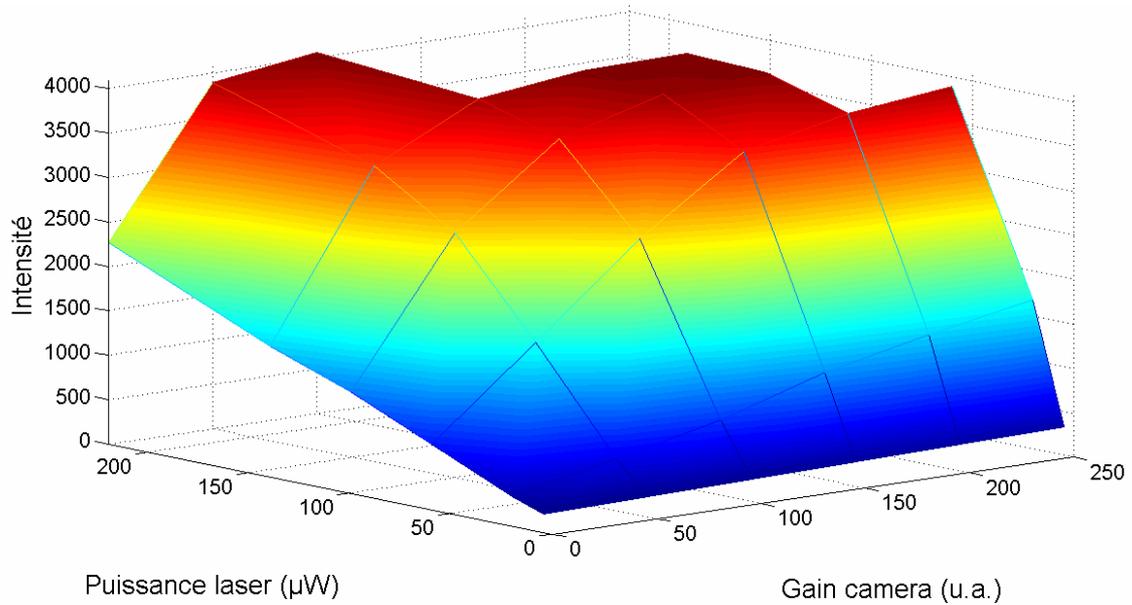


Figure 3-A1-3 : influence du gain de la caméra CCD sur l'intensité détectée pour une image moyennée.

Concernant la porte temporelle, les résultats sont également concluants.

A gain fixé, loin de la saturation, l'intensité sur la caméra est une fonction linéaire de la puissance laser. Par contre, à puissance fixée, l'intensité sur la caméra ne varie pas linéairement en fonction du gain : l'évolution est plutôt exponentielle. Cette évolution est normale quand on utilise des détecteurs comme les galettes à microcanaux ou les photomultiplicateurs (figure 3-A1-4).

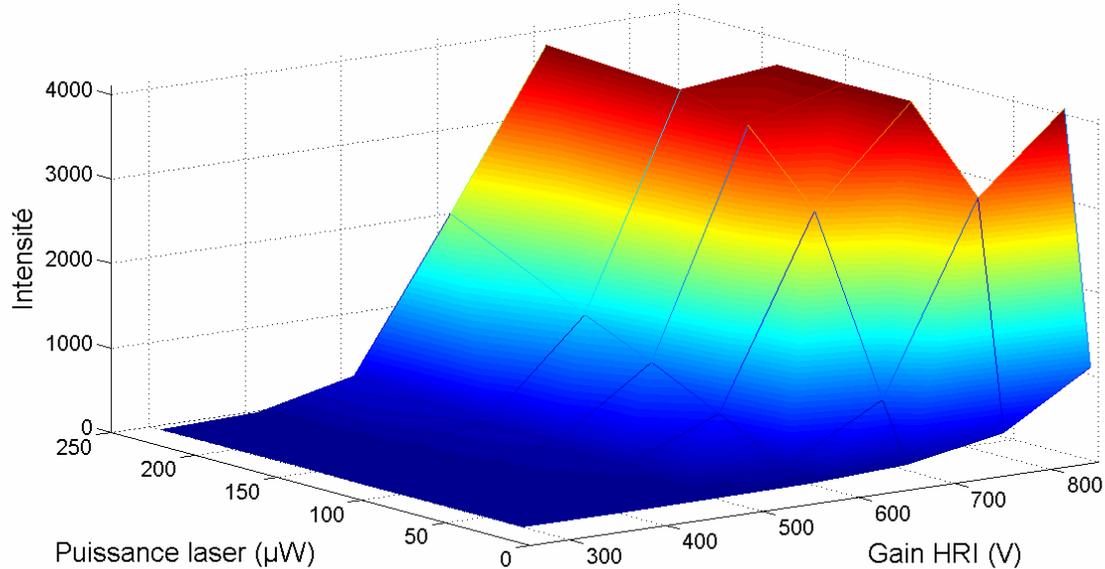


Figure 3-A1-4 : influence du gain de l'intensificateur sur l'intensité détectée pour une image moyennée.

A largeur de porte fixée, l'intensité sur la caméra en fonction de la puissance laser est parfaitement linéaire. Par contre, l'intensité sur la caméra en fonction de la largeur de la porte à puissance laser fixée n'est pas complètement linéaire (figure 3-A1-5). Ceci n'est pas très gênant puisqu'a priori, nous n'allons pas changer largeur temporelle pour la porte au cours d'une acquisition. Et ceci pourrait s'expliquer par des largeurs de portes effectives quelque peu différentes des valeurs de consigne.

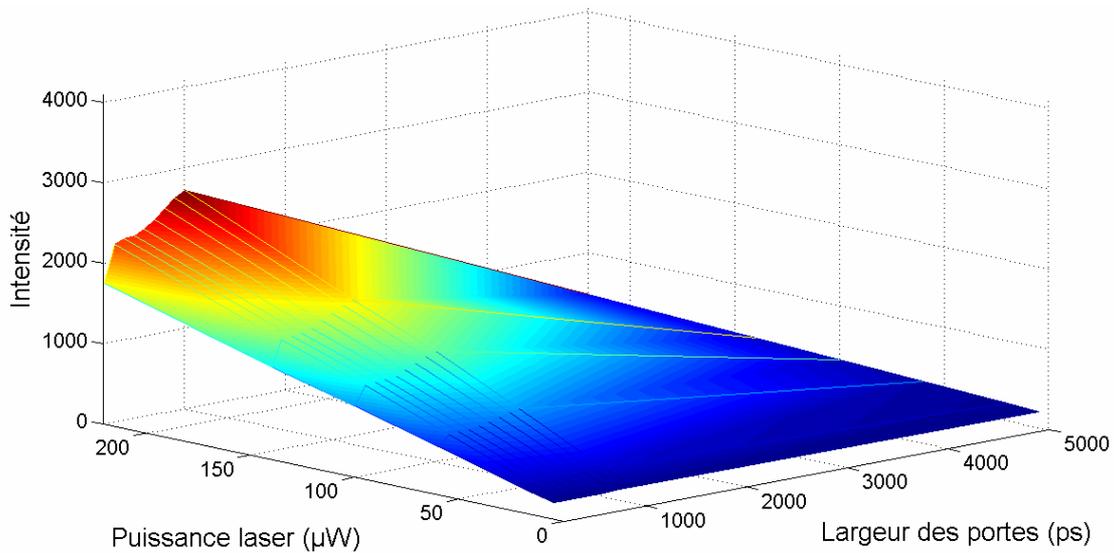


Figure 3-A1-5 : influence de la largeur des portes temporelles de l'intensificateur sur l'intensité détectée pour une image moyennée.

### A2.1.2 - Détermination de la largeur des portes temporelles

La largeur des portes à une cadence de 15 MHz est contrôlée en plaçant un miroir dans le plan focal de l'objectif, comme précédemment. Une série d'images pour une largeur de porte donnée est enregistrée en déplaçant la porte de 25 ps (le plus petit pas possible) entre chaque acquisition. On trace ensuite l'intensité du signal reçu sur le système caméra/porte temporelle en fonction du retard autour de l'instant d'arrivée de l'impulsion. La largeur à mi hauteur de la courbe ainsi obtenue correspond à la largeur effective de la porte. Les profils obtenus sont rapportés figure 3-A1-6 et les largeurs mesurées à mi-hauteur figurent dans le tableau 3-A1-2.

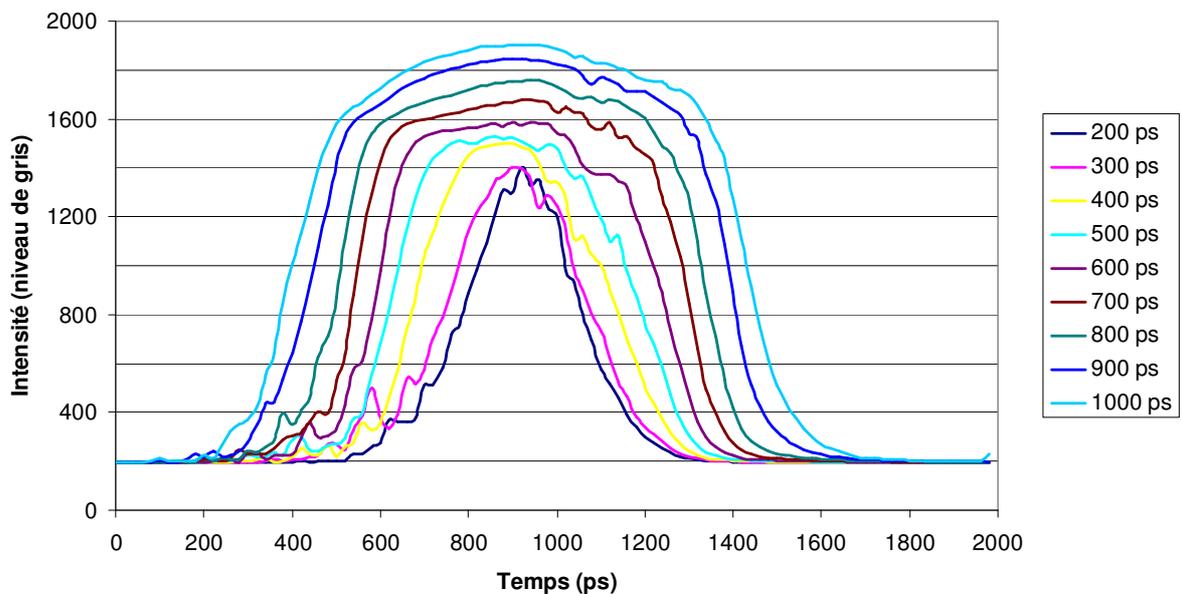


Figure 3-A1-6 : détermination expérimentale de la largeur des portes pour les différentes consignes.

Largeur de consigne (ps)	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	5000
Largeur mesurée à mi-hauteur (ps)	272	328	441	540	624	742	840	940	1040	4800

Tableau 3-A1-2 : comparaison des largeurs de portes de consigne et mesurées.

On note des différences significatives entre les consignes et les largeurs de portes mesurées, ce qui pourrait expliquer la non-linéarité observée précédemment. Les portes mesurées dans le mode Comblow (porte de 100 ps à 1000 ps à une cadence de 20 MHz) sont plus longues que la consigne d'une quarantaine de ps. Ceci est sans doute due à la différence entre la cadence de travail de la porte (définie par le constructeur à 20 MHz), et la cadence de notre source laser (15 MHz). Les portes plus longues du mode User 1 pour des algorithmes d'acquisition à deux portes semblent quant à elles 200 ps plus courtes que la consigne (4800 ps mesurées contre 5000 ps de consigne).

Au cours de cette étude, nous avons également pu vérifier que la largeur effective des portes temporelles ne varie pas lorsque l'on change le gain du HRI.

Cette caractérisation des détecteurs étant achevée, nous allons maintenant nous intéresser à la mesure de temps de vie de fluorescence et aux performances temporelles de notre dispositif.

## **A2.2 – Influence des paramètres d'acquisition sur les temps de vie mesurés**

Nous étudions l'influence des différents paramètres d'acquisition sur le temps de vie mesuré. Pour toutes ces mesures, nous utilisons le même algorithme, qui est notre algorithme de référence (nous le noterons  $A_{ref}$ ) et qui est défini dans le tableau 3-A1-3 (les temps sont exprimés en ps).

1ère acquisition	$t_0 + 10000$
2ème acquisition	$t_0 + 8000$
3ème acquisition	$t_0 + 6000$
4ème acquisition	$t_0 + 5000$
5ème acquisition	$t_0 + 4000$
6ème acquisition	$t_0 + 3000$
7ème acquisition	$t_0 + 2500$
8ème acquisition	$t_0 + 2000$
9ème acquisition	$t_0 + 1500$
10ème acquisition	$t_0 + 1000$
11ème acquisition	$t_0 + 750$
12ème acquisition	$t_0 + 350$
13ème acquisition	$t_0 + 0$

Dans cet algorithme, nous réalisons 13 acquisitions pour échantillonner le déclin. Pour limiter l'influence de la persistance, l'acquisition se fait en remontant le déclin. Au début du déclin, les acquisitions sont plus proches. Nous exploitons la relativement basse cadence de la source en prenant un point 10 ns après l'impulsion.

Cet algorithme permet de mesurer proprement des temps de vie aux alentours de 2 ns.

Tableau 3-A1-3 : algorithme Aref.

### **A2.2.1 - Paramètres d'acquisitions CCD**

Comme on l'a vu, nous avons trois paramètres à régler sur la caméra CCD : le nombre d'acquisitions à moyenner pour obtenir une image, le temps d'exposition et le gain. Nous avons donc analysé l'influence de chacun de ces paramètres en travaillant toujours avec le même algorithme. Pour cela, nous avons fait varier le paramètre concerné (« valeurs prises pour l'étude ») et nous avons fixé les autres aux valeurs « par défaut » indiquées dans le tableau 3-A1-4.

Nous observons ici une solution de rhodamine B et par conséquent nous utilisons pour l'excitation un filtre centré à 531 nm avec une largeur de 40 nm, et pour la détection, un filtre centré à 593 nm avec une largeur de 40 nm.

Paramètre	CCD			HRI	
	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur par défaut	10	100	0	500	600
Valeurs prises pour l'étude	1	1	0		
	5	100	50		
	10	200	100		
	15	250	150		
	20	300	200		
	30	400	250		
		1000	255		

Tableau 3-A1-4 : paramètres d'acquisition.

Les valeurs rapportées ont été obtenues avec une mesure à chaque fois, c'est-à-dire qu'elles correspondent à une moyenne sur l'ensemble d'une image, i.e. sur les  $672 \times 512$  pixels. De plus, ces évolutions rapportées pour chacun des paramètres sont représentatives du comportement observé pour différentes séries de mesures et avec différents échantillons.

Concernant le nombre d'images (figure 3-A1-7), quand on acquiert une seule image et qu'on ne calcule pas de moyenne, on obtient des temps de vie aberrants avec un écart type important (environ 6%). Ces valeurs aberrantes s'expliquent sans doute par le fait qu'avec une seule acquisition, nous sommes gênés par la persistance de l'ensemble du système de détection qui fausse la mesure. L'écart type important quant à lui est probablement dû au scintillement de l'écran à phosphore qui dégrade le rapport signal à bruit de l'image obtenue. Dès que nous moyennons sur quelques acquisitions, les valeurs obtenues sont plus pertinentes (le poids des toutes premières acquisitions faussées par la persistance dans l'image finale diminue), et l'écart type diminue (le scintillement est moyenné). Ce paramètre a une certaine influence sur les temps de vie trouvés. Nous décidons donc de le fixer pour toutes nos mesures à la valeur de 10. En effet en effectuant la moyenne sur 10 acquisitions, nous obtenons des temps de vie corrects et un écart type relativement bas (moins de 2%). Bien entendu, en augmentant le nombre d'acquisitions, nous réduirions encore cet écart type mais de manière moins importante, et par contre nous augmenterions sensiblement le temps total d'acquisition.

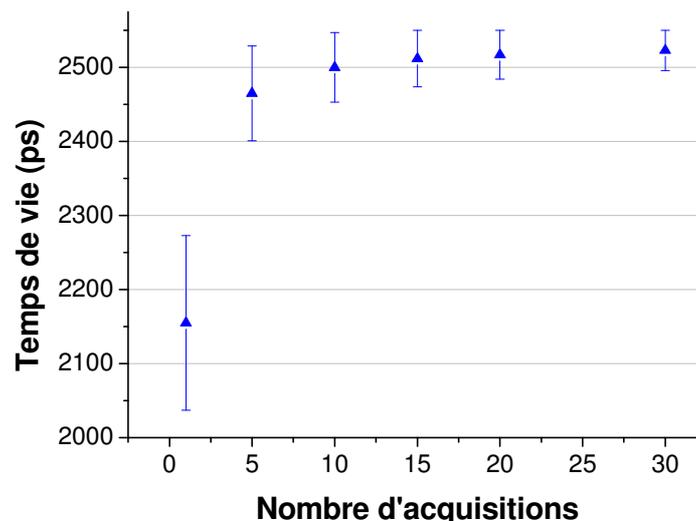


Figure 3-A1-7 : influence du nombre d'acquisitions utilisées pour obtenir une image moyennée sur le temps de vie mesuré.

Pour le temps d'exposition, nous obtenons une évolution comparable, ceci étant prévisible vue la linéarité du détecteur (figure 3-A1-8). Pour des temps d'exposition très courts (quelques ms), le

signal est vraiment noyé dans le bruit et le temps de vie mesuré est par conséquent faussé, avec un écart type important. En augmentant le temps d'exposition, nous retrouvons des valeurs convenables, avec un écart type plus raisonnable qui va en diminuant. Pour des niveaux de signal comparables à celui de la fluorescence dans des cellules, un temps d'exposition de 250 ms semble un bon compromis. On garde toutefois à l'esprit que pour des niveaux plus importants, il est possible de réduire raisonnablement le temps d'exposition (jusqu'à 100 ms) pour gagner du temps pendant l'acquisition.

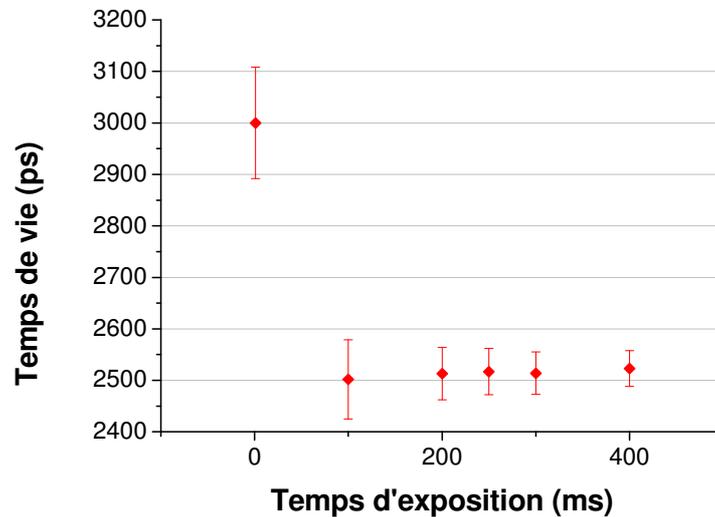


Figure 3-A1-8 : influence du temps d'exposition sur la CCD sur le temps de vie mesuré.

Le gain quant à lui a une influence très minime sur les temps de vie trouvés (figure 3-A1-9). Il n'apporte rien de plus par rapport aux choix des paramètres d'acquisition de la porte temporelle.

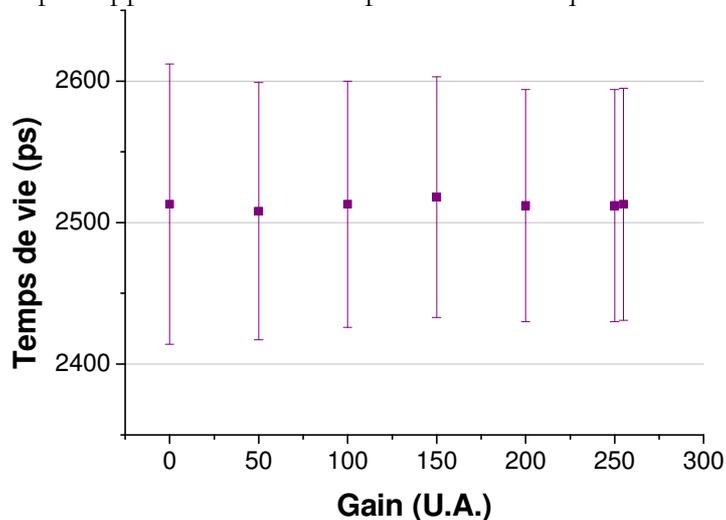


Figure 3-A1-9 : influence du gain de la CCD sur le temps de vie mesuré.

### A2.2.2 - Paramètres d'acquisitions HRI

Pour l'intensificateur, l'utilisateur peut régler deux paramètres : la largeur des portes et le gain. Comme pour la caméra, nous avons donc regardé l'influence de chacun de ces paramètres en procédant exactement de la même manière (tableau 3-A1-5).

Paramètre	CCD			HRI	
	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur par défaut	10	250	0	500	670
Valeurs prises pour l'étude				200	260
				300	300
				400	350
				500	400
				600	450
				700	500
				800	550
				900	600
				1000	650
					700
				750	
				800	
				850	

Tableau 3-A1-5 : paramètres d'acquisition.

Pour la largeur des portes, nous rapportons ici les résultats obtenus avec un échantillon de fluorescéine, ce qui explique les temps de vie mesurés plus courts. L'excitation est réalisée grâce à un filtre centré à 482 nm avec une largeur de 35 nm, et la détection avec un filtre centré à 536 nm avec une largeur de 40 nm. On remarque une légère augmentation du temps de vie quand la largeur des portes augmente (une augmentation de 50 ps entre les deux extrêmes) ainsi qu'une diminution de l'écart type (figure 3-A1-10). Cette augmentation peut être due d'une part au temps de vie assez court, qui est proche de la largeur des portes les plus longues (900 ps et 1000 ps) pour lesquelles l'augmentation est la plus significative. De plus, comme on le verra par la suite, cette augmentation peut aussi s'expliquer par le décalage dans le temps du début du déclin suivant les portes. Toujours est-il que cette augmentation est assez faible. Pour l'écart type, l'évolution était prévisible : en intégrant plus longtemps le signal de fluorescence, on augmente le rapport signal à bruit pour chaque image. Dans la plupart de nos études, nous allons opter par conséquent pour des largeurs de portes de 800 ps.

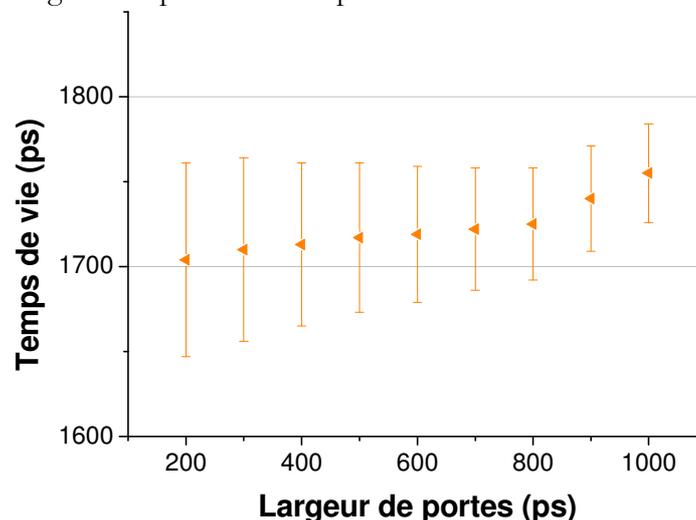


Figure 3-A1-10 : influence de la largeur des portes temporelles du HRI sur le temps de vie mesuré.

Pour étudier l'influence du gain, nous revenons à un échantillon de rhodamine B. Les résultats obtenus sont plus difficilement interprétables (figure 3-A1-11). En effet, il est impossible de parcourir toute la gamme de gain accessible avec le même niveau de signal de fluorescence. Ceci est nettement visible concernant l'écart type : sur le graphe de la figure 3-A1-11 correspondant, on voit une décroissance de l'écart type quand le gain augmente et que le signal de fluorescence est constant, et on peut ainsi déterminer précisément quand la valeur du signal de fluorescence a

été retouchée. On retiendra donc concernant ce paramètre que les variations de temps de vie mesurées consécutives au changement de gain sont inférieures à 60 ps.

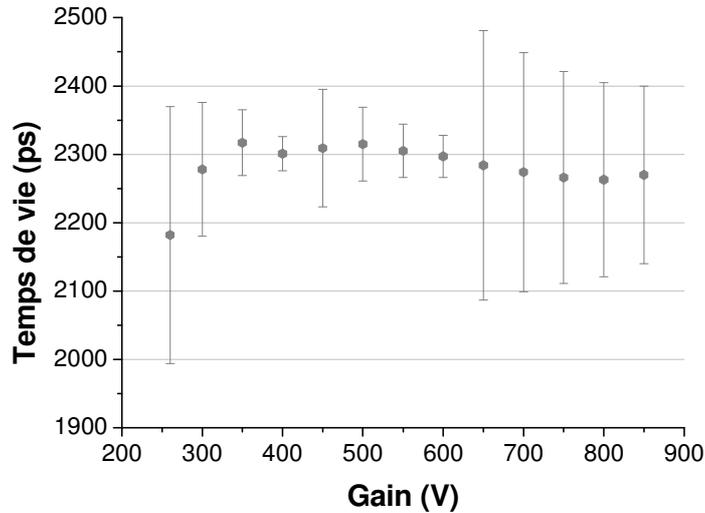


Figure 3-A1-11 : influence du gain du HRI sur le temps de vie mesuré.

Au final, ce paramètre est ajusté à chaque mesure, pour amplifier convenablement le signal de fluorescence, et bénéficier d'une dynamique importante sur la caméra CCD.

### A2.2.3 - Position du maximum d'intensité

Ensuite, pour continuer l'étude de l'influence des différents paramètres sur la mesure du temps de vie, il semble qu'un des paramètres qui induise le plus d'erreur est la position de début de l'échantillonnage du déclin. En effet, au cours de toutes ces expériences d'étalonnage, nous avons pu constater que des petits décalages temporels de l'impulsion (plusieurs dizaines de ps) d'un jour sur l'autre entraînent des changements importants sur les temps de vie mesurés (plusieurs centaines de ps). Nous avons donc cherché à positionner précisément le début du déclin, ou autrement dit l'image la plus intense, et à voir l'influence d'un décalage entre cette image et le début de l'échantillonnage.

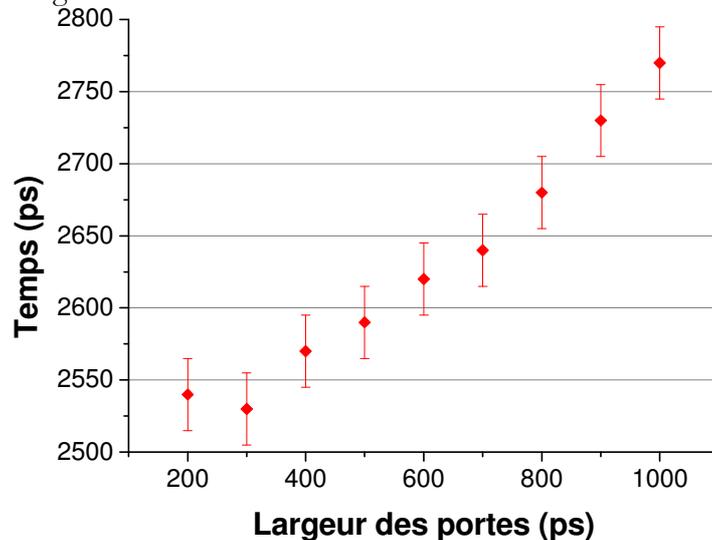


Figure 3-A1-12 : position du début du déclin suivant la largeur des portes.

La position de l'image la plus intense dépend de la largeur des portes. La référence (le 0) de l'échelle de temps est définie arbitrairement. Comme nous l'avons vu lors de la mesure de la largeur effective des portes, l'élargissement temporel se fait de manière symétrique, ce qui introduit cette petite dérive quand on augmente la largeur des portes.

Cette position peut être mise en évidence pratiquement de manière simple. Pour cela, il suffit pratiquement de localiser grossièrement le maximum d'intensité, puis de décaler la porte grâce à la ligne à retard du plus petit pas possible (25 ps) et de repérer ainsi précisément la position de l'image la plus intense. Lorsque ce repérage se fait avec des échantillons assez fluorescents et des paramètres d'acquisitions convenablement choisis, nous sommes capables de trouver cette position à 25 ps près (figure 3-A1-12).

Nous mesurons ensuite le temps de vie de fluorescence pour un échantillon de rhodamine B en solution. Les paramètres d'acquisition sont reportés dans le tableau 3-A1-6.

Paramètre	CCD			HRI	
	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	10	100	0	800	550

Tableau 3-A1-6 : paramètres d'acquisition.

Le maximum d'intensité est repéré à 6625. Nous décalons donc la prise de l'image la plus intense autour de cette valeur mesurée (et par conséquent nous décalons toutes les prises d'images de l'algorithme). Les temps de vie obtenus figurent dans le graphe suivant (figure 3-A1-13).

On voit l'importance primordiale de ce paramètre : un décalage de 50 ps décale le temps de vie mesuré d'une soixantaine de ps. Si l'algorithme part trop tôt, les premières valeurs d'intensité du déclin (les dernières dans l'ordre de l'acquisition avec l'algorithme utilisé), vont créer un front montant ou un palier artificiel qui vont rallonger le temps de vie. Et à l'inverse, si l'algorithme part trop tard, les dernières images du déclin (les premières dans l'ordre de l'acquisition avec l'algorithme utilisé) sont noyées dans le bruit de fond, et ainsi on va raccourcir le déclin et écourter le temps de vie mesuré. L'optimum semble de choisir  $t_0$  (début de l'algorithme) 300 ps après le maximum, pour se situer sur le « plateau » mis en évidence sur la courbe 3-24 et pour bénéficier d'un écart type le plus bas.

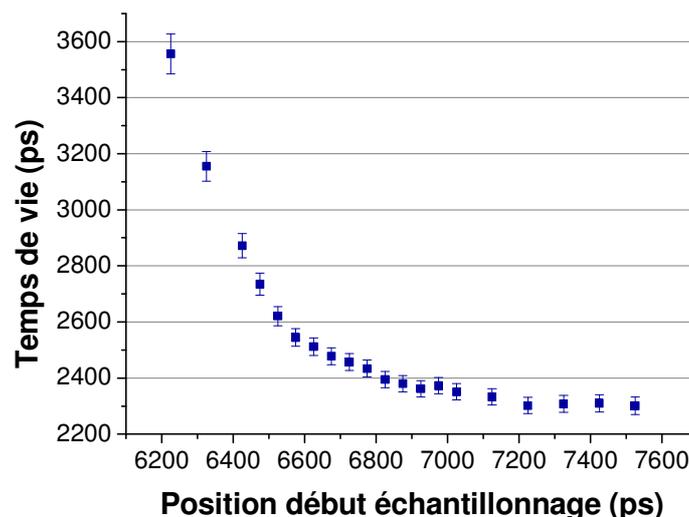


Figure 3-A1-13 : temps de vie mesuré en fonction du temps de départ de l'acquisition.

A la vue de ces résultats, il est essentiel, avant de lancer une série d'expérience, de repérer précisément la position du maximum d'intensité pour ne pas fausser le temps de vie mesuré.

**A2.2.4 - Persistance de la détection**

	Aref	Aenv	Araz
1ère acquisition	t0 + 10000	t0 + 0	t0 + 32000
2ème acquisition	t0 + 8000	t0 + 350	t0 + 10000
3ème acquisition	t0 + 6000	t0 + 750	t0 + 32001
4ème acquisition	t0 + 5000	t0 + 1000	t0 + 8000
5ème acquisition	t0 + 4000	t0 + 1500	t0 + 32002
6ème acquisition	t0 + 3000	t0 + 2000	t0 + 6000
7ème acquisition	t0 + 2500	t0 + 2500	t0 + 32003
8ème acquisition	t0 + 2000	t0 + 3000	t0 + 5000
9ème acquisition	t0 + 1500	t0 + 4000	t0 + 32004
10ème acquisition	t0 + 1000	t0 + 5000	t0 + 4000
11ème acquisition	t0 + 750	t0 + 6000	t0 + 32005
12ème acquisition	t0 + 350	t0 + 8000	t0 + 3000
13ème acquisition	t0 + 0	t0 + 10000	t0 + 32006
14ème acquisition			t0 + 2500
15ème acquisition			t0 + 32007
16ème acquisition			t0 + 2000
17ème acquisition			t0 + 32008
18ème acquisition			t0 + 1500
19ème acquisition			t0 + 32009
20ème acquisition			t0 + 1000
21ère acquisition			t0 + 32010
22ème acquisition			t0 + 750
23ème acquisition			t0 + 32011
24ème acquisition			t0 + 350
25ème acquisition			t0 + 32012
26ème acquisition			t0 + 0

Tableau 3-A1-7 : position des différentes acquisitions pour les 3 algorithmes. t0 est le début du déclin.

Pour finir, nous avons étudié la persistance de la détection et son influence sur les temps de vie mesuré. Pour ce faire, nous avons utilisé trois algorithmes (tableau 3-A1-7) :

- $A_{ref}$  défini précédemment
- $A_{env}$  qui est le même algorithme que  $A_{ref}$  mais en procédant aux différentes acquisitions dans l'ordre inverse
- $A_{raz}$ , qui échantillonne le déclin comme  $A_{ref}$ , mais en intercalant entre chaque mesure, une remise à zéro en enregistrant une image très loin après l'impulsion.

L'utilisation de l'algorithme  $A_{env}$  permet d'évaluer l'erreur induite par cette acquisition et de montrer pourquoi l'acquisition doit être réalisée en commençant par la fin du déclin. L'algorithme  $A_{raz}$  permet d'appréhender le pourcentage de l'intensité de l'image précédente qui persiste pour l'image suivante. De plus les déclins et les temps de vie obtenus avec cet algorithme peuvent être considérés comme une référence, puisque chaque image reçoit une contribution égale du bruit de fond.

Nous observons dans cette étude toujours de la rhodamine B diluée dans de l'éthanol avec les mêmes filtres. La puissance du laser est réglée pour avoir un signal assez important qui nous permette de travailler avec des valeurs de gain et de largeur de portes pour le HRI pas trop importantes. Nous procédons ici comme pour les études précédentes, en faisant varier certains paramètres d'acquisition (tableau 3-A1-8), et en réalisant à chaque fois la mesure du temps de vie avec les trois algorithmes.

Paramètre	CCD			HRI	
	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur par défaut	10	100	0	600	600
Valeurs prises pour l'étude	5	100		200	
	10	250		600	
	30	400		1000	
		1000			

Tableau 3-A1-8 : paramètres d'acquisition.

Pour chaque valeur des différents paramètres étudiés, nous rapportons le tableau avec les temps de vie et les écarts types mesurés pour chacun des algorithmes. Les déclin moyens obtenus (moyenne réalisée sur tous les pixels de l'image) figurent également dans cette annexe. La valeur de « Contribution image précédente (%) » représente le pourcentage de l'intensité de l'image précédente retrouvée sur l'image étudiée.

La persistance ayant une durée finie, nous pensons que seules les premières acquisitions utilisées dans le calcul pour obtenir l'image moyenne sont touchées.

		Temps de vie (ps)	Ecart type (ps)	Contribution image précédente (%)
5 images	Aref	2322	58	45
	Aenv	3245	96	
	Araz	2426	75	
10 images	Aref	2345	42	18
	Aenv	2745	53	
	Araz	2408	47	
30 images	Aref	2384	25	5,5
	Aenv	2507	27	
	Araz	2400	26	

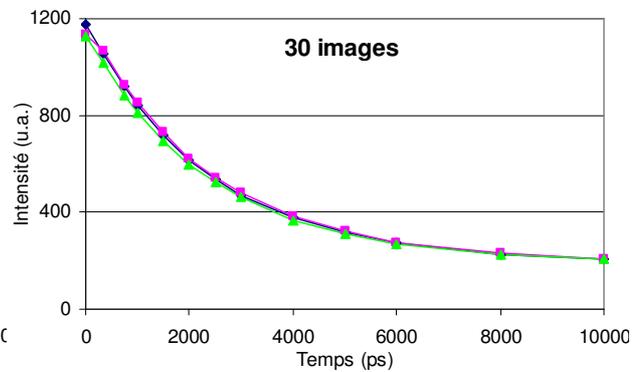
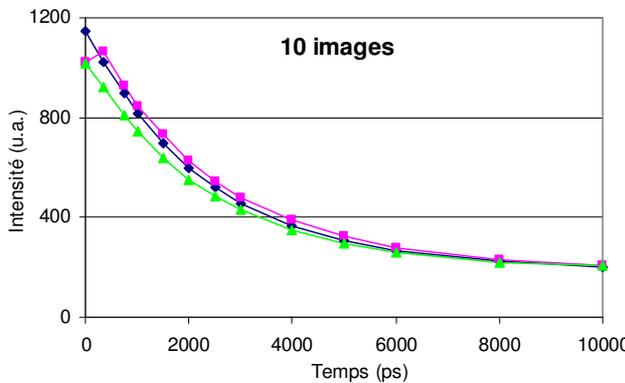
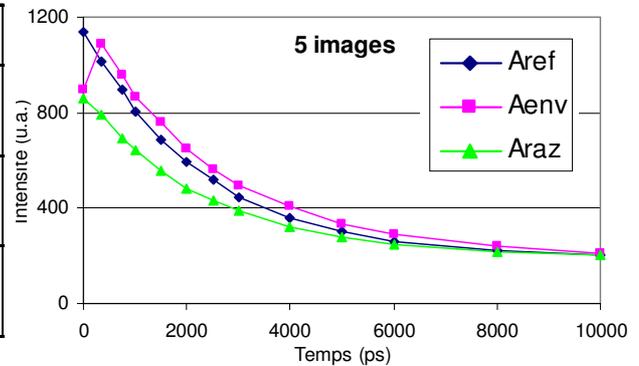


Figure 3-A1-14 : influence du nombre d'images moyennées sur la persistance. En haut à gauche, tableau avec, pour chaque nombre d'images et chaque algorithme, le temps de vie mesuré et l'écart type. Figure aussi dans ce tableau la contribution de l'image précédente mesurée suivant le nombre d'images moyennées. Sont également rapportés dans cette figure les déclin moyens obtenus pour chaque algorithme dans chacune des conditions.

Concernant le nombre d'images, nous remarquons que pour une moyenne sur 5 images, les algorithmes  $A_{ref}$  et  $A_{env}$  fournissent des temps de vie très différents (quasiment 1 ns d'écart) (figure 3-A1-14). Cette différence s'estompe quand le nombre d'images augmente. Les déclin rapportés confirment cette tendance. De même la différence entre les temps de vie obtenus avec  $A_{ref}$  et  $A_{raz}$  s'amenuise, passant de 100 ps à 63 ps, puis à 16 ps. Il est également intéressant d'analyser la contribution de l'image précédente sur l'image étudiée : en passant de 5 images à 10 images, cette contribution est quasiment divisée par 3 (de 45% à 18%), puis en prenant 30 images, elle est divisée aussi par trois. Cette évolution confirme bien que ce problème de

persistance se pose vraiment pour les toutes premières images acquises, et en augmentant le nombre d'acquisitions, nous réduisons considérablement l'influence de cette persistance.

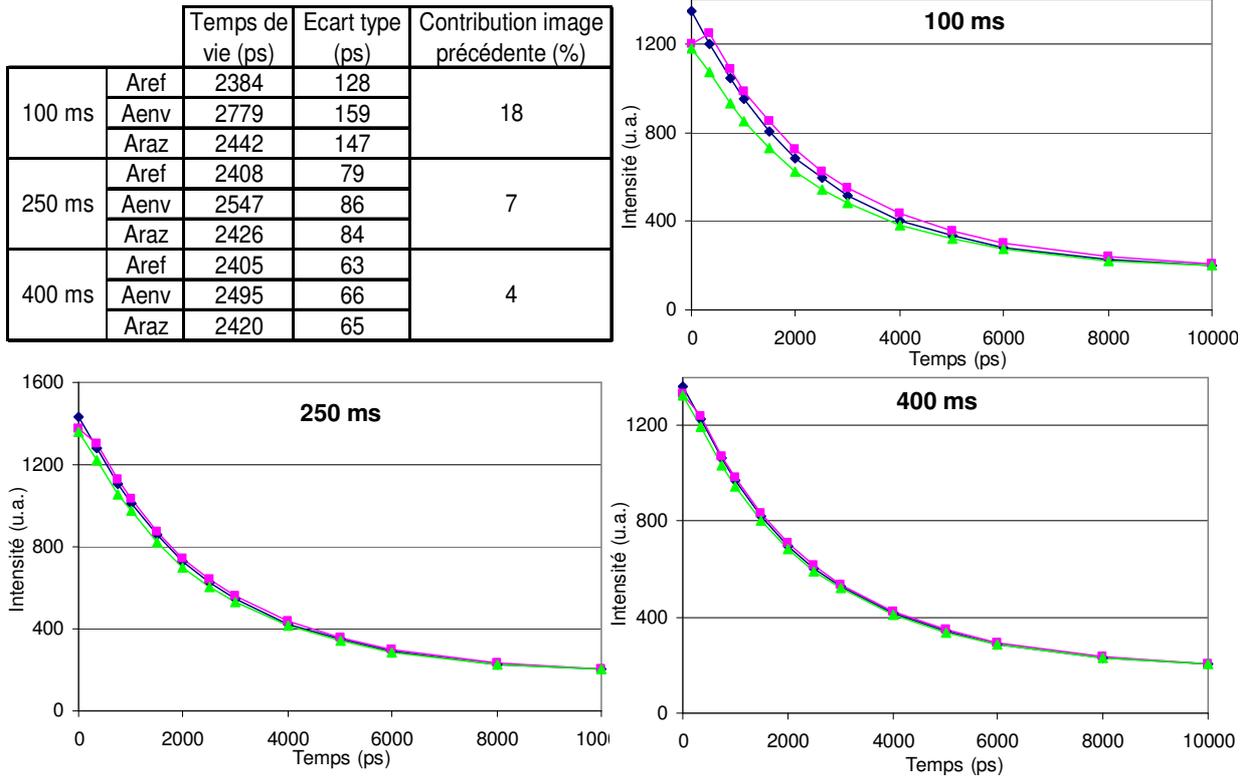


Figure 3-A1-15 : influence du temps d'exposition sur la CCD sur la persistance. En haut à gauche, tableau avec, pour chaque temps d'exposition et chaque algorithme, le temps de vie mesuré et l'écart type. Figure aussi dans ce tableau la contribution de l'image précédente mesurée suivant le temps d'exposition. Sont également rapportés dans cette figure les déclin moyens obtenus pour chaque algorithme dans chacune des conditions.

Le temps d'acquisition sur la caméra CCD a effectivement une influence comparable sur la mesure des temps de vie, mais dans des proportions moindres (figure 3-A1-15). En effet, les variations infligées au temps d'acquisition sont relativement bien moins importantes que les variations subies précédemment par le nombre d'images.

On retiendra ainsi, qu'augmenter le nombre d'images ou allonger le temps d'exposition permet logiquement de réduire l'influence de la persistance.

Par contre, nous nous sommes assurés que la largeur des portes temporelles ne jouait aucun rôle (figure 3-A1-16). Ceci confirme bien que cette persistance se produit au moment de relayer l'image, c'est-à-dire entre l'intensificateur et la CCD, et que c'est en jouant sur les paramètres de cette dernière que nous pouvons réduire la gêne occasionnée.

Cette étude nous conforte dans notre choix d'échantillonner le déclin de fluorescence en commençant par la fin. De plus, il semble que réaliser la moyenne sur 10 acquisitions pour obtenir chaque image et travailler avec un temps d'exposition de 250 ms nous permet de nous affranchir raisonnablement de la persistance de l'écran à phosphore. Dans ces conditions, seule 7% de l'intensité de l'image précédente affecte l'image acquise, ce qui est faible et n'induit qu'une faible erreur lorsque l'acquisition commencera par la fin du déclin. Ici encore, le choix final des paramètres est un compromis, puisque l'augmentation du nombre d'images ou du temps d'exposition est coûteuse en temps.

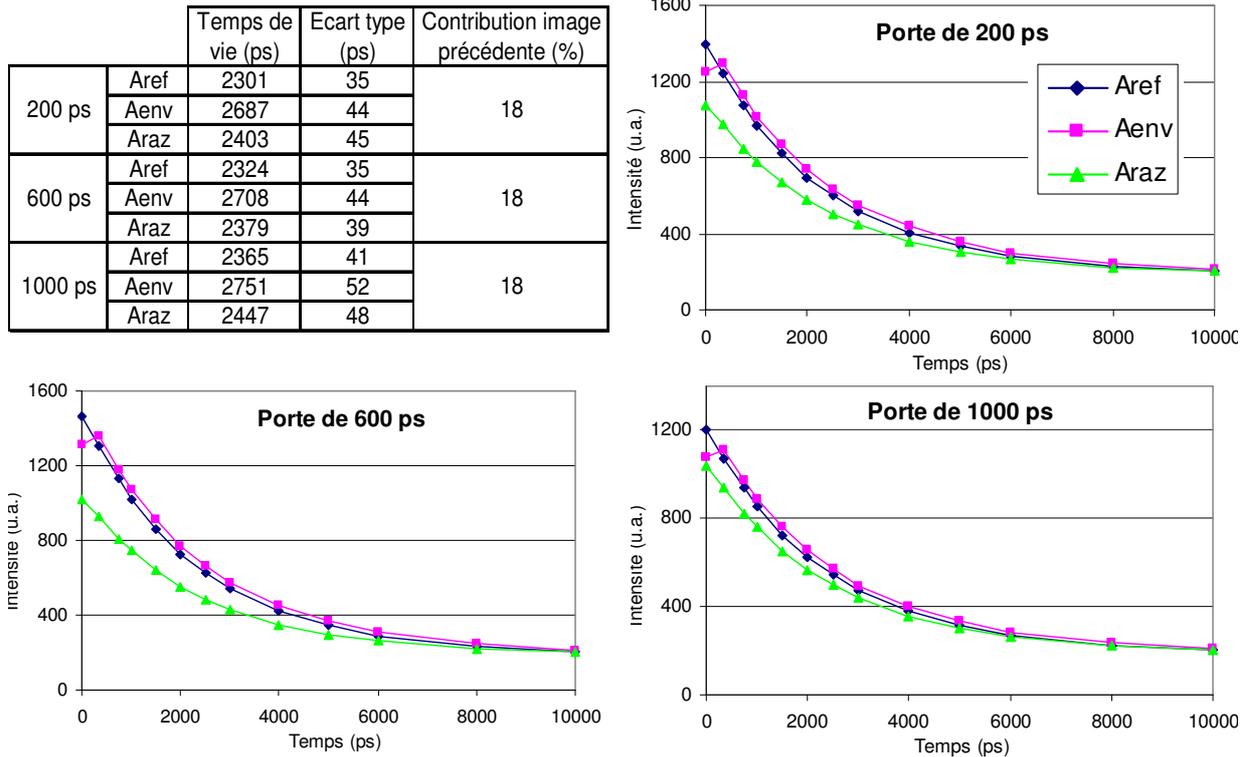


Figure 3-A1-16 : influence de la largeur des portes temporelles du HRI sur la persistance. En haut à gauche, tableau avec, pour chaque largeur de porte et chaque algorithme, le temps de vie mesuré et l'écart type. Figure aussi dans ce tableau la contribution de l'image précédente mesurée suivant la largeur de la porte. Sont également rapportés dans cette figure les déclin moyens obtenus pour chaque algorithme dans chacune des conditions.

Notons également qu'une erreur conséquente sur le temps de vie (quelques centaines de ps) est introduite lorsque la dernière image affichée avant de lancer l'algorithme d'acquisition ( $A_{ref}$ ) a une intensité importante. Effectivement, puisque la première image réalisée est celle de fin de déclin, si juste avant de lancer l'acquisition, l'image affichée a une intensité importante, la persistance de la détection fausse la mesure : au lieu d'avoir une valeur d'intensité proche du bruit de fond (puisque la première acquisition se situe 10 ns après l'impulsion), nous surestimons l'intensité de cette dernière image, et en augmentant ainsi artificiellement ce que l'ajustement considère comme le 0, nous raccourcissons le déclin. Ainsi, avant de lancer l'acquisition, il faut que l'image affichée à l'écran soit du bruit de fond.

Cette persistance semble être essentiellement due à des problèmes de synchronisation des différents outils utilisés pour échantillonner le déclin et acquérir les images d'intensité, et pilotés par notre programme : la ligne à retard et la caméra CCD. Le décalage de la ligne à retard ne semble pas être immédiat, permettant ainsi à la caméra d'enregistrer quelques images (une ou deux suivant les temps d'exposition utilisés) alors que la ligne est en train de changer de position mais n'a pas encore atteint la position qu'elle doit occuper pour l'acquisition. L'écran à phosphore souffre également d'une certaine persistance, mais les valeurs ne sont pas du tout du même ordre de grandeur (la persistance du phosphore utilisé P43, composition  $Gd_2O_2S:Tb$  est d'environ 1,2 ms).