

Système de détection SiVIR de nouvelle génération pour le microscope confocal à balayage laser FLUOVIEW FV4000

Résumé

Evident a mis au point son propre système de détecteur SiVIR de nouvelle génération pour le microscope confocal à balayage laser FV4000. Ce détecteur établit une nouvelle référence en matière d'imagerie multicolore en assurant un bruit exceptionnellement faible et une grande sensibilité avec un rapport signal/bruit (S/B) impressionnant dans la plage de longueurs d'onde du visible et du proche infrarouge. Avec sa capacité à détecter avec précision les photons, et notamment sa fonction de comptage de photons à grande vitesse et sur une plage dynamique étendue, le détecteur SiVIR contribue à assurer la répétabilité des expériences. En outre, il introduit un mode d'utilisation simplifié en éliminant le besoin de procéder à des ajustements du gain, comme c'est généralement le cas avec les détecteurs à tube photomultiplicateur. Ses excellentes performances placent le détecteur SiVIR sur une trajectoire toute tracée pour devenir la nouvelle référence du secteur de la microscopie à balayage laser.

1. Introduction

Les tubes photomultiplicateurs (PMT), qui sont capables de détecter de faibles niveaux de lumière de l'ordre de plusieurs photons avec une haute sensibilité et un gain élevé, se sont imposés comme les détecteurs standard pour la microscopie à balayage laser (LSM) pour capter une lumière fluorescente très faible. Néanmoins, un certain nombre de problèmes est associé à la microscopie à balayage laser utilisant des tubes photomultiplicateurs. Ces problèmes seront abordés dans les sections suivantes.

Le système de détecteur SiVIR utilise un capteur de type semi-conducteur pour détecter la fluorescence. Ce photomultiplicateur au silicium (SiPM) élimine de nombreux problèmes et restrictions associés aux tubes photomultiplicateurs classiques. Le circuit de traitement du signal intègre également une technologie qui maximise les capacités du capteur, élargissant ainsi son applicabilité à l'imagerie à grand nombre de pixels et à grande vitesse (figure 1).

Dans cet article, nous décrivons les problèmes liés à l'imagerie en microscopie à balayage laser conventionnelle recourant à des détecteurs à tube photomultiplicateur et expliquons comment le détecteur SiVIR peut résoudre ces problèmes.

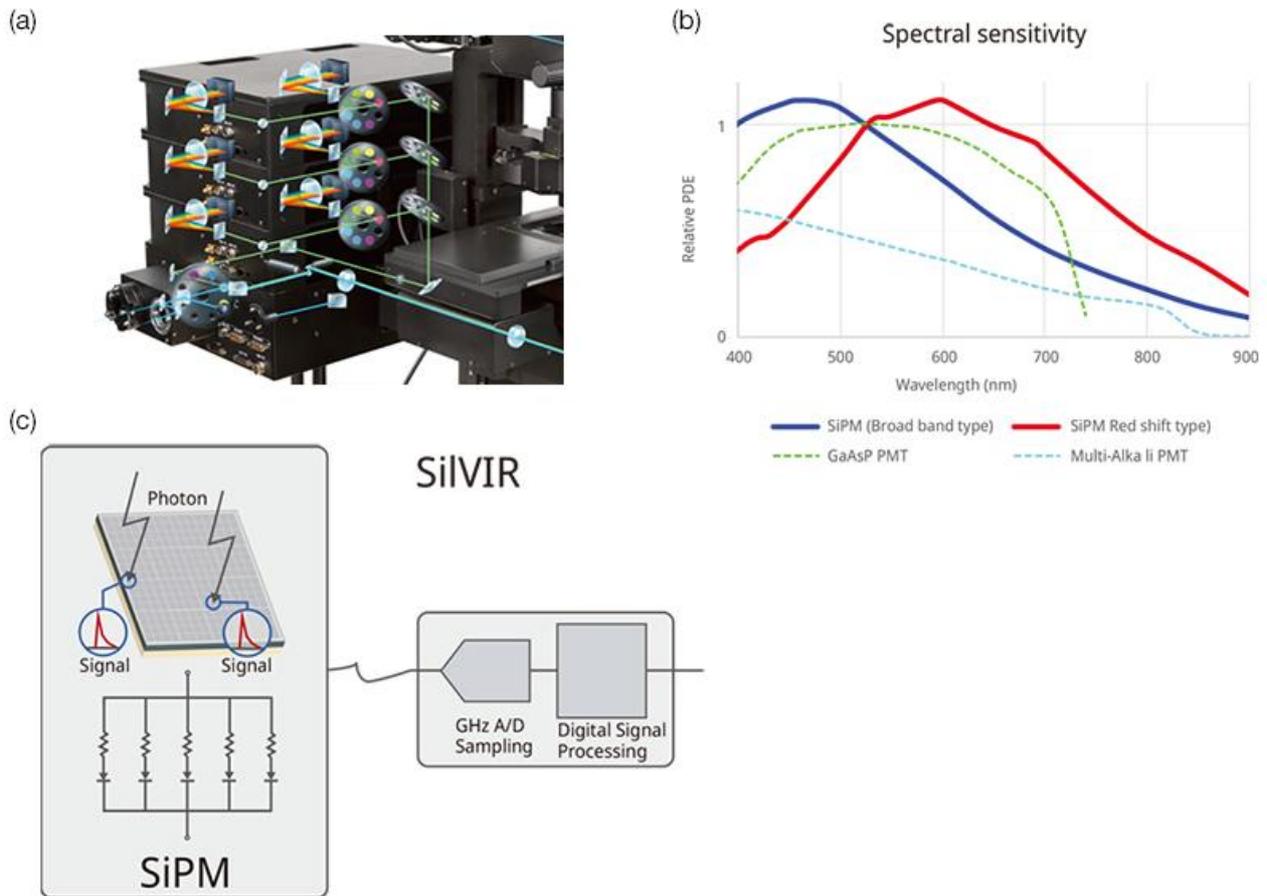


Figure 1 – Dispositifs composant le détecteur SiVIR : (a) détecteur de fluorescence FV4000 ; (b) représentation graphique de la sensibilité spectrale du détecteur SiVIR : le détecteur, avec un capteur SiPM de type à large bande et un capteur SiPM de type à décalage vers le rouge, a une sensibilité de 400 à 900 nm supérieure à celle des photomultiplicateurs GaAsP à haute sensibilité classique ; (c) le détecteur SiVIR comprend un capteur SiPM, un échantillonnage A/N de 1 GHz et un traitement numérique des signaux.

2. Besoins des utilisateurs de microscopes à balayage laser : construire un meilleur détecteur

Parmi les plaintes courantes des utilisateurs de microscopes à balayage laser, on peut citer :

- la confusion quant aux paramètres à ajuster pour optimiser les performances du microscope;

- l'excès de photoblanchiment et de phototoxicité;
- la saturation involontaire des détecteurs;
- la nécessité d'améliorer la qualité d'image, la résolution et la fréquence d'images;
- l'incapacité à acquérir de meilleures images.

Toutes ces plaintes ont une même origine : le détecteur à tube photomultiplicateur et son principal mode de fonctionnement. Nous présentons ici certains des facteurs que nous avons pris en compte lorsque nous avons entrepris de mettre au point un meilleur détecteur.

Une haute sensibilité et un rapport signal/bruit (S/B) élevé

Pour détecter efficacement ne serait-ce qu'une petite quantité de photons incidents, comme cela est nécessaire pour l'imagerie de signaux fluorescents faibles, il est essentiel que le détecteur ait un rendement quantique (QE) et un rendement de photodétection (PDE) élevés. De plus, le bruit intrinsèque des circuits du capteur et du détecteur doit être négligeable pour arriver à un rapport signal/bruit élevé.

Quantification de la lumière détectée

Bien qu'il existe diverses définitions de la mesure physique de la lumière détectée, la quantification du « nombre de photons » est la façon la plus précise de quantifier une lumière fluorescente très faible. Par conséquent, la façon la plus simple de mesurer l'intensité lumineuse consiste est de mesurer le nombre de photons détectés (figure 2).

Pouvoir quantifier l'intensité de la fluorescence au moyen d'une valeur numérique est très important. Par exemple, cela permet de reproduire les mêmes résultats d'imagerie sur différents instruments du fait que cette valeur n'est pas spécifique à un appareil donné. De plus, étant donné que la valeur du nombre de photons est universelle, les chercheurs peuvent plus facilement échanger leurs données. Enfin, les valeurs quantitatives peuvent être utilisées comme indicateur pour le prétraitement des images au moment de l'analyse.

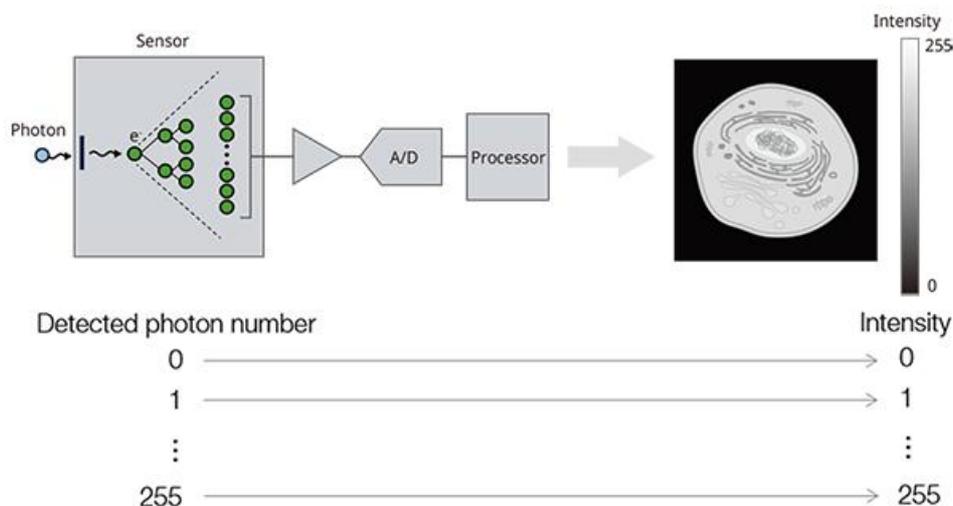


Figure 2 – Le processus de détection de la fluorescence commence lorsque des photons frappent la surface du photodétecteur. Les photons détectés sont alors convertis en électrons qui sont amplifiés et émis sous forme de courant électrique. Le courant fait l'objet d'une conversion analogique-numérique après avoir traversé le circuit d'amplification. Le signal numérisé est ensuite converti en une valeur d'intensité pour chaque pixel suite à un traitement arithmétique, et il est représenté visuellement sous la forme de chaque pixel de l'image par le logiciel.

Une plage dynamique étendue

Même si les éléments ci-dessus peuvent être réalisés, si le nombre maximal de photons détectables à un instant t (on parle d'« étendue dynamique ») est faible, une saturation de l'intensité se produira dans les régions avec une fluorescence de forte intensité, et la capacité à quantifier sera perdue. De plus, l'une des façons d'améliorer la qualité de l'image consiste à supprimer le bruit photonique (le bruit probabiliste de la détection des photons au niveau du capteur, également connu sous le nom de bruit de grenaille) en augmentant le nombre de photons d'émission par une forte excitation. Des images de haute qualité peuvent être prises sans saturer la luminosité lorsque la plage dynamique est étendue. Par exemple, comme le montre la figure 3, plus l'excitation est forte, plus on détecte de lumière fluorescente, meilleure est la qualité de l'image (à droite). Cependant, en définitive, la saturation des détecteurs compromettra de nombreuses étapes de post-traitement et d'analyse.

Un gain constant du détecteur pour la quantification de l'image

L'idéal est d'avoir une plage dynamique étendue sans changer les conditions du détecteur ou du circuit. Par exemple, si le gain du détecteur est modifié pour étendre la plage supérieure, l'intensité résultante de l'image change également. Cependant, cette relation n'est pas linéaire, ce qui rend difficile l'estimation inverse de la quantité de lumière détectée uniquement sur la base de l'image obtenue. Une courbe d'étalonnage doit être préparée séparément pour la correction. En revanche, si le réglage du détecteur est fixe, le nombre de photons détectés au niveau de chaque pixel peut être estimé de façon quantitative à partir de l'intensité lumineuse (dont le profil le long de la ligne A de chaque image est représenté dans les graphiques de la figure 3) de n'importe quelle image.

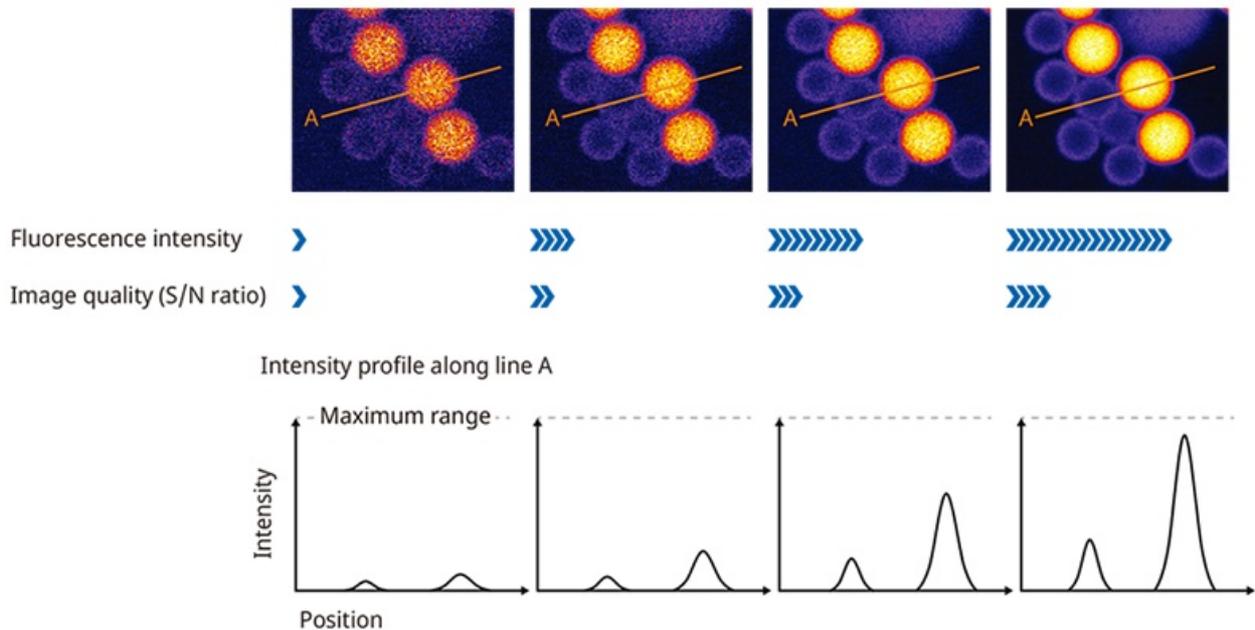


Figure 3 – Relation entre l'intensité de fluorescence et la qualité de l'image. Le rapport signal/bruit est déterminé par le rapport « intensité de la fluorescence/ $\sqrt{\text{intensité de la fluorescence}}$ ».

3. Problèmes liés aux détecteurs PMT conventionnels en imagerie LSM

Nous discutons ci-dessous des principaux problèmes rencontrés lors de l'utilisation d'un détecteur à tube photomultiplicateur pour la microscopie à balayage laser.

Difficulté à obtenir à la fois une haute sensibilité et un rapport signal/bruit élevé

Actuellement, il est courant d'utiliser comme détecteur à haute sensibilité des photomultiplicateurs GaAsP de type photocathodique [1], dont le rendement quantique dans le visible a été amélioré pour atteindre 40 % ou plus. En raison du bruit lié aux capteurs et aux circuits, ce détecteur a généralement été utilisé en amplifiant le signal avec un gain plus élevé pour éviter que le bruit relatif n'affecte l'image. Un tube photomultiplicateur convertit également les photons en électrons au niveau de la surface photoréceptrice, lesquels subissent ensuite un processus d'amplification stochastique en plusieurs étapes pour générer un signal sous forme de courant électrique (figure 4). Par conséquent, même si le nombre de photons détectés est constant, le signal en sortie change à chaque fois en raison des fluctuations stochastiques. Cela peut réduire le rapport signal/bruit de l'image, en particulier pour l'imagerie à grande vitesse et à grand nombre de pixels lorsque le nombre de photons détectés est moindre.

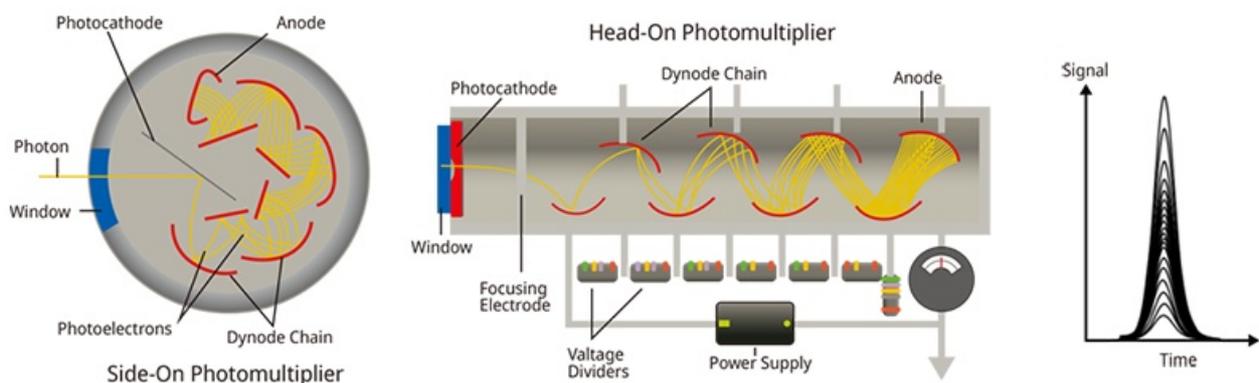


Figure 4 – Structure des caractéristiques d'entrée et de sortie d'un tube photomultiplicateur. Lorsque des photons frappent la photocathode, les électrons émis par la photocathode sont amplifiés dans un tube à vide. Comme les électrons secondaires sont amplifiés de manière répétée au niveau de plusieurs chaînes de dynodes, le signal d'impulsion en sortie généré à la suite de la détection d'un photon n'est pas uniforme ou stable.

Une faible capacité à quantifier l'intensité pour les photons détectés

Comme décrit ci-dessus, un tube photomultiplicateur présente des variations stochastiques lors de l'amplification des photoélectrons. Par conséquent, la capacité à quantifier le rapport entrée/sortie est faible, en particulier lorsque le taux de détection des photons est faible. En outre, bien que le gain puisse être ajusté en faisant varier la tension appliquée entre les électrodes, le rapport correspondant entre le signal d'entrée et de sortie va également être modifié. De plus, même si l'on applique la même tension à chaque tube photomultiplicateur, le gain effectif varie fortement entre les tubes en raison de différences propres à chacun des tubes. Et lorsque la tension appliquée est réglée sur un niveau bas pour amplifier une certaine quantité de lumière, le changement de gain en réponse à la tension appliquée est atténué, et cela dégrade la linéarité. [1]

De plus, les phénomènes inévitables suivants vont entraîner une dégradation de la sensibilité du

tube photomultiplicateur en fonction des photons détectés accumulés par l'utilisation.

- Lorsque les photons entrent dans la photocathode, des électrons sont émis depuis la photocathode vers le tube à vide en raison de l'effet photoélectrique externe. La photocathode se détériore parce qu'elle ne peut pas être entièrement réapprovisionnée en électrons.
- La dégradation des dynodes due à la collision avec des électrons (photoélectrons) émis par la photocathode.
- La détérioration de la photocathode ou des dynodes due à la collision avec des ions générés par la collision de photoélectrons avec du gaz résiduel ou des impuretés dans le tube à vide.
- La diminution du vide due à des impuretés générées par les dynodes en raison de la collision des photoélectrons avec les dynodes.

En raison de ce qui précède, les microscopes à balayage laser utilisant des tubes photomultiplicateurs ne permettent pas d'établir une relation quantitative entre la quantité de lumière détectée et l'intensité lumineuse de l'image.

De la difficulté d'obtenir une plage dynamique étendue et un rapport signal/bruit élevé

Lorsque le gain du capteur est augmenté, un faible signal de quelques photons peut toujours être détecté malgré le bruit, ce qui permet d'atteindre un rapport signal/bruit élevé. Mais la limite supérieure du courant de sortie du tube photomultiplicateur peut être de l'ordre de seulement quelques μA . Si le gain est réglé sur un niveau élevé, le signal de sortie sera facilement saturé, même par un petit nombre de photons détectés, ce qui conduit à une plage dynamique de faible étendue (figure 5a). En revanche, si le gain est faible, le signal de sortie ne sera pas saturé même lorsqu'une forte fluorescence (un grand nombre de photons) est détectée, et la plage dynamique sera plus étendue. Cependant, une fluorescence faible, de l'ordre de quelques photons, ne sera pas amplifiée et sera masquée par le bruit, ce qui entraînera une détérioration du rapport signal/bruit (figure 5b). Il en résulte que l'utilisateur doit régler manuellement le gain du détecteur en fonction de la luminosité de l'objet et de la qualité d'image souhaitée. En outre, le fait que l'étendue dynamique et le rapport signal/bruit soient involontairement modifiés en raison de ce réglage est un inconvénient.

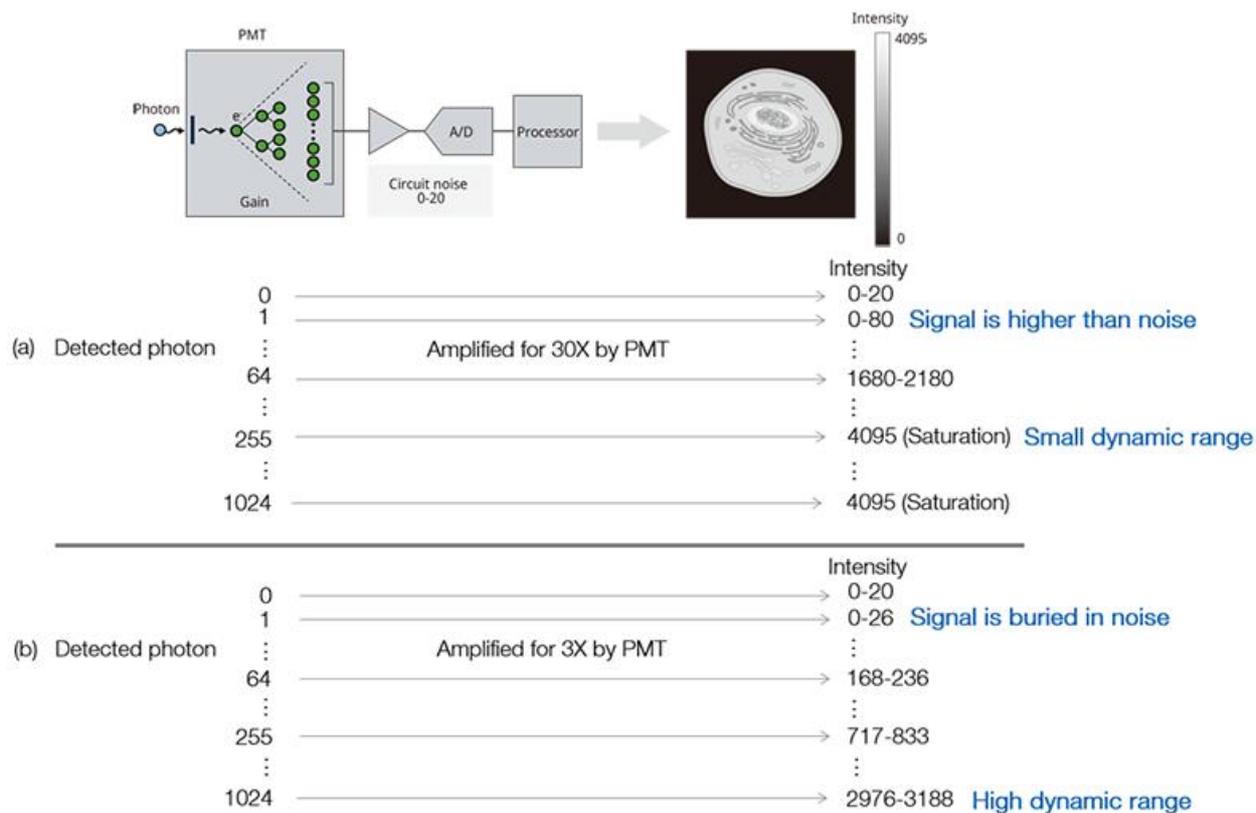


Figure 5 – Le réglage du gain d'un tube photomultiplicateur nécessite de trouver le bon équilibre entre le rapport signal/bruit et l'étendue dynamique ; (a) gain élevé : le signal de sortie peut être amplifié à un niveau plus haut que le bruit lors de la détection d'un photon, mais cela réduit l'étendue dynamique, et le signal est facilement saturé ; (b) gain faible : le signal de sortie ne peut pas être distingué du bruit lorsque seuls quelques photons sont détectés. En revanche, la plage dynamique est plus étendue et il n'y a pas saturation du signal lors de la détection d'un grand nombre de photons.

Des réglages de détection complexes

L'ajustement des réglages du détecteur pour arriver à une qualité d'image satisfaisante tout en évitant la saturation de la luminosité n'est pas simple, ce qui rend la tâche difficile pour des utilisateurs sans compétences poussées en microscopie à balayage laser. À des fins explicatives, la figure 6 montre des images de billes fluorescentes présentant différentes intensités de fluorescence causées par différents réglages du gain du détecteur.

La figure 6a montre des images de billes à différentes excitations acquises avec un gain élevé. Les billes sombres peuvent à peine être distinguées du bruit, même avec une faible excitation (l'image la plus à gauche de la figure), mais l'image des billes brillantes devient saturée lorsque l'intensité de la lumière d'excitation augmente (les deux images de billes brillantes sur le côté droit de la figure).

En revanche, la figure 6b montre les mêmes images de billes fluorescentes, mais acquises cette fois avec un gain plus faible. Le signal des billes sombres à faible excitation (les deux images sur le côté gauche du diagramme) est à peine discernable dans le bruit. Le signal est meilleur que dans le cas du gain élevé en ce sens que l'image des billes brillantes ne se sature pas, même lorsque l'excitation est réglée au niveau le plus élevé (côté le plus à droite de la figure), mais elle ne présente pas un meilleur rapport signal/bruit que l'image la plus à droite de la figure 6a (image prise avec un gain élevé) lorsque l'on considère le rapport signal/bruit des billes sombres.

signal/bruit et l'étendue dynamique, ce qui peut s'avérer compliqué. Les images ont été acquises à l'aide de différents réglages du laser d'excitation, les images de droite ayant été acquises avec un réglage plus élevé. Les tracés sous les images représentent le profil de l'intensité lumineuse le long de la ligne A. Le rapport signal/bruit est le rapport entre S (la hauteur du profil) et N_s (bruit photonique) et N_d (bruit du circuit). La figure 6a comprend des images d'échantillons acquises avec un gain élevé. Les zones des billes de faible intensité lumineuse ont un rapport S/B plus élevé, mais les zones des billes les plus brillantes sont saturées. La figure 6b comprend des images d'échantillons acquises avec un gain faible. Les zones des billes de faible intensité lumineuse ont un rapport S/B moins élevé, mais les zones des billes brillantes ne sont pas saturées.

Problèmes liés au circuit de détection

Il existe également des problèmes au niveau du circuit de détection ainsi que des capteurs. Comme le signal du capteur et ses circuits d'amplification présentent un bruit élevé, le rapport signal/bruit devient très faible lorsque le signal brut échantillonné par les convertisseurs analogique-numérique (AN) est transformé en données de pixels (figure 7a, à gauche). En général, ce rapport S/B peut être amélioré pour être équivalent à la valeur réelle de l'intensité de la fluorescence en échantillonnant le signal après lissage au moyen d'un filtre passe-bas ou d'un intégrateur dans le circuit de détection analogique (figure 7a, à droite). Cependant, plus la vitesse de balayage est rapide, comme c'est le cas pour un scanner résonnant, plus le temps nécessaire pour traverser la structure de l'échantillon est court. La figure 7b montre l'image de la même structure fluorescente que celle de la figure 7a, à l'exception près que balayage est réalisé à une vitesse deux fois plus grande que celle à la figure 7a. Si un filtre passe-bas est appliqué de la même manière pour réduire le bruit, la résolution temporelle pour résoudre les structures fines avec une fréquence spatiale élevée sera insuffisante et la résolution spatiale de l'image résultante sera dégradée (figure 7b, à droite).

Lorsque la fréquence de coupure des filtres passe-bas est augmentée, la résolution temporelle s'améliore. Cependant, l'efficacité de la suppression du bruit est dégradée, et le rapport signal/bruit se détériore. Pour éviter une diminution du rapport signal/bruit, même si la fréquence de coupure des filtres passe-bas est augmentée, il est nécessaire d'augmenter la fréquence d'échantillonnage des convertisseurs AN de plusieurs fois à plusieurs dizaines de fois la fréquence de pixel pour effectuer un grand nombre d'acquisitions dans un pixel (suréchantillonnage). En outre, la vitesse de balayage plus rapide et le plus grand nombre de pixels raccourcissent le temps de séjour d'un pixel, ce qui explique pourquoi la plus grande vitesse d'échantillonnage des convertisseurs AN est nécessaire.

Pour le lissage du bruit, un autre problème repose dans le fait que le circuit analogique ne peut adopter qu'un filtre simple (tel qu'un filtre passe-bas) au détriment de la résolution temporelle. Un procédé de filtrage qui sépare uniquement le bruit sans sacrifier la résolution temporelle par application de filtres avancés de traitement de signaux numériques sur des données échantillonnées à grande vitesse est souhaitable.

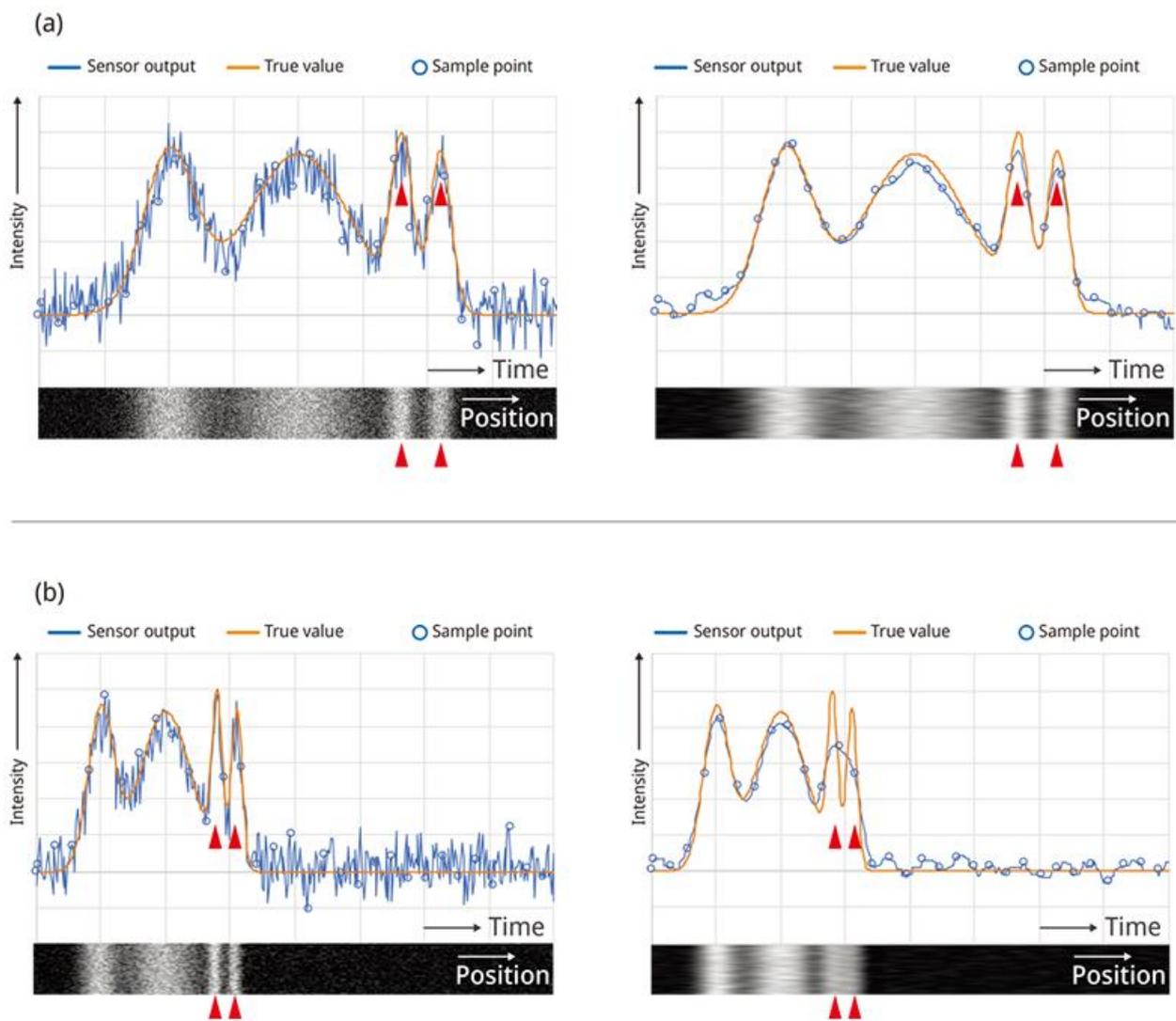


Figure 7 – Effet de la réduction du bruit sur la qualité de l'image et la résolution spatiale. L'image de la figure 7a a été prise à une vitesse de balayage standard, et la qualité de l'image a été améliorée par réduction du bruit. L'image de la figure 7b a été prise à une vitesse de balayage deux fois plus grande que celle utilisée à la figure 7(a), et on peut voir que la résolution spatiale s'est dégradée en raison de la chute au niveau de la bande passante du signal.

Les problèmes d'imagerie des microscopes à balayage laser ci-dessus causés par les tubes photomultiplicateurs peuvent être résolus à l'aide de notre détecteur SiVIR, qui combine un nouveau capteur SiPM de type semi-conducteur et un échantillonnage numérique à grande vitesse. Dans la section suivante, nous expliquons comment nous avons résolu les problèmes ci-dessus au moyen de nos technologies avancées.

4. Présentation technique du détecteur SiVIR

4-1. Caractéristiques du capteur SiPM

Le mode Geiger permet de détecter l'incidence d'un seul photon à des niveaux de signal élevés par un processus de multiplication très stable malgré un gain élevé. En outre, le procédé de fabrication des semi-conducteurs permet un contrôle précis des variations individuelles entre les SiPM. Grâce à

une production de masse uniforme, les différences au niveau de l'efficacité de la photodétection (PDE) et de gain entre les SiPM peuvent être minimisées à un degré élevé. En outre, même si de nombreux photons sont incidents en même temps, la somme des courants des APD respectifs est émise par le SiPM, de sorte que la limite supérieure du courant de sortie est élevée, ce qui se traduit par une large étendue dynamique pour détecter un grand nombre de photons incidents. En d'autres termes, le signal d'un seul photon peut être multiplié avec un gain élevé et a une large plage de détection. Cela permet d'obtenir simultanément un rapport signal/bruit élevé et une large étendue dynamique, éliminant ainsi la nécessité d'un compromis entre les deux par réglage du gain.

En outre, la conversion photoélectrique par un SiPM, comme les photodiodes, utilise l'effet photoélectrique interne, selon lequel les électrons sont excités de la bande de valence vers le conducteur. Par conséquent, les électrons sont reconstitués rapidement lorsqu'ils sont excités. Il en résulte que la sensibilité et le gain ne sont pas dégradés, même s'il y a une grande quantité de lumière incidente.

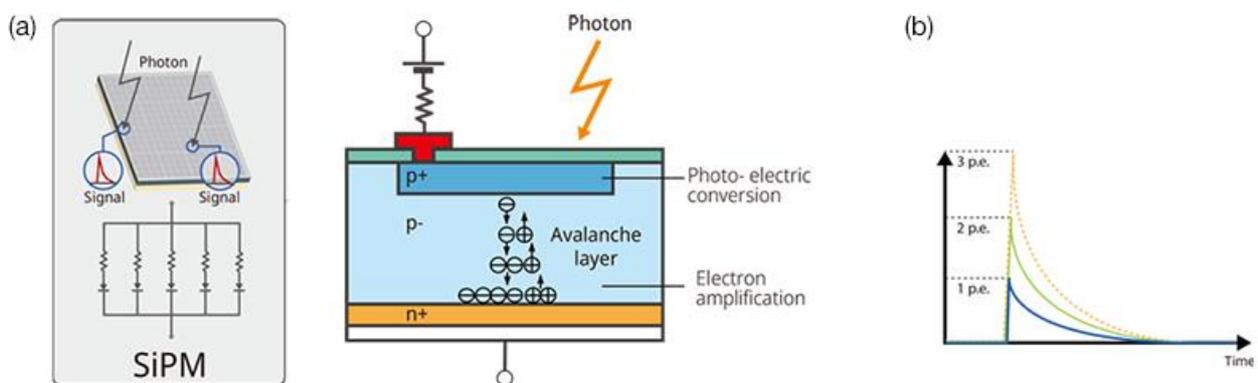


Figure 8 – Structure d'un capteur à photomultiplicateur au silicium (SiPM) et caractéristiques des signaux d'entrée et de sortie. Figure 8(a) : Un SiPM est composé d'APD multipixels. Lorsqu'un photon frappe la surface de réception des photons de l'APD, le signal d'intensité électrique est émis par la conversion photoélectrique interne suivie d'une amplification électronique par avalanche au niveau de la couche d'avalanche. Figure 8(b) : Lorsque plusieurs photons arrivent simultanément, le signal de sortie est la somme des signaux de l'APD. La forme d'onde de sortie de l'APD en réponse au photon détecté est constante et stable.

En outre, le capteur SiPM possède d'excellentes caractéristiques de sensibilité. La figure 1b illustre la sensibilité spectrale du capteur SiPM. En utilisant une combinaison de capteurs SiPM avec différentes sensibilités spectrales, que nous appelons le détecteur au silicium à large bande (BSD) et le détecteur au silicium à décalage vers le rouge (RSD), on peut obtenir une meilleure sensibilité qu'un détecteur à photomultiplicateur GaAsP dans la plage de longueurs d'onde du visible (400 nm) au proche infrarouge (900 nm). Le rendement de la détection des photons (EPD) du SiPM est défini par l'équation suivante :

$$PDE = QE \times FF \times AP$$

QE : rendement quantique

FF : rendement d'ouverture (facteur de remplissage)

AP : probabilité du mode Geiger (probabilité d'avalanche)

Le facteur de remplissage (FF) est déterminé par la surface de l'APD sur la surface de réception des

photons du SiPM par rapport à la surface de la zone aveugle entre les pixels de l'APD. L'AP dépend de la tension appliquée au SiPM : plus la tension est élevée, plus un PDE élevé peut être atteint. En revanche, l'augmentation de la tension appliquée augmente le bruit du capteur. Par exemple, dans le modèle S13360-3050 fabriqué par Hamamatsu Photonics, le PDE peut être augmenté d'environ 1,4 fois par augmentation de la surtension (tension appliquée au-dessus de la tension disruptive) de 3 à 7 V, mais le bruit de comptage est augmenté d'environ 2 fois, le bruit diaphonique de plus de 2 fois et le bruit postimpulsionnel de plus de 3 fois [2]. Cette augmentation du bruit annule les avantages liés à l'augmentation du PDE et, en conséquence, n'améliore pas le rapport signal/bruit. En outre, l'augmentation du bruit entrave considérablement la capacité à quantifier la détection des photons, qui est l'un des principaux avantages des SiPM. De plus, comme le gain est également augmenté d'un facteur deux ou plus, la plage dynamique de détection devient moins étendue. Cet exemple des écueils potentiels si l'on se concentre uniquement sur des valeurs élevées de PDE ou de QE sert à rappeler qu'il faut éviter de rechercher aveuglément de telles caractéristiques, car elles peuvent entraîner des inconvénients inattendus. Pour cette raison, le microscope confocal FV4000 utilise un SiPM avec une surtension optimale pour obtenir un niveau de bruit et une sensibilité équilibrés et une étendue dynamique exceptionnelle pour la détection de la fluorescence.

Le fait qu'un SiPM ait un bruit de comptage plus élevé que celui d'un tube photomultiplicateur est souvent cité comme un inconvénient. En guise de mesure compensatoire, la surface réceptrice des photons est refroidie à environ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($-4\text{ }^{\circ}\text{F}$) pour réduire le bruit de comptage à une valeur comprise entre plusieurs kilocomptes et plusieurs dizaines de kilocomptes par seconde. Mais cette valeur reste plus grande que celle d'un tube photomultiplicateur refroidi. Cependant, lorsqu'un SiPM avec un bruit de comptage de 10 kilocomptes par seconde est utilisé pour le balayage à 512 pixels/ligne avec un temps de séjour de $2\text{ }\mu\text{s}/\text{pixel}$, un bruit de comptage équivalent à 1 photon apparaît dans seulement environ 10 pixels pour 1 ligne. À ce niveau, il y a peu d'impact sur la qualité des images LSM.

Un autre inconvénient de l'utilisation d'un SiPM comme détecteur LSM est le fait qu'un long trainage peut subsister dans le signal de sortie (figure 8). Cela pose un problème dans l'imagerie à grande vitesse, mais comme décrit dans la section suivante, nous avons réussi à résoudre ce problème en mettant en œuvre une solution de circuits de détection innovants.

4-2. Des fonctions d'échantillonnage et de traitement numérique à grande vitesse

Comme décrit plus haut, les systèmes classiques trouvent un équilibre entre rapport signal/bruit et résolution temporelle en combinant le lissage du signal au moyen d'un filtrage à circuit analogique avec la fréquence d'échantillonnage AN minimale nécessaire (une période d'échantillonnage d'environ la moitié de la période de pixel) pour la résolution de pixel. Cependant, cette solution est techniquement limitée pour répondre au plus grand nombre de pixels (période de pixels plus courte) du scanner résonnant à grande vitesse (figure 9a).

Un échantillonnage AN à grande vitesse

Nous avons établi une fréquence d'échantillonnage AN de 1 GHz, ce qui est 12 fois plus rapide que la fréquence d'échantillonnage classique, et adopté une méthode de suréchantillonnage dans laquelle une grande quantité d'échantillonnages est effectuée au cours d'une même période de pixel. Étant donné que le signal de sortie de capteur SiPM a une large étendue dynamique, l'étendue de son signal de sortie est également très grande par rapport à un tube photomultiplicateur. En plus de la fréquence d'échantillonnage AD plus élevée, la précision de résolution d'amplitude est 16 fois plus élevée (de 10 à 14 bits) qu'avec les dispositifs conventionnels. Ces dispositifs à haute performance sont optimisés pour les applications de traitement des signaux du SiPM. L'isolation contre le bruit utilise un filtre de traitement des signaux numérique au lieu d'un filtre de circuit analogique, ce qui atténue efficacement le bruit tout en minimisant le sacrifice de la largeur de bande du signal pour atteindre un rapport signal/bruit plus élevé. Par conséquent, les composants à haute fréquence qui ne pouvaient pas être séparés par le procédé classique peuvent être détectés séparément, et une résolution en pixels suffisante (résolution temporelle) peut être obtenue, même si le nombre de pixels du scanner résonnant est de 1k ou plus (figure 9b).

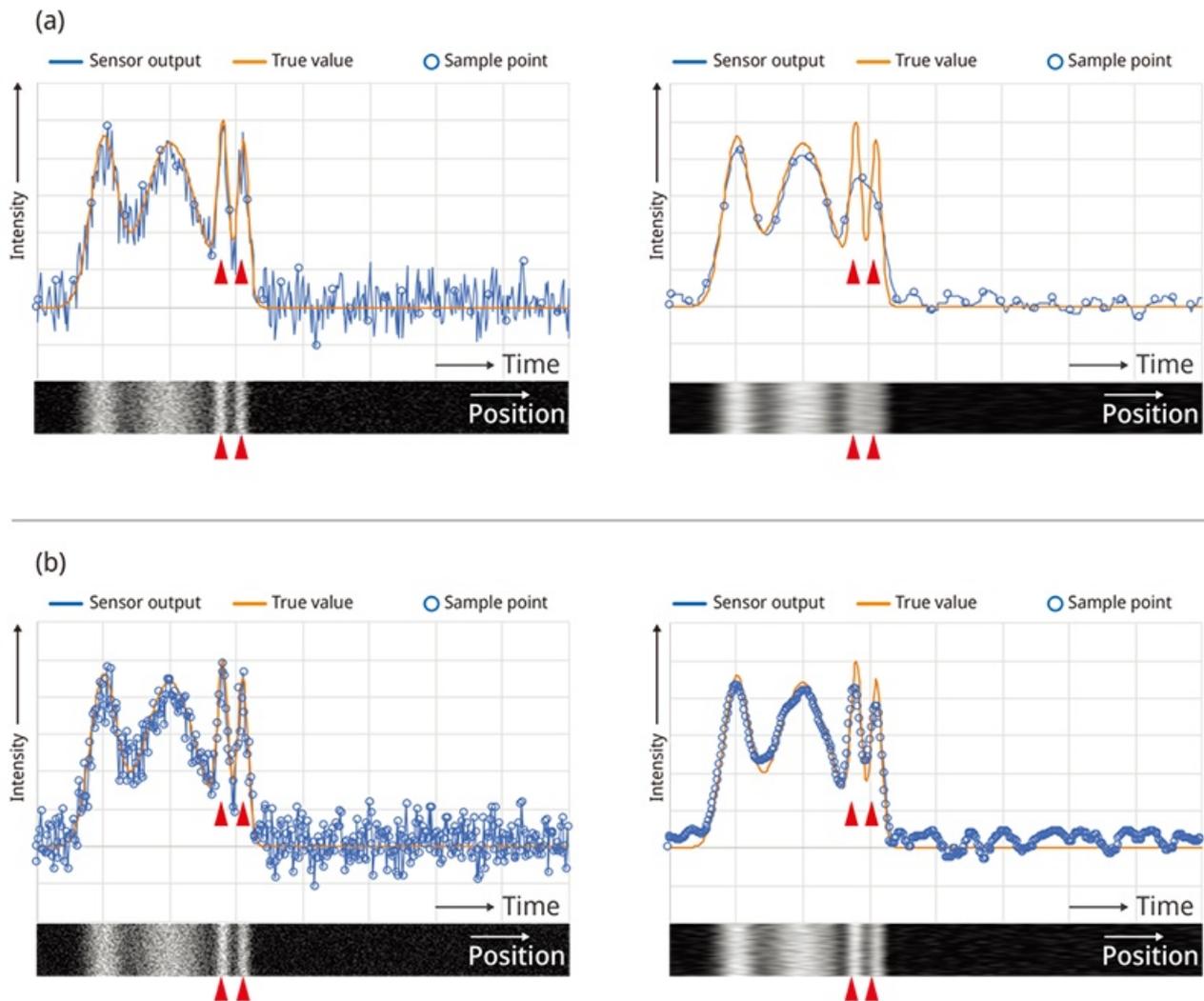


Figure 9 – Effet de la réduction améliorée du bruit sur la qualité de l'image et la résolution spatiale. Figure 9(a) : Méthode conventionnelle avec un filtre de circuit analogique et une faible fréquence d'échantillonnage ; la résolution spatiale est dégradée en raison de la chute de la bande passante du signal lorsque le balayage est rapide. Figure 9(b) : Combinaison

d'un échantillonnage à grande vitesse et d'une réduction du bruit obtenue par filtre numérique pendant un balayage à grande vitesse tout en conservant la résolution spatiale.

Transformation inverse en temps réel au niveau du réseau de fenêtres programmables sur le terrain (FPGA) pour éliminer le traînage du signal

En outre, nous avons développé une technique pour restaurer la bande passante dégradée à cause du lent traînage du signal, qui est un inconvénient des capteurs SiPM, en utilisant un traitement avancé du signal au niveau du FPGA (réseau de portes programmables sur le terrain) sans restriction. Une technique d'élimination du signal de traînage connue est le procédé de remise à zéro de force [3]. Cependant, notre technique peut restaurer le signal de sortie à une plus grande vitesse sans nécessiter les circuits de détection compliqués de la technique conventionnelle.

Bien qu'un capteur SiPM soit capable d'assurer la détection des photons et de compter le nombre de photons détectés avec précision et rapidité, il présente un inconvénient : un signal de sortie qui traîne lentement. Lorsque l'on utilise un scanner résonnant pour réaliser des images, le court temps de séjour des pixels provoque la fuite d'un signal de traînage dans les pixels adjacents, ce qui dégrade la résolution en pixels et la résolution temporelle (figure 10a).

En utilisant un SiPM, la sortie de signal totale est la somme des sorties des signaux de chacun des APD, et la forme d'onde d'impulsion de réponse de sortie créée en réponse à l'incidence des photons pour chaque APD est très stable et maintient une forme constante par rapport à un tube photomultiplicateur. Si la réponse au signal d'entrée peut être définie de manière unique, le signal de sortie final peut être obtenu par la somme des convolutions de la réponse au signal d'entrée. En supposant que le moment de la détection des photons et le nombre de photons sont $x(t)$ à la figure 10b et que la réponse du capteur est $h(t)$, le signal de sortie $y(t)$ suit l'équation suivante :

$$y(t)=(x*h)(t)=\sum x(i)h(t-i)$$

Lorsque le signal de sortie du SiPM $y(t)$, signal de traînage inclus, est mesuré, si la réponse du capteur $h(t)$ peut être définie, l'événement de détection des photons $x(t)$ ne contenant pas de signal de traînage peut être calculé en exécutant cette transformation inverse. Cela repose sur le même concept qu'un filtre de déconvolution [4], qui est souvent appliqué pour éliminer la traînée de la forme d'onde du signal, par exemple lors de l'analyse quantitative des signaux de sparks calciques de la dynamique des ions calcium dans le domaine des neurosciences. Le FPGA est doté d'un processeur de signal numérique (DSP) avancé à grande vitesse qui permet le traitement en temps réel des calculs de transformation inverse dans le dispositif. En fait, nous avons développé une technique pour obtenir les données de sortie du signal du capteur inversement transformé au niveau du FPGA en temps réel [5], comme illustré dans la figure 10c.

En calculant l'intensité des pixels à l'aide de cette séquence de données inversement transformées, nous avons éliminé la fuite du signal de traînage dans les pixels voisins, comme illustré dans la figure 10a. En outre, les filtres de restauration suppriment non seulement le signal de traînage, mais ils isolent également les bruits mélangés, qui diffèrent de la réponse originale de détection des photons. Cela améliore encore le rapport S/B du signal.

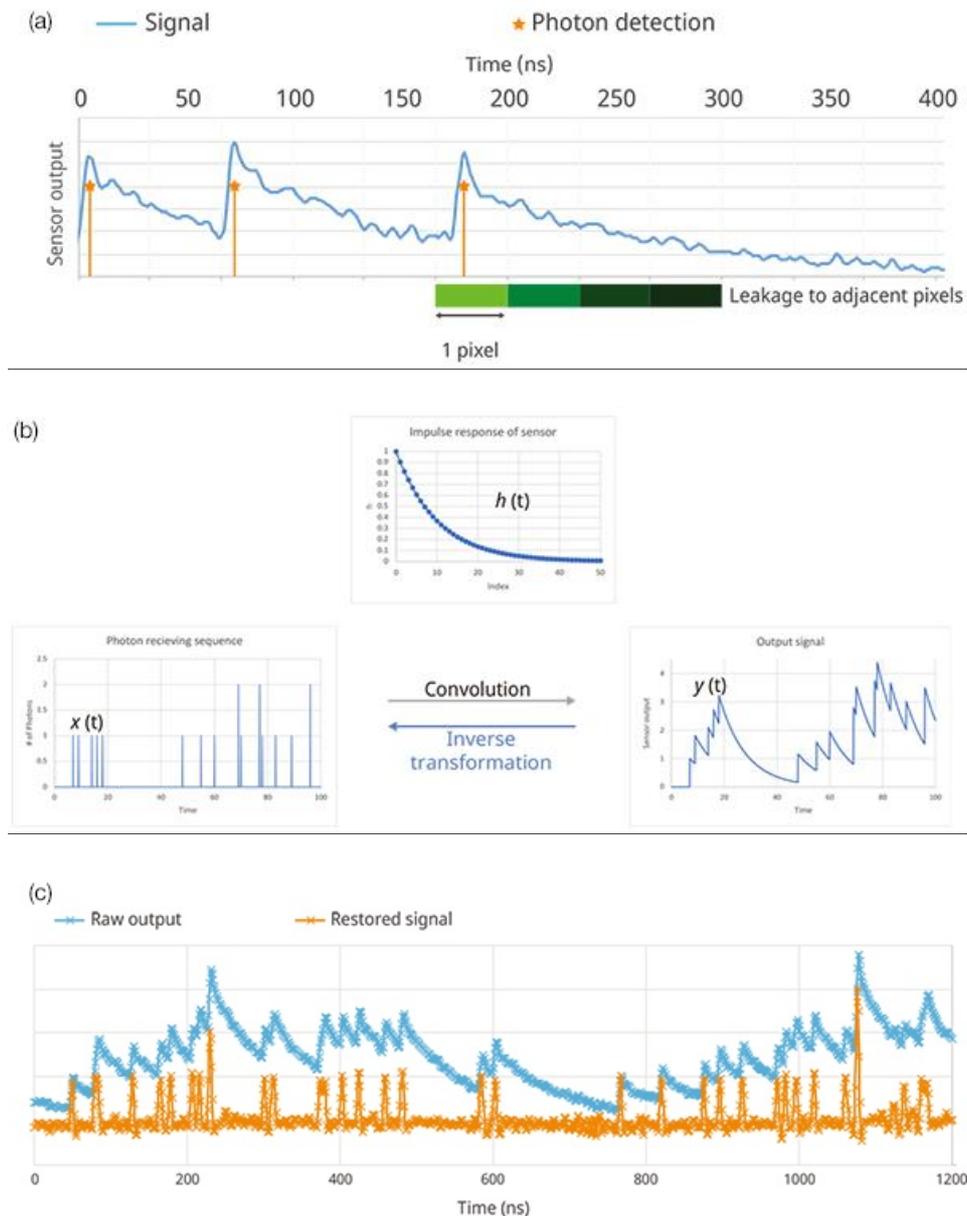


Figure 10 – Présentation de la technique de restauration de la bande passante dégradée par le signal de traînage du SiPM. Figure 10(a) : Signal de traînage du capteur et dégradation de la résolution spatiale. Figure 10(b) : Relation entre le signal d'entrée et le signal de sortie du capteur SiPM. Figure 10(c) : Estimation du signal d'entrée par déconvolution.

Comme le montre la figure 11, s'il n'y a pas de transformation inverse, la résolution en pixels de l'image est dégradée par l'effet du traînage du signal du SiPM, en particulier lors d'un balayage résonnant à grande vitesse et haute résolution. À l'inverse, l'application de la transformation inverse restitue la résolution temporelle sans perdre le signal d'entrée des photons, ce qui permet d'obtenir une image par scanner résonnant de haute résolution (1 024 pixels/ligne) sans perte de résolution particulière et/ou de photons détectés.

Un comptage de photons sur une plage dynamique étendue

Les signaux de sortie bruts du SiPM sont plus susceptibles d'être empilés lorsque des événements de détection de photons à haute fréquence se produisent, tels que la détection d'un plus grand nombre de photons avant le traînage du signal (ligne bleue de la figure 11). Par conséquent, pour tirer parti de la plage dynamique étendue d'un SiPM, l'échelle de conversion du convertisseur AN doit être supérieure à l'amplitude du signal de la détection de photons à haute fréquence, effet d'empilement inclus. D'autre part, pour effectuer le processus de transformation inverse avec précision, l'amplitude du signal d'un photon, qui est le plus petit signal possible, doit être détectée avec un pas de résolution fine. Par conséquent, un convertisseur analogique-numérique avec une résolution plus élevée est nécessaire pour capter des amplitudes plus petites avec une résolution plus fine et des amplitudes d'empilement plus grandes. En outre, la transformation inverse n'est pas possible sans une résolution temporelle très élevée, à savoir de nombreuses séquences de données numériques acquises à des fréquences d'échantillonnage élevées. En général, les convertisseurs AN ayant une fréquence d'échantillonnage de 1 GHz pour les dispositifs à grande vitesse ont un degré de résolution de 8 bits. Cependant, nous avons réalisé ce processus de transformation inverse en utilisant des convertisseurs AN haut de gamme avec une fréquence d'échantillonnage de 1 GHz, une résolution de 14 bits (gradation de 16384), et un traitement à grande vitesse des données numériques de grande capacité et à grande vitesse obtenues à partir de ces convertisseurs à l'aide d'un FPGA haut de gamme.

Le signal inversement transformé (la ligne orange de la figure 11) est restauré et conserve la résolution temporelle en supprimant le signal de traînage. En nivelant les signaux empilés, on peut obtenir l'amplitude de l'impulsion de sortie (valeur de crête de l'onde) correspondant au nombre de photons détectés. En d'autres termes, lorsqu'un photon est détecté, des impulsions de même amplitude sont produites. De la même façon, lorsque deux photons sont détectés simultanément, des impulsions d'amplitude deux fois plus élevée sont produites. Si des photons sont détectés simultanément par la suite, les impulsions sont produites avec une amplitude qui est un multiple entier de ce photon. Par conséquent, si N photons sont détectés dans un certain intervalle, l'intégration temporelle de ces impulsions de sortie peut être obtenue comme l'intensité intégrée de N fois l'impulsion au moment de la détection d'un photon. Cette relation reste vraie lorsqu'un grand nombre de photons sont détectés dans un temps très court.

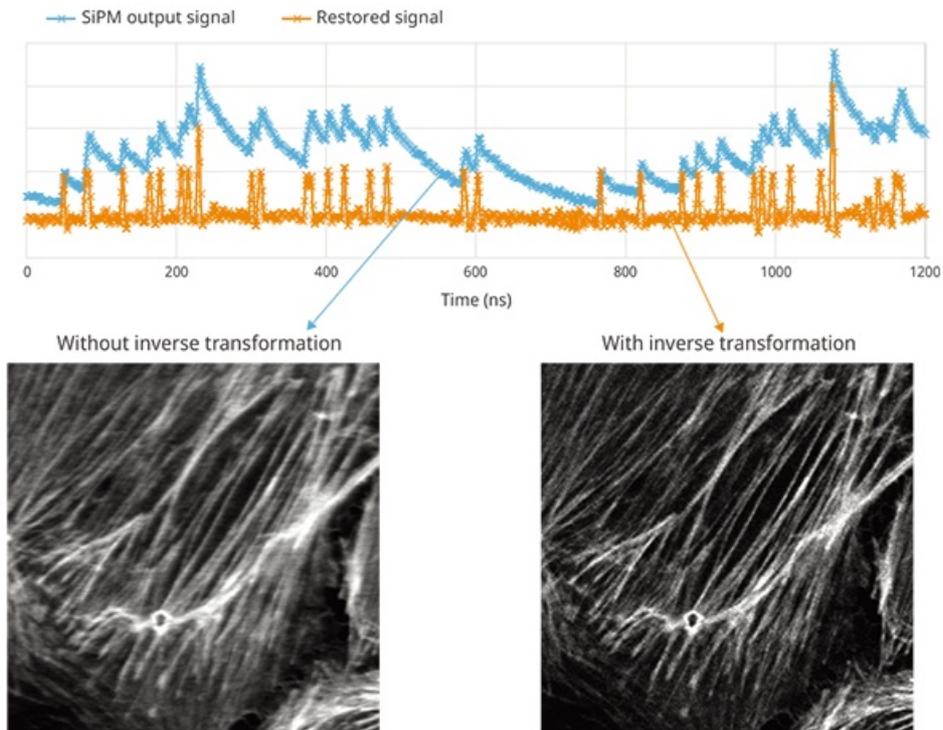


Figure 11 – Exemple d’images d’un échantillon (actine [BODIPY FL] dans une cellule endothéliale artérielle pulmonaire bovine) prises avec et sans transformation inverse ; résonnant, moyenne 64, ex. 488 nm, ém. 500–540 nm, même puissance d’excitation ; UPLSAPO40x2/NA 0.95, CA 1 AU, 1 024 × 1 024 pixels.

Par conséquent, ce procédé permet la détection précise de la lumière fluorescente, même lorsqu’un grand nombre de photons sont détectés en un court laps de temps, avec un rapport signal/bruit capable de détecter des photons séparément. En pratique, jusqu’à 1 gigaphoton par seconde peut être détecté avec ce rapport S/B sans saturation. Alors que la méthode classique de comptage de photons individuels (paralytique ou non paralytique) [1] ne pouvait être appliquée qu’à des taux de détection de photons à basse fréquence, la présente technique permet d’obtenir un comptage de photons à plage dynamique étendue, qui est comparable d’un point de vue du S/B au comptage de photons individuels, même lors de la prise d’images d’échantillons très lumineux à grande vitesse (figure 12).

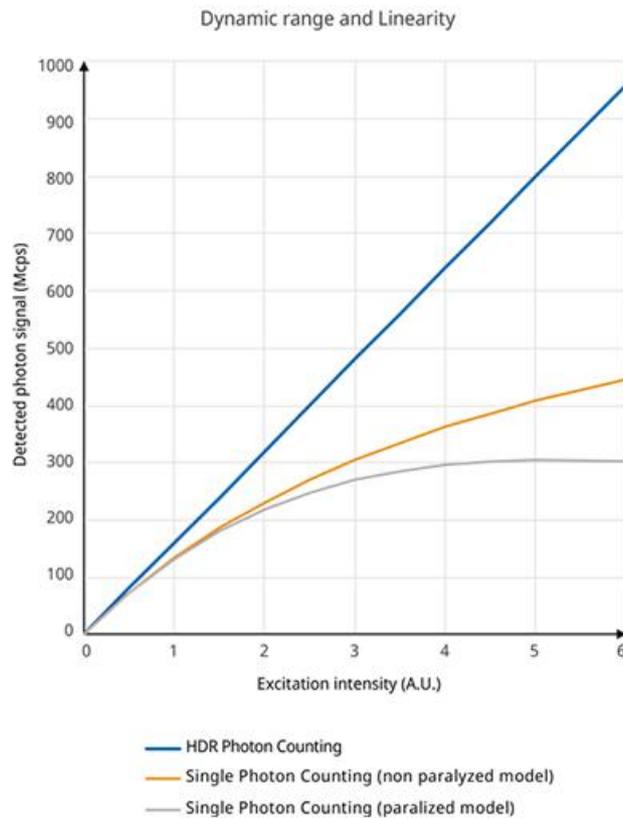


Figure 12 – Relation entre l'intensité d'excitation et le signal de sortie. Un plus grand nombre de photons par un laps de temps donné peut être détecté lorsque l'on augmente la puissance d'excitation. Avec un procédé de comptage de photons classique, le signal de sortie se retrouve saturé à un faible taux de photons. Le comptage de photons à plage dynamique étendue assuré par le détecteur SiVIR ne sature pas, même à un taux de photons incidents à haute fréquence. Les courbes du comptage monophotonique ont été calculées avec une résolution de paires d'impulsions de 1,2 ns.

4-3. Les avantages du détecteur SiVIR

Le système de détection SiVIR combine un capteur SiPM et un traitement numérique à échantillonnage à grande vitesse. Dans la section précédente, nous avons décrit la détection de fluorescence idéale en microscopie à balayage laser (LSM) et comment la LSM conventionnelle s'écarte en pratique de la situation idéale. Nous sommes cependant parvenus à réaliser une détection de fluorescence en LSM presque idéale au moyen du détecteur SiVIR.

Une haute sensibilité et un rapport S/B élevé

Un système de détection idéal devrait avoir un rendement de détection de photons (PDE) élevé et aucun bruit lié au capteur ou au circuit électrique.

En utilisant deux types de capteurs SiPM, le détecteur SiVIR atteint un PDE plus élevé à la fois dans la plage visible et dans le proche infrarouge, sans compromis entre l'étendue dynamique et le rapport signal/bruit. En outre, le bruit de grenaille des photons est dominant dans le détecteur SiVIR parce que le bruit de circuit électrique est supprimé à un niveau d'un photon ou moins, et le courant d'obscurité est négligeable. Par conséquent, le rapport S/B approximatif peut être estimé à partir du nombre de photons détectés par l'équation suivante :

$$\text{Rapport S/B} = N/\sqrt{N} = \sqrt{N}$$

N : nombre de photons détectés

Comme le rapport S/B peut être plus facilement quantifié, le nombre de photons détectés peut être un indicateur utile pour échanger et commenter des images, mais aussi pour reproduire la qualité des images dans une expérience d'imagerie sur plusieurs jours.

Une capacité à quantifier l'intensité de la fluorescence détectée

Un détecteur idéal peut établir la relation entre la quantité de fluorescence détectée et l'intensité sur une échelle quantitative. Cependant, avec la technologie conventionnelle, cette relation restait floue et incertaine. Le détecteur SiVIR peut quantifier la fluorescence détectée selon une échelle quantitative claire : le nombre de photons.

Une large étendue dynamique

Un détecteur idéal devrait avoir une large étendue dynamique pour être en mesure de détecter un nombre de photons allant d'un photon à plusieurs milliers de photons. Cependant, en recourant à la technologie classique, l'étendue est étroite lorsque le gain est élevé et large lorsque le gain est faible, ce qui oblige à faire un compromis entre signal et bruit. Le gain élevé du détecteur SiVIR permet la détection de photons individuels, tandis que sa large étendue dynamique permet la détection de milliers de photons en peu de temps.

Des réglages de détection simples (gain fixe)

Un détecteur ne doit pas nécessiter de réglages compliqués. Cependant, la technologie conventionnelle exige que les utilisateurs ajustent en permanence la haute tension (HT) en fonction de la luminosité de la fluorescence cible. Le détecteur SiVIR, quant à lui, ne nécessite que l'ajustement de la vitesse de balayage, de la taille des pixels et du nombre d'intégration (ou de moyennage) des images.

L'histogramme d'intensité d'une image, comme celui représenté à la figure 13, montre que le signal fluorescent peut être détecté de manière discrète et quantitative par le détecteur SiVIR avec un rapport signal/bruit élevé. Dans la figure 13, l'intensité apparaît sous forme de pics en forme de peigne, et l'intensité de la plupart des pixels est concentrée à des valeurs d'intensité correspondant à ces pics. Chaque pic correspond au nombre de photons détectés identifiés à partir de la valeur maximale du signal d'impulsion comme décrit dans la section précédente. Par exemple, si la valeur maximale du signal d'impulsion détecté à un pixel donné est de juste 1 photon, l'intensité du pic correspond à 1 photon, et si la valeur maximale de l'impulsion détectée à un pixel donné est de 2 photons, l'intensité du pic correspond à deux photons. De même, même si le nombre de photons détectés augmente, la valeur d'intensité est convertie en position de crête du photon détecté. Comme ce processus contient naturellement une faible quantité de bruit et d'erreurs, lorsqu'un grand nombre de photons sont détectés, ces erreurs s'accumulent et les pics en peigne sont difficiles à résoudre à haute intensité. Cependant, étant donné que le bruit et les erreurs sont supprimés à une intensité inférieure à celle d'un photon, l'histogramme peut comprendre des pics en peigne de photons détectés de façon individuelle. En fait, lorsque l'on simule la distribution de l'intensité en supposant qu'elle contienne du bruit avec un écart-type d'environ 1/3 de l'intensité de détection d'un photon, les pics supérieurs à trois ou quatre photons ne peuvent pas être résolus.

Ainsi, un photon, qui est la plus petite unité quantique de la lumière, peut être détecté séparément du bruit à un rapport signal/bruit suffisant. Cela signifie que l'intensité de l'image n'est composée

que de l'intensité correspondant au nombre de photons détectés au niveau de chaque pixel, et que l'effet du bruit contaminant peut se trouver annulé ou non reconnu. En d'autres termes, le détecteur SiVIR peut produire des images à un rapport S/B élevé équivalent à l'image obtenue par la méthode traditionnelle de comptage de photons. En outre, le détecteur SiVIR peut détecter à un rapport S/B élevé même en cas d'imagerie de fluorescence de haute intensité à grande vitesse, tandis que la méthode classique de comptage des photons fonctionne bien uniquement pour la détection de faibles niveaux de fluorescence avec une exposition plus longue. Ces caractéristiques font du SiVIR un détecteur révolutionnaire pour l'imagerie de fluorescence de précision.

Dans le microscope confocal à balayage laser FV4000, l'intensité sur l'axe horizontal de la figure 13 peut être convertie en nombre de photons détectés et affichée sur l'image à la place de la valeur de l'intensité. Le nombre de photons peut être converti à partir de la largeur entre les pics en forme de peigne parce que les pics sont à intervalles égaux. Plus précisément, le détecteur SiVIR est conçu pour produire 32 comptes lors de la détection d'un photon, tandis qu'un photon équivaut à un compte dans le cas du comptage de photons conventionnel. Avec notre méthode, une image acquise peut avoir un certain degré de gradation même lorsque le nombre de photons détectés est faible. Par conséquent, en accumulant ou en moyennant des images à faible nombre de photons, il est possible d'améliorer le rapport S/B tout en évitant que les informations sur le nombre de photons ne soient dissimulées dans le bruit ou les erreurs.

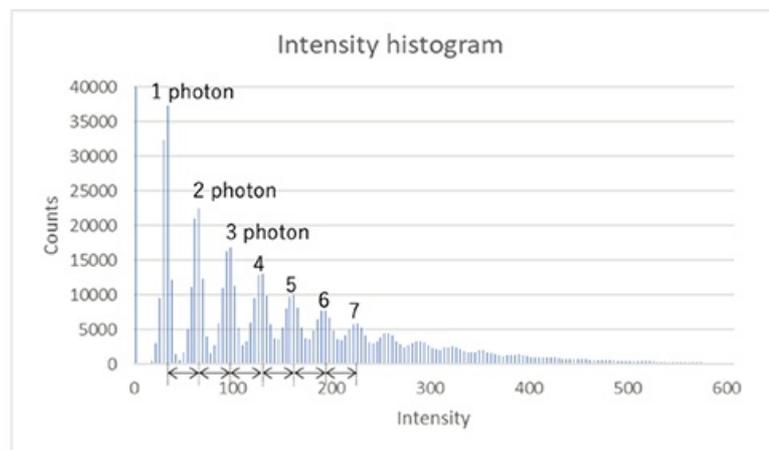
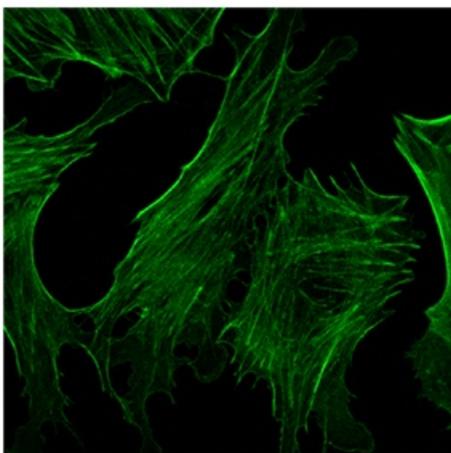


Figure 13 – Image de fluorescence acquise par SiVIR FV4000 et histogramme d'intensité de pixels associé. L'histogramme montre la distribution des fréquences en forme de peigne des photons détectés de façon discrète.

5. Exemples d'images prises avec le détecteur SiVIR

Cette section présente des images prises avec un microscope à balayage laser équipé du détecteur SiVIR.

Comparaison avec des images prises avec un photomultiplicateur GaAsP

La figure 14 comprend des images de fluorescence verte prises par le détecteur SiVIR et un détecteur à photomultiplicateur GaAsP. L'échantillon a été excité par un laser à la même puissance pour obtenir une intensité de fluorescence typique. Lorsque l'intensité est relativement forte (environ 128 photons), les deux images présentent une qualité similaire, mais le détecteur SiVIR indique directement sur l'image le nombre de photons comptés.

(a) SiVIR



(b) GaAsP PMT 550V

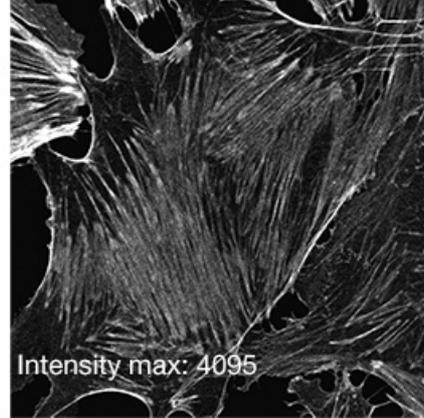


Figure 14 – Les détecteurs SiVIR et à photomultiplicateur GaAsP peuvent tous deux acquérir une image lumineuse d'un échantillon avec un rapport signal/bruit équivalent. L'image de la figure 14(a) a été acquise avec le détecteur SiVIR tandis que celle de la figure 14(b) a été acquise avec le détecteur à tube photomultiplicateur à 550 V. Le même échantillon a été excité par un laser à la même puissance. L'intensité maximale de la fluorescence est d'environ 128 photons/2 μ s.

Scanner : scanner galvanométrique, 2 μ s/pixel

Excitation : laser à 488 nm

Émission : 500 à 540 nm

Filaments d'actine (BODIPY FL) de cellule endothéliale artérielle pulmonaire bovine

Cependant, il n'en est pas de même pour la fluorescence faible. La figure 15 comprend des images du même échantillon présentant une faible fluorescence (environ 12 photons) et prises avec les deux détecteurs. On peut constater que les images prises au moyen du détecteur SiVIR présentent moins de bruit que celles prises au moyen du détecteur à photomultiplicateur GaAsP conventionnel. En outre, l'histogramme d'intensité de l'image du détecteur SiVIR est en forme de peigne, ce qui indique que le nombre de photons a été détecté avec précision au niveau de chaque pixel. En revanche, l'histogramme d'intensité de l'image du photomultiplicateur GaAsP montre que l'intensité de l'image est aléatoire, ce qui ne permet pas la quantification des photons. De plus, la haute tension doit être aju

Microscope confocal à balayage laser

FV4000



- Étendue dynamique révolutionnaire pour l'imagerie, de l'échelle macro jusqu'aux structures subcellulaires
- Possibilité de multiplexer jusqu'à six canaux simultanément avec la technologie TruSpectral
- Scanners à haute résolution et à grande vitesse repensés pour l'imagerie des cellules fixées et vivantes
- Profondeur et photosensibilité améliorées grâce à des

capacités pionnières dans le proche infrarouge et à des composants optiques réputés

- Tranquillité d'esprit grâce au détecteur SiVIR fiable et reproductible
- Dix lignes laser uniques dans le secteur* avec une plage spectrale plus large de 405 à 785 nm

* En date d'octobre 2023.

En apprendre plus ► <https://www.olympus-lifescience.com/laser-scanning/fv4000/>



Microscope multiphotonique à balayage laser

FV4000MPE

- Faites l'acquisition de données d'image quantitatives précises, de l'échelle macro jusqu'aux structures subcellulaires.
- Obtenez plus d'informations à partir d'une même image multicolore.
- Surveillez les processus dynamiques des neurones et d'autres éléments essentiels grâce à une imagerie ultrarapide.

En apprendre plus ► <https://www.olympus-lifescience.com/laser-scanning/fv4000MPE/>

FLUOVIEW Laser Scanning Microscope Solutions



SiVIR detector

- Combines a silicon photomultiplier and patented* fast signal processing for lower noise, higher sensitivity, and improved photon resolving capabilities
- High detection efficiency provides superior signal-to-noise to bring weak fluorescence to life
- Capture vivid fluorescence images with no offset adjustments
- Precisely quantify image intensity for more reliable data

*Patent number US11237047

En apprendre plus ► <https://www.olympus-lifescience.com/laser-scanning/silvir-detector/>