



Les capteurs pour l'imagerie en biologie



Marc Moreau Catherine Leclerc
Centre de Biologie du développement
UMR 5547 et GDR E n° 731 Toulouse

BC02 mars 2013

Historique - CCD

- - 1887 : Hertz montre l'émission d'électrons par des corps recevant du rayonnement électromagnétique
- - 1905 : Einstein fournit une interprétation de l'effet photoélectrique (intuition du photon)
- - 1950 : premiers tubes de télévision Vidicon
- - 1960 : améliorations des tubes : Plumbicon
- - 1970 : améliorations des tubes : Saticon, Chalnicon, Newvicon
- - 1975 : tubes vidicon solides
- - **1980** : arrivée des technologies basées sur les semi-conducteurs; photodiodes et photocapacités MOS interrogées par des registres **CCD**

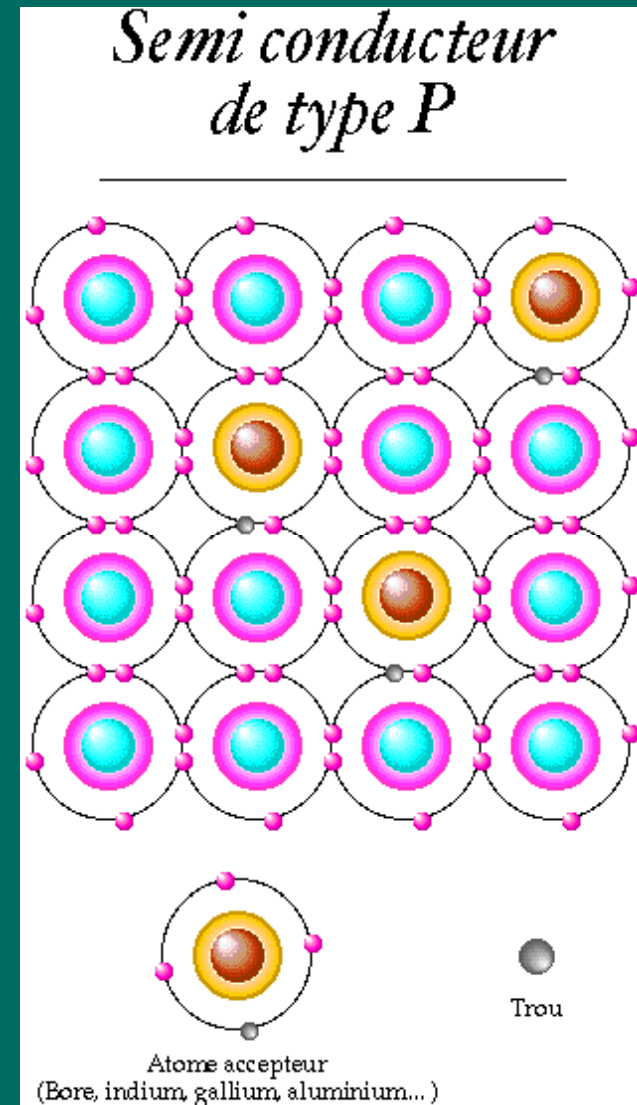
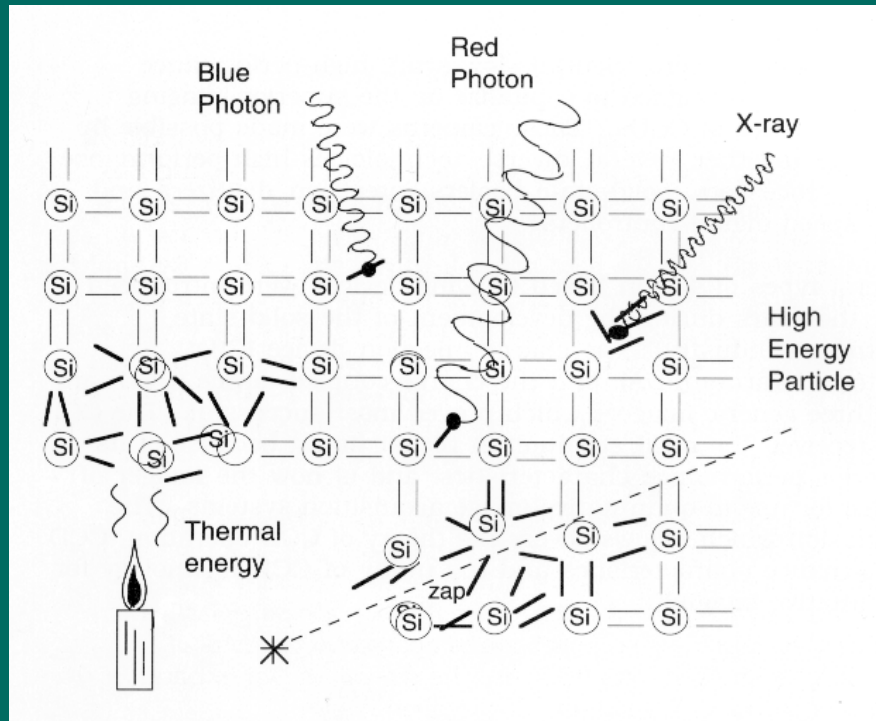
Les différents système d'imagerie à base de silicium

- **PDA photodiode array**
- **CCD charged coupled device**
- **Capteur CMOS**

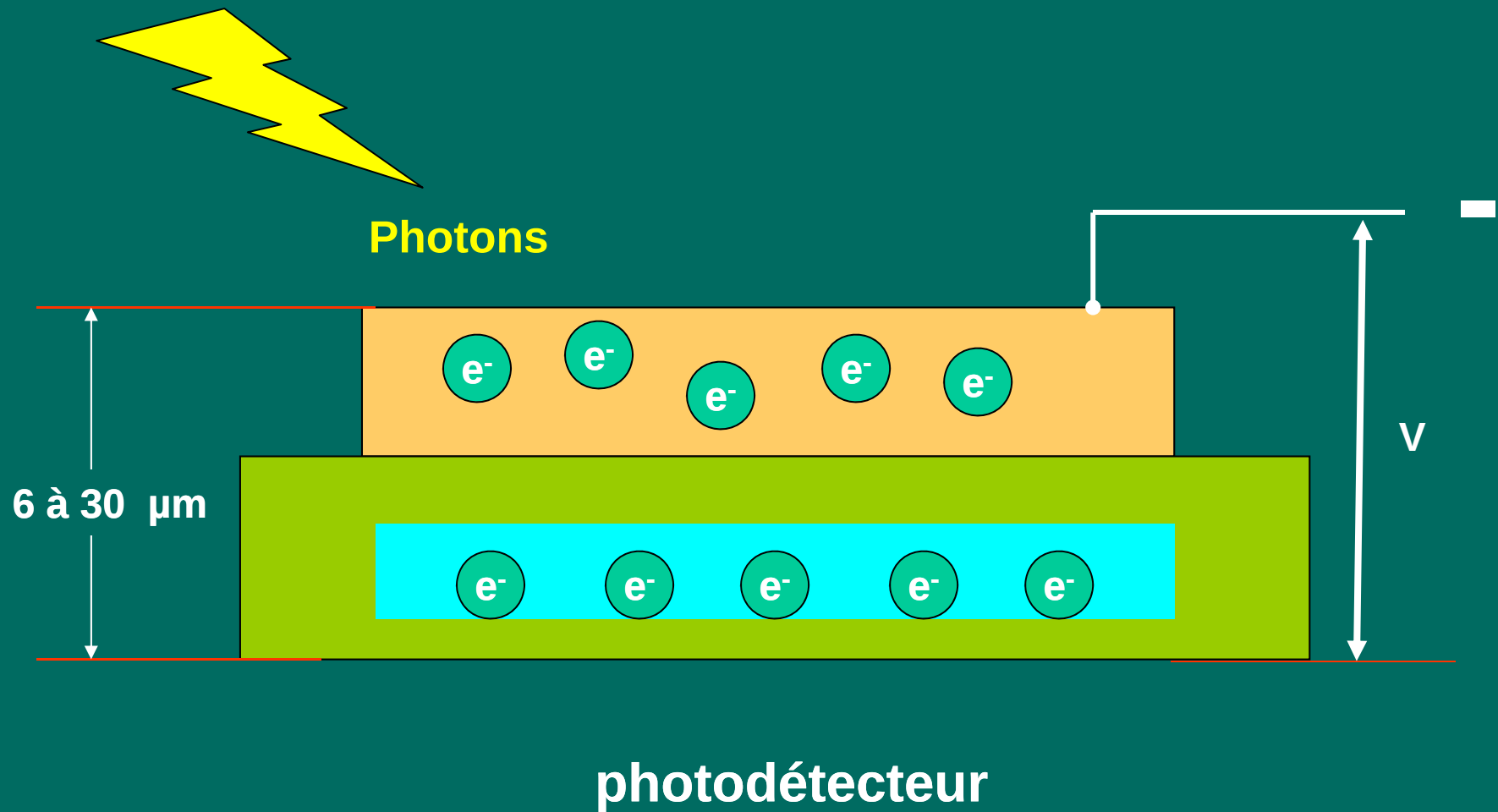
Les capteurs numériques et l'œil

- Sensibilité (bas niveaux de lumière, hauts niveaux de lumière)
- Spectre de sensibilité : visible (400-700 nm) mais aussi IR, UV, RX
- Dynamique : l'œil peut résoudre 30 niveaux de gris, la caméra au moins 256
- Vitesse, souvent les ccd sont lentes, elles sont utilisées en appareil photo. Cependant en ccd intensifiée on trouve des modèles pouvant acquérir 100 images/sec
- Analyse : quantification, analyse morphologique
- Enregistrement de données
- Correction : soustraction de bruit de fond, rapport d'images modification du contraste, conversion en noir et blanc...

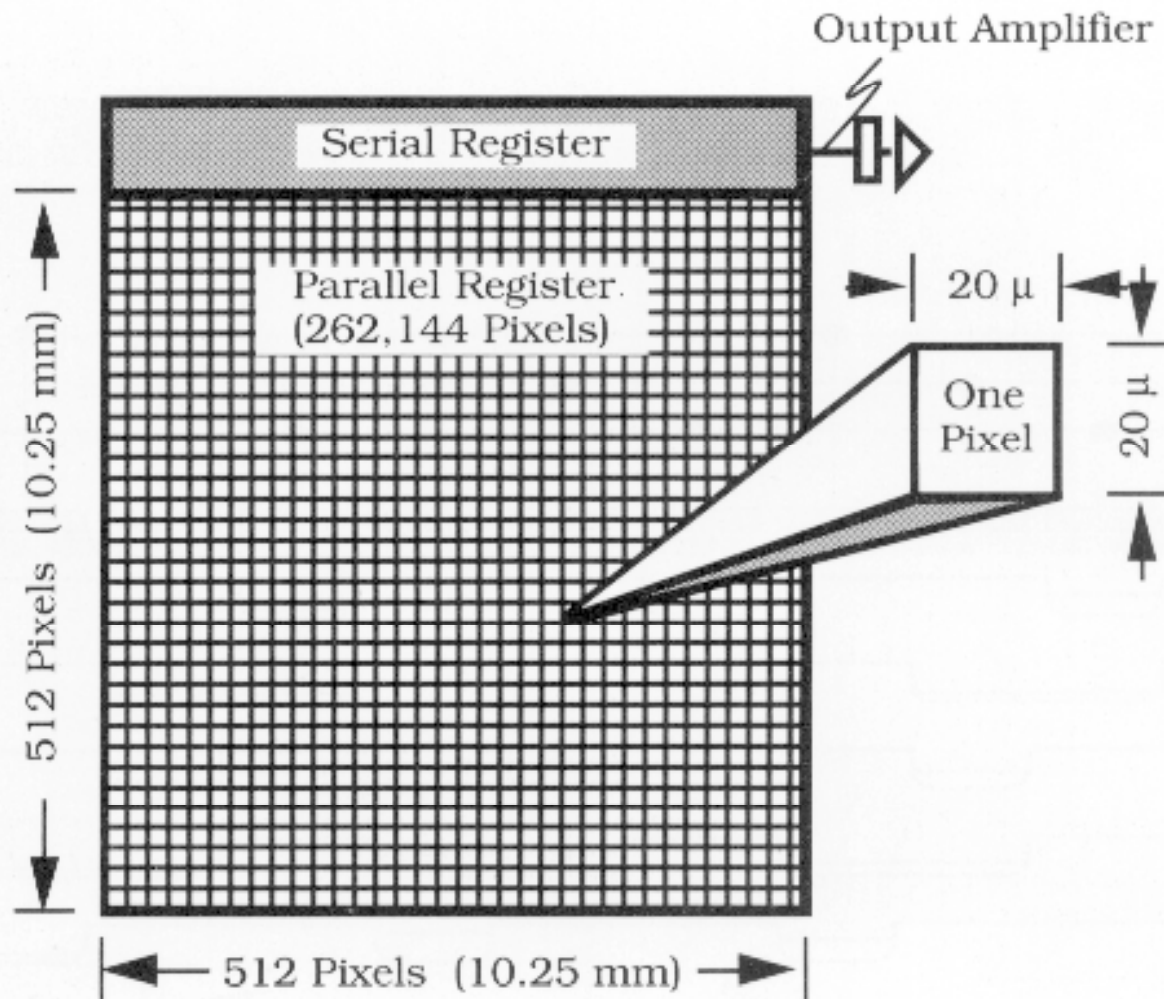
Les capteurs silicium



Puits de potentiel



Charge maxi (nb d 'électrons) = $800 \times \text{surface du photodetecteur en } \mu\text{m}^2$



CoolSNAPHQ (Roper)

1392 x 1040 pixels

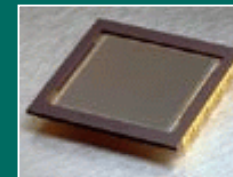
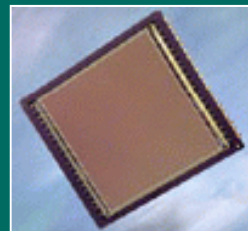
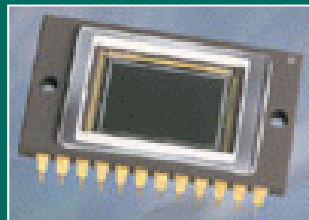
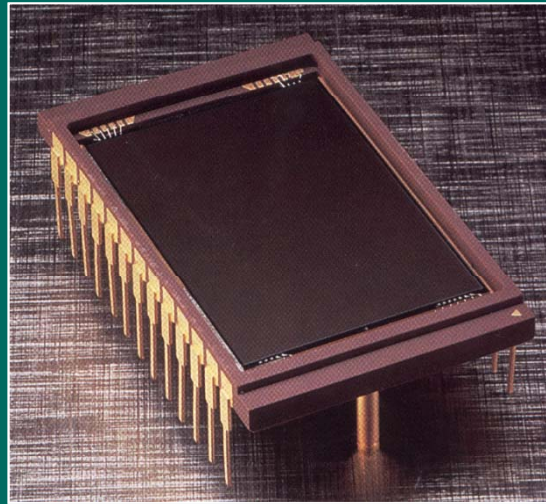
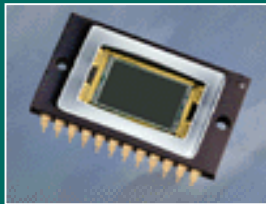
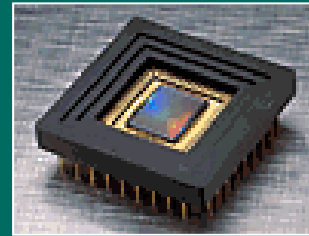
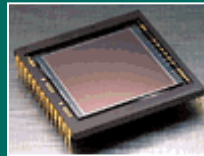
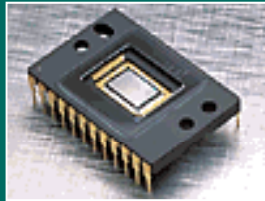
pixel = 6.45 x 6.45 μm

Orca ER (Hamamatsu)

1344 x 1024 pixels

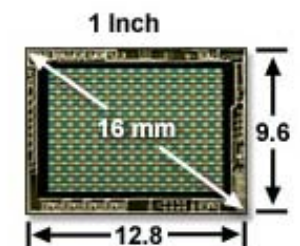
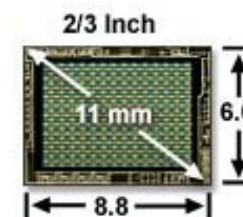
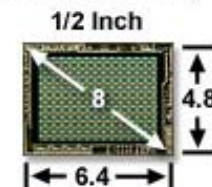
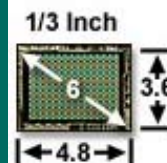
pixel = 6.45 x 6.45 μm

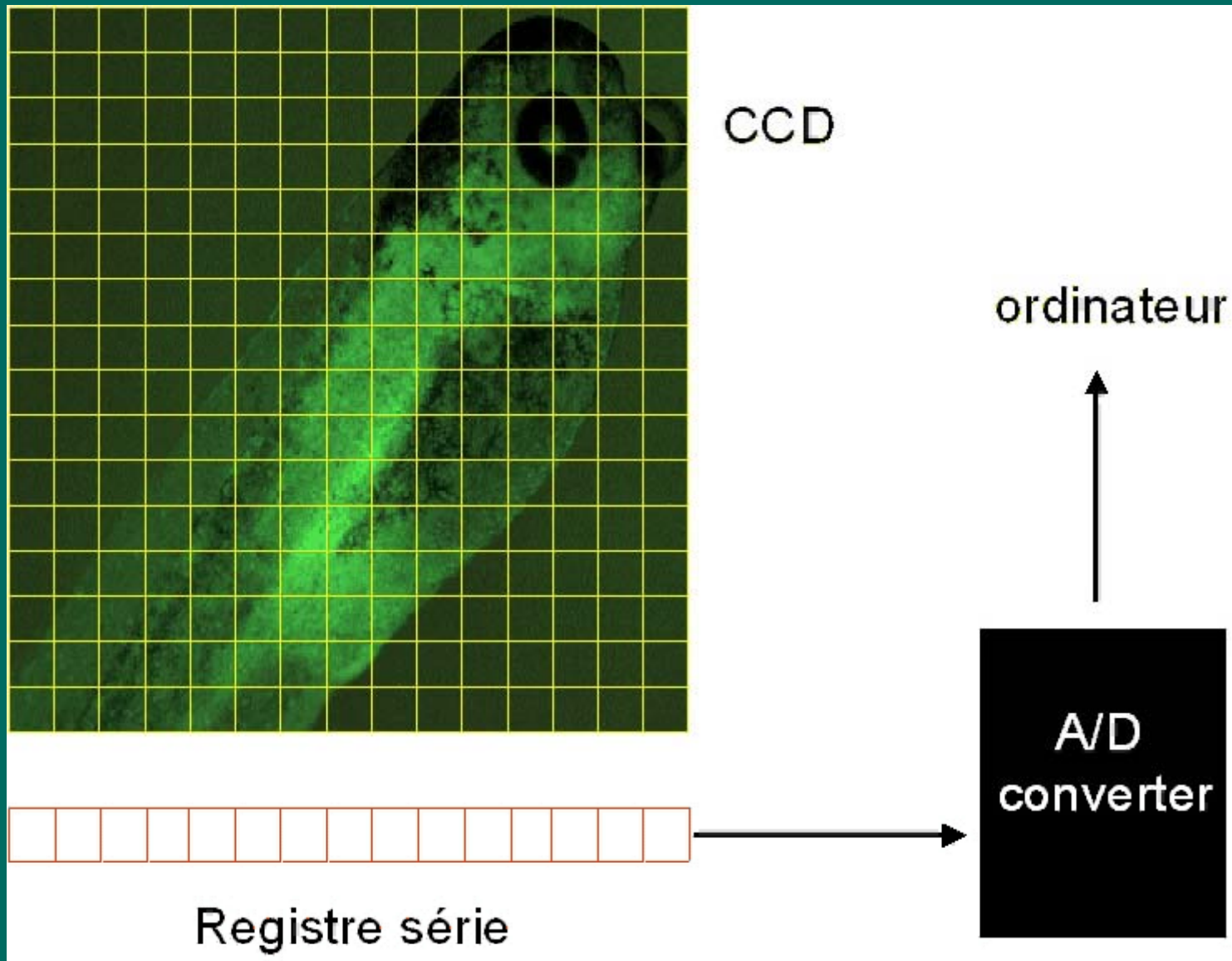
Les capteurs CCD

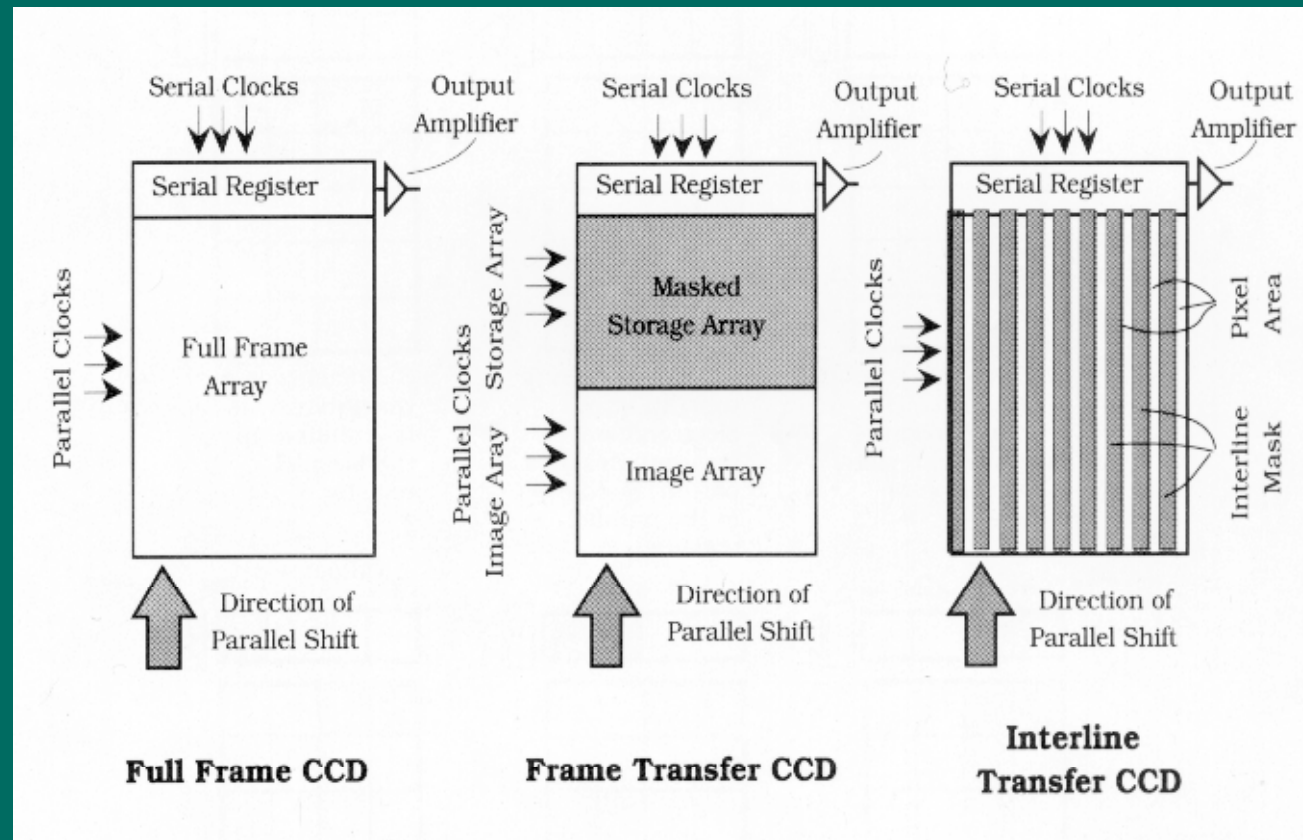


Common CCD Image Sensor Formats

(Dimensions in Millimeters)

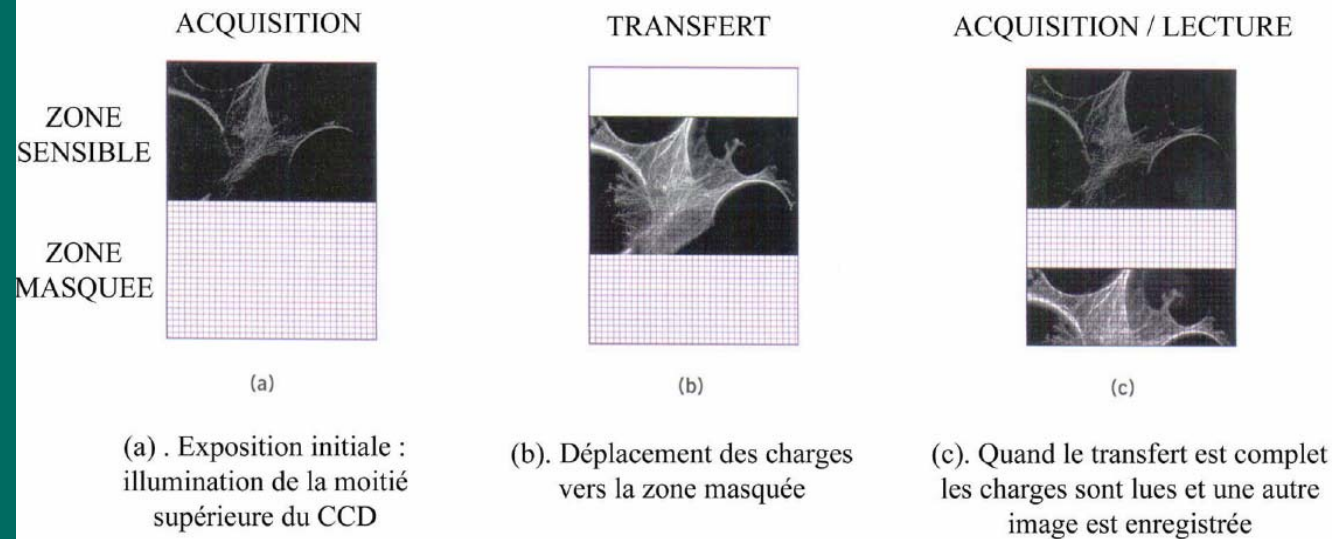


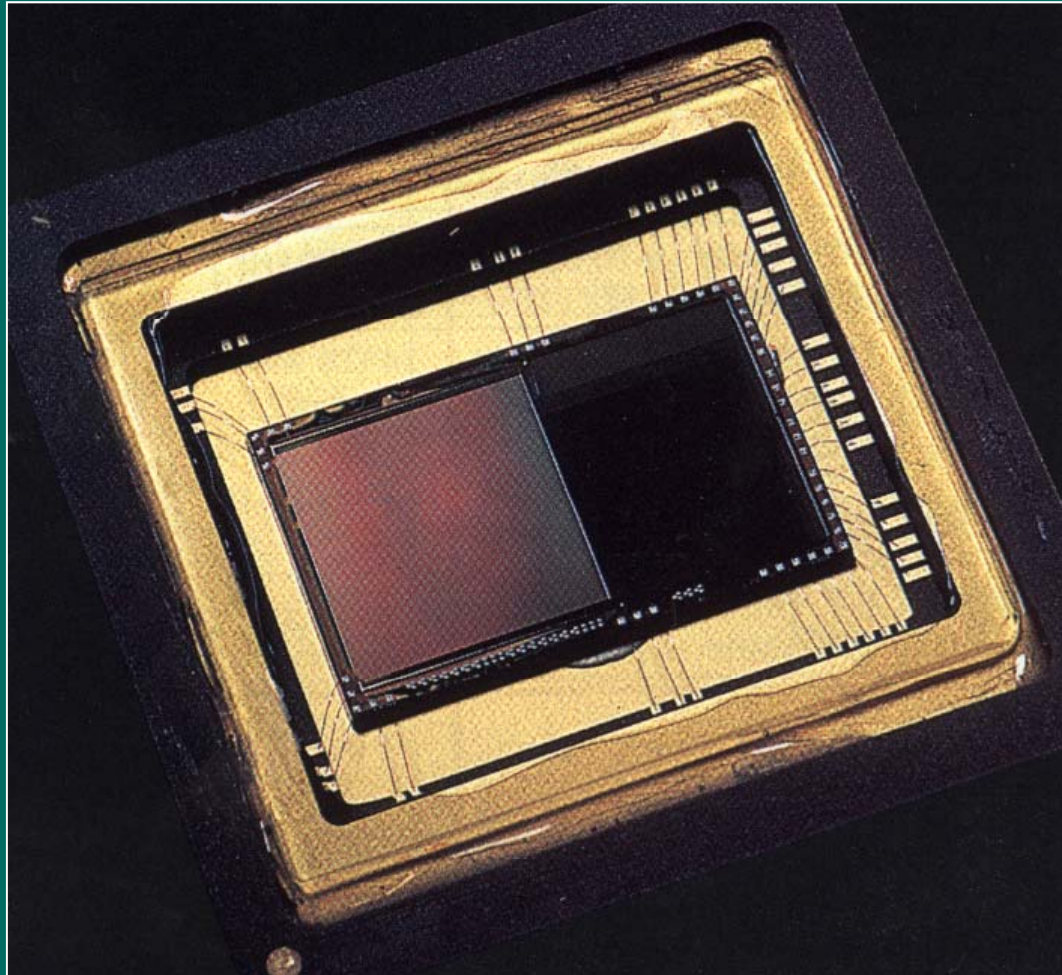




Architecture des CCD

Capteurs à transfert de trame

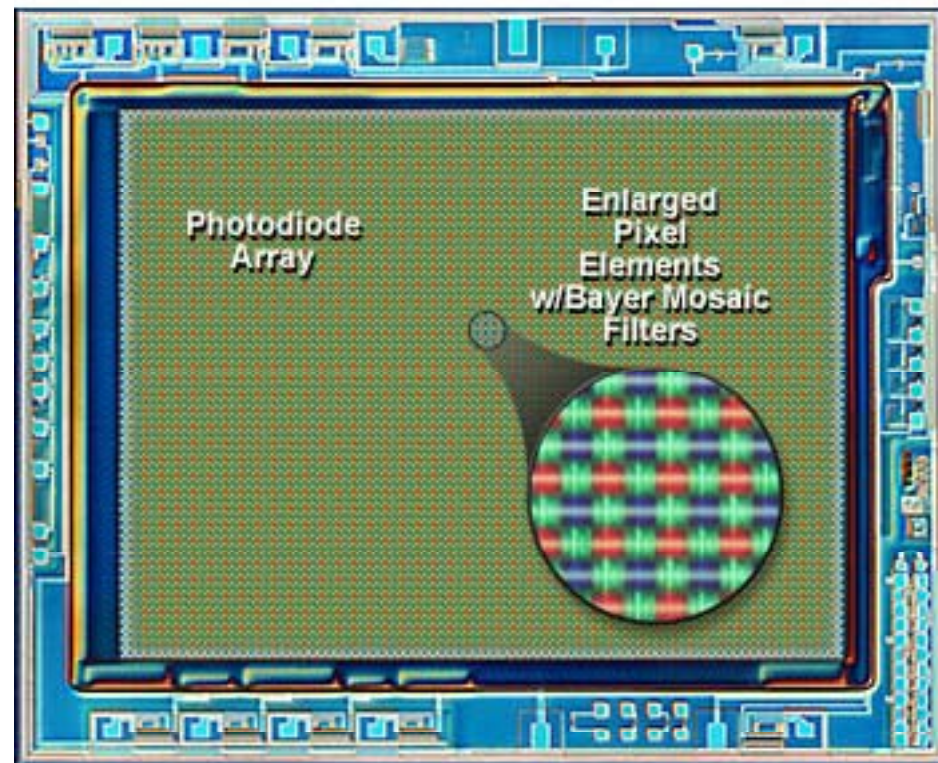




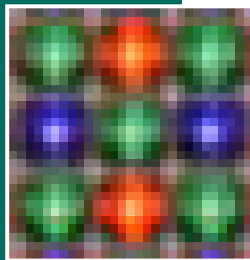
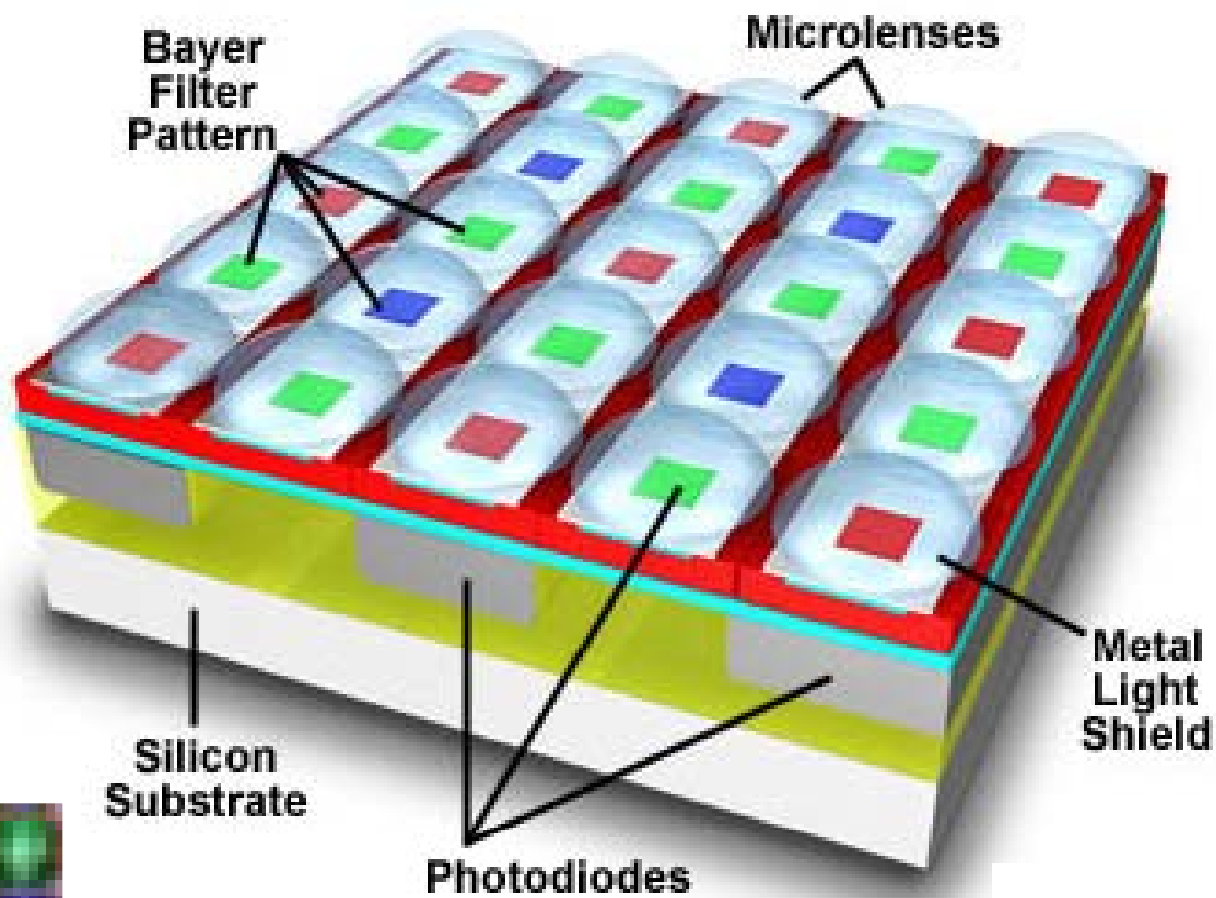
CCD frame transfer

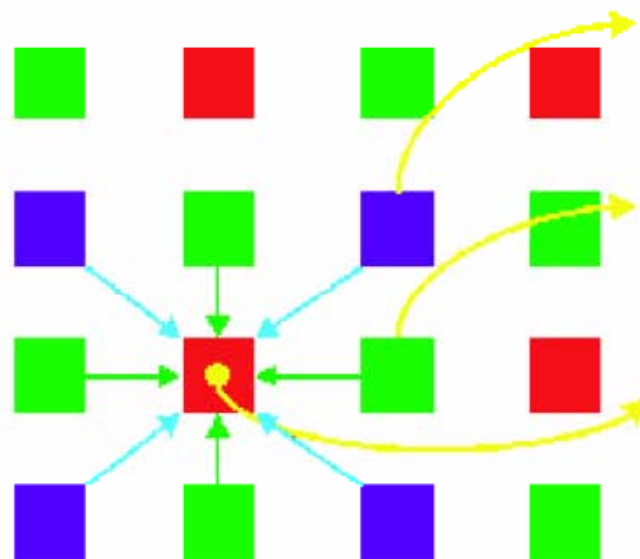
Caméras couleurs

CCD Photodiode Array Integrated Circuit



Microlens Array on Photodiodes





- le photosite mesure l'intensité du bleu
- le vert est calculé par moyenne sur les 4 verts voisins
- le rouge est calculé par moyenne sur les 4 rouges voisins

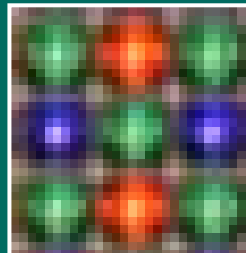
- le photosite mesure l'intensité du vert
- le bleu est calculé par moyenne sur les 2 bleus voisins
- le rouge est calculé par moyenne sur les 2 rouges voisins

- le photosite mesure l'intensité du rouge
- le bleu est calculé par moyenne sur les 4 bleus voisins
- le vert est calculé par moyenne sur les 4 verts voisins

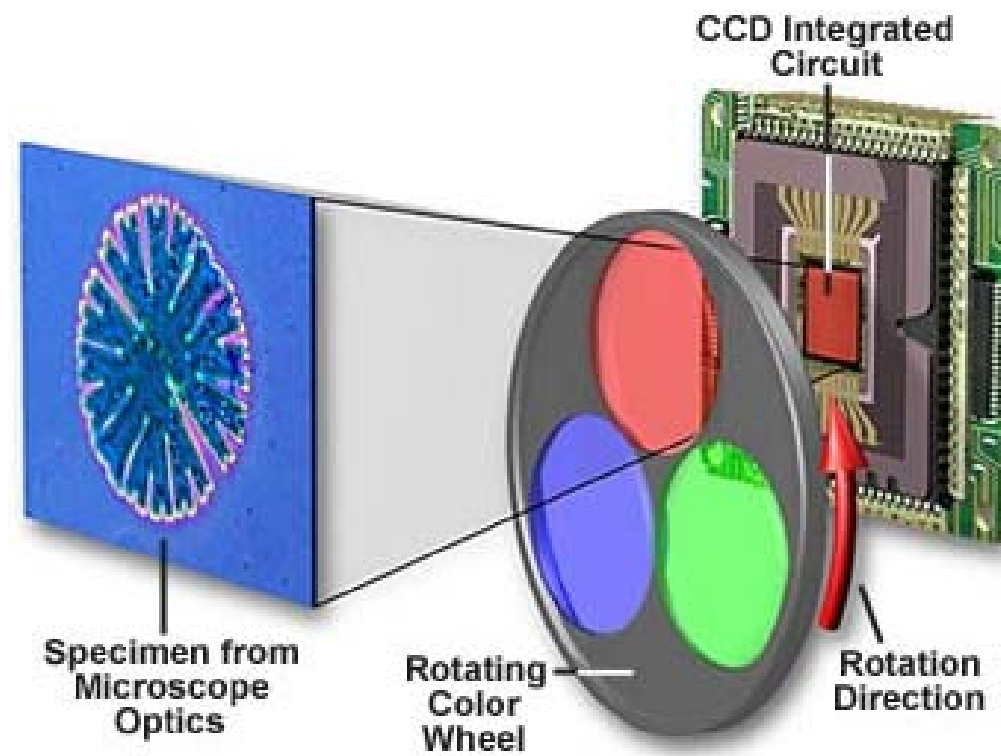
Reconstruction de l'image couleur

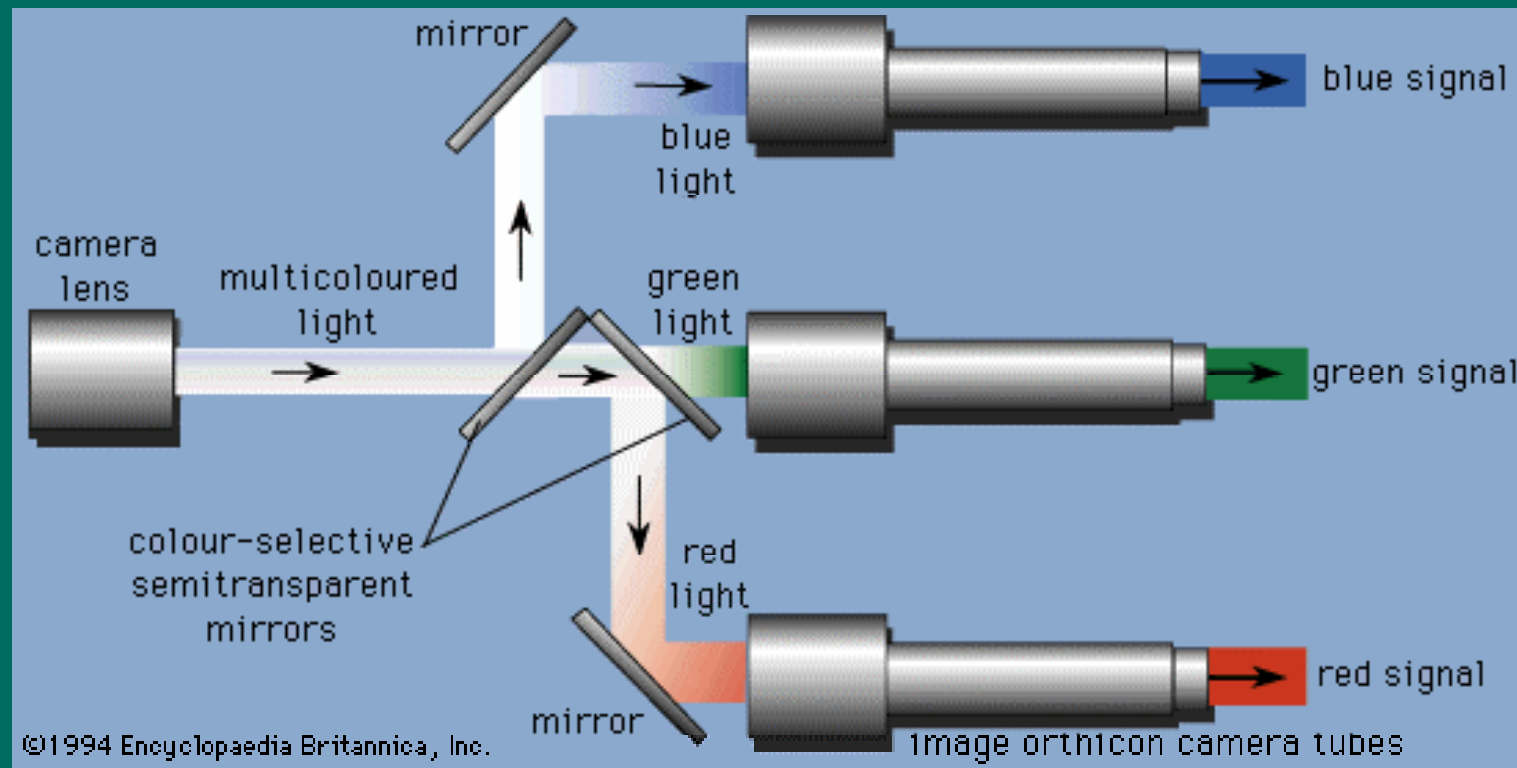


interpolation



Sequential Color Three-Pass CCD Imaging System





Comment augmenter la sensibilité ?

- **Intensification**
- **Illumination arrière**
- **Technologie EM-CCD**

1 lux =



à 1 mètre



Lux

10^{-12}

10^{-10}

10^{-8}

10^{-6}

10^{-4}

10^{-2}

10^0

10^2

10^4

Sondes bioluminescentes

Film 10000 ASA

CCD normale

Camera SIT

CCD intensifiée

CCD intensifiée refroidie



10^0

10^2

10^4

10^6

10^8

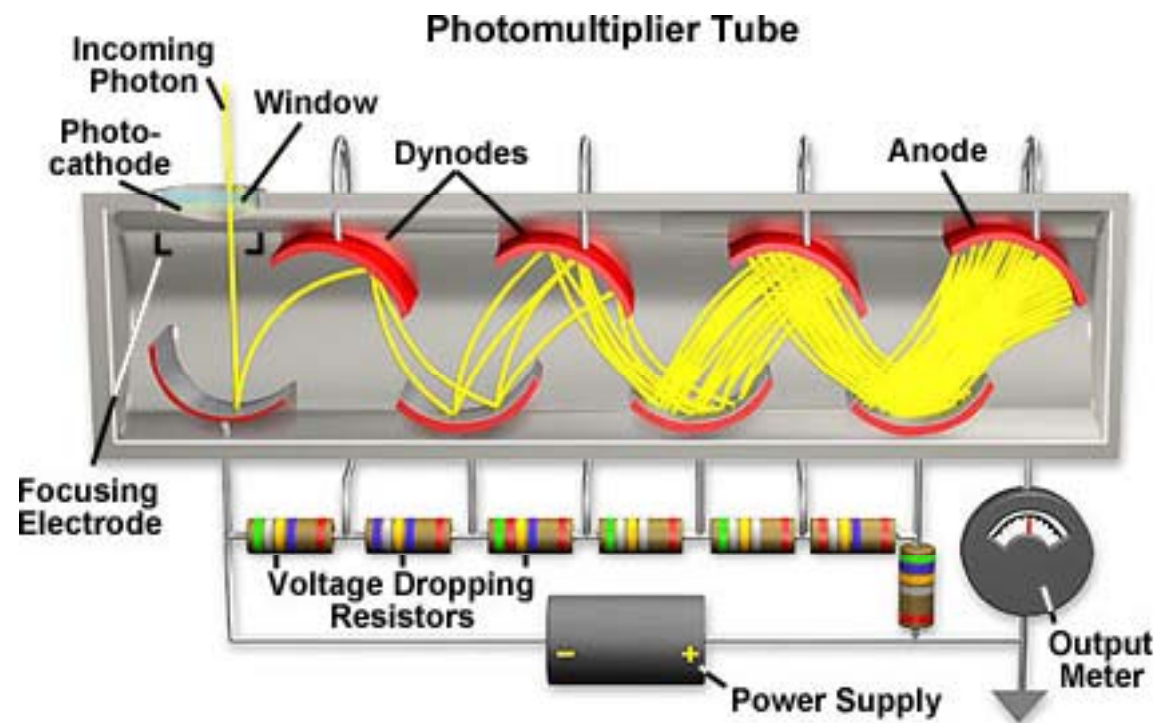
10^{10}

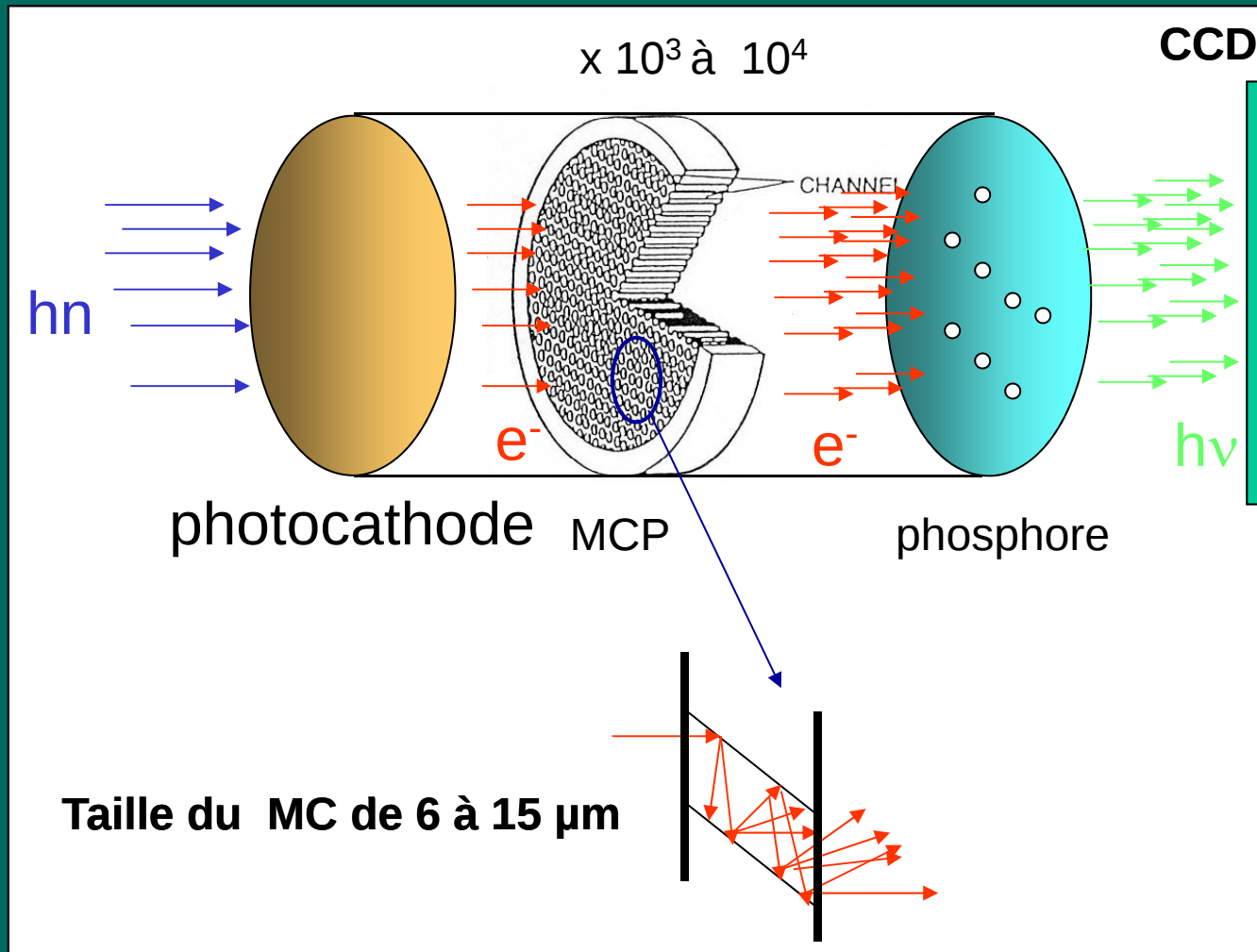
10^{12}

10^{14}

Photons/mm²/sec

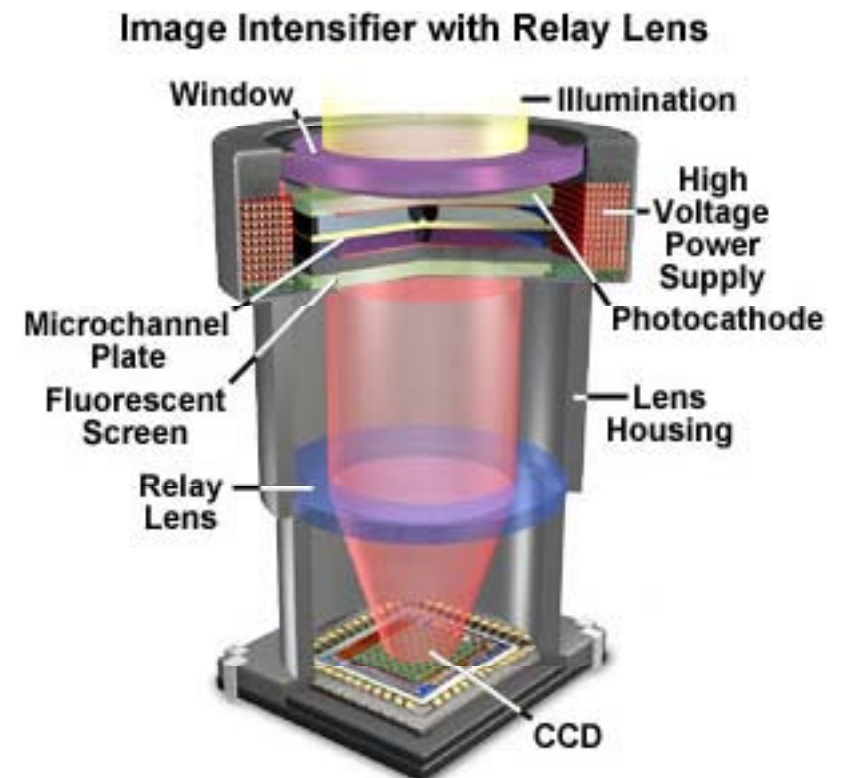
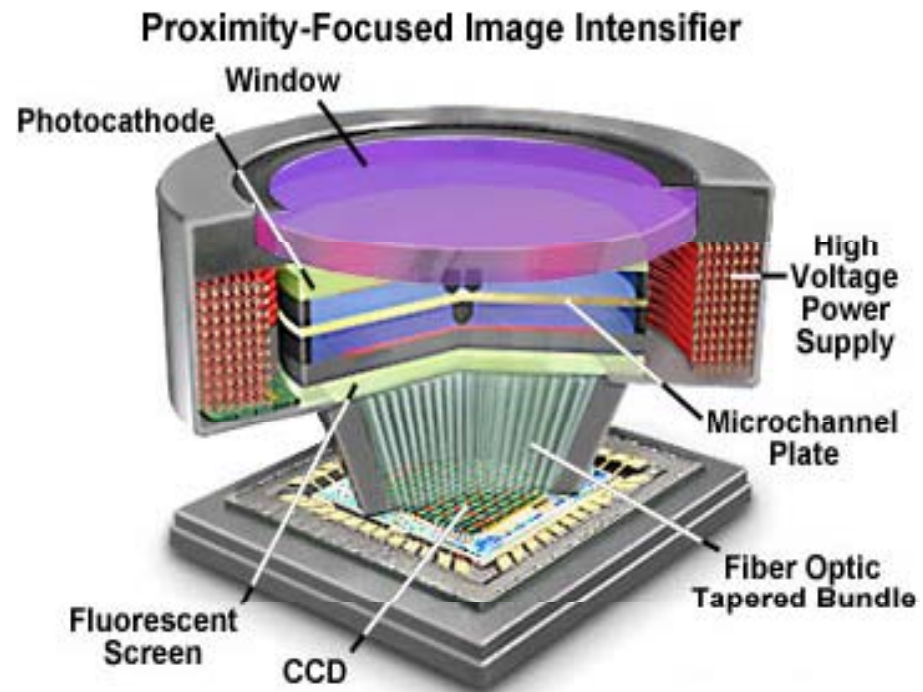
Intensification





•

Intensificateur d'image



Avantages

Gain > 10 000

Inconvénients

Taille du pixel modifiée
On passe de 6.7 μm à 25 μm

Illumination arrière

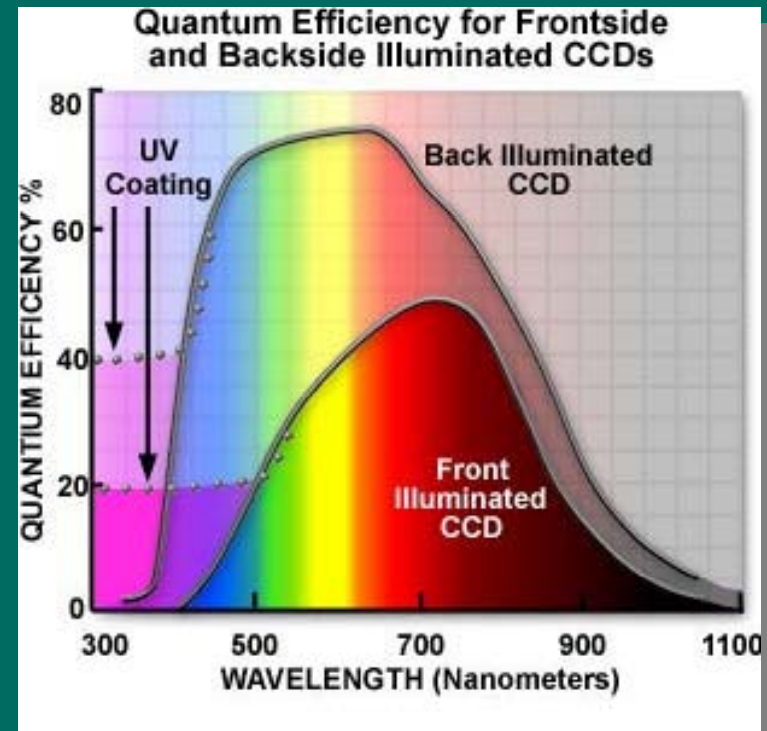
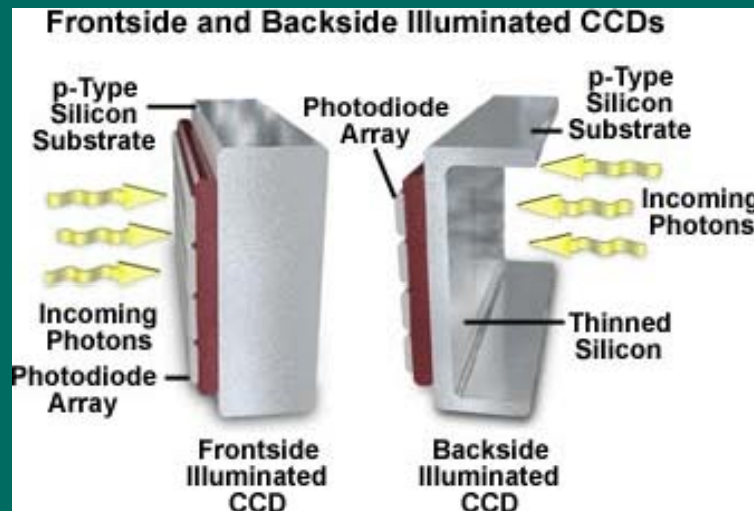
Efficacité quantique (QE)

Efficacité quantique (*quantum efficiency*, QE)

Capacité de l'imageur à produire des électrons sous l'action d'un photon incident (%)

Varie en fonction du spectre et de la géométrie du détecteur

L'information est perdue s'il n'y a pas un électron pour un photon.



La technologie EMCCD

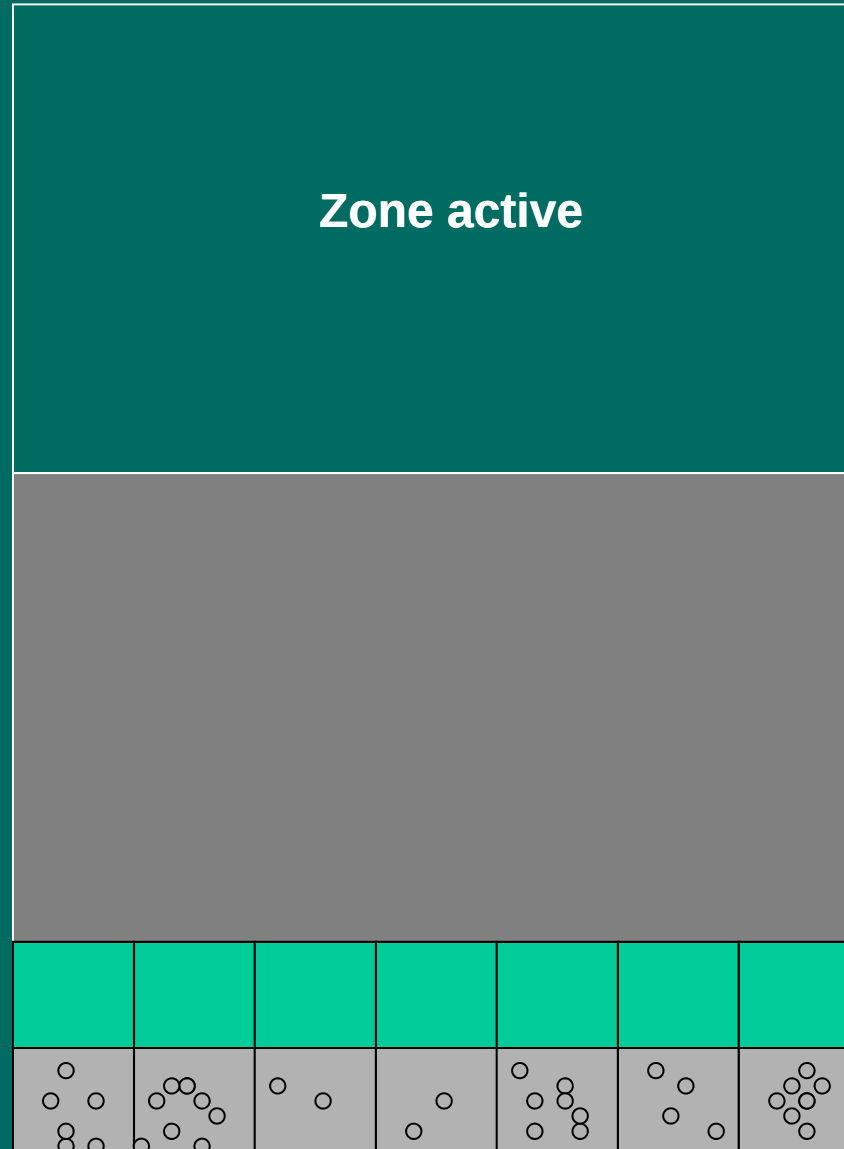
EM-CCD

Zone active

50 V

Registre multiplicateur

LECTURE



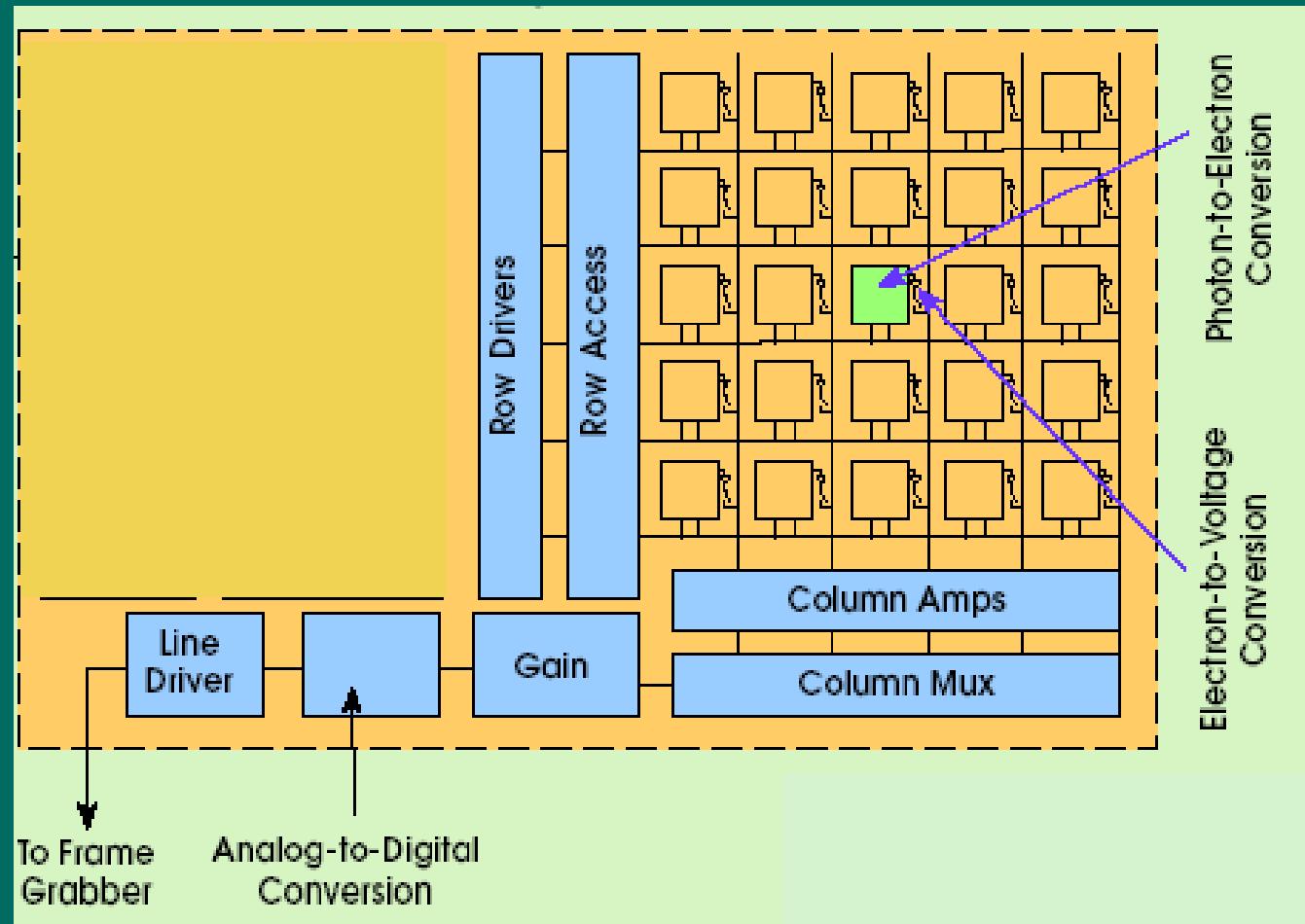
Avantages

- Gain de 2000 sans augmentation de bruit
- Taille du pixel conservée
- Rapidité : Permet des prises de vues > 50 images/sec

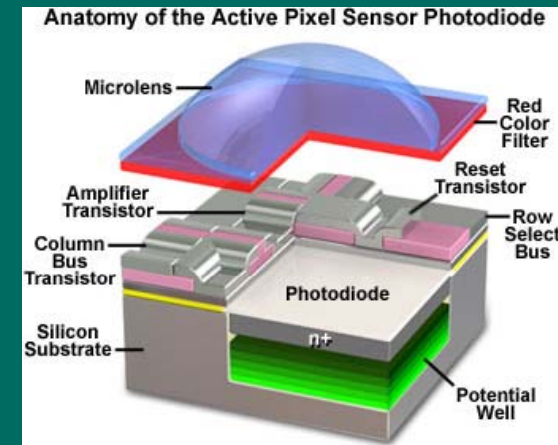
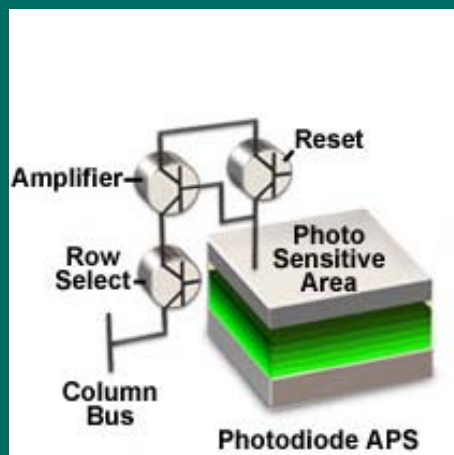
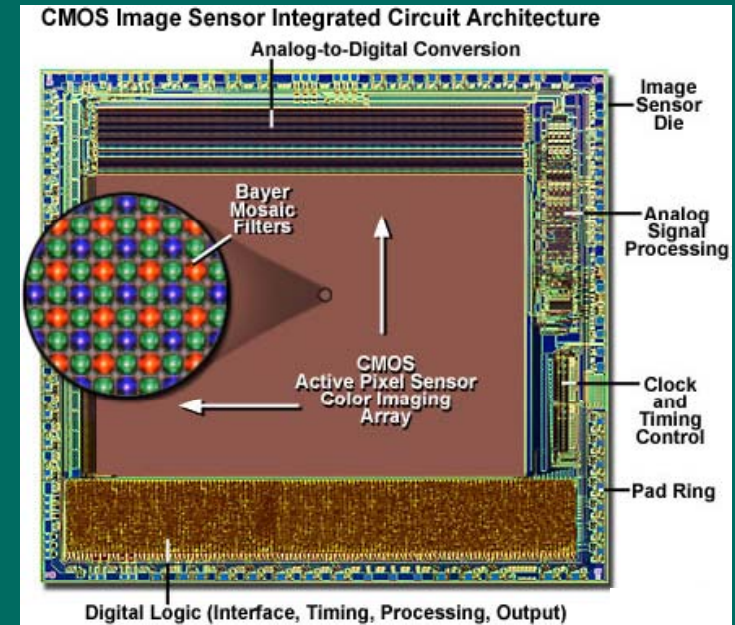
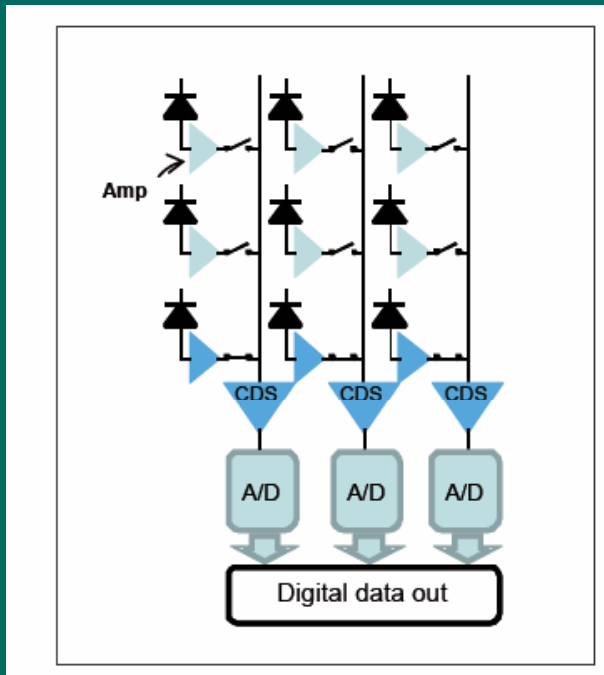
Inconvénients

- Sensibilité à la température

Capteur CMOS



Le capteur c-Mos



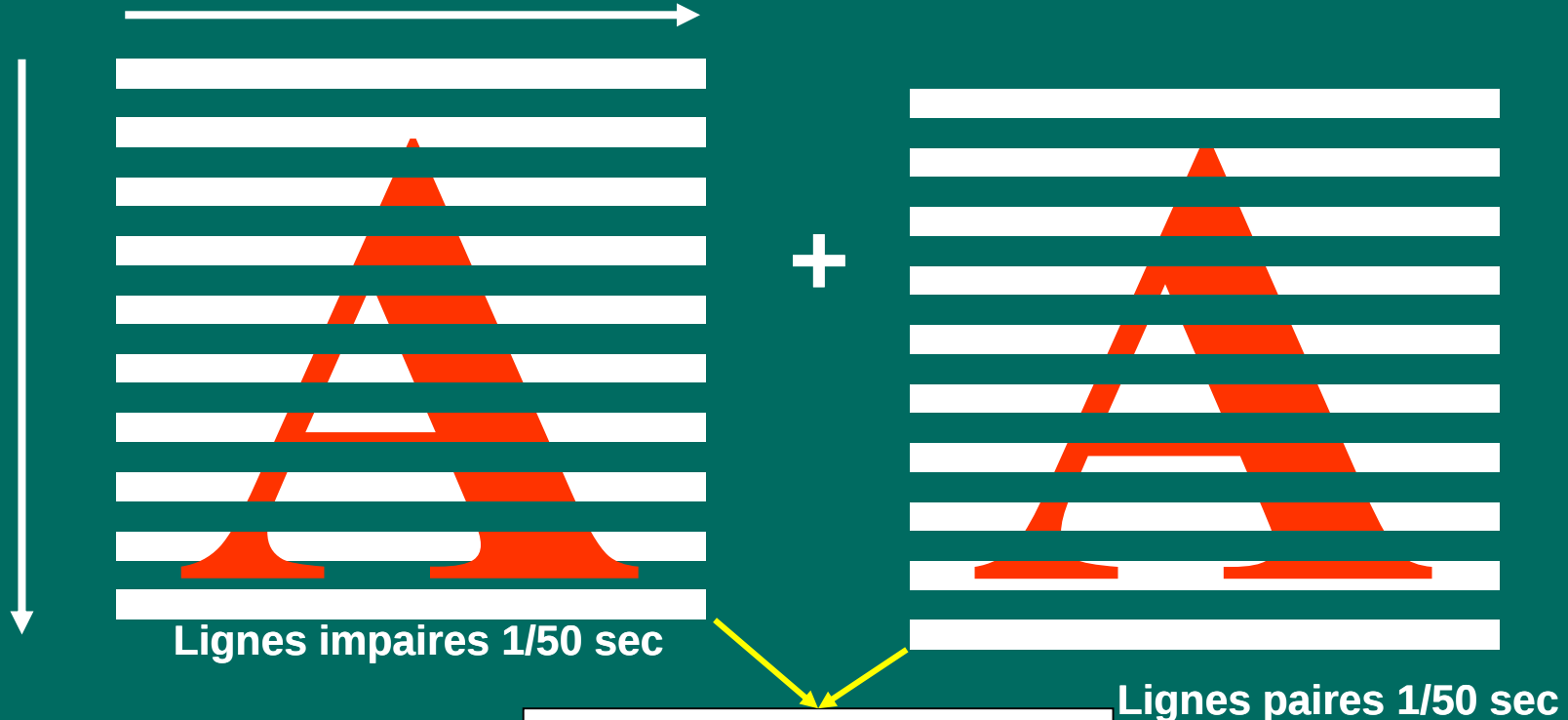
30% assurent la détection

CCD ou CMOS ?

	CCD	CMOS
vitesse	10-15 MHz	>15 MHz
uniformité	Excellente (même amplificateur pour tous les pixels)	Faible (nécessité de correction pour chaque amplificateur)
ROI	Oui mais demande d'isoler le reste du CCD	Très souple

L'image vidéo

Vidéo



Europe, Australie :
625 lignes, 25 images/s

USA, Japon :
525 lignes, 30 images/s

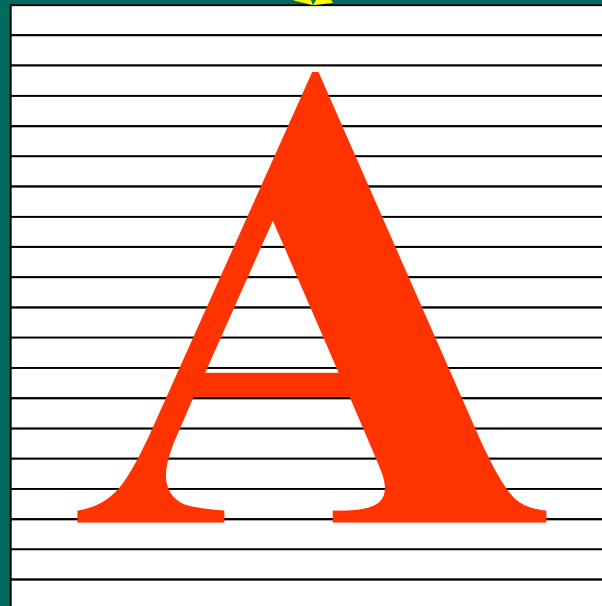
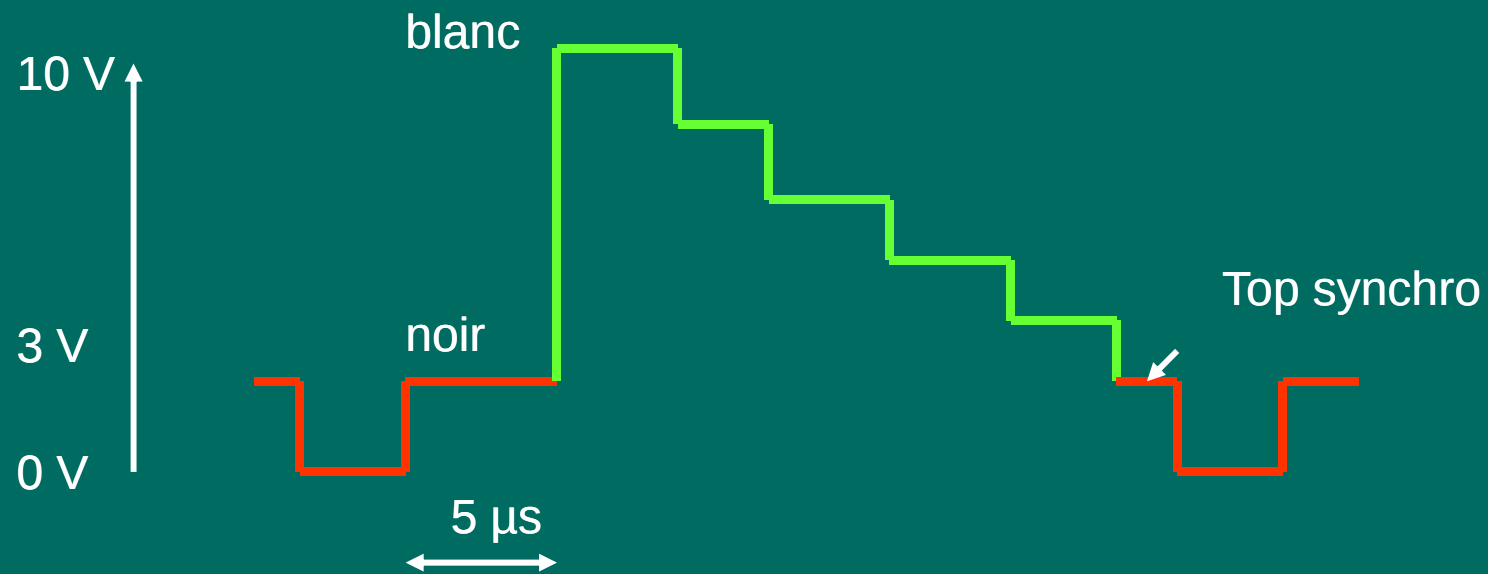
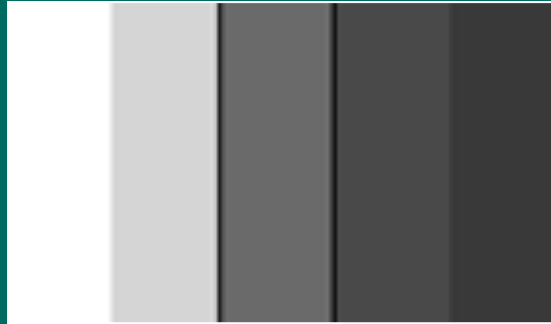
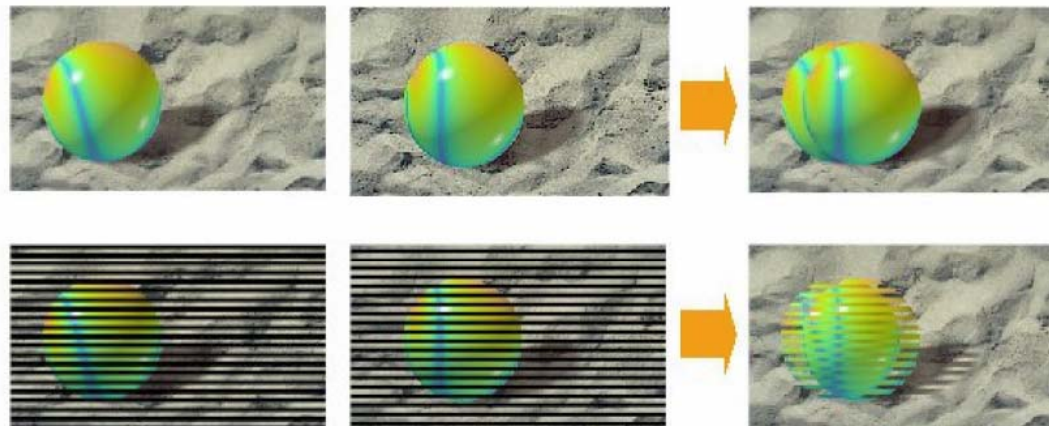


Image finale 1/25 sec

SIGNAL VIDEO



L'entrelacement
est gênant pour le
traitement
d'image si il y a
mouvement.



L'entrelacement est gênant pour le traitement s'il y a mouvement.

Le choix d 'une caméra CCD

- **Le plus de pixels possible**
- **Le bruit le plus réduit du marché**
- **La plus grande dynamique**

Ce qui conduit à :

le coût le plus élevé du marché...

- **Peut on optimiser en fonction des besoins ?**

Performances des CCD. Paramètres importants.

- Logiciel
- Résolution spatiale et temporelle
- Dynamique
- Efficacité quantique (*quantum efficiency*, QE)

Logiciels

Image J (freeware)

www.rsweb.nih.gov/ij/

ImageJ est un logiciel multi-plateforme et open source de traitement et d'analyse d'images développé par le National Institute of Health (NIH). Il est écrit en Java et permet l'ajout de nouvelles fonctionnalités via des plugins et macros.

Le développeur du projet, Wayne Rasband, fait partie du Research Services Branch du National Institute of Mental Health

Metamorph (50K €)

Résolution spatiale

Taille du pixel



Attention, souvent un point est représenté par plusieurs pixels !

Résolution du microscope/taille du pixel

Objectif (NA)	Résolution (μm)	Taille projetée (μm)	Taille du pixel nécessaire (μm)
4x (0.20)	1.4	5.6	2.8
10x (0.45)	0.61	6.1	3.0
20x (0.75)	0.37	7.4	3.7
40x (0.95)	0.29	11.6	5.8
60x (0.95)	0.29	17.4	8.7
100x (1.40)	0.20	20.0	10.0

Résolution temporelle /Vitesse de lecture

Les vitesses de lecture sont exprimées en Hz
(nombre d'opérations / sec)

Les vitesses des caméras vont de 0.1 à 15 Mhz

application :

Ex : CCD 1024 x 1024 pixels

1 048 576 pixels

à 10 MHz le temps de lecture sera d'environ 100 msec

la prise d'images en time lapse ne pourra excéder

10 images/sec

Il sera difficile de faire des mesures à la cadence vidéo !

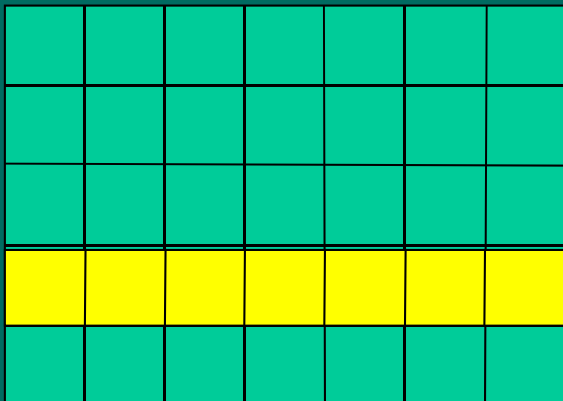
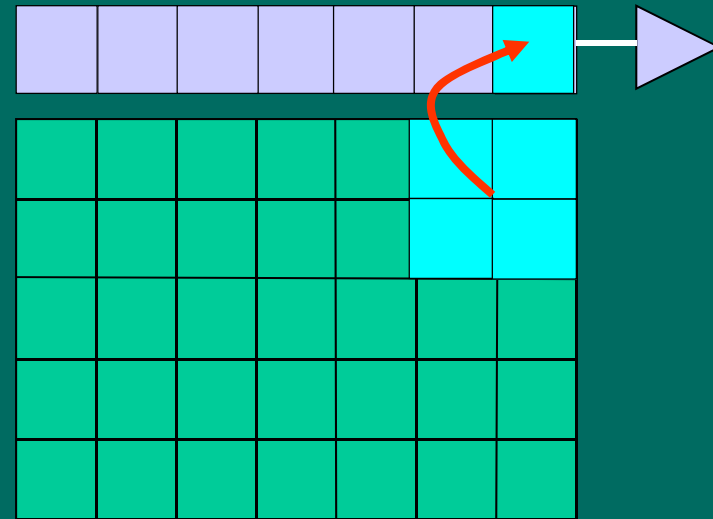
Amélioration de la vitesse de lecture

Binning

On regroupe les pixels $n \times n$

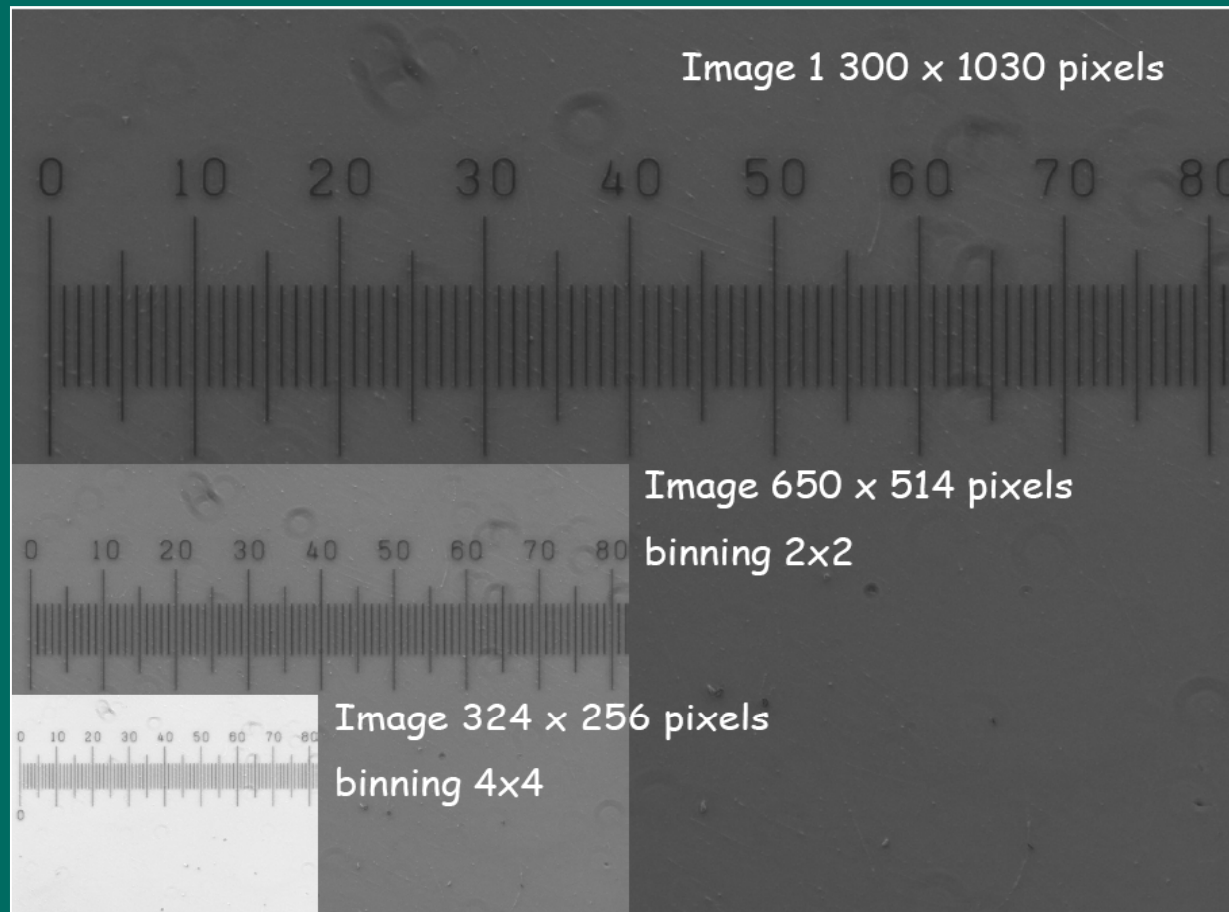
Conséquences :

- La vitesse de lecture est accrue
- La résolution est divisée par n
- mais le signal devient n^2
- Le bruit de lecture n'augmente pas
- Le rapport S/N s'améliore



Lecture d'une ROI

Le binning



Le binning ou regroupement de pixels diminue la taille de l'image et sa résolution mais augmente l'intensité



Le rapport Signal/bruit

Rapport signal/bruit (SNR)

- **Bruit du préamplificateur de lecture**
*dépend de la qualité de l'électronique.
Le bruit augmente avec la vitesse de lecture*
- **Courant de noir (dark current)**
*résulte de la polarisation de la jonction silicium/oxyde de silicium dans le CCD. Ce bruit est fonction de la température.
On peut refroidir le CCD entre -10 et -120°C
à température ambiante le bruit peut atteindre
1 e⁻/pixel/sec*
- **Bruit photonique** : *propriété fondamentale de la nature quantique de la lumière*

Le bruit photonique

Les photons sont des événements indépendants Ils arrivent avec une probabilité obéissant à la loi de Poisson :

si la moyenne du nombre d'évènements est N photons/pixel, la déviation standard sera $N^{1/2}$

Sur une région uniformément exposée avec par exemple 100 photons/pixel, nous aurons :
95, 110, 86, 98, 102, 101 photons ...

Dans ces conditions la détection de variations de lumière de $\pm 5\%$ est impossible !

Rapport signal/bruit (SNR)

Exemple :

Bruit du préamplificateur utilisé en fluorescence :

10 photons

signal de fluorescence : 100 photons.

$$\text{Bruit} = \sqrt{100} + 10$$

$$S/B = 100/20 = 5$$

En intégrant de façon à avoir un signal de 500 photons

$$\text{bruit} = \sqrt{500} + 10$$

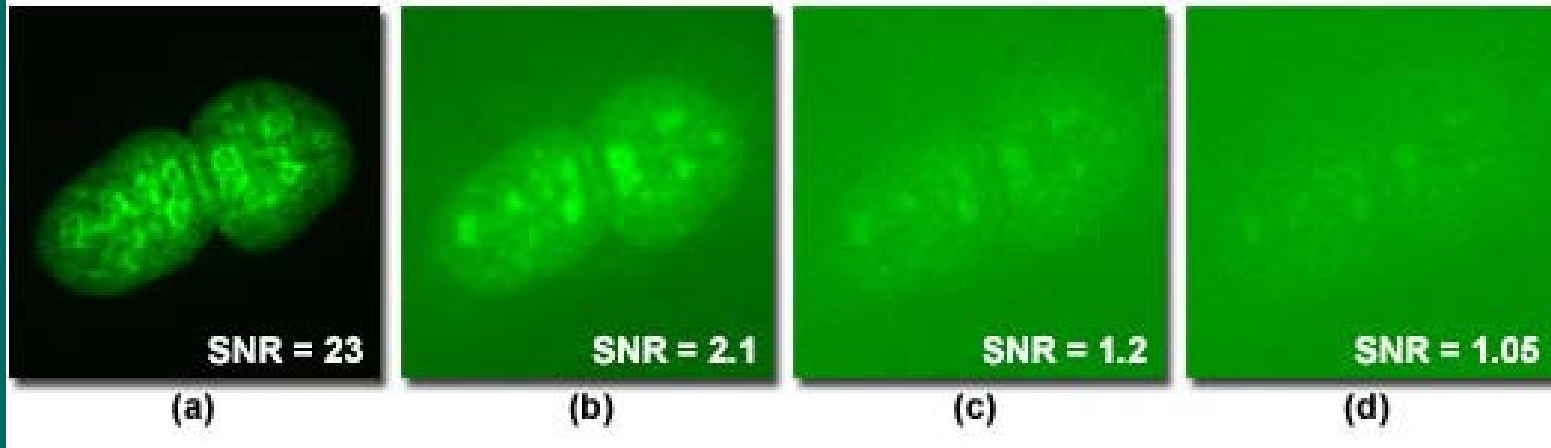
$$S/B = 500/(23+10) = 15$$

Inconvénient : photobleaching

SNR < 20 limite de l'acceptable, 40 bon, > 50 excellent

Rapport signal/bruit

Signal-to-Noise Ratios in Fluorescence Microscopy



- Remarque 1 : pour convertir le rapport signal sur bruit en décibels on utilise :
 - $(S/N)_{db} = 20 \log (S/N)$
- Remarque 2 : pour avoir le rapport en bits soit calculer le logarithme de base 2 de S/N soit diviser le rapport S/N en décibels par 6 (1 bit est équivalent à 6 db) :
 - $(S/N)_{bits} = (S/N)_{db} / 6$

Ne pas oublier

L'intensité de la lumière collectée décroît avec le carré du grossissement

L'intensité de la lumière augmente comme le carré de l'ouverture numérique

Dans la mesure du possible il faut utiliser des faibles grossissement ou des objectifs à forte ouverture numérique

Comment améliorer le rapport S/N ?

Améliorer le signal :

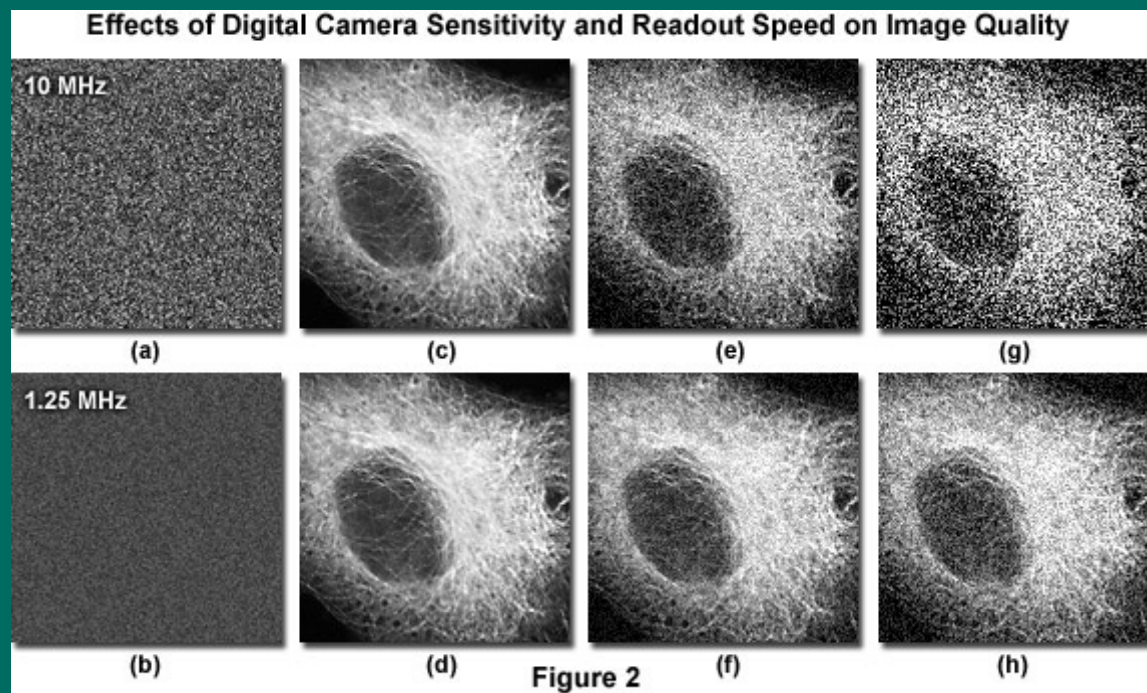
- Ouverture numérique (utiliser un meilleur objectif)
- Efficacité quantique
- Augmenter la surface du capteur
- Allonger le temps d'exposition (si c'est possible)

Réduire le bruit :

- Améliorer le bruit de lecture
- Refroidir si le courant de noir est important
- Ralentir la vitesse de lecture

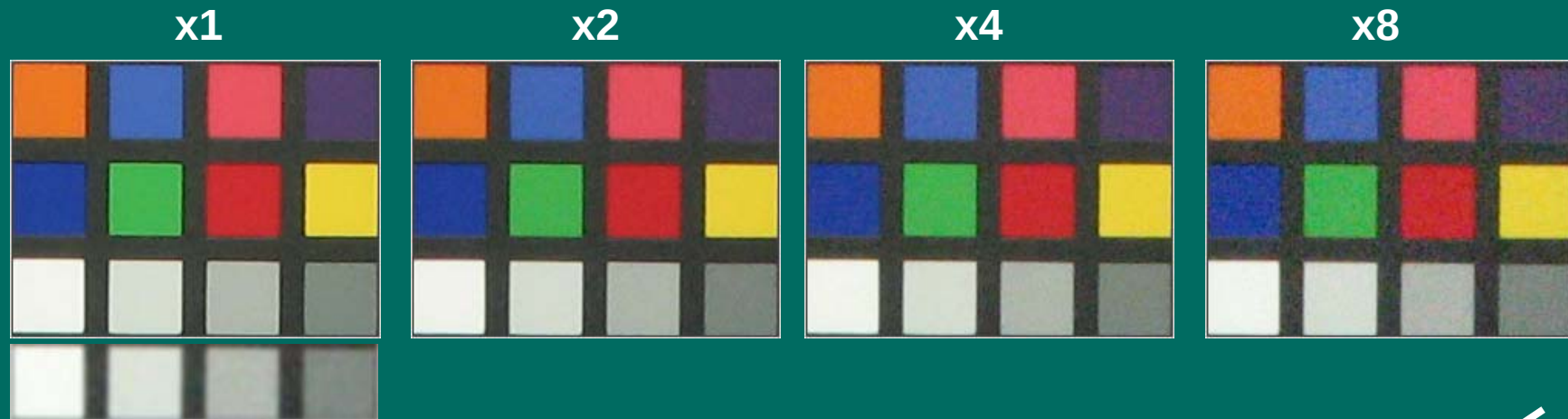
Si tous ces points ne sont pas possibles utiliser une EM-CCD

Bruit et vitesse de lecture



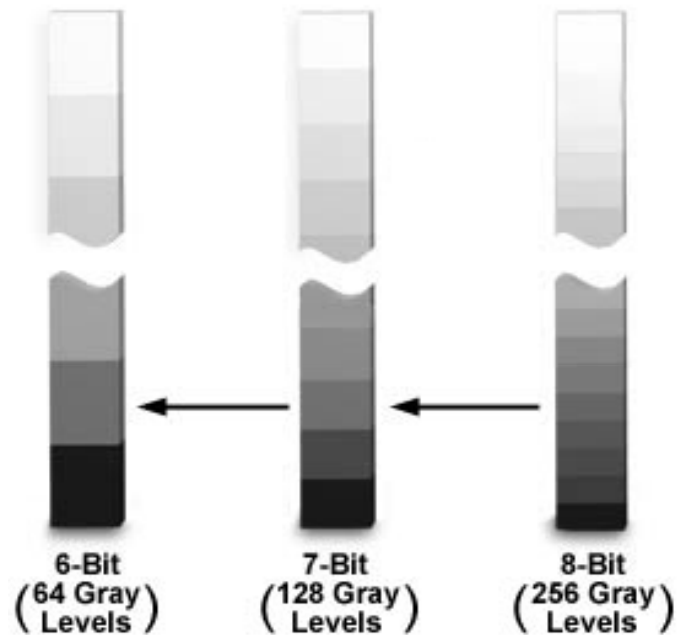
Le bruit dans les images

Il est toujours possible d'amplifier le signal :
Est-ce que l'information est meilleure ?



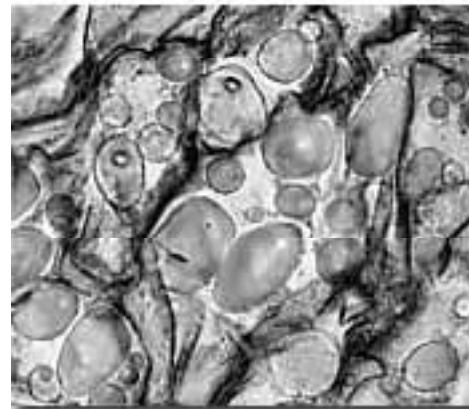
Application d'un filtre passe-bas pour atteindre le bruit obtenu avec le gain 1

Bit Depth in Binary Images

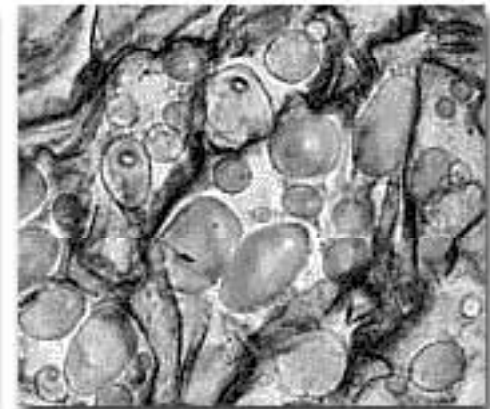


Dynamique

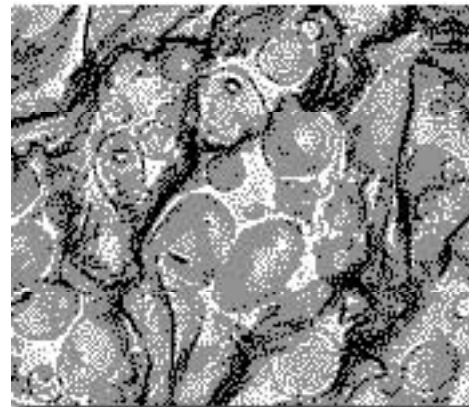
Grayscale Resolution and Image Appearance



6 bits



5 bits



4 bits



3 bits

Exemples de valeurs du pas de numérisation en fonction du nombre de bits utilisés pour la conversion analogique-numérique (pour un signal analogique maximum de 10 V en sortie)

Nombre de bits	Nombre d'octets	Nombre de valeurs possibles	Pas de numérisation (V)
1	-	2	5
8*	1	256	0,0390625
10*	-	1024	0,009765625
12*	-	4096	0,00244140625
16*	2	65536	0,000152587890625
24	3	16777216	-
32	4	4294967296	-
36	-	68719476736	-
48	6	281474976710656	-
64	8	18446744073709551616	-
128	16	3,4028236692093846346337460743177.10 ³⁸	-

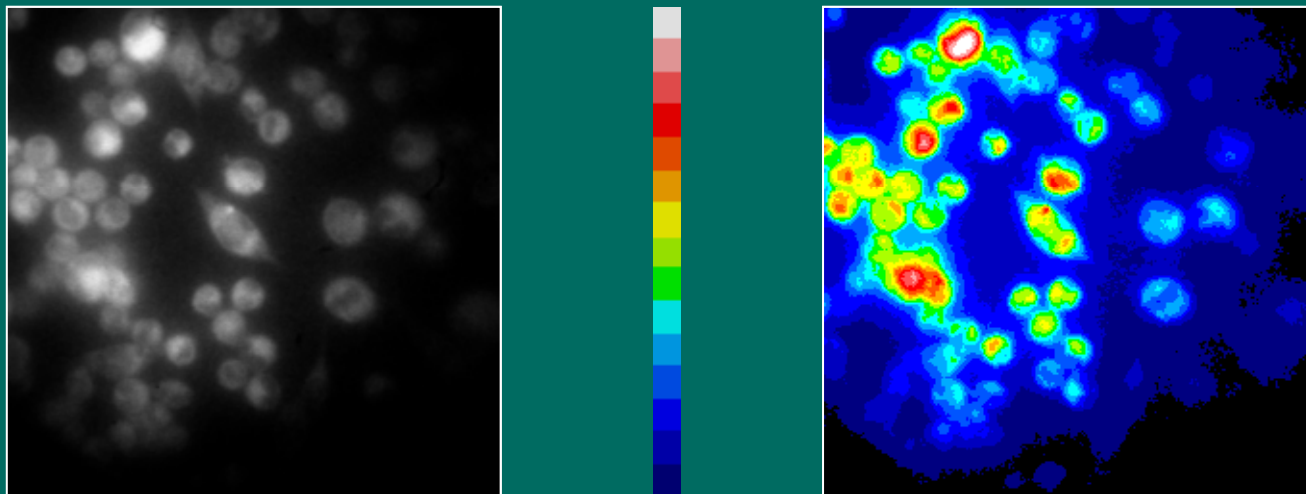
*Valeurs couramment rencontrées sur les caméras CCD

Pseudo-couleurs et LUT (look up table)

Un œil exercé distingue entre 20 et 25 niveaux de gris.

Les caméras classiques travaillent au moins sur 256 niveaux de gris.

Il est possible de coder des ensembles de gris dans une couleur précise.



Les pseudo-couleurs ne permettent pas les études morphologiques

DMX 1200 (Nikon)

Maximum Pixel Output	12 Million
CCD	Sony ICX085AK (Bayer Mosaic Filters)
Pixel Size (Shape)	6.7 Microns (Square)
CCD Chip Size	10.0 (H) x 8.7 (V) (Millimeters)
CCD Cooling	None
Fastest Shutter Speed	1/12000 Seconds
Slowest Shutter Speed	170 Seconds
Sensitivity Setting	3 Levels (Normal, High, Max)
Exposure Control	Manual
Signal/Noise	50 dB
Dynamic Range	8 Bits (48 dB)
Dark Current	4 Electrons/Pixel/Second
Read Noise	16 Electrons/Pixel
Well Depth	16,000 Electrons
Resolution	1800 TV Lines
Live Image Display Rate	12 Frames/Second
Pixel Size (Shape)	6.7 Microns (Square)
Maximum Image Size	3840 x 3072 Pixels
Image Storage Format	TIF, BMP, JPG

Conclusion

- Les systèmes d'imagerie numérique atteignent de très hautes performances

La plus grande limitation viendra toujours du bruit photonique ($N^{1/2}$)

- Pour améliorer les performances penser à la qualité de l'objectif
- Toujours sélectionner l'équipement en fonction des besoins.



Types de capteurs matriciels CCD

- Trois types de capteurs CCD sont définis en fonction du **mode de transfert** utilisé :
 - les capteurs **pleine trame** (Full frame)
 - ces capteurs sont dépourvus de zone mémoire et nécessitent l'utilisation d'un **obturateur mécanique** (shutter) qui coupe la lumière pendant la phase de lecture (il peut subsister un effet de « traînage » dans ce type de capteur)
 - Un des avantages de ce type de capteurs est qu'ils sont constitués de pixels continus ce qui leur confère la **meilleure résolution spatiale**.

Types de capteurs matriciels CCD

- les capteurs à **transfert de trame** (Frame transfert)
 - Composés d'une **zone image** et d'une **zone mémoire** de même taille
 - Ce type de construction permet de lire les données dans la zone mémoire simultanément à l'exposition de la zone image d'où une **fréquence de saisie plus importante** que pour les capteurs pleine trame (ne nécessite pas d'obturateur mécanique)

Types de capteurs matriciels CCD

- Les capteurs à **transfert interligne** (Interline transfert)
 - La **zone mémoire (ou masque)** est en forme de grille et le transfert de la zone image à la zone mémoire se fait simultanément et quasi instantanément pour chaque ligne (environ $1\mu\text{s}$)
 - **Fréquence de saisie très rapide** : fréquence vidéo (30 images/s) ou plus sur certains modèles
 - Les anciens capteurs CCD à transfert interligne étaient beaucoup moins performants que les autres types en ce qui concerne la résolution de l'image et le rendement quantique (15%). Les nouvelles générations de capteurs à transfert interligne (en particulier Sony) corrigent ce défaut par l'utilisation de micro-lentilles placées devant le capteur
 - ces micro-lentilles collectent la lumière qui est dirigée sur les régions masquées et la dirigent vers un élément photosensible; il y a autant de micro-lentilles que d'éléments photosensibles ce qui permet d'obtenir un rendement quantique de 30% en moyenne et même 55% à 510nm (pic d'émission de la GFP) sur certains modèles (Sony HAD ICX-601).

Caractéristiques des capteurs CCD

- **Dynamique du capteur (dynamic range)**

- Liée à la capacité en électrons des éléments photosensibles
- On s'arrange généralement pour adapter la dynamique du capteur à celle du convertisseur analogique numérique

- **Linéarité**

- Le nombre d'électrons émis doit être en relation linéaire avec le nombre de photons reçus (notion de gamma du capteur)

- **Rendement quantique**

- Nombre d'électrons libérés par rapport au nombre de photons reçus (toujours inférieur à 1)
- Le rendement quantique est dépendant de la longueur d'onde (notion de sensibilité ou réponse spectrale)
- Généralement le pic de la réponse spectrale se situe dans le domaine visible
- La majorité des capteurs CCD sont beaucoup plus sensibles dans le rouge et l'infrarouge que dans le bleu et l'ultra-violet
- Des revêtements spéciaux (filtres), déposés à la surface du capteur, permettent de modifier la sensibilité des capteurs CCD aux diverses longueurs d'ondes (filtre anti-infrarouge par exemple)
- Il convient de s'assurer que le capteur a un bon rendement quantique dans la longueur d'onde qui correspond au pic d'émission de ce qu'on désire étudier

Camera CCD Video

- La caméra converti l'image en une séquence de signaux électriques
- Différents standards sont utilisés
 - NTSC (USA et Japon)
 - CCIR (Europe; PAL et SECAM)
 - RS-170
- Ces caméras ne sont pas considérées comme étant des caméras bas niveau de lumière car elles ont un **faible rendement quantique** (10 à 20%)
- Leur dynamique est généralement de 8 bits (leur dynamique réelle étant plutôt proche de 6 bits de part leur bruit de lecture assez élevé)
- Le nombre de pixels de ces capteurs se situe approximativement vers 700 par 500
- La fréquence de saisie est fixée à 30 Hz
- Ces caméras ont l'avantage d'être connectables à tous les équipements vidéo standards. Il en existe des modèles spécialisés dédiés, par exemple, à la vidéomicroscopie et permettant de définir le temps d'intégration (de 100 µsecondes à plusieurs dizaines de secondes)
- Les capteurs CCD de ces caméras sont de type transfert de ligne.