
**Microscopes — Microscopes
confocaux — Données optiques des
microscopes confocaux à fluorescence
pour l'imagerie biologique**

*Microscopes — Confocal microscopes — Optical data of fluorescence
confocal microscopes for biological imaging*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21073:2019](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c3865cf9-71b6-4dba-9f55-35e89576a482/iso-21073-2019)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c3865cf9-71b6-4dba-9f55-35e89576a482/iso-21073-2019>



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 21073:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c3865cf9-71b6-4dba-9f55-35e89576a482/iso-21073-2019>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2019

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
Fax: +41 22 749 09 47
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Quantités	2
4.1 Résolution et limite de sectionnement optique.....	2
4.1.1 Généralités.....	2
4.1.2 Définition de la résolution.....	3
4.1.3 Définition de la limite de sectionnement optique.....	3
4.1.4 Mesure.....	3
4.2 Uniformité de champ et précision de centrage.....	6
4.2.1 Définition d'uniformité de champ et précision de centrage.....	6
4.2.2 Mesure.....	6
4.3 Précision de co-enregistrement.....	7
4.3.1 Définition de la précision de co-enregistrement.....	7
4.3.2 Mesure de la précision de co-enregistrement.....	8
4.4 Stabilité de la puissance d'éclairage.....	9
4.4.1 Généralités.....	9
4.4.2 Mesure de la stabilité de la puissance d'éclairage.....	9
4.5 Nombre de champ de l'élément optique de balayage confocal.....	10
4.5.1 Généralités.....	10
4.5.2 Définition de nombre de champ de l'élément optique de balayage confocal.....	10
4.5.3 Mesure du diamètre maximum du champ balayé.....	10
4.6 Fréquence de balayage.....	11
Annexe A (informative) Résolution théorique	13
Bibliographie	15

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

(standards.iteh.ai)

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC) voir le lien suivant: www.iso.org/iso/foreword.html.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 172 *Optique et photonique*, sous-comité SC 5 *Microscopes et endoscopes*.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Introduction

Ce document vise à fournir des spécifications comparables de microscopes confocaux par des fabricants de microscopes et à permettre aux utilisateurs de comparer et surveiller les performances d'imagerie de leurs microscopes confocaux.

Un microscope confocal à balayage laser dans le présent document comprend une source de lumière d'illumination laser, une unité de balayage pour dévier la lumière laser d'excitation, un objectif et une unité de détection composée d'un trou d'épingle de détection et d'un photodétecteur.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21073:2019](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c3865cf9-71b6-4dba-9f55-35e89576a482/iso-21073-2019)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c3865cf9-71b6-4dba-9f55-35e89576a482/iso-21073-2019>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21073:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c3865cf9-71b6-4dba-9f55-35e89576a482/iso-21073-2019>

Microscopes — Microscopes confocaux — Données optiques des microscopes confocaux à fluorescence pour l'imagerie biologique

1 Domaine d'application

Le présent document précise les quantités généralement utilisées en termes de performances d'imagerie en microscopie confocale à balayage laser, utilisée pour l'imagerie d'échantillons biologiques fluorescents.

Le présent document s'applique uniquement aux scanners à point confocal unique utilisant une excitation monophoton.

2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 10934-1, *Optique et instruments d'optique — Vocabulaire relatif à la microscopie — Partie 1: Microscopie optique*

ISO 10934-2, *Optique et instruments d'optique — Vocabulaire relatif à la microscopie — Partie 2: Techniques avancées en microscopie optique*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans l'ISO 10934-1, l'ISO 10934-2 et les suivants s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

— ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

3.1

longueur d'onde d'excitation

longueur d'onde de lumière spécifique requise pour exciter une molécule fluorescente, telle qu'un anticorps fluorescent ou une protéine fluorescente, afin d'émettre de la lumière à des longueurs d'onde d'émission

3.2

bande de longueur d'onde de détection

plage spécifique de longueurs d'onde de lumière collectée par le photodétecteur

3.3
unité d’Airy
AU

diamètre du premier minimum théorique de la PSF de détection dans l’approximation d’ouverture numérique basse

$$AU = 1,22 \frac{\lambda_{\text{ref}}}{NA}$$

où

NA est l’ouverture numérique

λ_{ref} est la longueur d’onde de référence

3.4
pixel

plus petit élément de l’image numérique auquel sont assignés des attributs

3.5
taille de pixel

la plus courte distance entre le centre d’un pixel et le centre d’un pixel adjacent mesurée dans l’espace d’objet

3.6
fonction d’étalement du point confocale
cPSF

produit des fonctions d’étalement du point en intensité des systèmes optiques d’illumination et de détection

[SOURCE: ISO 10934-2:2007, 2.11.7 modifié — le mot «intensité» a été ajouté, et «dans un microscope confocal» a été retiré de la définition.]

3.7
système de coordonnées

système de coordonnées cartésien orthogonal droit défini par l’axe optique comme axe z et le plan x y qui lui est perpendiculaire

Note 1 à l’article: Les coordonnées x et y sont appelées coordonnées latérales, tandis que les coordonnées z sont appelées coordonnées axiales.

3.8
rapport signal sur bruit

rapport du signal à son bruit

3.9
rapport signal sur fond

rapport du signal à son fond

4 Quantités

4.1 Résolution et limite de sectionnement optique

4.1.1 Généralités

La résolution est la capacité à distinguer des détails fins, qui est déterminée par la séparation spatiale minimale de deux points objets requise pour leur observation en tant qu’objets distincts. Différents critères ont été proposés pour déterminer la résolution, par exemple, les critères d’Abbe, de Rayleigh,

de Schuster, d'Houston ou de Sparrow. En microscopie confocale, la résolution est généralement décrite par la largeur totale à mi-hauteur (FWHM) de la fonction d'étalement du point confocale (cPSF).

En général, la distance minimale de séparation est la quantité la plus pertinente en ce qui concerne la résolution. Pour des raisons pratiques, le présent document définit la résolution telle qu'elle figure en [4.1.2](#).

En pratique, d'autres facteurs tels que le bruit et le fond du signal, ainsi que la FWHM de la cPSF, affectent la distance de résolution minimale.

NOTE Tout au long du présent document, le terme résolution désigne la résolution spatiale, par opposition à la résolution temporelle ou spectrale.

4.1.2 Définition de la résolution

La résolution est définie comme la largeur totale à mi-hauteur (FWHM) de la cPSF mesurée au centre du champ objet. La résolution latérale est donnée par la FWHM du signal d'intensité dans une direction latérale à travers le centre d'un point objet fluorescent.

La résolution axiale est donnée par la FWHM du signal d'intensité dans la direction axiale à travers le centre d'un point objet fluorescent.

4.1.3 Définition de la limite de sectionnement optique

L'utilité de la microscopie par fluorescence confocale repose en grande partie sur la capacité à éliminer la lumière hors foyer et ainsi à permettre un sectionnement optique de l'échantillon. La limite de sectionnement optique dépend des fréquences spatiales de l'objet balayé à travers le foyer. Un objet plan fluorescent uniforme est couramment utilisé et généralement accepté comme objet d'essai pour le sectionnement optique^[3]. Un autre critère de discrimination de profondeur utile est l'évaluation du signal détecté d'un miroir balayé à travers le foyer^[4]. Bien que l'utilisation d'une fine couche fluorescente uniforme comme objet d'essai est plus proche de l'application prévue du microscope confocal, la mesure d'un objet plan réfléchissant est plus facile à mettre en œuvre. La fine couche fluorescente uniforme et l'objet plan réfléchissant représentent tous deux une rupture dans la direction axiale et contiennent donc toutes les fréquences spatiales dans la direction axiale. La limite de sectionnement optique est ainsi définie comme la FWHM du signal d'un objet plan balayé à travers le foyer telle que mesurée au centre du champ objet.

4.1.4 Mesure

La résolution est déterminée par imagerie d'un petit point objet, par exemple une microsphère fluorescente. Le point objet doit être d'une taille suffisamment inférieure à la résolution attendue, par exemple le diamètre de l'objet doit être inférieur à la moitié de la résolution attendue. Pour les mesures de la résolution avec des objectifs conçus pour une utilisation avec une lamelle en verre couvre objet, les objets fluorescents montés aussi près que possible de la lamelle en verre couvre objet doivent être choisis de façon à minimiser les aberrations causées par le milieu de montage. La résolution théorique, calculée pour un microscope confocal à fluorescence idéal, est listée dans l'[Annexe A](#). En pratique, la résolution théorique n'est pas atteinte.

La limite de sectionnement optique est déterminée comme la FWHM du signal d'une fine couche fluorescente uniforme ou d'un objet plan réfléchissant balayé à travers le foyer. Le signal est mesuré au centre du champ objet. La fine couche fluorescente uniforme utilisée pour la mesure de la limite de sectionnement optique avec des objectifs conçus pour une utilisation avec un verre protecteur doit être située de préférence sur le verre protecteur afin de minimiser les aberrations causées par le milieu de montage. La fine couche fluorescente uniforme doit être significativement plus fine que la limite de sectionnement attendue, c'est-à-dire qu'il est recommandé que la fine couche fluorescente uniforme soit plus petite que la moitié de la limite de sectionnement optique attendue.

Pour les trous d'épingle de détection différents d'un trou d'épingle circulaire, la taille caractéristique du trou d'épingle déterminant la résolution doit être identique au diamètre d'un trou d'épingle circulaire

correspondant. La dimension maximale d'un tel trou d'épingle ne doit pas dépasser 50 % de la longueur de la plus petite dimension du trou d'épingle, par exemple la diagonale d'un trou d'épingle carré est 41 % plus longue que son côté.

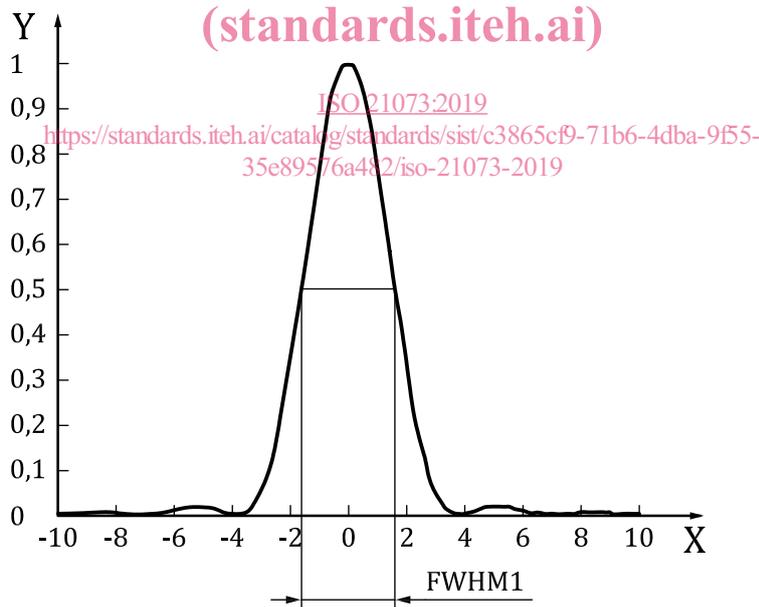
NOTE 1 Pour une résolution maximale, la taille du trou d'épingle de détection doit théoriquement être infinitésimale. Pour obtenir des niveaux de signal plus élevés, le trou d'épingle est ouvert et généralement réglé à un diamètre de 1 AU en microscopie par fluorescence. Le microscope confocal démontre une bonne capacité de sectionnement axial même si la résolution latérale obtenue avec un diamètre de trou d'épingle de 1 AU n'est que légèrement meilleure que la résolution d'un microscope à champ large.

La taille de pixel doit être suffisamment inférieure à la résolution théorique, par exemple la taille de pixel doit être au moins 10 fois plus petite que la résolution théorique. Le champ balayé doit être au moins 10 fois plus grand que la résolution théorique. En présence de lobes latéraux supérieurs à 50 % de l'intensité maximale de la cPSF, une résolution ne doit pas être indiquée, car la FWHM de la cPSF est ambiguë.

NOTE 2 Les performances d'imagerie limitées par la diffraction d'un microscope confocal induisent des lobes latéraux largement inférieurs à 50 % de l'intensité maximale de la cPSF.

Il convient de porter une attention au rapport signal sur bruit lors de la détermination de la FWHM de la cPSF. Si la FWHM de la cPSF ne peut pas être clairement déterminée par une mesure unique, la moyenne doit être faite sur un nombre suffisant de mesures multiples d'un ou de plusieurs objet(s) ponctuel(s).

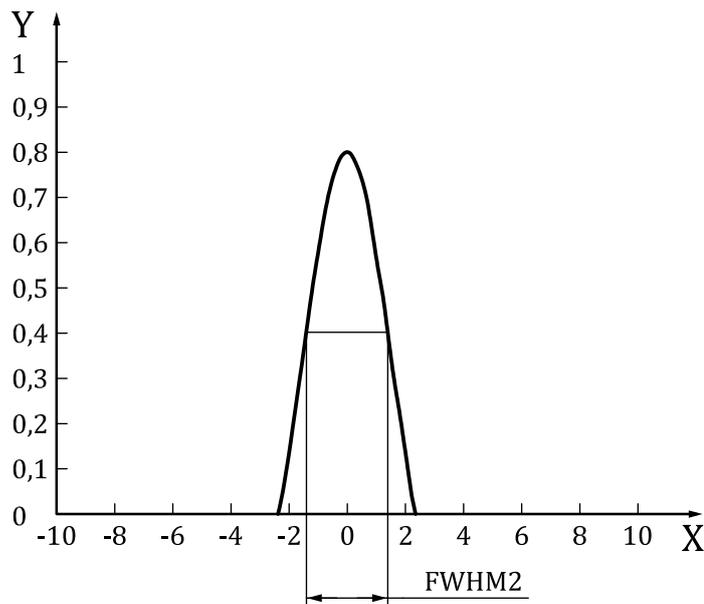
Le maximum et le minimum de la cPSF doivent être inclus à l'enregistrement de la cPSF afin d'éviter une détermination incorrecte de la FWHM. Cela est illustré à la [Figure 1](#) et la [Figure 2](#), qui montrent qu'un écrêtage de la cPSF à une valeur de 0,2 entraîne une valeur FWHM «FWHM2» environ 14 % plus petite que la valeur FWHM correcte de «FWHM1».



Légende

- X distance à partir du centre [a.u.]
- Y intensité [a.u.]

Figure 1 — Détermination de la valeur FWHM correcte «FWHM1» de la cPSF



Légende

X distance à partir du centre [a.u.]

Y intensité [a.u.]

Figure 2 — Un écrêtage de la CPSF entraîne une valeur FWHM incorrecte de «FWHM2»

(standards.iteh.ai)

La FWHM doit être déterminée à partir des données enregistrées non traitées, c'est-à-dire que les données ne doivent pas être déconvoluées. Le trajet de transmission du signal doit en outre être linéaire, c'est-à-dire que l'excitation du fluorophore et le signal issu du détecteur ne doivent pas être saturés. Un trajet de transmission linéaire du signal inclut également le trajet de transmission du signal dans le système de microscope confocal, en particulier l'électronique et le logiciel.

La valeur FWHM doit être obtenue en adaptant une fonction gaussienne de forme

$$I(x) = A \cdot e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{x-x_0}{\sigma} \right)^2} + c$$

aux données mesurées, où A , x_0 , σ et c doivent être ajustés. La FWHM est donnée par

$$\text{FWHM} = 2 \cdot \sqrt{2 \cdot \ln(2)} \cdot \sigma \approx 2,35 \cdot \sigma$$

L'ajustement gaussien doit être effectué à partir des profils d'intensité d'une ligne, c'est-à-dire d'une largeur d'un pixel.

La mesure de la résolution et de la limite de sectionnement optique dépend en grande partie des paramètres suivants, qui ont été déclarés avec les valeurs nominales de résolution/limite de sectionnement optique:

- Longueur d'onde d'excitation;
- Bande de longueur d'onde de détection;
- Désignation de l'objectif par le fabricant;
- Taille du trou d'épingle de détection en unités d'Airy et longueur d'onde de référence utilisée pour spécifier l'unité d'Airy. De manière générale, une taille de trou d'épingle de détection de 1 AU doit être utilisée;