

UNIVERSITÉ DE HAUTE-ALSACE



THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Traitement du Signal

Application des techniques de déconvolution multinoyaux et de tomographie diffractive optique à l'amélioration de l'imagerie microscopique 2D et 3D

Présentée pour obtenir le grade de
Docteur en Sciences de l'Université de Haute-Alsace
par

BERTRAND SIMON

le 14 décembre 2007

Jury :

Vincent Loriette,	Laboratoire Photon et Matière / ESPCI	(Rapporteur)
Philippe Réfrégier,	Ecole Centrale / Marseille	(Rapporteur)
Carmello Pirri,	Laboratoire LPSE / Université de Haute-Alsace	(Président)
Vincent Georges,	Laboratoire MIPS / Université de Haute-Alsace	(Encadrant)
Olivier Haeberlé,	Laboratoire MIPS / Université de Haute-Alsace	(Directeur)

Connaître, ce n'est point démonter, ni expliquer. C'est accéder à la vision. Mais, pour voir, il convient d'abord de participer. Cela est dur apprentissage.

ANTOINE DE SAINT-EXUPÉRY, Pilote de guerre

à Marjorie

Remerciements

Je tiens à remercier,

Pierre Ambs, directeur du Laboratoire MIPS de l'Université de Haute-Alsace, pour son accueil.

Olivier Haeberlé, mon directeur de thèse, pour son attention permanente à l'évolution de mes travaux, pour ses conseils et pour son soutien lors de la rédaction de ce manuscrit. Il a guidé mes premiers pas dans la communauté scientifique.

Serge Jacquey fondateur avec Guy Schultz de notre équipe, pour son accueil à mon arrivée au laboratoire lors de mon stage de DEA.

Vincent Georges, maître de conférence, pour son soutien et son enthousiasme, pour le temps qu'il a passé avec moi en salle d'optique ou devant le tableau et pour les enrichissantes discussions que nous avons pu avoir.

Matthieu Debailleul, Ingénieur d'étude puis ingénieur de recherche au laboratoire, pour son soutien, sa sympathie, son point de vue critique et ses conseils d'expérimentateur chevronné qui ont permis que ces travaux arrivent à leur terme.

Carmelo Pirri qui me fait l'honneur de présider ce jury ainsi que Philippe Réfrégier et Vincent Lorientte qui ont accepté de rapporter ces travaux malgré un emploi du temps chargé.

Alain Dieterlen, Bruno Colicchio, Christophe Cudel et Sophie Kolher, professeur et maîtres de conférences de l'équipe, qui ont été de véritables soutiens.

Il me faut également remercier Vincent Lauer avec qui notre équipe collabore sur les problématiques de microscopie tomographique et qui a prêté une attention certaine à mes travaux.

Je veux aussi remercier, Joël Lambert, technicien au laboratoire, qui a usiné de nombreuses pièces de notre montage expérimental ainsi que Lavina Balan, Rodolphe Jaffiol et Dominique Voisin qui ont fourni la plupart des échantillons présentés dans ces travaux.

Arnaud De Meyer, doctorant dans la même équipe, qui a démarré sa thèse en même temps que moi, et avec qui je n'ai pas seulement partagé un bureau, mais aussi les joies et les peines de la vie de doctorant. Je lui exprime tous mes vœux de réussite pour la suite de ses travaux. Je formule également ces vœux pour Elie Maalouf, doctorant au laboratoire depuis cette année.

Je voudrais aussi exprimer d'amicales pensée à Hervé Boeglen, également doctorant au laboratoire avec qui j'ai pu avoir de nombreuses discussions amicales, ainsi que Nicolas Huebert qui a soutenu sa thèse cette année avec qui nous avons certainement plus échangé sur nos centres d'intérêts communs que sur notre travail au laboratoire.

Merci aussi à Renaud Greget, avec qui j'ai travaillé pendant son stage de DEA et avec qui j'ai eu une collaboration amicale et fructueuse.

Je ne peux oublier mes collègues enseignants du département GEII de l'IUT de Mulhouse et plus particulièrement Jean Pierre Cayrou avec qui j'ai préparé mes premiers TP d'automatique et Jean Gaillard à qui j'ai succédé en TP d'outils mathématiques, mais aussi Dominique Haultcoeur, Hubert Jemelen, Bernard Keltz, Benoit Vignes avec qui nous partageons souvent une tasse de café.

Il m'est difficile de citer nommément tous les personnels de l'IUT ou du laboratoire qui ont pu me soutenir ou m'aider. J'espère qu'ils se reconnaîtront, je les remercie.

Je veux dédier ces travaux,

à ceux qui m'ont mis en chemin, Michèle et Jean-François,
à celui qui est là à toutes les étapes, Pierre-Henri,
à mes compagnons de route, Alexis, Igor, Julien et Mathieu

à celle que j'aime et qui illumine mon chemin, Marjorie.

BERTRAND SIMON

Résumé

Mots clés : microscopie de fluorescence, microscopie holographique, microscopie tomographique optique diffractive, synthèse d'ouverture, déconvolution, traitement d'image.

Le travail de cette thèse porte sur l'amélioration des techniques de microscopies optiques 2D et 3D.

Dans une première partie des travaux, j'ai proposé une technique d'illumination structurée focalisée et des traitements numériques spécifiques permettant un gain de la résolution latérale d'un facteur deux en microscopie confocale de fluorescence.

La deuxième partie des travaux a consisté à réaliser un montage expérimental de microscopie tomographique optique diffractive qui permet, après une étape de reconstruction numérique, l'imagerie de spécimen transparents en trois dimensions. La caractérisation du montage expérimental a montré que cette technique permettait d'obtenir une information jusqu'alors inaccessible : la cartographie des indices optiques au sein du spécimen observé. En outre un gain en résolution vis à vis des techniques de microscopie plus classiques a été obtenu.

Abstract

Keywords : fluorescence microscopy, holographic microscopy, diffractive optical tomographic microscopy, synthetic aperture, deconvolution, image processing.

This work concerns the improvement of 2D and 3D optical microscopy techniques.

In a first part, I propose a focused structured illumination technique with specific numerical processing allowing an improvement of a factor two of the lateral resolution in confocal fluorescence microscopy.

The second part of work consisted in carrying an experimental diffractive optical tomographic microscopy set-up. This one allows, after a stage of numerical processing of the images, to image 3D transparent specimens. The characterization of the experimental set-up showed that this technique allowed to obtain information not accessible before : the cartography of the optical indices within the specimen observed. Moreover an improvement of the resolution with respect to the more traditional techniques of microscopy was obtained.

Table des matières

I Propositions pour l'amélioration de la résolution en microscopie de fluorescence	3
1 Amélioration de la résolution en microscopie de fluorescence : méthodes optiques	4
1.1 Principes généraux de la microscopie de fluorescence	4
1.1.1 Principe de la fluorescence	4
1.1.2 Microscope de fluorescence classique	6
1.1.3 Microscope de fluorescence confocal	7
1.2 Acquisition 3D	9
1.3 Ouverture numérique et limites de résolution	10
1.4 Objectifs à forte ouverture numérique	14
1.5 Techniques existantes utilisant une illumination structurée	17
1.5.1 Illumination par interférence longitudinale de faisceaux en champs large	17
1.5.2 Illumination par interférence longitudinale de faisceaux focalisés	17
1.5.3 Illumination par interférences latérale de faisceaux en champs large	18
1.6 Technique proposée : illumination par interférence latérale de faisceaux focalisés	19
1.6.1 Apodisation de l'objectif	19
1.6.2 Faisceaux décalés	24
2 Amélioration de la résolution : méthodes numériques	30
2.1 Introduction	30
2.2 Configuration considérée	30
2.3 Techniques par fusion de données	33
2.3.1 Moyennage des données	33
2.3.2 Fusion dans l'espace de Fourier : FIF	38
2.4 Techniques de déconvolution	44
2.4.1 Rappels sur la déconvolution	44

**II Étude et mise en œuvre d'un microscope tomographique
optique diffractif 60**

3 Tomographie diffractive optique : rappels théoriques 61

3.1 Enregistrement de l'onde diffusée 64

3.2 Reconstruction de l'objet 67

3.2.1 Equation de Helmholtz et première Approximation de Born . 67

3.2.2 Reconstruction dans le domaine de Fourier 69

3.2.3 \mathbf{k} -vecteurs et fréquences spatiales 72

3.3 Techniques de tomographie en transmission 73

3.3.1 Rotation de l'objet sur lui même 74

3.3.2 Rotation de l'ensemble illumination/détecteur 75

3.3.3 Variation de la longueur d'onde d'illumination 75

3.3.4 Balayage angulaire de l'illumination 75

3.3.5 Effet des contraintes angulaires, ouverture numérique 77

4 Construction d'un microscope tomographique optique diffractif 82

4.1 Microscope Holographique 84

4.1.1 Montage sur le bâti IX71 85

4.1.2 Holographie à décalage de phase : calibration expérimentale 89

4.1.3 Holographie numérique : CCD et condition d'échantillonnage 90

4.1.4 Reconstruction 93

4.2 Microscope tomographique 95

4.2.1 Balayage angulaire de l'illumination 95

4.2.2 Reconstruction des données 100

4.3 Résultats expérimentaux 101

4.3.1 Comparaison du microscope holographique avec la MTOD . 101

4.3.2 Étude expérimentale de la résolution 103

4.3.3 Observation expérimentale de l'indice complexe 105

4.3.4 Couplage avec la microscopie confocale 109

4.4 Perspectives d'évolution 110

Introduction

La vue est un sens essentiel dans la perception du monde qui nous entoure. C'est pourquoi la compréhension du déroulement d'un phénomène nécessite souvent d'en avoir une approche visuelle. Ainsi, Galilé avait-il sa lunette et Pasteur, son microscope.

Le microscope optique, en offrant des possibilités d'observation à l'échelle du micromètre, a suscité et suscite encore un vif intérêt. En effet, il possède un grand nombre de champs d'application aussi variés que la biologie, la physique des matériaux ou l'industrie de la micro-électronique. La microscopie s'est diversifiée avec le nombre croissant des domaines où elle a fait son entrée et donc avec la variété croissante des objets à observer. Ainsi le microscope en transmission qui est la configuration la plus classique, a évolué vers le microscope en réflexion, le microscope à lumière polarisée ou le microscope à contraste de phase.

La biologie est un domaine où cet instrument est particulièrement utilisé. A cela il y a plusieurs raisons. Tout d'abord, la cellule, élément de base constitutif de toute forme de vie, présente des dimensions qui correspondent à l'échelle d'observation qu'offre le microscope. De plus, dans ce domaine en particulier, la compréhension des fonctions du vivant passe par l'observation de ses structures caractéristiques. Enfin l'avènement de la microscopie de fluorescence qui permet le marquage de structures ou de fonctions spécifiques a représenté une évolution marquante dans l'étude du vivant. Grâce à cette technique, les zones ou les fonctions marquées, donc fluorescentes, peuvent être étudiées isolément. Un grand nombre de sondes et de marqueurs ont donc été développés pour permettre l'étude de fonctions cellulaires telles que le métabolisme, la protéomique ou la biologie moléculaire.

Ces possibilités d'imagerie se sont vues étendues avec l'apparition de la microscopie de fluorescence tridimensionnelle. Le principe consiste à faire l'acquisition d'une série d'images du spécimen à des profondeurs différentes par section optique. L'image tridimensionnelle est alors reconstruite au moyen d'un ordinateur.

On notera cependant que ce type de microscopie voit ses possibilités limitées en raison de la difficulté à séparer les plans le long de l'axe longitudinal. Ceci est

dû au processus de formation d'image.

De façon générale, la limite essentielle du microscope optique tient à son pouvoir séparateur limité. Il existe deux voies pour remédier à ce problème. La première consiste à modifier le microscope. Autrement dit, à modifier le processus de formation d'image pour améliorer le pouvoir séparateur. Une grande innovation dans ce domaine est certainement l'invention du microscope confocal par Marvin Minski en 1957. Depuis, de nouvelles techniques ont vu le jour et des progrès ne cessent d'être réalisés.

Une autre voie consiste à traiter les images numériquement en inversant le processus de formation d'image au moyen d'algorithmes de déconvolution.

Le Laboratoire MIPS de l'Université de Haute-Alsace travaille sur la modélisation et la caractérisation instrumentale ainsi que sur les méthodes de déconvolution en microscopie de fluorescence depuis près de quinze ans.

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans cette thématique du laboratoire en suivant deux approches. Le plan adopté se décomposera donc en deux grandes parties.

La première partie concerne l'amélioration de la résolution en microscopie de fluorescence à travers des propositions de montages théoriques permettant d'améliorer la résolution latérale. Ces propositions ont pu être simulées et évaluées au moyen des modèles développés au laboratoire. La mise en œuvre de méthodes numériques adaptées aux montages présentés prolonge les travaux réalisés dans cette équipe sur la déconvolution.

Dans la deuxième partie, nous partons du constat que la non-homogénéité du spécimen est négligée dans le processus de formation d'image ou dans les méthodes de déconvolution. Or l'utilisation, sur les mêmes spécimens, de techniques de microscopie telle que le contraste de phase montre que ceux-ci sont inhomogènes. C'est pourquoi, Bruno Colicchio, au cours de sa thèse présentée dans le laboratoire, a étudié une méthode de déconvolution susceptible de prendre en compte la non-homogénéité du spécimen. Pour fonctionner, cette méthode nécessite d'avoir accès aux propriétés optiques du spécimen. C'est pourquoi le laboratoire a décidé de réaliser un montage de microscopie tomographique optique diffractive qui permet de mesurer la distribution d'indices du spécimen. La deuxième partie de ce manuscrit rappelle donc les bases théoriques de ce type de microscopie et décrit la mise en œuvre du montage expérimental réalisé au cours de cette thèse. Les résultats expérimentaux obtenus sur ce montage sont également présentés.

Première partie

Propositions pour l'amélioration de la résolution en microscopie de fluorescence

Chapitre 1

Amélioration de la résolution en microscopie de fluorescence : méthodes optiques

1.1 Principes généraux de la microscopie de fluorescence

Le microscope de fluorescence est un cas à part dans la mesure où la détection se fait à une longueur d'onde différente de celle de l'éclairage. Ceci est dû au phénomène de fluorescence. Il est alors possible de distinguer certaines zones, marquées par une sonde présentant le phénomène de fluorescence, du reste du spécimen.

1.1.1 Principe de la fluorescence

La fluorescence appartient à la famille de phénomènes appelée photoluminescence. La photoluminescence consiste en l'excitation et le passage à un niveau d'énergie plus élevée des électrons de la couche de valence d'une molécule, par une source d'énergie lumineuse. Ce passage est suivi par un retour des électrons à un état d'énergie bas, se traduisant par l'émission de lumière. Selon que ce retour aux bas niveaux passe ou non par un état triplet, le délai de retour sera plus ou moins long. On parlera de fluorescence pour un délai de l'ordre de la nanoseconde (pas de passage par l'état triplet) ou de phosphorescence pour les délais de l'ordre de la microseconde (passage par un état triplet).

La transition de retour des électrons à l'état de repos provoque un dégagement d'énergie sous deux formes : une transition radiative (émission de lumière) et une

ou des transitions non radiatives (émission de chaleur). Il en résulte que le total d'énergie lumineuse restituée est inférieur à l'énergie nécessaire à l'excitation. L'énergie d'une onde lumineuse est donnée par :

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (1.1)$$

où $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$ est la constante de Planck, $c = 2,99 \cdot 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ la célérité de la lumière dans le vide et λ la longueur d'onde dans le vide. La perte d'énergie dans la transition radiative se traduira par une augmentation de la longueur d'onde ré-émise par la molécule fluorescente. On parle alors de décalage de Stokes.

Décalage de Stokes et détection de la fluorescence

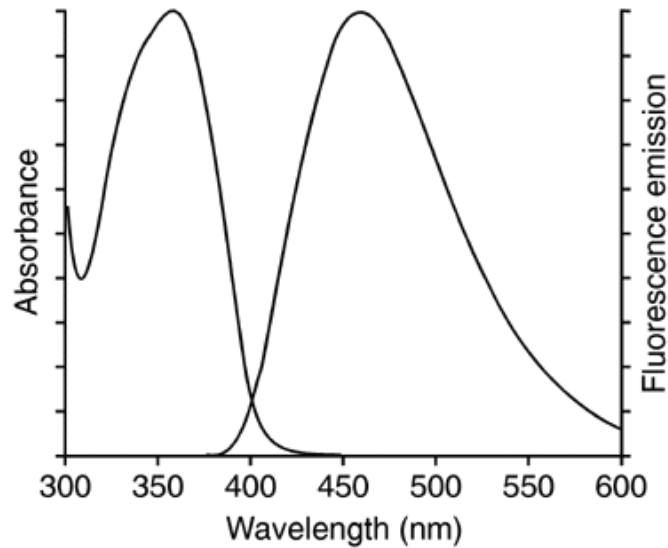


FIG. 1.1 – Spectres d'absorption et d'émission de la molécule DAPI. Ce fluorochrome est utilisé pour marquer les structures nucléaires dans la cellule et possède un maximum d'excitation dans l'*U.V.* et un maximum d'émission situé, dans le bleu, à une longueur d'onde de 461 nm (source : Molecular Probes©).

Du fait du décalage de Stokes, les spectres d'excitation et d'émission d'un fluorochrome se trouveront décalés vers les grandes longueurs d'onde comme on peut le constater sur la Figure 1.1 qui montre les spectres d'absorption et d'émission d'un fluorophore particulier, le DAPI. Ceci permet, à la détection, de séparer les

ondes d'illumination et d'émission au moyen d'un simple filtre monochromatique ou d'un miroir dichroïque. De même, les spectres d'émission étant caractéristiques pour chaque fluorochrome, il est également possible de séparer les diverses sources de fluorescence au moyen d'un jeu de filtres permettant des techniques comme la colocalisation. Ceci est une propriété très importante de la fluorescence, dans la mesure où chaque fluorochrome se fixe préférentiellement sur un plusieurs types de structures biologiques particulières. Le phénomène de fluorescence est donc un outil de choix pour les biologistes, dans la mesure où l'étude des organismes vivants est très souvent basée sur une association structure/fonction qui peut donc être étudiée au moyen de fluorochromes spécifiques.

Perte de fluorescence : photoblanchiment

On appellera *quenching* l'ensemble des phénomènes physico-chimiques impliquant la molécule fluorescente et qui se traduisent par une perte de fluorescence. Par exemple, il peut arriver, sous des conditions particulières, qu'il y ait un phénomène de résonance se traduisant par des échanges d'énergie entre le fluorochrome et une autre molécule. Le fluorochrome à l'état excité voit son surplus d'énergie transféré vers une autre molécule voisine pouvant alors à son tour émettre de la lumière (phénomène utilisé dans l'imagerie FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) ou dissiper l'énergie de façon non radiative. Dans tous les cas, ces phénomènes, voulus ou non, implique une diminution réversible de la fluorescence émise par le fluorochrome.

D'autre part, le changement de niveau d'énergie des électrons de la couche de valence du fluorochrome peut influencer sur sa réactivité vis à vis des molécules qui l'entourent. Certaines réactions chimiques avec un autre agent, comme par exemple l'oxygène, peuvent se produire. Dans ce cas, il y a une diminution non réversible du signal de fluorescence, on parle alors de photoblanchiment, ou *photobleaching*. Ce phénomène est bien entendu fortement dépendant de l'environnement thermo-chimique du fluorochrome à travers des paramètres comme le *pH*, la température ou les concentrations ioniques.

1.1.2 Microscope de fluorescence classique

Un microscope à fluorescence est donc un microscope photonique équipé de deux lampes, une lampe ordinaire qui fournit une lumière blanche incohérente pour une observation classique par transmission et une lampe à arc, couplée avec un filtre, fournissant une lumière adaptée à l'excitation de la fluorescence. Un point très important est qu'il faut pouvoir séparer le rayonnement d'excitation du rayonnement de fluorescence. On équipe donc le microscope d'un filtre dichroïque, qui rejette

le rayonnement à la longueur d'onde d'excitation éventuellement renvoyée vers le capteur tout en laissant passer le rayonnement de fluorescence.

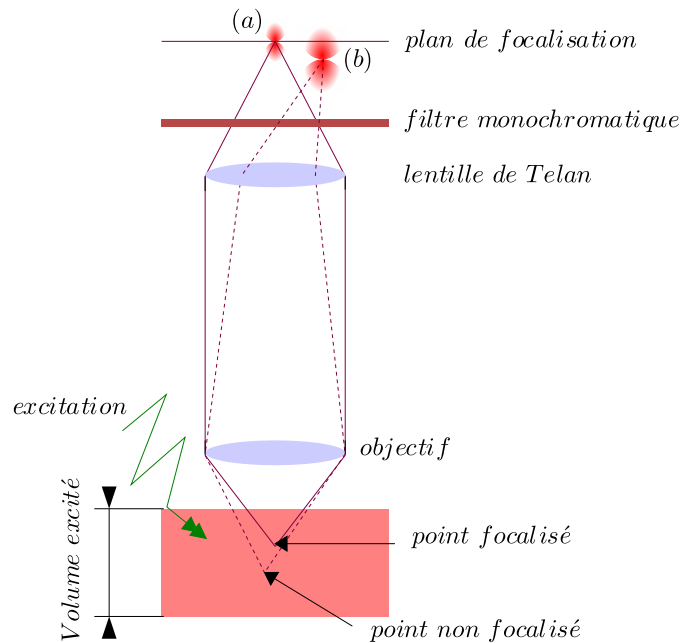


FIG. 1.2 – Focalisation dans un microscope de fluorescence classique

L'image du spécimen est formée de manière globale à travers l'objectif pour être observée directement à l'œil ou enregistrée par une caméra. La Figure 1.2 indique les chemins optiques pour la détection d'un point dans le plan focal et d'un point hors plan focal. A cause des limitations du système optique (fonction de transfert), l'image d'un point n'est pas un point, mais une tache d'Airy (a), qui définira la résolution du microscope. Notons aussi que dans un microscope conventionnel, l'image d'un point en dehors du plan de focalisation est aussi présente dans le plan de détection (plan image), bien que floue (b). De ce fait, l'image d'un plan, si elle contient bien l'information du plan observé, est aussi dégradée par les informations en provenance des autres plans.

1.1.3 Microscope de fluorescence confocal

Pour palier aux défauts du microscope conventionnel, on peut utiliser un montage confocal [Minsky, 1988]. Un faisceau laser est focalisé et balaye le plan d'observation. L'excitation n'est plus globale, mais assimilable à un point. La détection

se fait au travers d'un « pinhole » en position confocale par rapport au spot d'excitation, c'est à dire que le système de détection ne voit que la zone de focalisation du faisceau d'excitation.

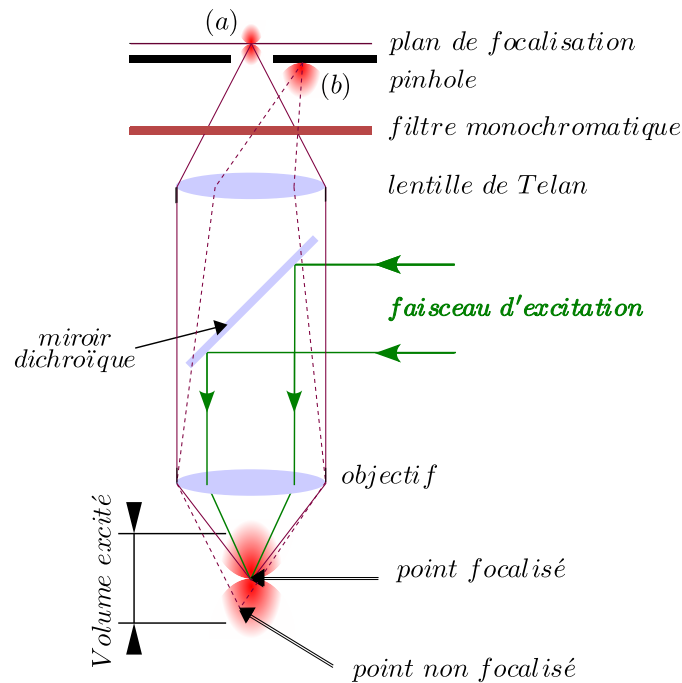


FIG. 1.3 – Focalisation dans un microscope confocal

Ce montage, décrit dans la Figure 1.3, permet de rejeter une très grande partie de la lumière (b) qui proviendrait des plans autres que le plan de focalisation : la résolution du microscope confocal est donc meilleure que celle du microscope conventionnel. Le signal est détecté à l'aide d'un photomultiplicateur, et l'image est donc formée point par point par balayage de l'objet. Si l'image est bien meilleure en termes de résolution, on peut cependant noter trois défauts inhérents à ce système :

- L'acquisition est souvent plus lente, à cause de la nécessité de balayer le spécimen pour former une image.
- Le rapport signal sur bruit est généralement plus faible que pour un microscope classique.
- L'illumination par un faisceau laser focalisé engendre des intensités locales très grandes qui peuvent induire un photo-blanchiment, voire endommager le spécimen.

Une variante du microscope confocal est le microscope biphoton qui utilise une excitation non-linéaire du fluorophore pour réaliser le confinement de l'excitation,

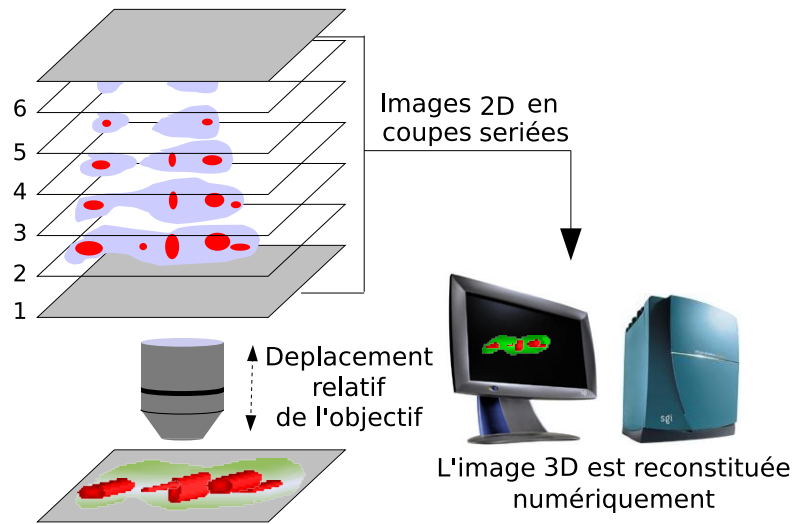


FIG. 1.4 – Principe général de l'acquisition 3D par coupes optiques séries.

la détection pouvant ˆtre confocale ou non.

1.2 Acquisition 3D

Par construction, le microscope (conventionnel, confocal ou bi-photon) ne permet de visualiser des spécimens que sur les deux dimensions du plan focal. Cependant, par déplacement de ce dernier à travers le spécimen, on acquiert une pile d'images 2D à partir desquelles il est possible de reconstituer une image en trois dimensions. Cette technique dite des coupes séries (*optical sectioning*) se base sur un balayage axial de l'objet observé. On peut effectuer ce balayage soit en déplaçant le spécimen via une platine motoris e, soit en déplaçant l'objectif, généralement à l'aide d'un élément piézo-électrique.

La Figure 1.4 décrit le principe de mesure par coupes séries. Le montage est constitué d'un microscope de fluorescence équipé d'un mécanisme de déplacement sur l'axe optique et d'un capteur permettant de former une image. L'ensemble du pilotage et de l'acquisition se fait à partir de la station informatique qui accompagne cet équipement. Ensuite, à l'aide d'outils de reconstruction informatique, il est possible de traiter et de visualiser les images en 3D.

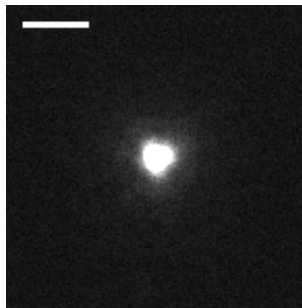
1.3 Ouverture numérique et limites de résolution

Le pouvoir de résolution d'un système optique traduit sa capacité à distinguer des détails fins. Il peut se définir comme la distance minimale entre deux éléments de l'objet observé telle qu'il existe deux éléments distincts correspondants dans l'image obtenue par ce système.

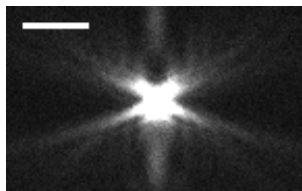
Un fluorophore excité peut être considérée comme une source ponctuelle émettant une onde lumineuse sphérique. Dans un microscope, la lumière est collectée par un objectif qui se caractérise par son ouverture numérique NA qui se définit par :

$$NA = n \cdot \sin u, \quad (1.2)$$

où n représente l'indice de réfraction du milieu d'immersion et u le demi angle d'ouverture de l'objectif. A cause de cette limitation angulaire seules les composantes dont l'angle avec l'axe optique de l'objectif sont inférieur à u participeront au processus de formation d'image. Il en résulte que l'image d'une source ponctuelle n'est pas un point mais une tâche d'Airy.



(a) plan $x - y$



(b) plan $x - z$

FIG. 1.5 – RIO 3D mesurée, plan $x - y$ et $x - z$. La mesure a été réalisée sur une bille de latex de $0,1 \mu m$ de diamètre, avec un objectif d'ouverture numérique $NA = 1.4$ immergé dans une huile d'indice $n_h = 1.52$ et une illumination de longueur d'onde $485 nm$ et une détection à $515 nm$. Le plan $x - y$ est présenté en (a) et le plan $x - z$ en (b). La barre d'échelle représente $2 \mu m$ dans le plan transversal, l'échelle en z est doublée dans un soucis de lisibilité.

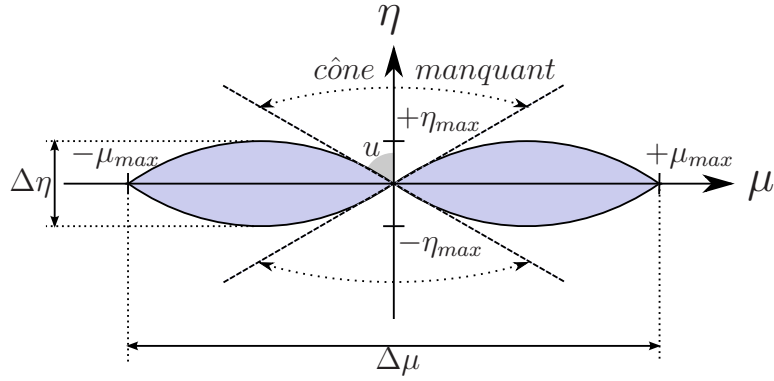


FIG. 1.6 – Fonction de transfert optique d’un microscope conventionnel : la fonction de transfert est présentée selon les axes μ (fréquences latérales) et η (fréquences longitudinales) sachant qu’elle présente une symétrie circulaire le long de l’axe η . Seules les fréquences spatiales comprises dans la bande passante $(\Delta\mu, \Delta\eta)$ sont transmises. Un double cône d’ouverture $2u$ (ouverture angulaire de l’objectif) empêche la transmission des fréquences longitudinales.

Par définition, cette tache d’Airy constitue la réponse impulsionnelle ou RIO¹ du système. Cette RIO sert à caractériser le microscope. Elle peut être calculée à l’aide de modèles se basant sur la théorie de la diffraction. Selon que l’on prenne en compte ou non les effets de polarisation, ces modèles seront scalaires ou vectoriels. La RIO peut également être mesurée en imageant des billes fluorescentes dont les dimensions sont sub-résolution.

La Figure 1.5 montre les coupes longitudinales et transversale d’une RIO mesurée. Le plan $x - y$ montre bien une tache et non un point tandis que le plan $x - z$ montre une conformation en forme de double cône. On peut constater que les intensités sont beaucoup plus étalées dans ce plan que dans le plan $x - y$.

L’optique de Fourier nous montre que dans un tel système imageant, il existe un lien entre le spectre angulaire collecté et les fréquences spatiales propres à l’objet. Par conséquent, du point de vue de l’automatisme, seules les basses fréquences spatiales seront collectées, et le microscope se comporte alors comme un filtre passe-bas dont la fonction de transfert optique est caractérisée par l’ouverture numérique de l’objectif. Par définition, cette fonction de transfert est la transformée de Fourier de la RIO. La Figure 1.6 donne une représentation du support de la fonction de transfert (ou FTO²) d’un microscope classique par rapport aux axes des fréquences latérales μ et longitudinales η , sachant que le support est circulaire symétrique autour de l’axe η . La bande passante $(\Delta\mu, \Delta\eta)$ montre bien qu’il s’agit d’un filtre passe bas. D’autre part, un double cône dont l’ouverture dépend de l’ouverture

¹RIO= Réponse Impulsionnelle Optique

²FTO= Fonction de Transfert Optique

numérique de l'objectif empêche la transmission des fréquences longitudinales.

Une conséquence importante de la bande passante limitée du système est que l'image d'un objet, considéré comme une collection d'impulsions, est le résultat de la convolution de cet objet par la RIO du microscope. Cette opération s'écrit selon l'équation :

$$I(x, y, z) = \int_{-\infty}^{+\infty} H(x - x_1, y - y_1, z - z_1)O(x_1, y_1, z_1)dx_1dy_1dz_1 \quad (1.3)$$

Où $H(x, y, z)$ représente la RIO du système d'acquisition et $O(x, y, z)$ l'objet original.

Dans le domaine des fréquences, l'opération de convolution se ramène à une multiplication et l'équation 1.3 s'écrit :

$$\widehat{I}(\omega_x, \omega_y, \omega_z) = \widehat{H}(\omega_x, \omega_y, \omega_z)\widehat{O}(\omega_x, \omega_y, \omega_z) \quad (1.4)$$

La résolution du système dépend donc de l'étalement de la RIO qui donne la plus petite distance résolue entre deux points dans l'image. Afin d'évaluer la résolution latérale, Ernst Abbe a proposé un critère, R_{Abbe} , qui correspond à la largeur à mi-hauteur de la RIO et qui se calcule à partir de la longueur d'onde d'observation, λ , et de l'ouverture numérique de l'objectif NA [Abbe, 1873], selon l'équation :

$$R_{Abbe} = \frac{\lambda}{2NA} \quad (1.5)$$

Ce critère, valable pour les microscopes classiques a été dépassé depuis l'invention du microscope confocal.

Dans ce type de microscopie, le support de fréquence est élargi par une opération de convolution entre la fonction de transfert de l'illumination et la fonction de transfert de la détection. La Figure 1.7 montre les plans longitudinaux et transversaux des RIO et des FTO correspondantes pour un microscope conventionnel et un microscope confocal. La comparaison des Figures 1.7(f) et (h) montre bien l'élargissement du support de fréquences longitudinales dans le cas de la microscopie confocale. En terme de résolution, la RIO confocale peut être estimée comme une élévation au carré de la RIO du microscope conventionnel. Ceci est visible sur les Figures 1.7. Il est alors observé une amélioration de la résolution de l'ordre de

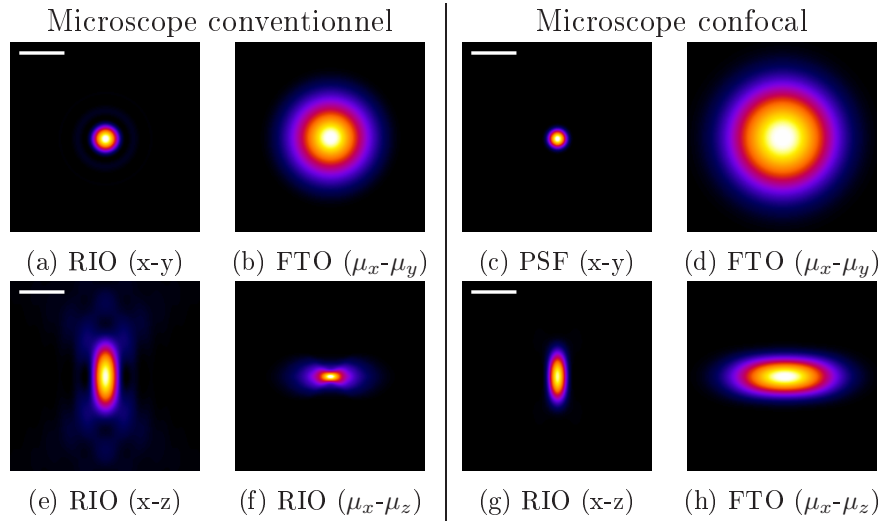


FIG. 1.7 – RIO et FTO conventionnelles et confocales calculées et présentées dans leur plans longitudinaux et transversaux. Paramètres de calcul *XCOSM*³ : $NA = 1,2$, $\lambda = 530 \text{ nm}$, taille du pixel $t_p = 0,015 \text{ }\mu\text{m}$ pour les RIO soit une longueur de $0,5 \text{ }\mu\text{m}$ pour la barre d'échelle. La taille des FTO a été multipliée par 4 pour favoriser la lisibilité.

25% en latéral et de 50% en longitudinal. Les RIO ont été calculées au moyen du logiciel *XCOSM*³, basé sur le modèle scalaire de [Gibson et Lanni, 1991].

L'équation 1.5 montre que la résolution est liée à deux paramètres du système : la longueur d'onde et l'ouverture numérique de l'objectif. En microscopie de fluorescence, les fluorochromes utilisés présentent des spectres d'excitation et d'émission dont la distribution en longueur d'onde se situe en très grande partie dans le domaine visible. Il existe donc une marge de manoeuvre faible dans les longueurs d'onde utilisables. Par conséquent, il ne peut s'agir d'un paramètre sur lequel il est possible de jouer afin d'améliorer la résolution. En revanche, des progrès techniques récents dans la construction des objectifs autorise l'utilisation d'ouvertures numériques au delà de $NA = 1,4$. Ceci constitue donc une voie possible pour l'amélioration de la résolution. Nous présentons donc dans un premier temps l'utilisation d'un objectif d'ouverture $NA = 1,65$ récemment développé et prévu initialement pour un type de microscopie particulier : la microscopie à réflexion totale interne de fluorescence dont le but est de collecter et d'imager des fluorochromes excités par des ondes évanescentes.

³Pour plus de détails sur le logiciel *XCOSM* voir <http://www.essrl.wustl.edu/~preza/xcosm/>

1.4 Objectifs à forte ouverture numérique

Pour améliorer la résolution, il apparaît donc nécessaire d'utiliser des objectifs de forte ouverture numérique (*cf.* eq 1.5). Typiquement, il existe en microscopie deux types d'objectifs à grande ouverture numérique :

- Les objectifs à immersion à huile d'ouverture numérique $NA = 1,4$ et donnant une résolution théorique selon Abbe de 160 nm pour une détection à $\lambda_{det} = 450\text{ nm}$. Ces objectifs présentent l'inconvénient de s'utiliser dans une huile d'immersion d'indice $n_{huile} = 1,515$ alors que les spécimens biologiques présentent un indice généralement assimilé à celui de l'eau $n_{spec} = 1,33$. Cette différence d'indice entre le milieu d'immersion et le spécimen provoque une aberration sphérique de plus en plus importante lorsque la profondeur d'observation dans le spécimen augmente, ce qui dégrade les capacités d'imagerie tridimensionnelle du microscope.
- Les objectifs à immersion à eau d'ouverture numérique $NA = 1,2$ dont les performances en terme de résolution sont moindres (du fait de la plus faible ouverture numérique) mais constantes lorsque le plan de focalisation pénètre plus profondément dans le spécimen. Ceci entraîne une meilleure capacité pour l'imagerie tridimensionnelle.

Dans cette première étude sont considérés des objets pseudo 2-D ou pseudo 1-D. On peut citer par exemple des chromosomes en métaphase déposés sur une lame de verre, des microtubules extraits d'une cellule ou des fragments d'ADN qui peuvent être considérés comme des spécimens 1-D. Ces spécimens n'étant pas vivants lors de leur observation, il est tout à fait envisageable de les préparer en les incluant dans un milieu dont l'indice correspond à celui du milieu d'immersion, pour mesurer le bénéfice de cette très grande ouverture numérique.

Il serait alors possible d'utiliser l'objectif récemment développé par *Olympus* pour la microscopie de fluorescence à réflexion interne [Klar et Hell, 1999] et dont l'ouverture numérique est de $NA = 1,65$ dans une huile d'immersion spéciale dont l'indice est $n_{huile} = 1,78$. Cet objectif s'utilisant avec des lamelles spéciale dont l'indice est $n_{lamelle} = 1,788$. Nous considérons également dans cette étude le fluorochrome *Cascade Blue*⁴ et dont la longueur d'onde d'excitation est $\lambda_{ill} = 400\text{ nm}$ pour une détection à une longueur d'onde $\lambda_{det} = 450\text{ nm}$.

En raison des effets de dépolarisation induits par l'utilisation d'objectifs à forte ouverture numérique, le modèle scalaire [Gibson et Lanni, 1991] que nous avons utilisé pour les calculs de RIO proposé par *XCOSM* (c.f. Fig. 1.7, n'est pas adapté.

⁴*Molecular Probes*

On utilise donc le modèle vectoriel de [Török et Varga, 1997] modifié par [Haeberlé, 2003]. La RIO de détection est calculée avec le modèle de détection d'un dipôle présenté dans la référence [Haeberlé et coll., 2003] et adapté aux cas biologiques dans la référence [Haeberlé, 2004]. L'adaptation de ce modèle consiste en une simplification aux cas biologiques permettant de prendre en compte de façon aisée les spécifications du constructeur de l'objectif [Gibson et Lanni, 1991].

Par soucis de simplification, la RIO confocale est calculée par une multiplication entre la RIO d'illumination et la RIO de détection. On suppose aussi que les polarisations de l'onde d'illumination et de l'onde détectée sont aléatoires. Dans ce cas la RIO confocale présente une symétrie circulaire.

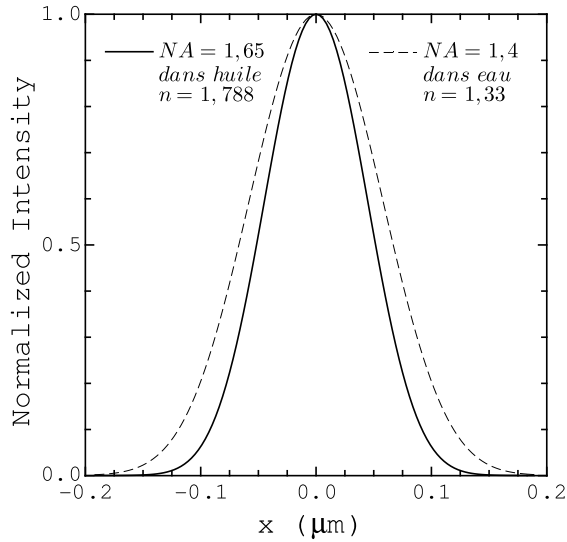


FIG. 1.8 – Profil d'intensité de la RIO confocale avec objectif d'ouverture numérique $NA = 1,65$ dans un spécimen 2-D spécialement préparé (observation dans l'huile) et un objectif d'ouverture numérique $NA = 1,4$ observant dans l'eau. $\lambda_{ill} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{det} = 450 \text{ nm}$.

La Figure 1.8 présente le profil de la RIO confocale ainsi calculée pour le fluorochrome considéré. On mesure une largeur à mi-hauteur de 103 nm ce qui représente une amélioration de la résolution de l'ordre de 25 % par rapport à un microscope confocal équipé d'un objectif d'ouverture numérique $NA = 1,4$ imageant un spécimen dont l'indice est assimilable à celui de l'eau. Il faut bien noter que le fait d'utiliser un tel objectif dans ces conditions, limite son ouverture numérique utile à $NA = 1,33$ et que la résolution confocale théorique dans ce cas est de 130 nm .

Cette amélioration de la résolution, qui passe par une utilisation d'un objectif à forte ouverture numérique utilisé dans des conditions particulières, constitue un

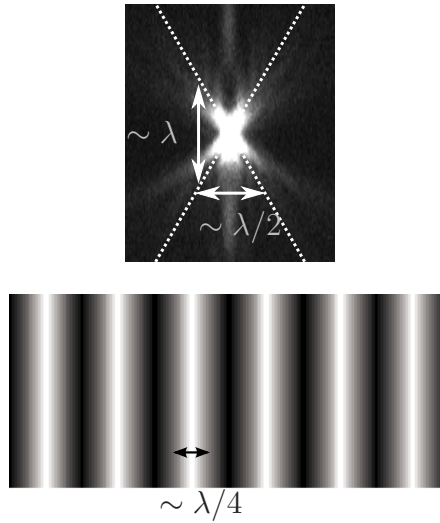


FIG. 1.9 – Schéma montrant le problème posé par le confinement de la lumière. La figure du haut montre le confinement par un objectif dans une surface dont les dimensions dans le plan, $x - z$ sont de l'ordre de $\lambda/2$ le long de l'axe x et de λ le long de l'axe z . La figure du bas montre à titre de comparaison une figure d'interférence dont la largeur à mi-hauteur est de l'ordre de $\lambda/4$.

premier progrès. La microscopie confocale consiste, nous l'avons vu (sec. 1.3), en une modification du mode d'illumination associé à une détection confocale. On peut l'interpréter comme une structuration de l'illumination réduisant le volume dans lequel les fluorochromes sont excités.

L'amélioration de la résolution en microscopie confocale est donc due à la capacité à confiner la lumière d'illumination dans un volume le plus petit possible. La figure 1.9 montre les capacités de confinement d'un objectif standard comparé à la largeur à mi-hauteur de l'interfrange d'une figure d'interférence. Dans le cas d'un objectif standard on obtient une largeur à mi-hauteur dont l'ordre de grandeur est d'une longueur d'onde dans le plan longitudinal et d'une demi longueur d'onde dans le plan transversal. Le phénomène d'interférence quant à lui, permet d'obtenir une structuration de l'onde d'illumination avec une période de $\lambda/4$. Les techniques que nous allons présenter maintenant mettent en jeu ce phénomène à travers diverses configurations.

1.5 Techniques existantes utilisant une illumination structurée

1.5.1 Illumination par interférence longitudinale de faisceaux en champs large

Pour améliorer la résolution longitudinale, une solution proposée consiste à créer une onde stationnaire par interférence de deux ondes planes se propageant en sens opposé le long de l'axe optique [Bailey et coll., 1993, 1994]. La modulation d'amplitude due au phénomène d'interférence génère un motif de Moiré. Dans l'espace des fréquences, ce motif se traduit par l'apparition de deux pics de part et d'autre du cône de fréquences manquantes. Il en résulte que des fréquences inaccessibles pour un objectif donné, sont alors transférées dans l'espace des fréquences théoriquement accessibles.

L'information recueillie étant modulée par l'onde d'illumination structurée, il est nécessaire de procéder à une démodulation du signal. Cette démodulation nécessite l'acquisition de trois images successives pour trois valeurs de phase différentes de l'onde d'illumination [Bailey et coll., 1993, 1994].

Cependant, cette technique ne permet pas de collecter toutes les fréquences intermédiaires entre la FTO standard et les pics de Moiré, ce qui peut, dans certains cas, provoquer des problèmes de reconstruction tridimensionnelle du spécimen [Krishnamurthi et coll., 1996 ; Nagorni et Hell, 2001b].

Une variante de ce système consiste à utiliser une illumination incohérente, en champs large et mettant en oeuvre les interférences se produisant entre des ondes planes émergeant de deux objectifs opposés frontalement [Gustafsson et coll., 1995]. Il s'agit ici aussi d'une technique de champs large qui permet une meilleure discrimination le long de l'axe longitudinal. Cependant, la microscopie I^3M présente toujours des fréquences manquantes le long de cet axe [Nagorni et Hell, 2001b].

1.5.2 Illumination par interférence longitudinale de faisceaux focalisées

La microscopie $4Pi$ [Hell et Stelzer, 1992] utilise également ce phénomène d'interférence pour améliorer la résolution longitudinale. L'onde d'illumination est focalisée par deux objectifs opposés frontalement et alignés le long de l'axe optique. On distingue 3 types de microscopie $4Pi$. Dans la microscopie $4Pi A$ [Hell et Stelzer, 1992], on utilise une illumination structurée et une détection confocale

par l'un des deux objectifs. Dans la microscopie $4Pi\ B$, la détection est réalisée par interférence des signaux détectés par les deux objectifs alors que l'illumination est confocale. La microscopie $4Pi$ de type C [Nagorni et Hell, 2001a], enfin, combine à la fois une illumination structurée et une détection cohérente.

Le principal avantage que présente la microscopie $4Pi$ tient au fait qu'il s'agit d'une technique impliquant un balayage du volume de l'échantillon, permettant aussi une reconstruction directe du spécimen observé, les lobes présents de part et d'autre de la RIO étant retirés par une simple méthode de filtrage numérique [Hell, 1997].

Il faut cependant bien noter que ces techniques (I^3M et $4Pi$) ne permettent pas de gain latéral en résolution par rapport à un microscope confocal classique utilisé de façon optimale.

1.5.3 Illumination par interférences latérale de faisceaux en champs large

Il est également possible d'améliorer la résolution latérale en microscopie en champs large en utilisant une illumination structurée latéralement, que se soit par des méthodes d'interférences [Gustafsson et coll., 1997] ou tout simplement en utilisant un réseau de diffraction [Heintzmann et Cremer, 1999]. De façon analogue aux techniques d'illumination structurée longitudinalement, le but est ici aussi de créer un effet de Moiré permettant de décaler par modulation les informations hautes fréquences vers le support des fréquences détectables par l'objectif. Tout comme dans la microscopie à onde stationnaire ou pour le I^3M , il faut ici aussi prendre une série d'images pour démoduler le signal. L'acquisition de neuf images du même spécimen doit être réalisée [Gustafsson, 2000]. De même, il est possible de réaliser une modulation spatiale 2-D [Frohn et coll., 2000]

L'avantage de cette technique est que toute la lumière est utilisée (pas de lumière rejetée par un pinhole). De plus, s'agissant d'une technique en champs large, une acquisition rapide est possible (pas de balayage). D'autre part, les algorithmes de démodulation sont plus rapides que les procédés habituels de déconvolution.

1.6 Technique proposée : illumination par interférence latérale de faisceaux focalisés

1.6.1 Apodisation de l'objectif

Nous avons tout d'abord proposé d'utiliser une illumination modifiée par une technique d'apodisation [Haeberlé et Simon, 2006]. Cette technique consiste à utiliser une lame de phase particulière qui inverse la phase de l'onde d'illumination sur la moitié de la face d'entrée de l'objectif. Une telle lame de phase a déjà été utilisée dans la mise en forme de faisceau d'illumination en microscopie STED [Klar et coll., 2001]. Nous proposons d'utiliser ce type de lame de phase dans un microscope confocal classique dans le but de réduire la taille de la RIO d'illumination, la taille de la RIO de détection confocale demeurant inchangée.

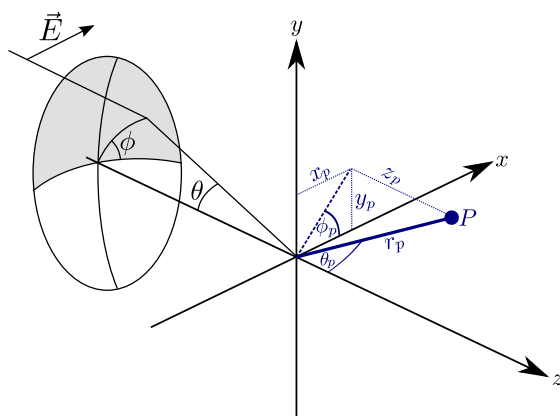


FIG. 1.10 – Schéma de focalisation d'une onde plane par un objectif de microscope avec une fonction d'apodisation. La partie grisée de l'objectif représente la zone où l'onde d'illumination est déphasée de π (dans un souci de simplicité, un seul milieu est représenté).

Nous décrivons ici de façon succincte le modèle de calcul de RIO utilisé pour cette étude. Considérons une onde d'illumination plane de vecteur d'onde k_0 , linéairement polarisée le long de l'axe x et focalisée par un objectif de grande ouverture numérique. Afin de calculer la RIO d'illumination de ce type de montage, le champ électrique est estimé au point $P(x_p, y_p, z_p)$ situé au voisinage du point focal. Nous utilisons les coordonnées sphériques polaires (r_p, θ_p, ϕ_p) avec $r > 0$, $0 \leq \theta_p < \pi$ et

$0 \leq \phi_p < 2\pi$, avec :

$$\begin{aligned} x_p &= r_p \sin \theta_p \cos \phi_p \\ y_p &= r_p \sin \theta_p \sin \phi_p \\ z_p &= r_p \cos \theta_p \end{aligned}$$

La géométrie du problème est décrite par la Figure 1.10. Nous considérons le cas d'un milieu stratifié à trois interfaces, composé du milieu d'immersion, de la lamelle et du spécimen d'indice n_1 , n_2 et n_3 respectivement. Les interfaces milieu d'immersion-lamelle et lamelle-spécimen sont respectivement situées au coordonnées $z = -h_1$ et $z = -h_2$ [Haeberlé, 2003, 2004 ; Haeberlé et coll., 2003 ; Török et Varga, 1997]. La Figure décrit cette configuration.

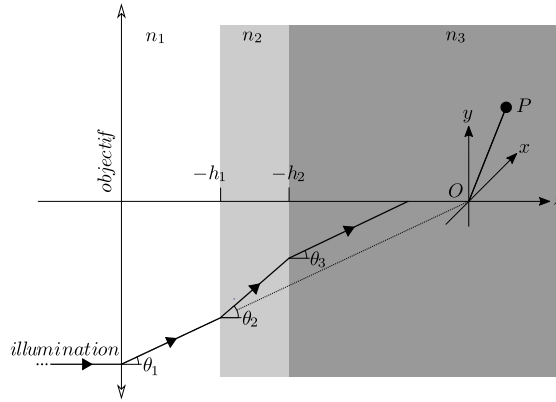


FIG. 1.11 – Schéma décrivant la focalisation d'une onde plane d'illumination à travers un milieu stratifié à trois couches.

Le calcul de la RIO résultante nécessite l'utilisation d'un modèle vectoriel, afin de prendre en compte les effet de dépolarisations induits par les objectifs de forte ouverture numérique. Nous utilisons le modèle vectoriel de diffraction proposées par [Török et Varga, 1997]. Avec la fonction d'apodisation considérée, il n'y a pas de symétrie circulaire, il convient donc d'utiliser les intégrales de diffractions 2-D décrites dans ce modèle. Notons que dans l'équation qui suit et dans la suite de l'étude, k_n représente le vecteur d'onde dans la n^{ieme} couche du milieu stratifié. Le champs au point r_p est donné par l'équation :

$$\mathbf{E}(r_p) = \int_0^\alpha \int_0^{2\pi} E e^{ir_p \kappa} e^{ik_0 \Psi_i} e^{ik_3 r_p \cos \theta_p \cos \theta_n \sin \theta_1} d\phi d\theta_1 \quad (1.6)$$

avec

$$E = A(\theta_1)B(\theta, \phi) \begin{bmatrix} T_p \cos \theta_3 \cos^2 \phi + T_s \sin^2 \phi \\ (T_p \cos \theta_3 - T_s) \cos \phi \sin \phi \\ -T_p \sin \theta_3 \cos \phi \end{bmatrix} \quad (1.7)$$

où $A(\theta)$ correspond à la fonction d'apodisation, qui pour un système sans aberration et obéissant à la condition des sinus s'écrit $A(\theta) = \cos^{1/2}(\theta)$. La fonction $B(\theta)$ décrit quant à elle l'influence de la lame de phase utilisée pour modifier l'illumination. Les termes Ψ_i et κ se calculent avec :

$$\Psi_1 = h_2 n_3 \cos \theta_3 - h_1 n_1 \cos \theta_1 \quad (1.8)$$

$$\kappa = k_0 \sin \theta_1 \sin \theta_p \cos(\phi - \phi_p) \quad (1.9)$$

Les coefficients de transmission pour un milieu stratifié à trois interfaces sont donnés par :

$$T_{s,p} = \frac{t_{12s,p} t_{23s,p} \exp(i\beta)}{1 + r_{12s,p} r_{23s,p} \exp(2i\beta)} \quad (1.10)$$

avec $\beta = k_2 |h_2 - h_1| \cos \theta_2$, les coefficients de Fresnel en transmission et en réflexion étant donnés par :

$$\begin{aligned} t_{mn+1,s} &= \frac{2n_n \cos \theta_n}{n_n \cos \theta_n + n_{n+1} \cos \theta_{n+1}} \\ t_{mn+1,p} &= \frac{2n_n \cos \theta_n}{n_{n+1} \cos \theta_n + n_n \cos \theta_{n+1}} \\ r_{mn+1,s} &= \frac{n_n \cos \theta_n - n_{n+1} \cos \theta_{n+1}}{n_n \cos \theta_n + n_{n+1} \cos \theta_{n+1}} \\ r_{mn+1,p} &= \frac{n_{n+1} \cos \theta_n - n_n \cos \theta_{n+1}}{n_{n+1} \cos \theta_n + n_n \cos \theta_{n+1}} \end{aligned}$$

En microscopie de fluorescence, on considère l'intensité de la réponse impulsionnelle optique en illumination :

$$PSF_{ill}(x, y, z) = |\mathbf{E}|^2 = |\mathbf{E}_x + \mathbf{E}_y + \mathbf{E}_z|^2 \quad (1.11)$$

Ces équations ont été adaptées aux configurations rencontrées en biologie, par [Haerlé, 2004] dans un code de calcul utilisé pour cette étude.

La lame de phase que nous utilisons, introduit un décalage de phase de π sur la moitié du champs du faisceau d'illumination. On a donc :

$$B(\theta, \phi) = \text{sign}(\phi - \pi) \quad (1.12)$$

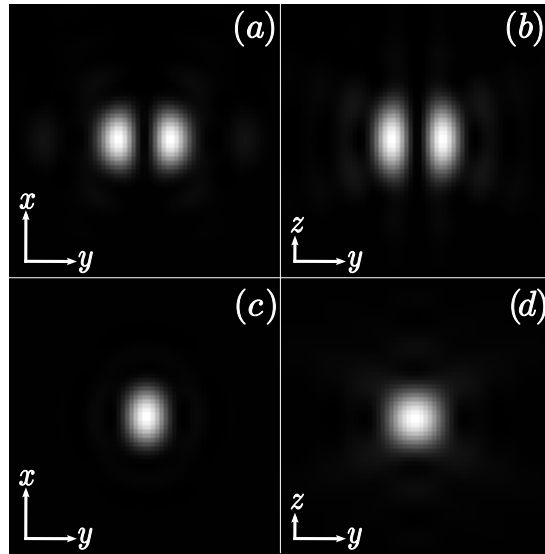


FIG. 1.12 – RIO d’illumination à deux lobes obtenue au moyen d’un montage avec une lame de phase dans le plan focal arrière de l’objectif avec $\lambda_{ill} = 400 \text{ nm}$ et $NA = 1,65$. (a) plan transversal ($x - y$), (b) plan longitudinal ($y - z$). Les flèches représentent une longueur de 200 nm (l’échelle le long de l’axe z étant doublée). (c) et (d) donnent à titre de comparaison la RIO d’illumination classique, sans lame de phase.

Les Figures 1.12(a) et 1.12(c) montrent les plans transversaux et longitudinaux la RIO d’illumination obtenue avec la lame de phase pour un objectif d’ouverture numérique $NA = 1,65$ une longueur d’onde d’excitation $\lambda_{ill} = 400 \text{ nm}$. A titre de comparaison, les Figures 1.12(b) et 1.12(d) montrent la RIO obtenue pour un montage confocal classique (détection à $\lambda_{det} = 450 \text{ nm}$). Sur la RIO modifiée, on peut noter l’existence de deux lobes de part et d’autre d’une vallée orientée le long de l’axe x . Les pics d’intensité maximale sont situés sur l’axe y . Il est important de noter que l’orientation de la polarisation par rapport à celle de la lame de phase est critique pour l’obtention d’un tel résultat [Klar et coll., 2001]. La largeur à mi-hauteur de chacun des lobes est de l’ordre de 105 nm . Pour une RIO d’illumination classique obtenue à travers le même objectif, avec un faisceau non polarisé, la largeur à mi-hauteur est de 135 nm .

La Figure 1.13(a) donne le profil d’intensité de la RIO à deux lobes le long de l’axe y . Les deux lobes étant bien séparés, Il est possible de les isoler en utilisant un montage confocal particulier où le pinhole serait décalé sur un côté (typiquement 90 nm). La Figure 1.13(b) montre la RIO de détection correspondante, calculée à partir du modèle vectoriel de détection présenté en [Haeberlé, 2004] et pour une détection à $\lambda = 450 \text{ nm}$. La RIO confocale ainsi obtenue est présentée sur la Figure 1.13(c). Sa largeur à mi-hauteur est de 90 nm . Ce qui représente un gain

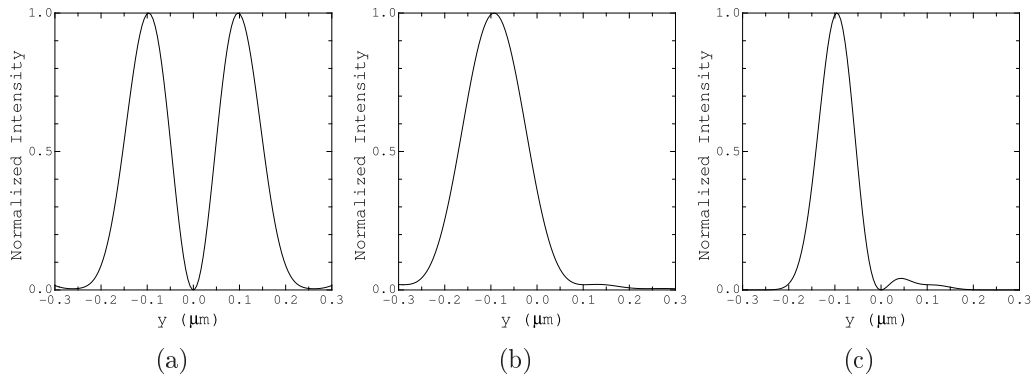


FIG. 1.13 – Profils d’intensité le long de l’axe y (a) de la RIO d’illumination à deux lobes de la Figure 1.12, (b) de la RIO de détection décalée de 90 nm et (c) de la RIO confocale résultante dont la largeur à mi-hauteur est de 90 nm .

en résolution de $12,5\%$ par rapport au montage confocal sans lame de phase pour lequel on a une largeur à mi-hauteur de 103 nm .

A titre de comparaison, la RIO confocale obtenue avec la même fonction d’apodisation et un objectif plus conventionnel d’ouverture numérique $NA = 1,4$, présente une largeur à mi-hauteur de 105 nm . Ce qui représente un gain en résolution de 25% par rapport au microscope confocal conventionnel avec le même objectif. Ceci montre qu’un gain important en résolution peut également être obtenu avec des objectifs plus largement usités sans pour autant mettre en oeuvre un montage complexe et en conservant une relative simplicité dans la préparation du spécimen.

Cependant, une étude plus détaillée de la Figure 1.12 montre que les lobes de la RIO du montage avec lame de phase, dans son plan longitudinal (Figure 1.12(b)), sont plus étalés que celui obtenu dans le cas d’un montage confocal avec le même objectif (Figure 1.12(d)). En effet, la lame de phase étant placée en amont de l’objectif, elle sépare le faisceau en deux parties. Chacune des parties du faisceau n’illumine alors que la moitié du plan focal arrière de l’objectif. Par conséquent, chaque « demi-faisceau » produit un spot plus large que pour un faisceau unique occupant la totalité du plan focal arrière de l’objectif. Ceci se traduit par une perte de résolution. Dans le plan transversal, le phénomène d’interférence permet de réduire la taille de chacun de ces spots. En revanche, dans le plan longitudinal, le phénomène d’interférence ne se produit que sur l’axe z . En conséquence, il n’y a pas de réduction de l’élongation de la RIO longitudinalement.

1.6.2 Faisceaux décalés

Une solution à ce problème consisterait donc à faire interférer deux ou plusieurs faisceaux remplissant chacun la totalité du plan focal arrière de l'objectif, légèrement décalés dans le plan focal et correctement déphasés. Pour le calcul de la RIO résultante d'une telle configuration nous avons utilisé le modèle décrit en [Haeberlé, 2003].

On utilisera donc pour calculer la RIO au point $P(x, y, z)$ l'équation 1.11, les trois composantes du champ électrique E_x , E_y et E_z étant données par :

$$\begin{aligned} E_x &= -i(I_{0ill} + I_{2ill} \cos 2\phi_p) \\ E_y &= -i(I_{2ill} \sin 2\phi_p) \\ E_z &= -2I_{1ill} \cos \phi_p \end{aligned} \quad (1.13)$$

I_0 , I_1 et I_2 présentent ici une symétrie radiale et se calculent [Gibson et Lanni, 1991; Haeberlé, 2003, 2004; Haeberlé et coll., 2003; Török et Varga, 1997] avec :

$$\begin{aligned} I_{0ill} &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta_1} \sin \theta_1 J_0(k_1 r_p \sin \theta_1 \sin \theta_p) \\ &\quad \times (T_{2s} + T_{2p} \cos \theta_3) \exp(ik_0 \Psi_i) \\ &\quad \times \exp(ik_3 r_p \cos \theta_p \cos \theta_3) d\theta_1 \\ I_{1ill} &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta_1} \sin \theta_1 J_1(k_1 r_p \sin \theta_1 \sin \theta_p) \\ &\quad \times (T_{2p} \sin \theta_3) \exp(ik_0 \Psi_i) \\ &\quad \times \exp(ik_3 r_p \cos \theta_p \cos \theta_3) d\theta_1 \\ I_{2ill} &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta_1} \sin \theta_1 J_2(k_1 r_p \sin \theta_1 \sin \theta_p) \\ &\quad \times (T_{2s} - T_{2p} \cos \theta_3) \exp(ik_0 \Psi_i) \\ &\quad \times \exp(ik_3 r_p \cos \theta_p \cos \theta_3) d\theta_1 \end{aligned} \quad (1.14)$$

Les équations (1.13) et (1.14) montrent que la RIO d'illumination présente une dépendance vis à vis de ϕ_p . Par conséquent, l'utilisation d'une polarisation linéaire induit une dissymétrie dans la forme de la RIO obtenue qui présente une légère élongation le long de l'axe y pour une polarisation le long de l'axe x .

On considère maintenant un montage avec deux faisceaux légèrement décalés et correctement déphasés. La Figure 1.14(a) présente cette configuration pour un

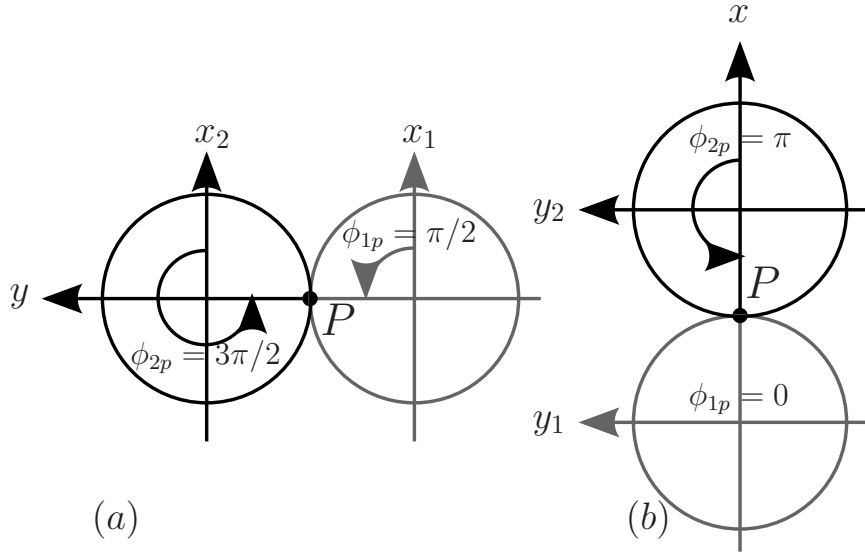


FIG. 1.14 – Schéma illustrant la configuration d’illumination à deux faisceaux, (a) avec décalage le long de l’axe x . Ce montage ne permet pas d’obtenir d’interférences destructives entre les deux RIO. (b) avec décalage le long de l’axe y permettant le phénomène d’interférence.

décalage de deux faisceaux le long de l’axe x . Une analyse de l’équation (1.13) montre que pour deux faisceaux d’illumination polarisés linéairement le long de l’axe x et légèrement décalés le long de ce même axe, le point P situé dans cette zone de recouvrement sera repéré par $\phi_{1p} = 0$ et $\phi_{2p} = \pi$. Les composantes des champs électriques E_1 et E_2 sont données par :

$$\begin{aligned} E_{1x} &= -i(I_{0ill} + I_{2ill}) \\ E_{1y} &= 0 \\ E_{1z} &= -2I_{1ill} \end{aligned} \quad (1.15)$$

et,

$$\begin{aligned} E_{2x} &= -i(I_{0ill} + I_{2ill}) \\ E_{2y} &= 0 \\ E_{2z} &= 2I_{1ill} \end{aligned} \quad (1.16)$$

Il apparaît que si les composantes E_y sont nulles, les composantes E_x ne peuvent interférer de façon destructive sans qu’il y ait une interférence constructive entre les composantes E_z .

En revanche, si l’on considère deux faisceaux légèrement décalés le long de l’axe y , comme sur la Figure 1.14(b), le point P situé dans la zone de recouvrement sera

repéré par les angles $\phi_{1p} = \pi/2$ et $\phi_{2p} = 3\pi/2$ les composantes des champs E_1 et E_2 seront donnée par :

$$\begin{aligned} E_{1x} &= i(I_{0ill} + I_{2ill}) \\ E_{1y} &= 0 \\ E_{1z} &= 0 \end{aligned} \quad (1.17)$$

et,

$$\begin{aligned} E_{2x} &= i(I_{0ill} + I_{2ill}) \\ E_{2y} &= 0 \\ E_{2z} &= 0 \end{aligned} \quad (1.18)$$

Les composantes E_y et E_z sont nulles. Il est donc possible de créer une interférence destructive entre les deux composantes E_x en les déphasant de π l'une par rapport à l'autre.

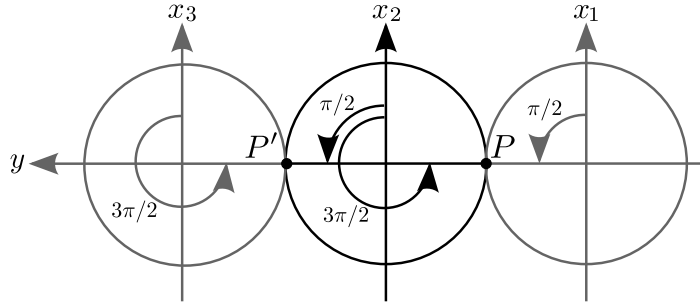


FIG. 1.15 – Diagramme illustrant la configuration un montage d'illumination à trois faisceaux, décalés le long de l'axe y et permettant une diminution de la taille de la RIO centrale par interférences destructives.

Par extension, cette technique permet de faire interférer trois faisceaux focalisés afin de réduire la taille de la zone centrale de la RIO. La Figure 1.15 décrit la configuration envisagée, avec trois faisceaux polarisés le long de l'axe x donnant trois RIO d'illumination légèrement décalées le long de l'axe y . Par un déphasage de π des faisceaux donnant les spots extrêmes et conformément au calcul des composantes du champ électrique dans la zone de focalisation des trois faisceaux, on voit alors apparaître le phénomène d'interférence destructive qui a pour effet de réduire les dimensions du spot central le long de l'axe y .

On considère une telle configuration que l'on compare à une configuration focale classique. La longueur d'onde d'observation est $\lambda_{det} = 500 \text{ nm}$ pour une excitation à $\lambda_{ill} = 395 \text{ nm}$ (correspondant au fluorochrome *Bis-ANS (B153) tubulin*

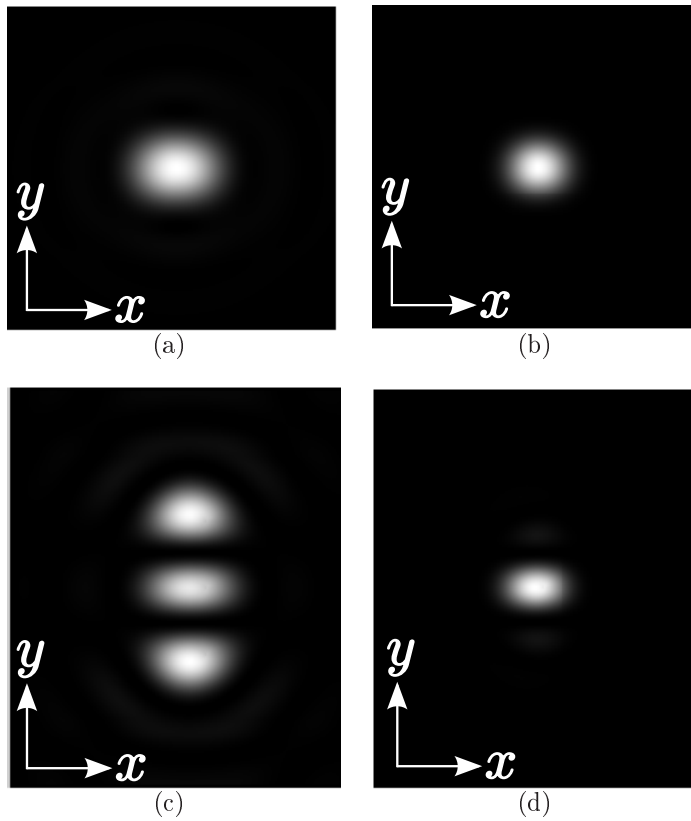


FIG. 1.16 – (a) RIO d’illumination pour un faisceau polarisé linéairement le long de l’axe x . (b) RIO confocale correspondante. (c) RIO d’illumination obtenue d’après le montage présenté Figure 1.15. (d) RIO confocale correspondante : les lobes latéraux sont supprimés. Pour toutes ces Figures : $NA = 1,65$, $\lambda_{ill} = 400 \text{ nm}$ et $\lambda_{det} = 500 \text{ nm}$.

de chez *Molecular Probes*©). La RIO de détection est calculée selon le modèle vectoriel simplifié aux cas biologiques et en considérant une polarisation aléatoire de l’émission de fluorescence.

La Figure 1.16(a) montre le plan transversal de la RIO d’illumination pour un montage confocal classique avec une illumination polarisée linéairement selon l’axe x . La Figure 1.16(b) montre la RIO confocale correspondante obtenue par la multiplication de la RIO d’illumination par la RIO de détection.

La Figure 1.16(c) montre la RIO d’illumination à trois faisceaux calculée pour le schéma proposé. Comme attendu, le spot central est plus étroit que le spot de la Figure 1.16(a), mais on peut noter la présence de lobes latéraux. Le passage par une détection confocale permet de supprimer ces lobes, comme illustré par la

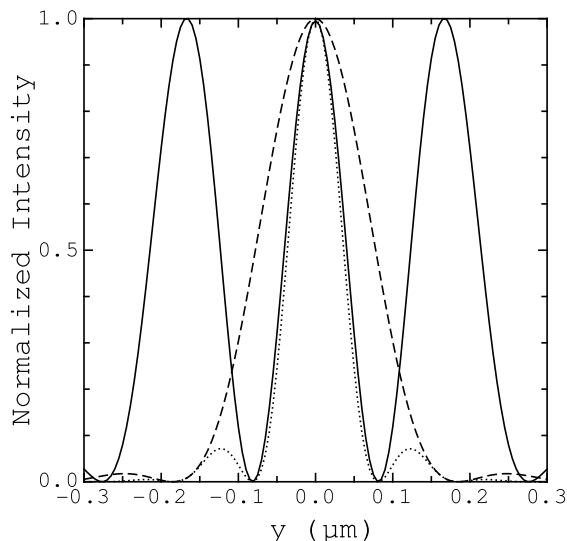


FIG. 1.17 – Profils d’intensité, le long de l’axe y des RIO d’illumination trois faisceaux (trait plein), RIO de détection (tirets) et RIO confocale résultante (pontillés) dont la largeur à mi-hauteur est de 75 nm .

Figure 1.16(d).

La Figure 1.17 représente le profil d’intensité de la RIO d’illumination 3-faisceaux (RIO_{3ill}), la RIO de détection (RIO_{det}) et la RIO confocale résultante (RIO_{3conf}). On mesure une largeur à mi-hauteur du lobe central de 75 nm pour (RIO_{3ill}). Notons que la largeur à mi-hauteur pour RIO_{3conf} est très proche, soit 73 nm . Ici, en effet, le gain en résolution n’est pas dû à la détection confocale, contrairement à un microscope confocal classique, mais à une illumination structurée. La détection confocale n’a ici pour but que d’éliminer les lobes latéraux. Notons également que RIO_{3ill} a été calculée pour un décalage entre les faisceaux choisi par optimisation.

Ce résultat est important dans la pratique. En effet, dans un microscope confocal classique, la taille du *pinhole* est sensée être infiniment petite. Cependant, l’utilisateur se voit souvent obligé d’ouvrir ce *pinhole* afin de collecter une quantité de photons plus importante. Il en résulte une perte importante de résolution. Dans le cas d’une illumination structurée à trois faisceaux focalisés, c’est la réduction de la taille du lobe central de la RIO d’illumination par le phénomène d’interférence qui améliore la résolution du système. L’ouverture du *pinhole* aura pour conséquence d’augmenter l’intensité des lobes latéraux. Ceci a un effet dommageable sur la qualité des images obtenues qui se verraient entachées d’un double écho latéral. Cependant, ce cas est très similaire à celui du microscope $4Pi$ [Hell, 1997] qui présente, lui, des lobes longitudinaux. Dans notre cas, il est donc envisageable

d'appliquer la solution de traitement numérique des images de microscopie $4Pi$ qui consiste en un simple filtrage, tant que l'intensité des lobes latéraux reste à 30 % inférieure à celle du lobe central [Hell et Stelzer, 1992].

On pourra noter, en particulier sur la Figure 1.16(d), que la RIO 3-faisceaux confocale obtenue présente une forte dissymétrie : le gain en résolution n'est possible que selon l'axe y . Par conséquent, les images produite par un tel système présenteraient donc une résolution fortement anisotrope.

Nous avons présenté dans ce chapitre les principes de la microscopie de fluorescence avant d'en souligner les limites en terme de résolution. Nous avons présenté une première possibilité d'amélioration de cette résolution qui porterait sur l'utilisation d'objectifs à forte ouverture numérique et une préparation particulière du spécimen. Puis, après un bref rappel des dernières techniques d'amélioration de la résolution utilisant une illumination structurée obtenue par le phénomène d'interférence, nous avons proposé deux voies possibles pour l'amélioration de la résolution latérale. La première consiste à utiliser une lame de phase, la deuxième une illumination à trois faisceaux mettant en jeu des interférences latérales. Les résultats obtenus montrent qu'il est possible d'obtenir un gain sensible le long d'un axe.

Dans le chapitre suivant, nous présenterons plusieurs techniques combinant plusieurs images présentant une résolution améliorée selon un axe seulement. Ces techniques basée sur des traitements numériques autorisent une amélioration isotrope de la résolution 2-D. Nous les appliquerons à des images simulée de l'illumination modifiée que nous venons de présenter.

Chapitre 2

Amélioration de la résolution : méthodes numériques

2.1 Introduction

Nous avons montré qu'il était possible d'améliorer la résolution latérale en microscopie confocale de fluorescence en utilisant une illumination modifiée, formée à partir de l'interférence de trois faisceaux focalisés. Nous avons obtenu un gain en résolution d'un facteur deux par rapport à un microscope en champs large. Cependant, ce gain en résolution ne concerne qu'une direction dans le plan transversal. Il est toutefois envisageable de faire l'acquisition de plusieurs images du même spécimen avec différentes orientations de la RIO_{3conf} vis-à-vis de l'objet, de sorte à obtenir un gain en résolution suivant différentes directions. Notons que d'un point de vue théorique, le fait de tourner l'objet autour de l'axe z afin de changer son orientation vis-à-vis de l'illumination ne présente pas de différence avec le fait de modifier l'orientation de l'illumination vis-à-vis de l'objet. Cependant, et comme nous l'avons montré précédemment, le fait d'obtenir l'interférence souhaitée entre les trois faisceaux de l'illumination nécessite un état de polarisation particulier. D'un point de vue expérimental, il paraît donc sans doute plus opportun d'envisager de tourner l'objet le long de l'axe z .

2.2 Configuration considérée

Une méthode d'imagerie combinant une illumination 3-faisceaux à une détection confocale, couplée à l'acquisition d'une série d'images pour lesquelles l'orientation de l'objet vis-à-vis de l'illumination varie, permettrait donc d'accéder à une résolution améliorée dans toutes les directions. Cependant, une étape de traitement numérique est nécessaire pour combiner dans une seule et même image finale les

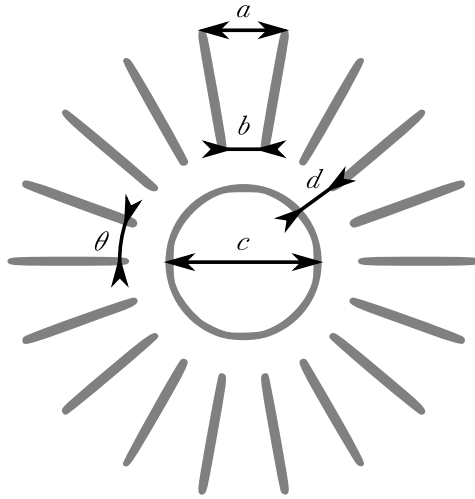


FIG. 2.1 – Vue schématique de l’objet numérique avec dimensions.

gains en résolution selon les différentes directions. Plusieurs méthodes seront proposées et évaluées dans ce chapitre. Afin d’évaluer ces dernières, des simulations d’acquisitions d’images doivent être réalisées. Ces simulations utilisent les modèles cités précédemment. Les paramètres retenus au cours de cette étude sont les suivants :

- objectif : $NA = 1.2$, immersion dans l’eau
- longueur d’onde d’illumination : $\lambda = 395 \text{ nm}$
- détection à une longueur d’onde $\lambda = 500 \text{ nm}$

Ce qui correspond à l’utilisation du fluorochrome *bis-ANS* de chez *Molecular Probes*©, marqueur de la myosine, dans le cadre d’une étude biologique avec un objectif à immersion à eau.

Un microscope confocal classique dans ces conditions offre une résolution théorique de 208 nm . La configuration avec une illumination à 3 faisceaux et une détection confocale dans les mêmes conditions, présente quant à elle une largeur à mi-hauteur de 100 nm dans sa partie la plus étroite. En conséquence, nous avons réalisé ces simulations pour l’acquisition d’un objet numérique dont la forme et les dimensions permettent d’évaluer les capacités de nos méthodes numériques en terme de résolution.

Nous considérons donc un objet, présenté sur la Figure 2.1. Cet objet a été composé numériquement avec une conformation radiale et des dimensions particulières, dans le but de mieux évaluer un gain éventuel en résolution selon les différentes

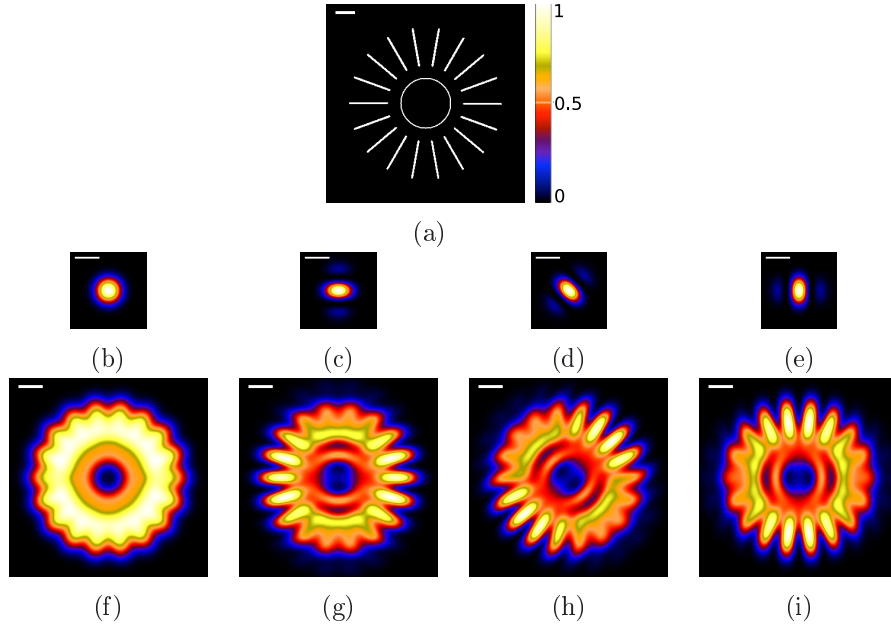


FIG. 2.2 – Images simulées pour un système confocal classique et pour un système confocal à illumination 3-faisceaux. (a) Objet numérique original. (b) RIO confocale normale, (c-e) RIO 3-faisceaux orientées respectivement à $\theta = 0^\circ$, 45° et 90° par rapport à l’axe x . (f-i) Images simulées correspondantes calculées pour $NA = 1.2$, $\lambda_{ill} = 400 \text{ nm}$ et $\lambda_{det} = 500 \text{ nm}$.

directions. Le cercle interne à la figure présente un diamètre $c = 410 \text{ nm}$, la distance entre le cercle et les rayons, noté d est de 112 nm , la plus petite distance entre deux rayons b est de 105 nm tandis que la distance la plus grande a est de 235 nm .

La Figure 2.2 présente (a) l’objet numérique utilisé pour simuler les images obtenues avec (f) un montage confocal classique dont la RIO est présentée en (b), (g-i) un système d’illumination 3-faisceaux et détection confocale. Pour ces images, la RIO 3-faisceaux confocale a été prise pour différentes orientations : respectivement $\theta = 0^\circ$, 45° et 90° par rapport à l’axe x . Dans le cas d’un système confocal classique, la résolution n’est pas suffisante. Sur la Figure 2.2 on ne peut pas discriminer le cercle central et les rayons (hormis dans leur partie périphérique). Dans le cas d’un système à illumination 3-faisceaux et à détection confocale, on obtient bien une amélioration de la résolution selon l’orientation de la RIO. Sur la Figure 2.2(g), on voit bien que les rayons dont l’angle avec l’axe des x est proche de 0 et 180° sont mieux résolus, tandis que dans la Figure 2.2(h) ce sont les rayons dont l’angle est proche de -45° ou de 135° et les rayons dont l’angle est proche de -90° ou de 90° dans la Figure 2.2(i). Une amélioration de la résolution dépendant de l’orientation de la PSF vis-à-vis de l’objet est donc obtenue.

L'acquisition par un système 3-faisceaux d'une série d'images pour lesquelles l'orientation de la RIO varie permet donc d'accéder à une meilleure résolution selon différentes directions. Combiner les informations obtenues pour les images d'une même série d'acquisitions devrait donc permettre d'obtenir une résolution améliorée dans toutes les directions.

D'autre part, pour comparer les résultats obtenus, nous avons besoin d'un critère d'erreur ce sur l'efficacité des traitements numériques et que nous utiliserons tout au long de ce chapitre. Nous avons choisi ce critère ce tel que :

$$ce = \sum \sum (\check{I}' - \check{O})^2 \quad (2.1)$$

où \check{I}' représente l'image estimée normalisée par rapport à son propre maximum d'intensité et \check{O} l'objet normalisé de la même manière. Ce critère diffère légèrement de la définition classique de l'erreur quadratique. Cependant il est proche de ce dernier et peut y être relié par un rapport de proportionnalité.

2.3 Techniques par fusion de données

2.3.1 Moyennage des données

L'acquisition d'une série d'images pour différentes orientations de la RIO 3-faisceaux confocale donne donc accès à une amélioration de la résolution selon une direction différente dans chaque image. Afin de combiner dans une seule et même image les améliorations de la résolution dans toutes les directions, l'idée la plus naturelle consiste à simplement moyennner ces images. On obtient alors une image résultante I' :

$$I' = \frac{1}{n} \sum_{i=0}^n I_i \quad (2.2)$$

La Figure 2.3 montre le résultat d'une telle méthode de fusion pour un objet ponctuel. On étudie ainsi les RIO équivalentes théoriquement obtenue. La Figure 2.3(a) représente la RIO confocale classique. Dans le cas de cette RIO, la fusion de plusieurs RIO pour différentes orientations n'apporte aucun gain en terme de résolution du fait qu'elle présente une symétrie circulaire. Elle a donc été placée sur cette figure à titre de comparaison. La Figure 2.3(b) représente une RIO 3-faisceaux confocale seule. La Figure 2.3(c) représente le résultat de la fusion par moyennage de deux RIO 3-faisceaux orientées perpendiculairement l'une par rapport à l'autre. Il est intéressant de noter sur cette dernière figure que le lobe central de la RIO est plus étroit mais n'est pas circulaire et présente une légère élongation le long des axes x et y . Il faut également noter que des lobes latéraux sont encore présents

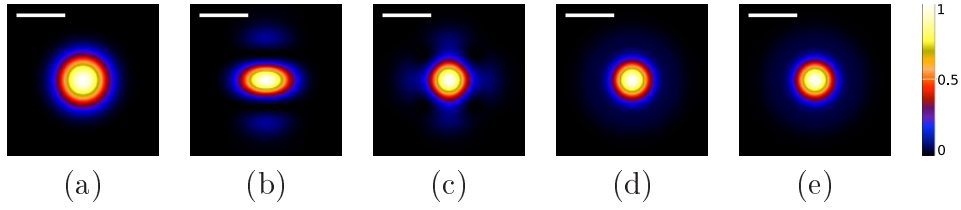


FIG. 2.3 – Moyennage de RIO. (a) RIO confocale classique, (b) RIO confocale 3-faisceaux, (c) moyenne de 2 RIO confocales 3-faisceaux formant un angle de 90° , (d) moyenne de 4 RIO confocales 3-faisceaux calculées pour des angles de $0, 45, 90$ et 135° , (e) (d) moyenne de 8 RIO confocales 3-faisceaux calculées pour 8 angles séparés d'un pas de $22,5^\circ$. La barre d'échelle représente 200 nm

le long des axes x et y . Cependant ces derniers sont tout de même atténués par rapport au lobe central. La Figure 2.3(d) montre le résultat de la fusion de quatre RIO 3-faisceaux orientées selon des angles de 45° les unes par rapport aux autres. Sur cette figure on peut noter la disparition des lobes latéraux et l'apparition d'un faible halo autour du lobe central. Ce dernier est quant à lui encore plus étroit et de conformation plus circulaire. La Figure 2.3(e) montre le résultat de la fusion de huit RIO 3-faisceaux pour des orientations espacées régulièrement d'un angle de $22,5^\circ$. Le résultat de la fusion dans ce cas ne présente pas d'amélioration nette par rapport au précédent obtenu à partir de quatre RIO 3-faisceaux. En effet, le résultat précédent donnant déjà une RIO équivalente circulaire symétrique l'addition de RIO supplémentaires, n'apporteront plus d'améliorations.

Les résultats obtenus sur des objets ponctuels permettent de penser qu'il serait possible, en réalisant la moyenne d'une série d'images acquises pour différentes orientations de la RIO 3-faisceaux, d'obtenir une image dont la résolution serait améliorée dans toutes les directions de l'espace.

La Figure 2.4 montre l'objet binaire (a), son image simulée pour un système confocal classique (b) et pour un système confocal 3-faisceaux en polarisation linéaire selon l'axe x (c). Les résultats de la fusion par moyennage obtenus pour un système confocal 3-faisceaux avec des séries de n noyaux $n = 2$ et $\theta = 0^\circ$ et 90° sont donnés sur la Figure 2.4(b), ceux pour $n = 4$ et $\theta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$ et 135° sur la Figure 2.4(c), et finalement ceux pour $n = 8$ avec θ variant par pas de $22,5^\circ$ sur la Figure 2.4(d).

Il faut noter que la RIO confocale normale (b) est circulaire symétrique. Par conséquent, elle est invariante par rotation et les images obtenues dans une même série sont toutes identiques. Il est alors inutile de présenter les résultats obtenus

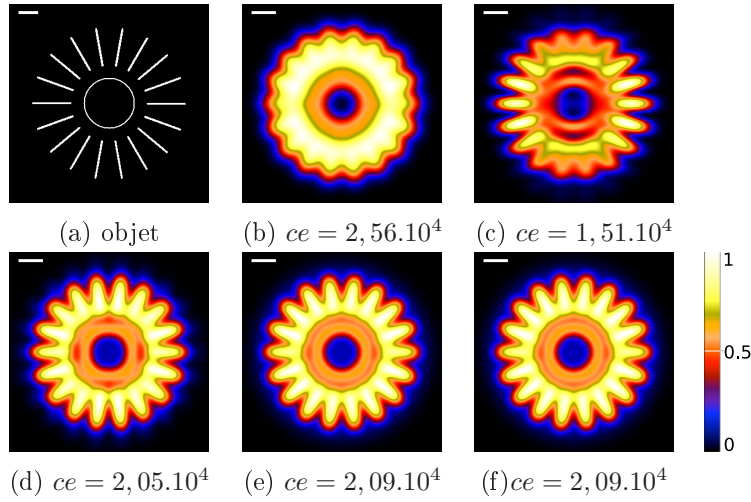


FIG. 2.4 – Moyennes d’images non bruitées. (a) Objet, (b) Image obtenue pour un système confocal classique, (c) pour un système confocal 3-faisceaux, (d) moyenne de 2 images confocales 3-faisceaux formant un angle de 90° , (e) moyenne de 4 images confocales 3-faisceaux calculées pour des angles de $0, 45, 90$ et 135° , (f) moyenne de 8 images confocales 3-faisceaux calculées pour 8 angles séparés d’un pas de $22,5^\circ$. La barre d’échelle représente 200 nm .

par calcul d’une image moyenne. Dans l’image simulée pour ce système, la partie centrale, hormis le bord intérieur du cercle, n’est pas résolue alors que la partie périphérique l’est à peine. Ceci correspond bien aux limites de résolutions théoriques d’un système confocal classique vis-à-vis des dimensions de l’objet considéré. Le résultat obtenu pour les séries simulées avec $n = 2$ RIO confocale à 3-faisceaux (Figure 2.4(d)) est déjà sensiblement différent. Le critère d’erreur vis-à-vis de l’objet $ce = 2,05.10^4$ augmente de plus de 30 % par rapport au cas d’une image simulée pour une seule RIO confocale 3-faisceaux $ce = 1,51.10^4$. En effet, si la résolution le long de l’axe x semble améliorée, la résolution le long de l’axe y est moins bonne : les rayons dont la direction est proche de l’axe x sont maintenant distincts les uns des autres dans leur partie périphérique, alors que les bases des rayons dont les directions sont proches l’axe y , sont maintenant confondues. Le résultat obtenu pour la fusion d’une série avec $n = 4$ (Figure 2.4(e)), ne présente pas d’amélioration visible de la résolution par rapport au cas précédent. D’ailleurs, la valeur du critère d’erreur ($ce = 2,09.10^4$) subit une légère augmentation par rapport au cas $n = 2$. En effet, si la forme de la zone entre le cercle et les rayons semble mieux résolue, cela s’accompagne d’une perte de contraste par rapport à celui obtenu précédemment le long des axes x et y . Le résultat obtenu pour la fusion d’une série avec $n = 8$ (Figure 2.4(f)), est quasiment identique au précédent, sans amélioration visible de la résolution ni de changement de contraste importants. Le critère d’erreur $ce = 2,09.10^4$ ne subit plus de variations significative.

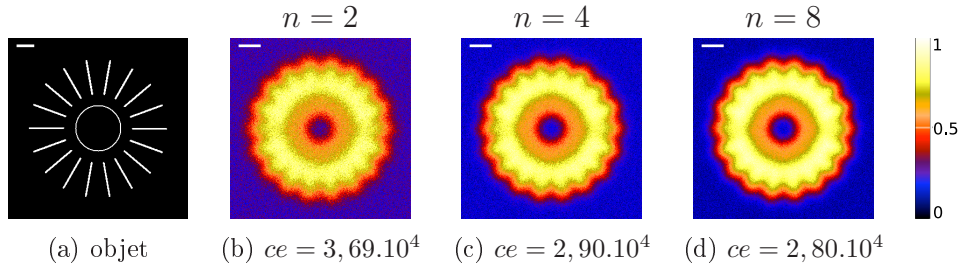


FIG. 2.5 – Moyennes d’images confocales classiques bruitées. (a) objet binaire, les figures suivantes présentent le résultat du moyennage de : (b) 2 images, (c) 3 images et (d) 4 images. Le rapport signal à bruit dans les images avant moyennage est de 20 dB . Le critère d’erreur ce vis-à-vis de l’objet est donné pour chaque moyenne. La barre représente 200 nm

Les résultats présentés ont été obtenus à partir de simulations d’images non bruitées. Il convient donc de s’interroger sur l’effet du bruit sur cette méthode. Classiquement, le bruit pose un problème important dans le traitement numérique des images. Dans le cas d’une fusion par moyennage, la situation est légèrement différente. Chaque image étant entachée d’une réalisation de bruit différente, on attend donc un effet un lissage permettant d’améliorer le rapport signal à bruit.

Nous avons vu que la RIO confocale classique présente une symétrie circulaire et que, par conséquent, elle était invariante en rotation. De ce fait, le moyennage n’apporte pas d’amélioration de la résolution, mais devrait permettre un lissage des images bruitées.

A titre d’exemple, la Figure 2.5 présente les résultats de moyennage obtenus pour des images bruitées simulées pour un système confocal classique. Le rapport signal à bruit dans les images avant moyennage est de 20 dB . Les moyennages calculés prennent en compte des séries de 2 (Fig.2.5(b)), 4 (Fig.2.5(c)) et 8 (Fig.2.5(d)) images. Les résultats obtenus confirment l’effet de lissage : le critère d’erreur diminue lorsque le nombre d’images pris dans la moyenne augmente. Sa valeur passe de $ce = 3,69.10^4$ pour $n = 2$ à $ce = 2,90.10^4$ pour $n = 4$ pour finalement atteindre $ce = 2,80.10^4$ pour $n = 8$.

On calcule maintenant les moyenne des images simulée pour un système 3-faisceaux avec différents niveaux de bruit dans des séries de $n = 2, 4$ et 8.

La Figure 2.6 donne les moyennes pour des séries de $n = 2,4$ et 8 images simulées pour des RIO confocales 3-faisceaux et bruitées avec des rapports signal à bruit de 20 dB (a-c) et 3 dB (d-f). Les valeurs du critère d’erreur sont données pour chacune de ces moyennes. Ces résultats montrent tout d’abord que contrairement

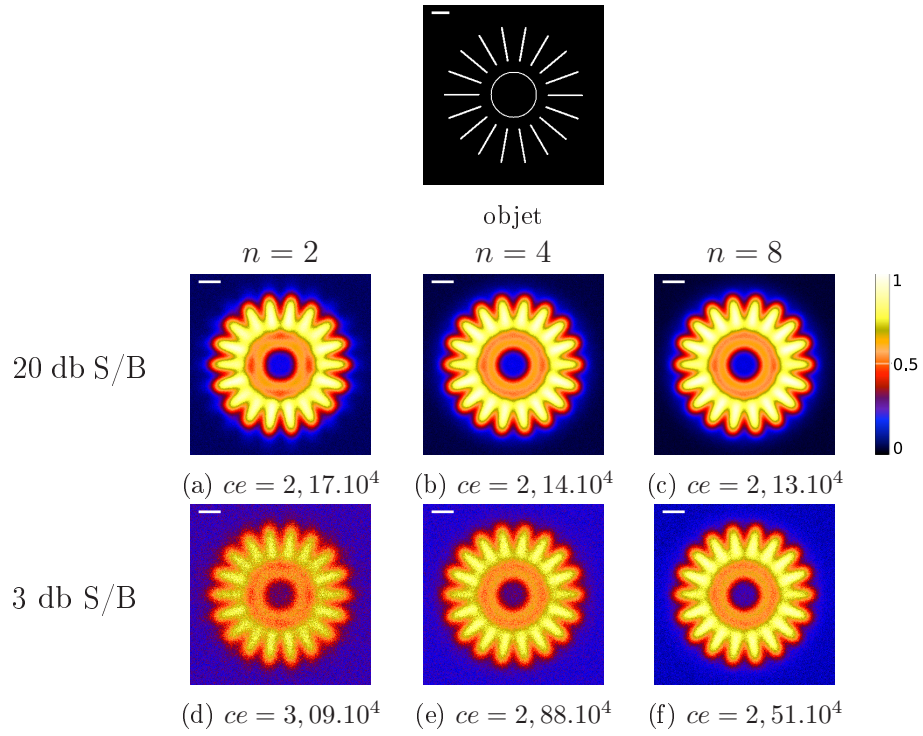


FIG. 2.6 – Moyenne d’images simulées pour une RIO confocale 3-faisceaux. (a) objet. Les images d’origine sont bruitées avec un rapport S/B de 20 dB (a-c) puis de 3 dB (d-f), pour des séries à $n = 2, 4$ et 8 images. Le critère d’erreur ce vis-à-vis de l’objet est donné pour chaque Moyenne. La barre représente 200 nm.

au cas sans bruit, la valeur du critère d'erreur diminue avec le nombre d'images pris en compte dans la moyenne. Pour le cas d'un rapport signal à bruit 3 dB la valeur du critère d'erreur passe de $ce = 2,17.10^4$ (Fig. 2.6(b)) pour une moyenne de deux images à $ce = 2,14.10^4$ (Fig. 2.6(c)) pour quatre images et atteint $ce = 2,13.10^4$ (Fig. 2.6(d)) pour huit. La diminution de l'erreur est encore plus sensible dans le cas à 20 dB : $ce = 3,09.10^4$, $ce = 2,88.10^4$ et $ce = 2,51.10^4$ respectivement pour $n = 2,4,8$ (Fig. 2.6(e-g)).

Ces résultats montrent que le calcul de moyenne joue plus sur le bruit par l'effet du lissage que sur la résolution. En effet, quand le bruit est nul, plus le nombre de noyaux est important, plus l'erreur augmente. Dans les cas avec bruit, plus le nombre de noyaux est important, plus l'erreur diminue. De plus cette diminution est d'autant plus sensible que le niveau de bruit dans les images de départ est important.

Notons que la fusion par moyennage à 2, 4 ou 8 noyaux, appliquée au cas de RIO confocale 3-faisceaux permet d'obtenir une meilleure résolution que dans le cas d'un système confocal classique. Il faut également noter que, par rapport au cas d'un système confocal 3-faisceaux simple, cette technique permet d'obtenir une résolution isotrope. D'autre part, la méthode permet une diminution importante de l'effet du bruit sur la qualité de l'image. Cependant, comme il a été montré, il existe une perte d'information globale : si la résolution est améliorée localement et dans certaines directions, elle est altérée par ailleurs. Ceci est à relier à l'opération de moyennage : la résolution finale obtenue correspond à une résolution moyenne et non pas au meilleur de la résolution de chaque image d'origine. Une autre méthode est donc à envisager.

2.3.2 Fusion dans l'espace de Fourier : FIF

Nous avons pu noter dans le développement précédent que la fusion d'images par moyennage ne permettait pas d'obtenir une amélioration satisfaisante de la résolution dans toutes les directions du plan de l'image. En effet, le fait de calculer une image moyenne ne permet pas de tirer le meilleur de chaque image, mais de faire la somme des qualités et des défauts de chacune. Nous avons donc étudié une autre méthode basée sur une fusion dans l'espace de Fourier [Li et coll., 2001].

Rappelons, comme il a été précisé dans la section 1.3 que dans le domaine des fréquences, l'OTF \widehat{H} peut être considérée comme un filtre qui ne transmet que partiellement les fréquences spatiales de l'objet. De ce point de vue, l'amélioration

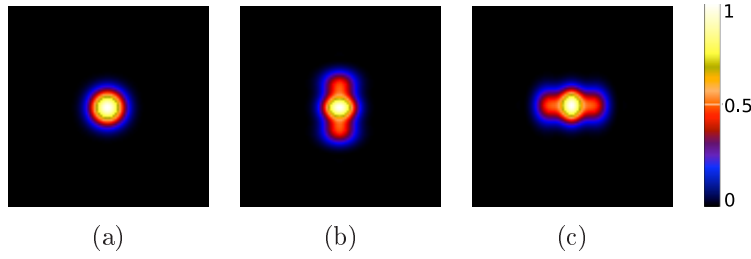


FIG. 2.7 – Modules des FTO : confocale classique (a), confocale 3-faisceaux pour une polarisation de l'illumination le long de l'axe x (b), confocale 3-faisceaux pour polarisation de l'illumination le long de l'axe y .

de la résolution sur l'axe y , permise par l'illumination à trois faisceaux, peut s'interpréter comme une meilleure transmission des fréquences spatiales de l'objet le long de cet axe.

Autrement dit, le support de l'OTF du système est plus étendu et les hautes fréquences moins atténuées le long de l'axe ω_y pour une illumination à trois faisceaux confocalisée, que pour un système confocal classique.

La Figure 2.7 donne le modules des FTO : confocale classique (a), confocale 3-faisceaux (b) et confocale 3-faisceaux pour une illumination orientée à 90° par rapport à l'axe x . On peut constater sur cette figure que les fréquences sont mieux transmises selon un axe pour les FTO confocales 3-faisceaux. Une série d'images acquises pour différentes orientations de l'illumination à trois faisceaux correspond donc au filtrage par une série d'OTF dont les supports montrent une élongation dans différentes directions. Ceci se traduira par une série d'images dans lesquelles les détails seront mieux représentés le long de différentes directions. Par conséquent, au cours de la série d'acquisition, les fréquences transmises couvrent un support élargi dans plusieurs directions.

Il existe donc, dans chaque image d'une même série, des fréquences mieux transmises que dans les autres. La méthode proposée consiste en l'occurrence, pour une même série d'images, à comparer point à point le niveau de signal dans le domaine de Fourier et d'extraire la valeur du point de plus grande énergie. Pour un pixel de coordonnées (x, y) , dans une série de n images prises dans le domaine de Fourier on définit $\hat{I}_m(x, y)$ tel que :

$$\left| \hat{I}_m(x, y) \right|^2 = \max \left\{ \left| \hat{I}_1(x, y) \right|^2 ; \left| \hat{I}_2(x, y) \right|^2 ; \dots ; \left| \hat{I}_{n-1}(x, y) \right|^2 ; \left| \hat{I}_n(x, y) \right|^2 \right\} \quad (2.3)$$

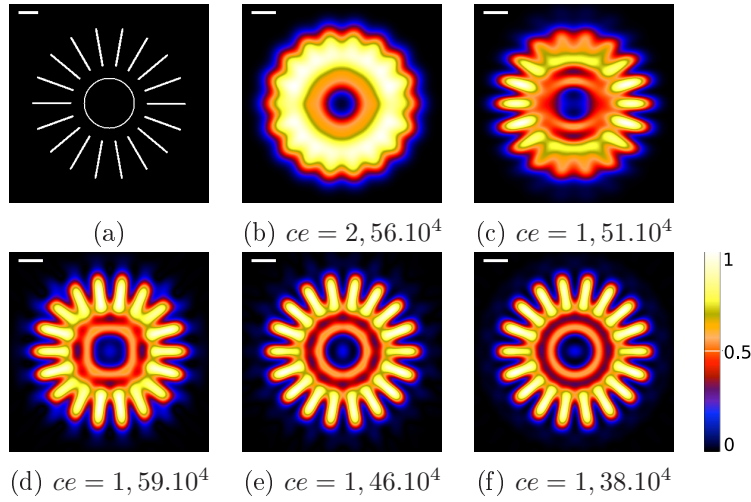


FIG. 2.8 – Résultats d’une fusion FIF d’images non bruitées. (a) Objet, (b) Image obtenue pour un système confocal classique, (c) pour un système confocal 3-faisceau. (d) fusion FIF de 2 images confocales 3-faisceaux formant un angle de 90° , (e) fusion FIF de images confocales 3-faisceaux calculées pour des angles de $0, 45, 90$ et 135° , (f) fusion FIF de 8 images confocales 3-faisceaux calculées pour 8 angles séparés d’un pas de $22,5^\circ$. La barre d’échelle représente 200 nm .

La valeur complexe de la transformée de Fourier \hat{I}' au pixel (x, y) est donc donnée par :

$$\hat{I}'(x, y) = \hat{I}_m(x, y) \quad (2.4)$$

Chaque fréquence transmise de l’objet est alors utilisée avec une transmission optimale dans l’image finale.

La Figure 2.8 donne les résultats d’une telle méthode de fusion. L’objet est présenté en (a) tandis que l’image simulée pour un système confocal classique est présentée en (b) l’image pour un système confocal 3-faisceaux en polarisation linéaire selon l’axe x en (c). Les résultats de la fusion dans le domaine de Fourier (FIF) obtenus pour un système confocal 3-faisceaux sont présentés avec des séries de n noyaux. Pour $n = 2$ et $\theta = 0^\circ$ et 90° en (Fig. 2.4(b)), $n = 4$ et $\theta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$ et 135° en (Fig. 2.4(c)), et finalement pour $n = 8$ avec θ variant par pas de $22,5^\circ$ en (Fig. 2.4(d)).

Rappelons tout d’abord que dans le cas d’un système confocal classique, toutes les images d’une même série sont identiques. De la même façon que pour la fusion par moyennage, la méthode FIF ne présente donc pas d’intérêt : le résultat obtenu sera identique à toutes les images de la série. Les Figures 2.8(b) et 2.8(c) ont été étudiées précédemment et ne sont présentées ici qu’à titre de comparaison. Le

résultat obtenu pour les séries simulées avec $n = 2$ RIO confocales à 3-faisceaux et donné sur la Figure 2.8(d). Le critère d'erreur vis-à-vis de l'objet $ce = 1,59.10^4$ augmente faiblement (5 %) par rapport au cas d'une image simulée pour une seule RIO confocale 3-faisceaux $ce = 1,51.10^4$. On peut voir que la résolution le long de l'axe x semble améliorée, tout en préservant la résolution long de l'axe y : les rayons sont distincts de la périphérie et au niveau de leur bases. Le cercle central est quasiment résolu. En effet, des zones de plus fortes intensités demeurent pour les directions $45^\circ/225^\circ$ et $135^\circ/315^\circ$, ce qui correspond aux angles non pris en compte dans la série. La légère augmentation du critère d'erreur peut être imputée aux rebonds que l'on voit apparaître autour de l'objet et qui correspondent aux lobes latéraux de la RIO confocale 3-faisceaux. Le résultat obtenu pour la fusion d'une série avec $n = 4$ (Figure 2.8(f)), présente une légère amélioration de la résolution par rapport au cas précédent. L'erreur ($ce = 1,46.10^4$) diminue légèrement par rapport au cas $n = 2$ pour prendre une valeur inférieure au cas à un noyau, sans fusion. En effet, le cercle central est maintenant mieux résolu. On note ici également la présence de zone d'intensité plus élevée dans les directions non prises en compte dans la série. Les rebonds présents autour de la figure sont atténués. Pour la fusion d'une série avec $n = 8$ (Figure 2.8(g)), l'erreur diminue significativement pour passer à $ce = 1,38.10^4$. Dans ce cas, les rebonds sont encore atténués et les zones de plus fortes intensités en bordure du cercle ont quasiment disparues.

La technique de fusion FIF permet donc de tirer parti du gain en résolution dans plusieurs directions qu'offre une série d'images acquises pour différents angles de la RIO confocale 3-faisceaux. Cependant les simulations réalisées ne tiennent pas compte du bruit qui apparaît lors d'une acquisition en conditions réelles. Dans ce type de méthode de fusion en particulier, il est légitime de penser que la sensibilité au bruit est d'autant plus importante que l'on réalise ici non pas une moyenne, mais une sélection de fréquences sur les pixels de plus haute énergie. Le bruit peut alors perturber le processus de sélection en ajoutant des fréquences qui ne devraient théoriquement pas être transmises ou qui n'existent pas dans le support de l'objet.

Afin d'éviter ce phénomène, nous réalisons un pré-filtrage. Le principe mis en œuvre dans notre cas, consiste à opérer l'opération de fusion sur les fréquences qui correspondent au support de l'OTF. Si cette méthode ne permet pas de supprimer l'effet du bruit sur les fréquences transmises, elle permet de supprimer le bruit haute fréquence dont on peut penser qu'il est plus perturbateur pour la lisibilité de l'image finale.

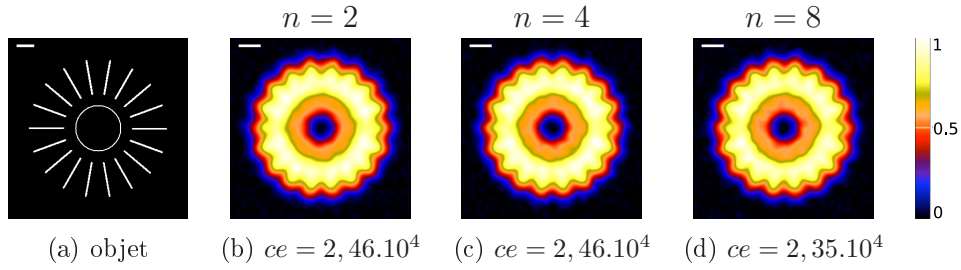


FIG. 2.9 – Fusion FIF d’images confocales classiques bruitées. (a) objet binaire, les figures suivantes présentent le résultat de la fusion de : (b) 2 images, (c) 3 images et (d) 4 images. Le rapport signal à bruit dans les images avant moyennage est de 20 *dB*. Le critère d’erreur *ce* vis-à-vis de l’objet est donné pour chaque résultat de fusion. La barre représente 200 *nm*

Le filtre utilisé est une simple fonction porte qui coupe les fréquences au-delà d’une fréquence de coupure f_c . Cette fréquence de coupure est égale à la plus haute fréquence spatiale transmise par le support de l’OTF confocale 3-faisceaux et ce pour toutes les images. Le filtre Π s’écrit donc :

$$\Pi(\mu_x, \mu_y) = \begin{cases} 1 & \text{si } (\mu_x^2 + \mu_y^2) \leq f_c^2 \\ 0 & \text{si } (\mu_x^2 + \mu_y^2) > f_c^2 \end{cases} \quad (2.5)$$

La Figure 2.9 présente les résultats de fusion FIF obtenus pour des images bruitées simulées pour un système confocal classique. Le rapport signal à bruit dans les images avant fusion est de 20 *dB*. Les fusions ont été calculées en prenant en compte des séries de 2 (Fig.2.9(b)), 4 (Fig.2.9(c)) et 8 (Fig.2.9(d)) images. Les résultats obtenus présentent des particularités due à la méthode utilisée. En effet, la valeur du critère d’erreur est identique dans les deux premier cas : $ce = 2,46 \cdot 10^4$ pour $n = 2$ et $n = 4$. D’autre part, le critère diminue à $ce = 2,35 \cdot 10^4$ pour $n = 8$.

Les images utilisées sont a priori comparables en terme de rapport signal à bruit et de fréquences transmises. D’autre part, on attend pas ici d’effet de lissage. La diminution du critère d’erreur peut s’expliquer différemment. Dans chaque image, les fréquences portées par le support de l’OTF ne sont transmises que partiellement. L’addition de bruit couplé au filtrage des hautes fréquences implique un rehaussement de certaines fréquences transmises par le support de l’OTF. Ce phénomène peut alors artificiellement avantager des fréquences de l’objet qui n’étaient que partiellement transmises. Ceci se traduit alors par une diminution du critère d’erreur.

Les fusions FIF d’images bruitées pour un système 3-faisceaux confocal sont présentées dans la Figure 2.10.

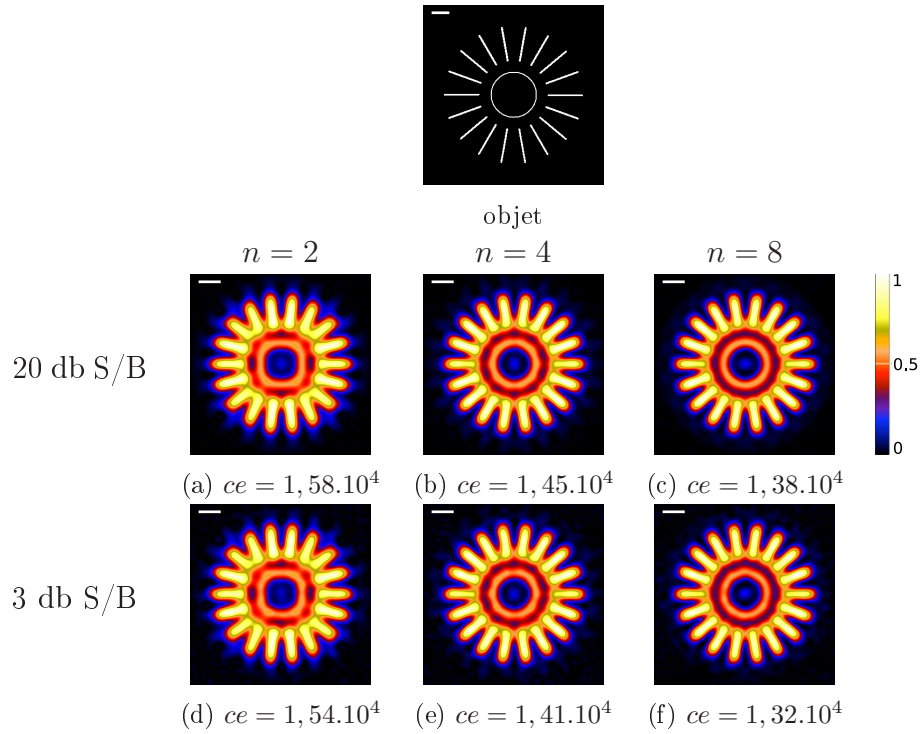


FIG. 2.10 – Fusions d’images simulées pour une RIO confocale 3-faisceaux. (a) objet. Les images d’origine sont bruitées avec un rapport S/B de 20 dB (a-c) puis de 3 dB (d-f), pour des séries à $n = 2,4$ et 8 images. Le critère d’erreur ce vis-à-vis de l’objet est donné pour chaque résultat de fusion. La barre représente 200 nm.

La Figure 2.10 illustre le comportement de la fusion FIF sur des séries d'images simulées pour un système 3-faisceaux confocal. Les images d'origine sont bruitées avec un rapport S/B de 20 dB (a-c) puis de 3 dB (d-f), pour des séries à $n = 2, 4$ et 8 images.

Tout d'abord, on peut constater que pour un même niveau de bruit, le critère d'erreur diminue avec le nombre d'images d'origines dans la série. Pour un rapport signal à bruit de 20 dB, la valeur du critère d'erreur passe de $ce = 1,58.10^4$ pour $n = 2$ (Fig. 2.10(b)) à $ce = 1,45.10^4$ pour $n = 4$ (Fig. 2.10(c)) et atteint $ce = 1,38.10^4$ pour $n = 8$ (Fig. 2.10(d)). Pour les séries où les images d'origines sont bruitées avec un rapport signal à bruit de 3 dB les valeurs du critère d'erreur sont $ce = 1,54.10^4$, $ce = 1,41.10^4$ et $ce = 1,32.10^4$ respectivement pour $n = 2, 4$ et 8 (Fig. 2.10(e-g)).

Le deuxième point intéressant à noter est que, paradoxalement, l'erreur diminue quand le niveau de bruit augmente, en particulier pour les séries à $n = 8$. On retrouve ce qui a été observé dans la Figure 2.9 et on peut avancer la même explication. Ces résultats amènent quelques réflexions.

Tout d'abord, nous sommes ici dans le cas d'un objet binaire très particulier avec des bords francs qui représentent une information très étendue en terme de fréquences spatiales. Ensuite, le fait que le critère d'erreur diminue, ne permet pas d'assurer de façon certaine que l'image reconstruite soit plus proche de la réalité. En effet, l'observation minutieuse la Figure 2.10(g), montre qu'il y a une certaine granulosité dans l'image obtenue. Or, un observateur n'ayant aucune information a priori sur l'objet serait sans doute induit en erreur quant à la forme de l'objet. On retiendra donc simplement que le bruit n'affecte pas de façon déterminante le procédé de fusion FIF associée à un pré-filtrage. Au final, tout dépend du compromis souhaité entre le gain en résolution et le rendu final. Rappelons toutefois que le but de ce montage associé à cette méthode de fusion n'est pas de combattre le bruit, mais bien d'obtenir une résolution améliorée dans toutes les directions de l'espace. La recherche d'un niveau de bruit minimum doit alors être menée en amont, durant le processus d'acquisition.

2.4 Techniques de déconvolution

2.4.1 Rappels sur la déconvolution

La déconvolution est une méthode de traitement numérique de l'image ayant pour but d'améliorer la résolution d'une image afin de la rendre plus fidèle à l'objet

observé [McNally et coll., 1999 ; Verveer, 1998]. L'équipe au sein de laquelle a été réalisé cette étude travaille sur ce sujet depuis quinze ans et a acquis une expertise dans ce domaine [Chomik, 1997 ; Chomik et coll., 1997 ; Colicchio et coll., 2005 ; Haeberlé et coll., 2001]. C'est pourquoi cette méthode a été envisagée parmi les traitements numériques applicables au cas de la technique basée sur une succession d'illuminations 3-faisceaux.

Plus précisément, la déconvolution consiste à résoudre par des méthodes numériques le problème posé par la résolution de l'équation (1.3) afin d'estimer au mieux O [Atkinson, 1997]. Dans cette équation, seule I est connue, de façon précise. La RIO (H) peut-être inconnue ou partiellement connue. On parle alors de déconvolution myope ou aveugle [Holmes et O'Connor, 2000 ; Holmes, 1992 ; MacCallum, 1990]. Toutefois, la plupart du temps, on considère que la RIO est connue, soit qu'elle ait été mesurée, soit qu'elle ait été calculée. D'autre part, on peut estimer les propriétés statistiques du bruit b . Enfin il est concevable que dans certain cas, on puisse avoir une connaissance a priori sur certaines propriétés de l'objet O [Homem et coll., 2002].

Afin de trouver une solution à ce problème, il faut avoir recourt à des algorithmes qui nécessitent la mise en place de plusieurs outils. Le premiers de ces outils est un critère d'erreur qui permet d'évaluer le degré de ressemblance du résultat obtenu. Généralement, les algorithmes de déconvolution se basent sur un compromis à réaliser entre la ressemblance, et l'amplification du bruit [Tikhonov et Arsenin, 1977]. C'est pourquoi, le deuxième outil à mettre en place consiste en une fonction de coût qui permet d'évaluer ce compromis. D'autre part, il arrive qu'une connaissance a priori de certaines caractéristiques de l'objet permette de baliser l'espace des solutions. Enfin, le dernier outil consiste en un algorithme de minimisation, ayant pour but de trouver le minimum de la fonction de coût.

Bien que leur structure générale soit la même, il est possible de distinguer deux grandes familles d'algorithmes de déconvolution. En effet, il existe au moins deux approches du processus de formation d'images. L'approche déterministe [Jansson et coll., 1984 ; Meinel, 1986 ; Van Cittert, 1931] et l'approche Bayésienne [Conchello, 1998 ; Demoment et Idier, 2001 ; Holmes, 1988 ; Holmes et Liu, 1989 ; Hunt, 1994 ; Lucy, 1974 ; Richardson, 1972]. L'approche déterministe est directement basée sur les lois de l'optique diffractive, et l'image finale correspond bien à une collection de RIO.

L'approche Bayésienne, quant à elle, fait référence à une approche statistique de la formation d'image où l'on étudie la probabilité pour un photon d'être localisé

dans l'espace image. Cette approche est basée sur la statistique Poissonnienne dans la mesure où c'est à cette loi qu'obéit la probabilité de détection d'un photon sur un capteur CCD.

Parmi ces deux grandes familles d'algorithmes, on peut distinguer deux autres sous-groupes dans chaque famille selon qu'il existe une solution analytique ou non au problème de la minimisation de la fonction de coût. Dans le cas d'une solution analytique existante, on parlera d'algorithme direct. Dans le cas contraire, un processus itératif est utilisé pour trouver ce minimum, on parle alors d'algorithme itératifs.

La mise en œuvre d'un algorithme de déconvolution adapté à notre problème de tirer le meilleur partie d'une série d'images présentant des gains en résolution selon différentes directions, semble *a priori* possible. Cependant, les algorithmes classiques ne mettent pas en jeu des séries d'images obtenues pour des séries de RIO différentes. Dans le cadre de la technique que nous proposons, il faudrait alors réaliser plusieurs déconvolutions dont on fusionnerait ensuite les résultats. Deux raisons essentielles nous ont détourné de cette approche. La première tient au fait que la déconvolution d'une image représente un coût en temps de calcul qui peut, dans certains cas être considéré comme handicapant. *A fortiori*, pour une série de déconvolutions le temps serait multiplié autant de fois qu'il y a d'images dans la série. D'autre part, un algorithme de déconvolution multi-noyaux a été étudié par [Goudail et coll., 2000] et correspondrait bien à la problématique qui nous est posée.

2.4.2 Déconvolution à n-noyaux

[Ghiglia, 1984] a proposé une approche à noyaux multiples pour la déconvolution simultanée de plusieurs images représentant plusieurs versions d'une même scène. Par plusieurs versions, il faut comprendre des images acquises avec une fonction de transfert variant au cours de la série. Cette approche permet de prendre en compte la diversité des informations transmises au travers des différentes acquisitions.

De plus, elle permet de s'affranchir en partie d'une contrainte importante des techniques de déconvolutions : la présence de zéros dans la fonction de transfert impliquant la perte de certaines fréquences. Dans le cas d'une approche à plusieurs versions, la fonction de transfert variant pour chacune d'elle, les zéros seront en partie différemment placés. De ce fait, les fréquences absentes dans une image, seront présentes dans une autre.

Une étude approfondie de la déconvolution à plusieurs noyaux a été menée par [Goudail et coll., 2000] dans le but d'en évaluer l'efficacité et la robustesse. Nous proposons d'évaluer cette méthode dans le cadre de l'illumination à trois faisceaux. Considérons l'acquisition d'une série de k images d'une même scène O convoluée par les k noyaux résultant des k rotations de la RIO d'illumination 3-faisceaux. Dans ce cas particulier et dans le domaine des fréquences spatiales, l'équation 1.3 devient :

$$I^{(k)}(x, y, z) = \int_{-\infty}^{+\infty} H^{(k)}(x - x_1, y - y_1, z - z_1) O^{(k)}(x_1, y_1, z_1) dx_1 dy_1 dz_1 \oplus b^{(k)}(x, y, z) \quad (2.6)$$

où $b^{(k)}$ est considéré comme un tirage indépendant de bruit blanc Gaussien pour chaque image de la série. La méthode de déconvolution considérée par [Goudail et coll., 2000] consiste en une régularisation selon Thikonov utilisant la norme d'un filtre Laplacien comme fonction de régularisation dont le but est de contrebalancer l'effet des hautes fréquences. L'objet estimé est la solution minimisant la fonction de coût F :

$$F(\mathbf{O}') = \sum_{k=1}^n \|\mathbf{I}^{(k)} - \mathbf{H}^{(k)} \otimes \mathbf{O}'\|^2 + \xi \|\mathbf{L} \otimes \mathbf{O}'\|^2 \quad (2.7)$$

où \mathbf{O}' est l'estimée de l'objet devant minimiser la fonction de coût, \mathbf{L} la réponse impulsionnelle du filtre Laplacien, et ξ un paramètre de régularisation permettant d'ajuster l'effet de \mathbf{L} . Notons que nous avons bien une fonction de coût qui met en jeu un critère de ressemblance (ici la somme des erreurs quadratiques des n images) et un outils de régulation de l'effet du bruit à travers le filtre Laplacien. Il a été démontré [Goudail et coll., 2000] que la minimisation de cette fonction de coût présentait une solution analytique à travers l'opérateur de déconvolution suivant dans le domaine de Fourier :

$$\hat{O}'(\omega_x, \omega_y) = \frac{\sum_{k=1}^n \hat{H}_k(\omega_x, \omega_y) \times \hat{I}_k(\omega_x, \omega_y)}{\sum_{k=1}^n \left| \hat{H}_k(\omega_x, \omega_y) \right|^2 + \xi |L(\omega_x, \omega_y)|^2} \quad (2.8)$$

Il doit être précisé que les déconvolutions présentées par la suite ont été effectuées pour une valeur de ξ minimisant le critère d'erreur. Ceci implique la réalisation d'une série de déconvolutions pour lesquelles le paramètre ξ varie et l'erreur est estimée. Il est cependant tout à fait envisageable d'automatiser cette procédure à l'instar de ce qui a été réalisé pour les algorithmes *LLS* et *MAP* par [Colicchio et coll., 2005] durant sa thèse au laboratoire MIPS.

Application de la déconvolution n-noyaux à un système 3-faisceaux confocal

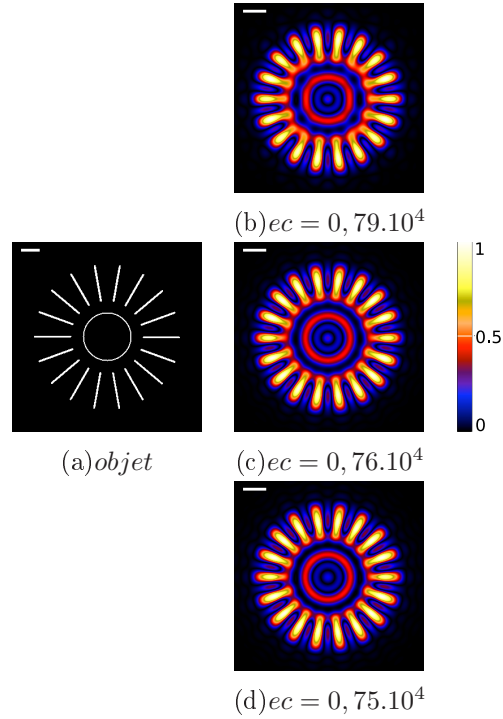


FIG. 2.11 – Déconvolution multi-noyaux calculé pour l'objet binaire (a) dont l'acquisition a été simulée pour (b) $n = 2$ et $\theta = 0^\circ$ et 90° , (c) $n = 4$ et $\theta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$, et 135° , (d) $n = 8$ et θ variant par pas de $22,5^\circ$.

Cette méthode de déconvolution multi-noyaux a été appliquée aux séries d'images obtenues par simulations numériques. La Figure 2.11 montre l'objet binaire (a) dont l'acquisition a été simulée pour $n = 2$ et $\theta = 0^\circ$ et 90° (Fig. 2.11(b)), $n = 4$ et $\theta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$ et 135° (Fig. 2.11(c)), et finalement pour $n = 8$ avec θ variant par pas de $22,5^\circ$ (Fig. 2.11(d)). Si, comme attendu, un nombre important d'acquisition permet une excellente reconstruction de l'objet, le résultat obtenu pour une série de quatre images permet déjà une reconstruction très satisfaisante.

Ce résultat présente un intérêt non négligeable dans le cadre d'un mise en œuvre pratique, dans la mesure où il permet d'obtenir une reconstruction convenable avec un moindre nombre d'acquisition, évitant ainsi des phénomènes de photoblanchiment ou permettant tout simplement d'augmenter la vitesse d'acquisition. Ceci est important pour l'observation de spécimens vivants, pouvant bouger durant un

long processus d'acquisition. Notons que dans le cas de spécimens pour lesquels il existe une information *a priori* comme par exemple une orientation préférentielle de fibres ou des spécimens 1-D comme des fragments d'ADN ou des microtubules, il est tout à fait envisageable de choisir des directions de polarisation préférentielles afin de réduire le nombre d'acquisitions tout en assurant un transfert optimal des fréquences de l'objet et donc une reconstruction performante.

La suite de cette étude a été publiée en 2006 à partir de résultats simulés pour un objet binaire représentant la formule d'Abbe. Le choix de cet objet particulier est un hommage à ce scientifique dont le centenaire de la mort avait lieu en 2005 alors que ces travaux étaient présentés au congrès *Focus on Microscopy* à Jena, sa ville natale. D'autre part, cet objet a pour avantage de présenter une géométrie plus quelconque que la mire radiale précédemment utilisée. La Figure 2.12 donne les résultats obtenus pour cet objet dont les acquisitions et les déconvolutions ont été simulées de la même façon que dans la Figure 2.12. Dans la Figure 2.12 l'acquisition a été simulée pour $n = 2$ et $\theta = 0^\circ$ et 90° (Fig. 2.12(b)), $n = 4$ et $\theta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$ et 135° (Fig. 2.12(c)), et finalement pour $n = 8$ avec θ variant par pas de $22,5^\circ$ (Fig. 2.12(d)).¹ On peut constater sur cette figure que le résultat est déjà satisfaisant pour une déconvolution à $n = 4$ noyaux.

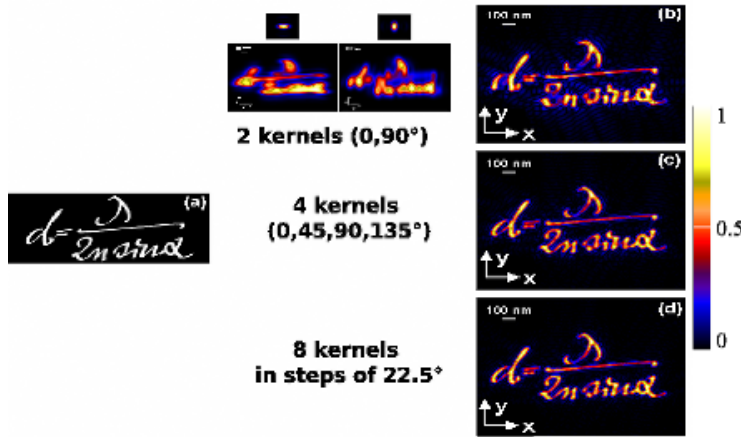


FIG. 2.12 – Déconvolution multi-noyaux calculé pour un objet binaire (a) dont l'acquisition a été simulée pour (b) $n = 2$ et $\theta = 0^\circ$ et 90° , (c) $n = 4$ et $\theta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$, et 135° , (d) $n = 8$ et θ variant par pas de $22,5^\circ$.

¹Il doit être précisé que ces déconvolutions ont été effectuée pour une valeur de ξ minimisant le critère d'erreur.

Effet du bruit dans la déconvolution n-noyaux

Un autre paramètre limitant de la déconvolution est la présence de bruit. En effet, le bruit peut, à travers le processus de déconvolution, se trouver amplifié de façon importante, réduisant ainsi de façon drastique la qualité du résultat obtenu, jusqu'à rendre nul l'intérêt du processus lui-même. Il convient donc, dans le procédé de déconvolution, de déterminer le niveau de régularisation optimal en fonction du niveau de bruit dans l'image [Colicchio et coll., 2005].

Dans le cas de la déconvolution à plusieurs noyaux, le cas est plus favorable. En effet, on peut considérer que chaque image d'une série est entachée d'une réalisation de bruit différente. [Goudail et coll., 2000] ont étudié l'avantage que représente l'approche de la déconvolution à plusieurs noyaux quant à la robustesse au bruit dans le cas d'une déconvolution à deux noyaux. Les auteurs mettent en évidence l'effet positif du moyennage du bruit permit par cette approche. En effet, cette dernière est basée en partie sur l'addition des différentes images de la série (Eq. (2.8)). Par conséquent, il est envisageable d'augmenter la robustesse au bruit en augmentant le nombre d'images acquises avec différentes fonctions de transfert. L'avantage que présente la déconvolution à plusieurs noyaux associée à une technique d'illumination permettant des RIO de largeur réduite, est donc double : augmenter la résolution finale par la combinaison d'information obtenues à travers plusieurs vues d'une même scène, mais aussi diminuer la sensibilité au bruit du procédé de déconvolution.

Dans les Figures 2.13(b-d), sont représentées les simulations de l'acquisition de l'objet représenté dans la Figure 2.12(a) calculées pour des réalisations de bruit dont les rapports signal sur bruit sont différents et pour une illumination à trois faisceaux, une détection confocale et une même orientation de la polarisation $\theta = 90^\circ$. Les Figures 2.13(e-g) montrent le résultat des déconvolutions 4-noyaux basées sur des série de 4 images simulées pour des noyaux orientés à $\theta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$ et 135° , et un rapport signal à bruit de 20 dB et 3 dB respectivement. A titre de comparaison, les Figures 2.13(h-j) montrent le résultat d'une déconvolution mono-noyau sur des images simulant une acquisition conventionnelle en microscopie confocale pour une RIO classique obtenue pour une polarisation le long de l'axe x avec les mêmes rapports signal à bruit.

Les déconvolutions à un noyau ont été obtenues simplement en utilisant l'équation (2.8) avec $n = 1$. Dans le but d'obtenir une comparaison équitable, les Figures 2.13(h-j) représentent la moyenne de quatre déconvolutions pour quatre images simulées avec quatre réalisations de bruit différentes, afin de réduire l'effet du bruit comme le fait la déconvolution à plusieurs noyaux.

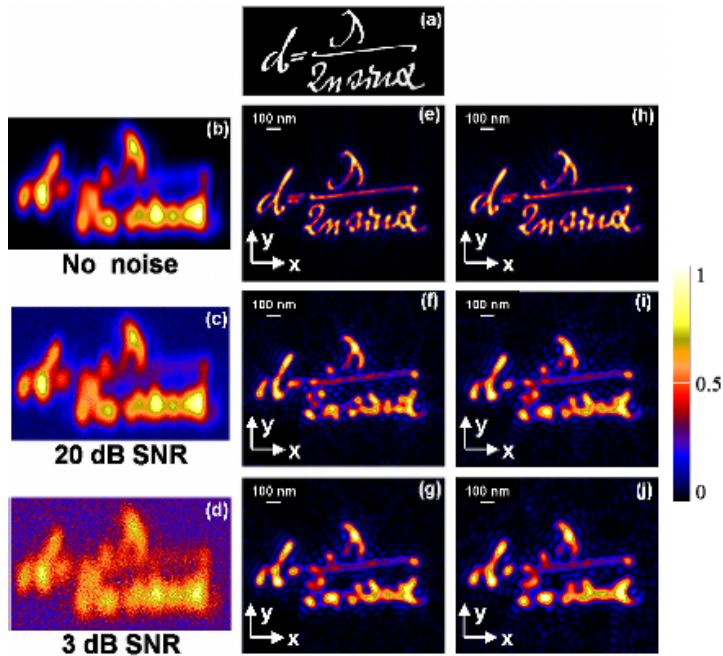


FIG. 2.13 – Comparaison de la déconvolution multi-noyaux avec une RIO rétrécie latéralement et une déconvolution mono-noyau avec une RIO confocale classique, pour différents niveaux de bruit : sans bruit, $S/B = 20 \text{ dB}$ et $S/B = 3 \text{ dB}$. (a) Objet, (b)-(d) : simulations de l’acquisition avec une RIO confocale 3-faisceaux orientée à $\theta = 90^\circ$ respectivement sans bruit (b) et avec un rapport signal à bruit de 20 dB (c) et 3 dB (d). (e-g) déconvolutions 4-noyaux correspondantes. (h-j) moyennes correspondantes de 4 déconvolutions mono-noyau.

Pour chacun des cas envisagés, le résultat de la déconvolution à 4 noyaux semble donner un résultat de meilleure qualité que la déconvolution à un seul noyau : un examen détaillé montre par exemple que la qualité du résultat obtenu dans la Figure 2.13(i) pour une déconvolution à un noyau et pour un rapport signal sur bruit de 20 dB est comparable à celui obtenu dans la Figure 2.13(g) mais pour une déconvolution à noyaux multiple et pour un rapport signal sur bruit de 3 dB . Cependant, ce critère visuel ne peut-être retenu en raison de sa subjectivité. C’est pourquoi un critère quantitatif mesurant l’écart du résultat de la déconvolution et l’objet doit être calculé.

Choix du paramètre de régularisation

Comme il a été précisé, la valeur choisie pour le paramètre de régularisation ξ importe sur les résultats obtenus lors de la déconvolution. Il convient donc d’étudier l’effet de la variation de ce paramètre sur la qualité de la reconstruction et ce en fonction des niveaux de bruit simulés.

Sur la Figure 2.14, sont représentées les valeurs du critère d'erreur (ce) entre les images déconvoluées et l'objet d'origine en fonction du paramètre de régularisation ξ pour les deux méthodes de déconvolution 4-noyaux (trait plein) et mono-noyau (tirets) et pour deux valeurs du rapport signal à bruit $S/B = 20$ dB (a) et $S/B = 3$ dB (b).

L'analyse des courbes de la Figure 2.14 montre que la valeur optimale de ξ est différente pour chaque type de déconvolution. Cependant, on pourra noter que pour des valeurs de ξ optimales la valeur de l'erreur dans le cas de la déconvolution à noyaux multiples est inférieure au cas de la déconvolution à un noyau et ce pour les deux niveaux de bruit. Ce constat est identique dans le cas d'images sans bruit.

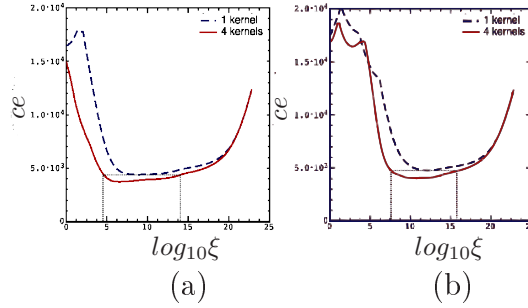


FIG. 2.14 – Courbes donnant le critère d'erreur entre l'objet original et le résultat de déconvolution en fonction du paramètre de régularisation ξ . Comparaison entre une déconvolution mono-noyau (tirets) et une déconvolution 4-noyaux pour une RIO confocale 3-faisceaux (trait plein). (a) $S/B = 20$ dB, (b) $S/B = 3$ dB. Le rectangle en pointillé indique les limites du domaine pour lequel, à une valeur de ξ donnée, la déconvolution multi-noyaux, donne une erreur inférieure à celle obtenue pour la déconvolution mono-noyau.

On pourra aussi noter, sur la Figure 2.14, que la valeur de l'erreur pour une déconvolution à plusieurs noyaux est inférieure à l'erreur obtenue pour une déconvolution mono-noyau sur une large plage de ξ . Ceci montre que la déconvolution à plusieurs noyaux, même si elle n'est pas réalisée à son optimum, donne de meilleurs résultats que la déconvolution à un noyau. C'est un résultat important sur le plan pratique. En effet, dans le cadre d'une utilisation d'un tel algorithme par des non-spécialistes, la marge de manœuvre dans la recherche d'une valeur optimale du paramètre de régularisation est amplifiée.

Ces constatations confirment pour le cas de RIO asymétriques les résultats obtenus par [Goudail et coll., 2000] pour des RIO symétriques, mais de tailles différentes.

Effet d'une erreur de RIO

Une autre propriété de la déconvolution mutli-noyaux mise en évidence par Goudail (et coll.) concerne la robustesse par rapport à la connaissance exacte de la RIO utilisée pour la déconvolution.

Il paraît évident que la qualité de la déconvolution avec l'algorithme que nous avons choisi, dépend de la connaissance du noyau à utiliser, c'est à dire la RIO du système. En raison de l'imprécision des modèles, ou de la qualité des mesures effectuées, cette connaissance de la RIO du système est toujours entachée d'une erreur d'estimation. Il existe donc un décalage entre la RIO réelle du système et la RIO supposée, utilisée pour la déconvolution.

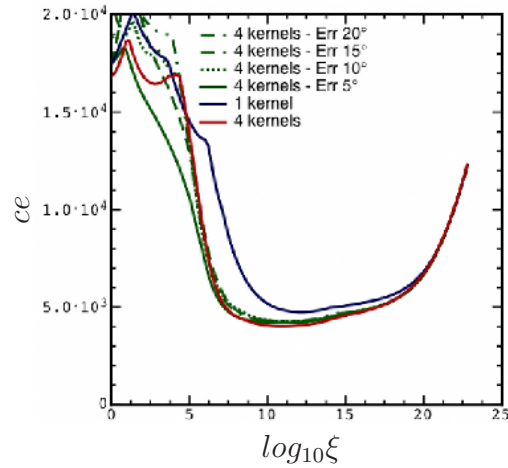


FIG. 2.15 – Courbes donnant le critère d'erreur entre l'objet original et le résultat de déconvolution en fonction du paramètre de régularisation ξ et d'une erreur d'estimation systématique sur l'angle de la RIO servant à la déconvolution pour un rapport signal à bruit de $S/B = 3 \text{ dB}$. Trait plein épais : déconvolution 4-noyaux sans erreur. Trait plein gris : équivalent pour mono-noyau. Trait plein : erreur de 5° . trait pointillé : erreur de 10° . Trait tirets : erreur de 15° . Trait mixte erreur de 20° .

Par exemple dans le montage que nous simulons, l'obtention d'une série de n images passe par n rotations du spécimen par rapport au système. Mais on peut supposer que, dans la pratique, il pourrait exister une erreur dans l'incrément d'angle entre chaque image. La série des n RIO utilisées pour la déconvolution diffère alors de la série des n RIO réelles. Afin d'étudier l'effet d'une erreur d'estimation de la série de RIO utilisée pour la déconvolution, nous avons appliqué au cas d'une acquisition d'une série de 4 images acquises pour $\theta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ, 135^\circ$ et 135° une déconvolution avec une erreur systématique sur l'angle théorique des

RIO de la série. La Figure 2.15(a) montre l'erreur en fonction de ξ calculée entre l'objet d'origine et le résultat d'une déconvolution mono-noyau comparée aux cas de déconvolution 4-noyaux pour lesquels on a appliqué diverses erreurs systématiques d'angle de la RIO de déconvolution par rapport à la RIO de simulation, pour des simulations réalisées avec un rapport signal à bruit de 3 *dB*.

On peut noter en analysant ces courbes qu'omis pour les faibles valeurs de ξ pour lesquelles la déconvolution multi-noyaux ne donne pas de solution satisfaisante, l'erreur résiduelle est beaucoup plus faible pour la déconvolution multi-noyaux que pour une déconvolution mono-noyau et ce même dans le cas d'une forte erreur sur l'angle de la RIO de déconvolution par rapport à la RIO de simulation.

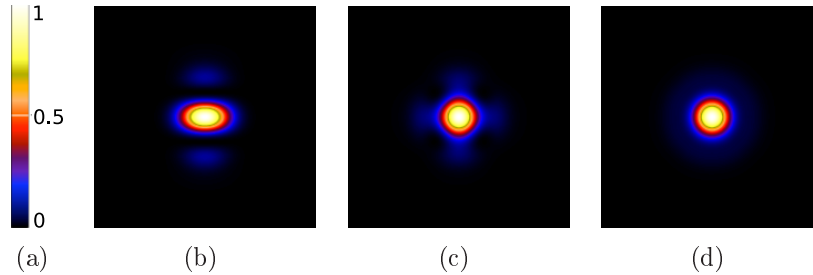


FIG. 2.16 – (a) Échelle des intensités normalisées. (b) RIO confocale à 3 faisceaux. (c) RIO équivalente pour déconvolution 2-noyaux, (d) RIO équivalente 4-noyaux.

Ce résultat surprenant peut s'expliquer par l'observation des RIO équivalentes. D'après l'observation de l'équation 2.8 on peut définir la RIO équivalente comme la somme des n RIO considérées. La Figure 2.4.2 donne la RIO équivalente d'un système d'acquisition (a) à une RIO, (b) deux RIO et (c) quatre RIO. Cette dernière présente une symétrie circulaire qui s'explique par le fait que les zones centrales de chacune des RIO sont amplifiées par le procédé d'addition. Ainsi, une erreur systématique dans l'estimation de l'angle entre le système et l'objet, est compensé par cette symétrie, même pour des erreurs angulaires élevées.

On peut également noter sur la Figure 2.15 que l'erreur dans le cas d'une déconvolution à noyaux multiples avec erreur d'estimation sur le noyau, demeure inférieure à celle d'une déconvolution mono-noyau, et ce pour un large intervalle du paramètre ξ . Ce qui signifie que la déconvolution à noyaux multiples et à la fois robuste à une erreur d'estimation de la RIO et dans le choix du paramètre ξ optimal.

Perspectives d'évolution

Nous avons montré que l'utilisation d'une illumination par interférence de faisceaux focalisés permettait d'améliorer la résolution latérale par un facteur deux dans le cas d'un microscope confocal. Comme il a été montré, ce gain en résolution ne peut être obtenu que dans une seule direction, en raison des effets de polarisation sur les faisceaux focalisés. Nous venons de montrer qu'il était possible de combiner cette technique avec une méthode de déconvolution à plusieurs noyaux de sorte à obtenir une résolution améliorée à la fois le long des axes x et y .

Il faut bien noter que la technique d'illumination par interférence de trois faisceaux focalisés [Haeberlé et Simon, 2006 ; Simon et Haeberlé, 2006] qui a été décrite dans ce chapitre présente un gain en résolution latéral tout à fait comparable à celle de l'illumination structurée linéaire qui nécessite également une série d'acquisitions sous différentes conditions. D'autre part, la technique d'illumination structurée non-linéaire permet un gain en résolution encore plus important. L'avantage que présente ces dernières techniques, comparativement à l'illumination 3-faisceaux confocale, tient au fait qu'il s'agit de techniques en champs large. il n'y a pas de rejet de photons par le *pinhole*, ce qui présente un intérêt certain dans le cas de l'utilisation de fluorophores sensibles au phénomène de photoblanchiment.

Cependant, si la technique 3-faisceaux confocale que nous présentons peut s'avérer limitée vis-à-vis des phénomènes de photoblanchiment, elle présente l'avantage d'être compatible avec les techniques d'illumination bi-photon, impossible à mettre en œuvre dans le cas de l'illumination structurée en raison de la puissance nécessaire pour induire l'effet bi-photon. Notons également que dans la microscopie bi-photon, il existe une perte de résolution latérale due au doublement de la longueur d'onde d'illumination, qui n'est pas compensé par l'élévation au carré de son intensité de la RIO d'illumination. La méthode que nous avons présentée permettrait de compenser en partie cette perte de résolution latérale due à l'excitation bi-photon.

L'idée qui consiste à utiliser une interférence de faisceaux afin de créer une illumination structurée a également été appliquée au cas de la microscopie TIRF, on parle alors de microscopie SW-TIRF² [Chung et coll., 2006]. Ce montage consiste à créer une illumination en faisant interférer deux faisceaux qui génèrent l'illumination par ondes évanescentes structurée. La Figure 2.17 montre les RIO mesurée pour un microscope TIRF classique (a) et un microscope SW-TIRF. Ce dernier type de microscopie fournit une RIO étroite avec deux lobes latéraux qui présentent

²SW-TIRF : *Standing Wave-Total Internal Reflexion Fluorescence*

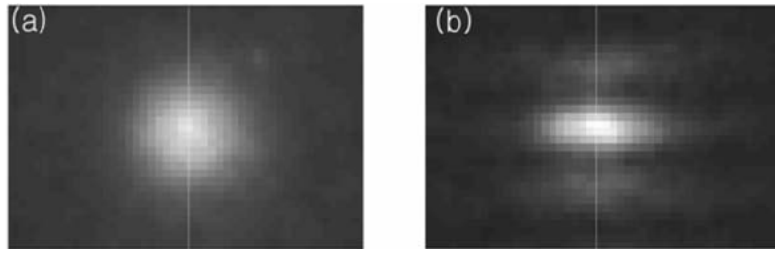


FIG. 2.17 – RIO mesurées pour un microscope TIRF standard (a) et un microscope SW-TIRF à une direction. La largeur à mi-hauteur de la RIO en TIRF classique a été mesurée à 272 nm contre 119 nm pour la RIO TIRF à illumination structurée [Chung et coll., 2006].

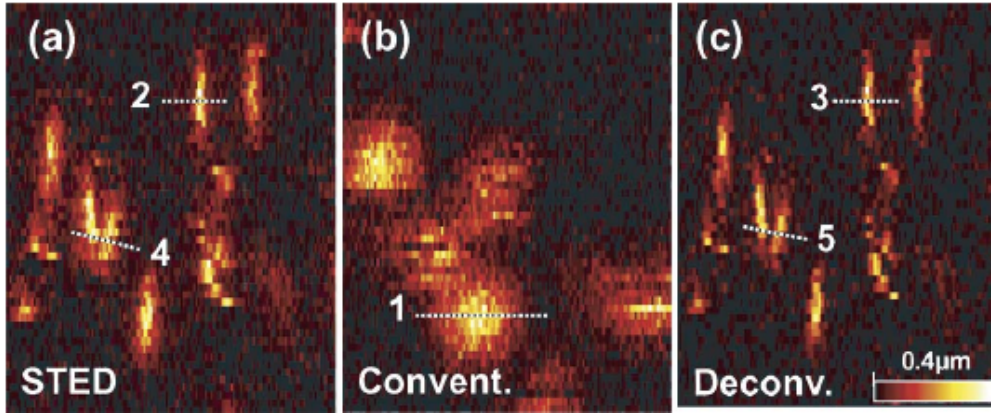


FIG. 2.18 – Images expérimentales de fluorophores déposés sur une surface. On voit sur (a) plan $x-y$ illumination STED, (b) le même spécimen imagé à travers un système confocal classique, (c) présente une déconvolution de l’image (a). On peut noter que certaines molécules sont présentes en (a) et non en (b) en raison du phénomène de photo-blanchiment. La technique permet une réduction d’un facteur 5 de la largeur à mi-hauteur de la RIO le long de l’axe x . Image extraite de [Westphal et coll., 2003].

des caractéristiques assez similaires à la RIO confocale 3-faisceaux que nous avons étudiée dans ce chapitre. L’équipe qui a mis en place cette nouvelle méthode a d’ailleurs étendu son principe en réalisant deux enregistrements successifs avec rotation de 90° du spécimen, les images étant alors simplement moyennées. Il serait donc intéressant d’adapter les techniques de déconvolution multi-noyaux à ce type de microscopie.

Parmi les meilleurs résultats obtenus en terme de résolution, on trouve la microscopie STED, qui peut aussi utiliser une RIO d’illumination asymétrique résultant d’une illumination focalisée subissant une déplétion par un faisceaux STED présentant une vallée de déplétion dans une direction [Westphal et coll., 2003]. Grâce à cette méthode, une résolution de l’ordre de 40 nm a pu être obtenue et améliorée

à $28nm$ par déconvolution. Ce résultat n'est donc possible que selon une direction seulement. La Figure 2.18 présente des RIO mesurées pour (a) un microscope STED, (b) un microscope confocal classique, (c) le résultat d'un filtrage linéaire calculé au moyen d'une RIO isolée. On peut voir sur cette figure qu'il existe bien une asymétrie de la RIO. Pour le cas où il serait possible d'obtenir via cette technique une série d'images pour différentes orientations de cette vallée de déplétion, la méthode de déconvolution multi-noyaux pourrait alors servir à reconstruire un spécimen 2-D avec la résolution obtenue en 1-D.

La déconvolution multi-noyaux peut donc être adaptée à tous ces types de microscopie permettant une amélioration de la résolution transversale. Cependant, la résolution longitudinale est quant à elle inchangée, ce qui fait que cette technique ne s'adapte qu'à des spécimens très peu épais. Toutefois, le microscope confocal, dans le cas d'une utilisation avec des objectifs de forte ouverture numérique, présente une résolution anisotrope. Dans le cas où l'on pourrait faire l'acquisition d'une série d'images 3-D du spécimen sous différents angles (en plaçant, par exemple, le spécimen dans un micro-tube identique à celui utilisé dans [Kikuchi et coll., 1996], mais ici, en le faisant tourner au lieu d'utiliser un double système d'imagerie) une extension de la déconvolution multi-noyaux à la 3-D permettrait de reconstruire une image 3-D présentant une résolution isotrope améliorée.

Il existe une autre technique à laquelle la déconvolution multi-noyaux pourrait convenir. Il s'agit de la microscopie à axe d'imagerie multiple (MIAM³) [Swoger et coll., 2003]. Dans les cas les plus courants, l'imagerie de spécimens de taille importante passe par l'utilisation d'objectif ayant une grande distance de travail. Cependant, dans ce type de microscopie, les images obtenues présentent une mauvaise résolution le long de l'axe optique du fait que la RIO de tels objectifs présente une importante élongation le long de cet axe. Dans la technique MIAM, l'image est obtenue à travers un jeu de 4 objectifs placés dans une configuration tétraédrique dans le but d'obtenir des images du spécimen selon 4 directions. Les 4 images 3-D résultantes sont alors recombinaison de sorte que le défaut de résolution le long de l'axe optique d'un objectif soit compensé par la meilleure résolution latérale des 3 autres. Dans l'article original [Swoger et coll., 2003], cette reconstruction consiste simplement à sommer les images obtenues à travers chacun des objectifs. Cette situation représente en fait une extension 3-D de celle que nous avons envisagée à travers l'illumination 3-faisceaux. Une extension, encore à réaliser, de la déconvolution multi-noyaux pourrait donc apporter une solution intéressante pour le traitement des images obtenues via cette technique.

³MIAM : Multiple Imaging Axis Microscopy

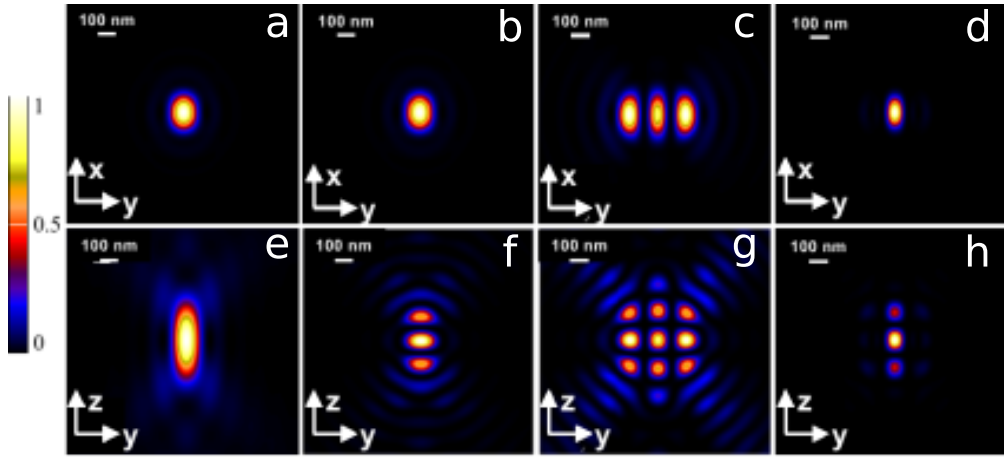


FIG. 2.19 – Application de l’illumination 3-faisceaux à la microscopie $4Pi A$. Les figures présentent les plans transversaux (a-d) et longitudinaux (e-h) de (a,e) : RIO confocale classique. (b-f) : RIO confocale $4Pi A$. (c-g) RIO avec illumination 3 faisceaux et $4Pi A$ combinée. (d-h) RIO 3-faisceaux- $4Pi A$ confocale. ($NA = 1,2$ excitation et détection respectivement à $\lambda_{ill} = 400\text{ nm}$, $\lambda_{det} = 500\text{ nm}$).

La microscopie à illumination par sélection de plan (SPIM⁴) [Huisken et coll., 2004] est une autre technique permettant d’imager de grand spécimen avec une haute résolution. Dans cette technique, une grande série d’images du même spécimen sous différents angles est acquise au moyen d’un support rotatif. Bien que cette technique utilise des objectifs à longue distance de travail, la résolution obtenue à la détection est quasi isotrope grâce à un système d’illumination par sélection de plan obtenue au moyen d’une lentille cylindrique. Toutefois une légère anisotropie peut subsister, en raison de la finesse du plan illuminé ainsi que de l’ouverture numérique de l’objectif. Pour cette technique également, l’utilisation d’une déconvolution multi-noyaux 3-D permettrait sans doute d’obtenir au final une résolution isotrope tout en réduisant le nombre d’images nécessaires.

D’autre part, l’utilisation d’une illumination par interférence de faisceaux focalisé peut théoriquement être combinée avec le phénomène d’interférences longitudinales observées dans un montage utilisant deux objectifs opposés frontalement, comme dans la microscopie de type $4Pi$ de type A . Les Figures 2.19(a,e) et 2.19(b,f) montrent respectivement les plans transversaux et longitudinaux pour un microscope confocal classique et un microscope de type $4Pi A$. La Figure 2.19(c,g) montre la RIO d’illumination d’un microscope $4Pi A$ combiné avec une illumination 3-faisceaux et la Figure 2.19(d,h) la RIO confocale correspondant à un tel montage (Ces RIO ont été calculée pour un objectif à immersion à eau d’ouverture

⁴SPIM : Selective Plane Illumination Microscopy

numérique $NA = 1.2$ et une longueur d'onde d'illumination $\lambda_{ill} = 400 \text{ nm}$ et une détection à $\lambda_{det} = 500 \text{ nm}$. L'observation de ces figures montrent que les lobes latéraux sont plus atténués que les lobes longitudinaux. Cependant, une technique de filtrage numérique éprouvée permet de supprimer ces lobes longitudinaux [Hell, 1997]. Ces simulations montrent qu'il est donc envisageable d'obtenir un gain simultané le long des axes y et z . Une série d'acquisition multiples et une combinaison avec une déconvolution multi-noyaux devrait alors permettre un gain en résolution selon les trois dimensions. Notre technique étant donc compatible avec la microscopie $4Pi$, on peut tout à fait envisager de l'utiliser dans les montages existant de microscopie $4Pi$ bi-photon. Ceci permet alors à la fois de s'affranchir du problème des lobes longitudinaux, tout en minimisant la perte de résolution latérale.

Dans ce chapitre, nous avons étudié des méthodes numériques permettant d'améliorer la résolution d'un système confocal 3-faisceaux de façon isotrope. La technique de fusion par moyenne semble peu adaptée à ce cas. La technique de fusion FIF apporte déjà des améliorations sensibles. La technique de déconvolution à noyaux multiples apporte une amélioration très notable. L'étude portait sur des RIO provenant d'un système d'illumination que nous avons proposé dans le premier chapitre. Cependant nous avons également vu que de nombreuses techniques de microscopie 2D ou 3D présentaient des RIO asymétriques et pourraient constituer d'autres applications possibles aux méthodes numériques que nous avons étudiées.

Deuxième partie

Étude et mise en œuvre d'un microscope tomographique optique diffractif

Chapitre 3

Tomographie diffractive optique : rappels théoriques

Dans le premier chapitre, nous avons présenté un ensemble de techniques permettant d'améliorer la résolution en microscopie de fluorescence. Parmi celles-ci, une méthode originale utilisant une illumination structurée pour améliorer la résolution latérale a été proposée. Dans le deuxième chapitre, nous avons présenté des méthodes numériques de restauration des images simulées pour un tel système.

Il existe toute une palette de techniques permettant l'amélioration de la résolution en microscopie de fluorescence. D'autre part, les méthodes de déconvolution ont pour but de reconstruire le plus fidèlement possible les données de départ. Il faut noter que ces deux approches sont parallèles et complémentaires. Les nouvelles techniques de microscopie de fluorescence permettent d'améliorer la résolution tandis que les techniques de déconvolution apportent encore un gain supplémentaire sur la qualité des images obtenues.

L'élément clef des techniques de déconvolution que nous avons présentées est la connaissance de la RIO (à l'exception des techniques dites aveugles ou myopes [Holmes et O'Connor, 2000 ; Holmes, 1992 ; MacCallum, 1990]). Il existe deux voies possibles pour y accéder. La première consiste à prendre en compte les caractéristiques physiques du système d'acquisition à travers des modèles de formation d'image. La deuxième se base sur une mesure de la RIO dans des conditions proches de celles rencontrées au cours de l'acquisition. Dans un cas comme dans l'autre, de nombreux paramètres doivent être pris en compte : ouverture numérique de l'objectif, longueur d'onde, propriétés optiques des milieux et interfaces séparant le spécimen de l'objectif (lamelle, milieu d'immersion). Cependant, le spécimen observé est considéré comme optiquement homogène. On suppose alors que la RIO est invariante dans l'image. Il convient de vérifier cette hypothèse.

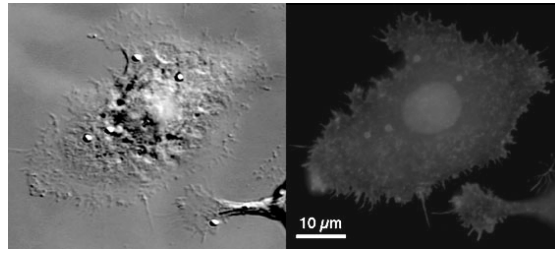


FIG. 3.1 – Images en microscopie DIC (à gauche) et de fluorescence (à droite) obtenues pour un macrophage de type J774 marqué avec des billes de latex et de la F-actin²

La Figure 3.1 présente deux images d'un même macrophage. La première (sur la gauche) a été obtenue en microscopie *DIC*³, la deuxième avec un microscope de fluorescence classique. La microscopie *DIC* est basée sur la création d'un contraste par interférence en fonction des variations de phase que subit la lumière en traversant le spécimen. Cette variation de phase traduit la nature inhomogène du spécimen d'un point de vue optique. En revanche, la microscopie de fluorescence est basée sur l'excitation d'une molécule dont on détecte la lumière émise par fluorescence. Dans ce cas, et particulièrement lors de la mise en œuvre d'algorithmes de déconvolution, on considère en fait le spécimen comme homogène.

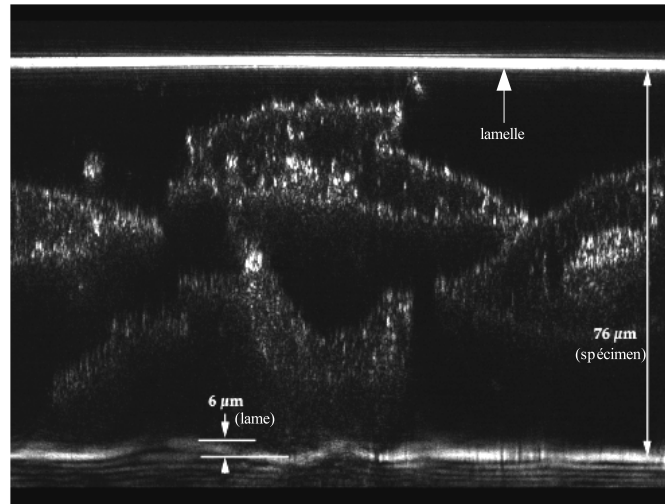


FIG. 3.2 – Coupe selon le plan x, z d'une image de cellules obtenue par rétro-diffusion. Les cellules sont placées entre lame et lamelle. L'image de l'interface supérieure est droite et lisse, celle de l'interface inférieure ne l'est pas. Ceci donne une indication sur les propriétés optiques des cellules sur une profondeur importante. Image extraite de [Pawley, 2002].

²source : <http://www.biologie.uni-rostock.de/tierphysiologie/Arbeitsgruppen/Motorenzyme/Research/Latex-infectedJ774.jpg>

³*DIC* : *Differential Interference Contrast*, microscopie à contraste de phase différentiel.

La Figure 3.2 présente une coupe longitudinale d'une image 3D de cellules, obtenue par rétro-diffusion. Les cellules sont placées entre lame et lamelle. L'image de l'interface entre le spécimen et la lamelle supérieure est droite et lisse, ce qui n'est pas le cas pour l'interface inférieure. Les déformations observées dans l'image de la lame sont dues aux propriétés optiques des cellules.

Face au problème que représente les aberrations dues au spécimen, deux approches sont possibles.

La première est inspirée de l'astronomie. Dans ce domaine, la turbulence atmosphérique qui dégrade l'image est compensée par l'utilisation d'une optique adaptative. La correction dynamique du front d'onde assure alors une stabilité de l'image durant le temps de pose. Cette correction est généralement effectuée à l'aide d'un miroir déformable et est contrôlée par un analyseur de front d'onde. Il est alors nécessaire d'utiliser un point de référence qui peut-être une étoile connue ou une étoile « artificielle » créée par un laser.

En microscopie, ce genre de techniques peut paraître plus facile à mettre en œuvre étant donné la nature quasi-statique du spécimen vis-à-vis du temps de pause. La difficulté réside en fait dans l'absence d'une référence permettant de réaliser la correction. Il a été proposé une méthode d'optique adaptative appliquée au cas du microscope multi-photon [Marsh et coll., 2003]. Dans ce montage, le critère permettant le contrôle est l'intensité mesurée sur le photomultiplicateur. Il s'agit cependant d'une technique assez difficile à mettre en œuvre. En effet, dans la microscopie confocale par exemple, le faisceau d'illumination et la lumière détectée subissent les aberrations à l'aller et au retour dans le spécimen. D'autre part la boucle de contre-réaction du système doit pouvoir converger rapidement en raison du balayage nécessaire à l'acquisition de l'image, contrairement au cas de l'astronomie.

Une autre approche possible consiste à corriger numériquement les images. Ceci nécessite d'avoir une distribution spatiale de la RIO au sein du spécimen, ainsi qu'un algorithme de déconvolution dit adaptatif qui prend en compte la non-invariance de la RIO. Un tel algorithme a été mis au point au sein de notre laboratoire au cours des travaux de thèse de Colicchio [Colicchio, 2004]. La principale difficulté de cette approche tient à l'obtention de la distribution de RIO au sein du spécimen.

Si la mesure directe de cette distribution paraît techniquement difficile, il est tout à fait envisageable de la calculer en étendant les modèles cités précédemment,

aux cas de focalisation et de détection dans des milieux inhomogènes [Haeberle et Simon, 2004]. Il devient alors nécessaire de mesurer la distribution des indices optiques au sein du spécimen. Connaissant les propriétés optiques du spécimen, on pourrait alors envisager une correction numérique des images de fluorescence.

En 1969, Wolf a établi, dans le cadre de la première approximation de Born, un lien entre l'amplitude et la phase de l'onde diffusée par un objet semi-transparent et la distribution des indices optiques au sein de cet objet [Wolf, 1969]. Il propose alors une technique d'imagerie en deux étapes. La première étape utilise l'holographie pour enregistrer à la fois en amplitude et en phase l'onde diffusée par le spécimen. La seconde consiste à reconstruire par des méthodes numériques, la distribution d'indice optique dans l'objet en trois dimensions. Cette technique a été jusqu'à récemment peu explorée en raison du volume des calculs imposés par l'étape de reconstruction. Les progrès réalisés dans le domaine des capacités de calcul des ordinateurs permettent désormais de concrétiser ces deux étapes. La seconde partie de notre étude portera donc sur le cadre théorique de cette méthode et sa mise en œuvre à travers un montage expérimental permettant de la coupler avec la microscopie confocale.

3.1 Enregistrement de l'onde diffusée

La première étape de la méthode proposée par [Wolf, 1969] pour imager des objets semi-transparents consiste donc à enregistrer l'onde diffusée par l'objet à la fois en amplitude et en phase. Ceci nécessite la mise en œuvre d'une technique particulière, dans la mesure où les capteurs existants ne sont sensibles qu'à des distributions d'intensité, tout au moins dans le domaine optique.

La technique permettant d'enregistrer une onde lumineuse à la fois en amplitude et en phase a été proposée en 1949 par [Gabor, 1949]. Cette technique, tout d'abord appelée reconstruction de front d'onde, est aujourd'hui connue sous le nom d'holographie. Le principe général consiste à utiliser une onde de référence connue interférant avec l'onde diffusée que l'on cherche à enregistrer.

La figure 3.3 présente de façon schématique une configuration simple d'enregistrement d'image holographique. L'onde incidente $\mathbf{u}_i(\mathbf{r})$ illumine l'objet diffusant. L'onde diffusée par l'objet $\mathbf{u}(\mathbf{r})$ interfère avec une onde de référence $\mathbf{u}_r(\mathbf{r})$. Le motif d'interférence est enregistré en intensité au niveau du capteur et l'intensité s'écrit

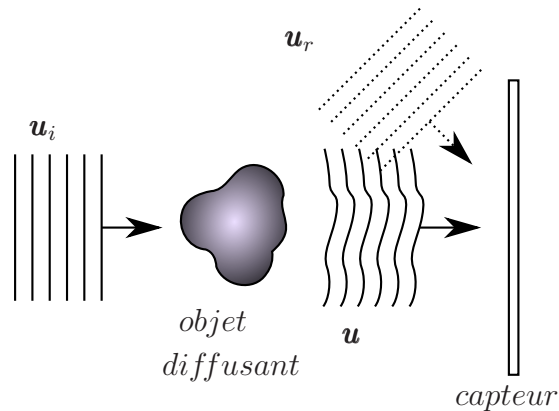


FIG. 3.3 – Schéma de principe de l'holographie

alors :

$$\mathcal{I}(x, y) = \underbrace{|\mathbf{u}(x, y)|^2 + |\mathbf{u}_r(x, y)|^2}_{\text{ordre 0}} + \underbrace{\mathbf{u}(x, y)\mathbf{u}_r^*(x, y)}_{\text{ordre objet}} + \underbrace{\mathbf{u}^*(x, y)\mathbf{u}_r(x, y)}_{\text{ordre objet conjugué}} \quad (3.1)$$

L'expression 3.1 permet de distinguer 3 composantes : un ordre 0 ou terme quadratique, un ordre objet et un ordre objet conjugué. La technique permet bien d'obtenir un enregistrement dont l'intensité transcrit l'amplitude de l'onde objet. Cependant, le lien n'est pas direct et il convient de passer par une étape supplémentaire pour remonter à l'information souhaitée.

Dans une configuration appelée holographie en ligne, on n'utilise pas d'onde de référence séparée. C'est l'onde d'illumination qui sert de référence. Il faut alors poser une condition forte sur l'objet qui doit être faiblement diffusant. Dans ce cas, on pourra considérer que l'amplitude de l'onde diffusée est négligeable vis à vis de l'onde d'illumination. C'est une technique robuste et rapide de mise en œuvre mais dont les champs d'applications sont limités en raison des conditions imposées sur la nature de l'objet. En optique, on préfère généralement utiliser une onde de référence séparée.

L'onde de référence peut-être considérée comme une porteuse modulant le signal transmis par l'onde diffusée, le problème consistant à retrouver l'amplitude complexe de l'onde objet se ramène alors à une démodulation. Une méthode courante consiste à démoduler en réalisant un filtrage spatial : c'est l'holographie hors-axe. Cette méthode permet d'enregistrer le front d'onde avec l'acquisition d'un seul hologramme. Cependant l'opération de filtrage spatial limite le champs utile.

Une autre méthode, appelée holographie à décalage de phase consiste à utiliser des sauts de phase connus successifs de l'onde de référence ou de l'onde illuminant l'objet [Yamaguchi et Zhang, 1997]. Une série de n hologrammes est ainsi enregistrée. Pour $n \geq 3$, il existe une combinaison linéaire des éléments de la série permettant de retrouver l'amplitude complexe de l'onde objet.

Parmi les combinaisons possibles des hologrammes d'une série, la plus directe en termes de calcul est celle qui prend en compte une série de 4 hologrammes. Cette solution implique un déphasage de $\frac{\pi}{2}$ entre chaque hologramme. Le $k^{ième}$ hologramme a donc subi un déphasage de $(\frac{k\pi}{2})$ et s'écrit :

$$\mathcal{I}_k(x, y) = |\mathbf{u}(x, y)|^2 + |\mathbf{u}_r(x, y)|^2 + \mathbf{u}(x, y)\mathbf{u}_r^*(x, y)e^{-jk\pi/2} + \mathbf{u}^*(x, y)\mathbf{u}_r(x, y)e^{jk\pi/2} \quad (3.2)$$

où l'on considère que c'est l'onde de référence qui a subi le déphasage. Les 4 hologrammes de la série s'écrivent donc si $\mu = +u(x, y)u_r^*(x, y)$:

$$\begin{aligned} \mathcal{I}_0 &= |\mathbf{u}(x, y)|^2 + |\mathbf{u}_r(x, y)|^2 + \mu + \mu^* \\ \mathcal{I}_1 &= |\mathbf{u}(x, y)|^2 + |\mathbf{u}_r(x, y)|^2 + -j\mu + j\mu^* \\ \mathcal{I}_2 &= |\mathbf{u}(x, y)|^2 + |\mathbf{u}_r(x, y)|^2 - \mu - \mu^* \\ \mathcal{I}_3 &= |\mathbf{u}(x, y)|^2 + |\mathbf{u}_r(x, y)|^2 + j\mu - j\mu^* \end{aligned} \quad (3.3)$$

Il vient alors :

$$\begin{aligned} \mathcal{I}_0 - \mathcal{I}_2 &= 4\Re(\mu) \\ \mathcal{I}_3 - \mathcal{I}_1 &= 4j\Im(\mu) \end{aligned} \quad (3.4)$$

L'onde de référence \mathbf{u}_r étant supposée connue en amplitude et en phase, \mathbf{u} se déduit directement par simple division, et l'on obtient :

$$\mathbf{u} = \frac{(\mathcal{I}_0 - \mathcal{I}_2) + (\mathcal{I}_3 - \mathcal{I}_1)}{4u_r} \quad (3.5)$$

Notons qu'il est possible de réaliser un enregistrement simultané pour différentes valeurs du déphasage en utilisant un montage périscopique divisant le faisceau en 4. Chaque faisceau ainsi obtenu est alors déphasé par une lame de phase [Dunsby et coll., 2003]. Cette technique présente l'avantage d'être plus robuste sur le déphasage réalisé. Cependant, il y a nécessité dans ce cas d'utiliser un capteur d'enregistrement 4 fois plus grand.

Que l'on utilise l'holographie à décalage de phase ou l'holographie hors-axe, la qualité de la restitution de \mathbf{u} dépend de la connaissance de \mathbf{u}_r . Les conditions expérimentales entraînent la plupart du temps une erreur sur la connaissance de \mathbf{u}_r . Ceci entraîne donc des erreurs dans le calcul de \mathbf{u} . Il existe cependant des méthodes numériques qui permettent de corriger le front d'onde final en prenant en compte ces erreurs [Charrière et coll., 2006a].

La première étape de la méthode proposée par [Wolf, 1969] est donc réalisée en mettant en oeuvre une technique d'holographie numérique à décalage de phase. L'étape suivante consiste à reconstruire numériquement la fonction objet à partir de la solution trouvée pour \mathbf{u} .

3.2 Reconstruction de l'objet

3.2.1 Equation de Helmholtz et première Approximation de Born

Considérons un objet illuminé par une onde plane monochromatique $\mathbf{u}_i(\mathbf{r})$ se propageant selon le vecteur \mathbf{k}_i que nous écrirons $\mathbf{k}_i = k\mathbf{s}_0$ avec $k = 2\pi/\lambda$ et $\mathbf{s}_0 = (m_0, p_0, q_0)$ afin de se conformer aux notations de la référence [Wolf, 1969]. L'expression de \mathbf{u}_i est donnée par :

$$\mathbf{u}_i(\mathbf{r}) = e^{(ik\mathbf{s}_0\mathbf{r})} \quad (3.6)$$

On considère \mathbf{u}_i illuminant un objet transparent ou semi-transparent. Posons $\mathbf{u}(\mathbf{r})$ le champ résultant à la position pointée par le vecteur \mathbf{r} . Ce champ peut s'écrire comme la somme du champ incident $\mathbf{u}_i(\mathbf{r})$ et du champ diffusé par l'objet $\mathbf{u}_d(\mathbf{r})$, soit :

$$\mathbf{u}(\mathbf{r}) = \mathbf{u}_i(\mathbf{r}) + \mathbf{u}_d(\mathbf{r}) \quad (3.7)$$

D'autre part, ce champ $\mathbf{u}(\mathbf{r})$ satisfait l'équation de Helmholtz, soit :

$$\nabla^2\mathbf{u}(\mathbf{r}) + k^2n^2(\mathbf{r})\mathbf{u}(\mathbf{r}) = 0 \quad (3.8)$$

où $n(\mathbf{r})$ est la distribution selon \mathbf{r} des indices complexes. On considère que l'objet est placé au sein d'un milieu d'indice $n \equiv 1$.

Sachant que $\mathbf{u}_i(\mathbf{r})$ satisfait à l'équation :

$$\nabla^2\mathbf{u}_i(\mathbf{r}) + k^2\mathbf{u}_i(\mathbf{r}) = 0 \quad (3.9)$$

On obtient des équations (3.7) et (3.8) le champ $\mathbf{u}(\mathbf{r})$ selon l'expression suivante :

$$\nabla^2 \mathbf{u}_d(\mathbf{r}) + k^2 \mathbf{u}_d(\mathbf{r}) = - \underbrace{k^2(n^2(\mathbf{r}) - 1)}_{O(\mathbf{r})} \mathbf{u}(\mathbf{r}) \quad (3.10)$$

Où $O(\mathbf{r})$ représente la distribution d'indices au sein de l'objet. Le problème que nous cherchons à résoudre consiste donc à trouver la solution de l'équation (3.10) de sorte à retrouver O . Dans cette équation, on identifiera le terme de droite comme une source et le terme de gauche comme le champ résultant de la propagation de cette source.

Il n'existe pas de méthode générale pour résoudre l'équation différentielle (3.10) pour \mathbf{u}_d . Cependant, une solution peut être écrite en utilisant la fonction de Green [Morse et Feshback, 1953]

$$g(\mathbf{r}|\mathbf{r}') = \frac{1}{4\pi R} e^{jkR} \quad (3.11)$$

où $R = \|\mathbf{r} - \mathbf{r}'\|$. Notons bien que $g(\mathbf{r}|\mathbf{r}')$, est une solution particulière de l'équation (3.10) dans le cas d'une inhomogénéité ponctuelle $\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')$.

Le terme de droite de l'équation (3.10), qui constitue la source, peut s'écrire sous la forme d'une somme d'impulsions, c'est à dire une somme d'inhomogénéités ponctuelles :

$$O(\mathbf{r})\mathbf{u}(\mathbf{r}) = \iiint O(\mathbf{r}')\mathbf{u}(\mathbf{r}')\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')d^3\mathbf{r}' \quad (3.12)$$

Par conséquent, le champ résultant de cette somme de sources s'écrira comme la convolution de la source par la réponse impulsionnelle, $g(\mathbf{r})$, soit :

$$\mathbf{u}_d(\mathbf{r}) = \iiint g(\mathbf{r}|\mathbf{r}')O(\mathbf{r}')\mathbf{u}(\mathbf{r}')d^3\mathbf{r}' \quad (3.13)$$

L'équation (3.13) nous donne une expression de \mathbf{u}_d en fonction de \mathbf{u} et O . Or d'après 3.7

$$\mathbf{u}(\mathbf{r}) = \mathbf{u}_i(\mathbf{r}) + \mathbf{u}_d(\mathbf{r})$$

donc

$$\mathbf{u}_d(\mathbf{r}) = \iiint g(\mathbf{r}|\mathbf{r}')O(\mathbf{r}')\mathbf{u}_i(\mathbf{r}')d^3\mathbf{r}' + \iiint g(\mathbf{r}|\mathbf{r}')O(\mathbf{r}')\mathbf{u}_d(\mathbf{r}')d^3\mathbf{r}' \quad (3.14)$$

Le terme $\mathbf{u}_d(\mathbf{r})$ est donc présent de part et d'autre de la relation (3.14). Une solution consiste alors à supposer que $\|\mathbf{u}_d\| \ll \|\mathbf{u}_i\|$, ce qui revient à supposer

que l'amplitude de l'onde diffusée est faible par rapport à l'amplitude de l'onde d'illumination. Une telle approximation est appelée première approximation de Born [Roman, 1965]. L'équation 3.14 s'écrit alors :

$$\mathbf{u}_d(\mathbf{r}) = \iiint O(\mathbf{r}') \mathbf{u}_i(\mathbf{r}') g(\mathbf{r}|\mathbf{r}') d^3\mathbf{r}' \quad (3.15)$$

Il faut maintenant déduire la distribution O .

3.2.2 Reconstruction dans le domaine de Fourier

Si l'on écrit la décomposition de l'onde sphérique $g(\mathbf{r}|\mathbf{r}')$ sur une base d'ondes planes 2D, on obtient :

$$g(\mathbf{r}|\mathbf{r}') = \frac{jk}{2\pi} \iint_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{m} e^{jk[p(x-x') + q(y-y') + m(z-z')]} dpdq \quad (3.16)$$

avec :

$$m = \begin{cases} (1 - (p^2 + q^2))^{(1/2)} & \text{si } p^2 + q^2 \leq 1 \\ ((p^2 + q^2) - 1)^{(1/2)} & \text{si } p^2 + q^2 > 1 \end{cases} \quad (3.17)$$

sachant que $\mathbf{r}(x, y, z)$ et $\mathbf{r}'(x', y', z')$ sont des vecteurs de position pointant respectivement hors et dans l'objet. L'équation 3.16 fait intervenir les composantes unitaires (p, q, m) du vecteur d'onde diffusé $\mathbf{k}_d = (u, v, w) = k(p, m, q)$.

L'équation (3.17) est liée à la condition d'élasticité :

$$|\mathbf{k}_i| = |\mathbf{k}_d| = k \quad (3.18)$$

Cette condition est essentielle dans la suite du problème : elle permet de retrouver les trois composantes du vecteur d'onde diffusée.

Pour \mathbf{r} pointant hors de l'objet on peut alors écrire [Wolf, 1969] :

$$\mathbf{u}_d(\mathbf{r}) = \iint_{-\infty}^{+\infty} A(p, q; p_0, q_0) e^{ik(px+qy+mz)} dpdq \quad (3.19)$$

avec

$$A(p, q; p_0, q_0) = -\frac{ik}{8\pi^2 m} \iiint O(\mathbf{r}') e^{ik[(p-p_0)x' + (q-q_0)y' + (m-m_0)z']} d^3\mathbf{r}' \quad (3.20)$$

Si $m \in \Re$, c'est à dire si $p^2 + q^2 \leq 1$, alors, l'équation (3.20) s'identifie comme la transformée de Fourier 3D inverse du potentiel objet $O(\mathbf{r})$ selon les variables $k(p - p_0), k(q - q_0)$ et $k(m - m_0)$.

D'autre part, d'après l'équation (3.19), la valeur du champ \mathbf{u}_d dans le plan de détection P tel que $z = z_c$, est s'écrit :

$$\mathbf{u}_d(x, y, z_c) = e^{ikmz_c} \iint_{-\infty}^{\infty} A(p, q; p_0, q_0) e^{ik(px+qy)} dpdq \quad (3.21)$$

où l'on peut identifier l'intégrale à la transformée de Fourier 2D inverse de $A(p, q; p_0, q_0)$ selon les variables x et y . Cette identification associée à la précédente (cf. équation (3.20)) permet d'écrire la relation donnée par [Wolf, 1969] pour le plan P :

$$\hat{O}(\alpha, \beta, \gamma) = \frac{iw}{\pi} e^{iwz_c} \hat{\mathbf{u}}_d(u, v, z_c) \quad (3.22)$$

où \hat{O} et $\hat{\mathbf{u}}_d$ représentent les transformées de Fourier respectives de O et \mathbf{u}_d prises selon les variables indiquées, avec :

$$\alpha = u - kp_0 \quad (3.23)$$

$$\beta = v - kq_0 \quad (3.24)$$

$$\gamma = \pm w - km_0 \quad (3.25)$$

et :

$$w = \sqrt{\pm(k^2 - (u^2 + v^2))} \quad (3.26)$$

conformément à la relation (3.17).

Si l'on réécrit l'équation 3.26 on obtient :

$$u^2 + v^2 + w^2 = k^2 \quad (3.27)$$

Autrement dit, les composantes du vecteur de diffusion \mathbf{k}_d dans le domaine de Fourier décrivent une sphère S_d^\pm de rayon k et centrée sur l'origine. Cette sphère est généralement appelée sphère d'Ewald. Il faut bien noter que selon la position du plan P qui correspond au plan du détecteur, il sera possible d'enregistrer soit la partie transmise, soit la partie réfléchi du champ diffusé.

La Figure 3.4 schématise le phénomène pour une coupe selon le plan $x - z$ dans un souci de lisibilité. Pour une onde d'illumination de vecteur \mathbf{k}_i orientant l'axe z , on pourra distinguer deux zones : la zone z^+ , où l'onde diffusée se propage dans le sens des z croissants, on parlera alors de la partie transmise de l'onde diffusée, et la zone z^- où l'onde diffusée se propage dans le sens des z décroissants, on parlera alors de partie réfléchi de l'onde diffusée.

Si le plan de détection $P : z = z_c$ se situe dans la zone z^+ ($z = z_c > 0$), alors les composantes décriront la demi-sphère S_d^+ (en bas à droite de la figure). Si le plan de détection P se situe dans la zone z^- ($z = z_c < 0$), alors les composantes détectées décriront la demi-sphère S_d^- (en bas à gauche de la figure).

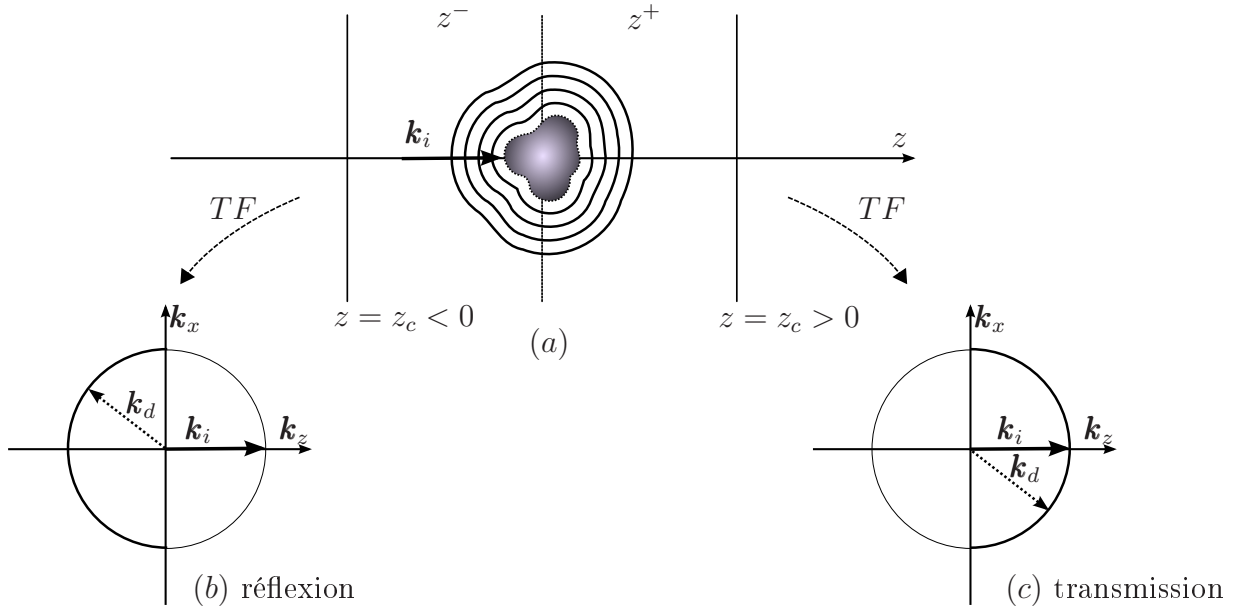


FIG. 3.4 – Schéma illustrant en coupe 2D le problème de la détection de l’onde diffusée. Selon la position du plan P on détectera les composantes transmises ou réfléchies de l’onde diffusée (a). Selon le cas, le support 3D de ces composantes dans le domaine de Fourier sera l’une ou l’autre moitié de la sphère d’Ewald représentée en noir et en gras (b,c).

Définissons maintenant un vecteur objet $\mathbf{k}_O = (\alpha, \beta, \gamma)$. Les relations (3.23) à (3.25) montrent que les composantes de Fourier de l’objet \hat{O} à partir des composantes de l’onde diffusée et de l’onde incidente, prises dans le domaine de Fourier, sous la forme :

$$\mathbf{k}_O = \mathbf{k}_d - \mathbf{k}_i \quad (3.28)$$

les composantes α , β et γ de l’objet dans le domaine de Fourier décriront alors une demi-sphère de rayon k et de centre $(-kp_O, -kq_O, -km_O)$. Autrement dit, les composantes α , β et γ décrivent la demi-sphère S_O^\pm , image de S_d^\pm par la translation de vecteur $-\mathbf{k}_i$.

La Figure 3.5 illustre la reconstruction du support des composantes objets selon ce processus. On peut constater sur cette figure, que selon que l’on détecte les composantes transmises ou réfléchies de l’onde diffusée, les composantes objets reconstruites décriront des supports différents. Il est tout à fait possible de travailler en réflexion. Par exemple, l’équipe de Giovannini à l’Institut Fresnel de Marseille, a déjà mise en place un montage expérimental de ce type [Giovannini et coll., 2007; Haeberlé et coll., 2005]. Cependant, en ce qui nous concerne, nous nous intéresserons par la suite aux configurations en transmission.

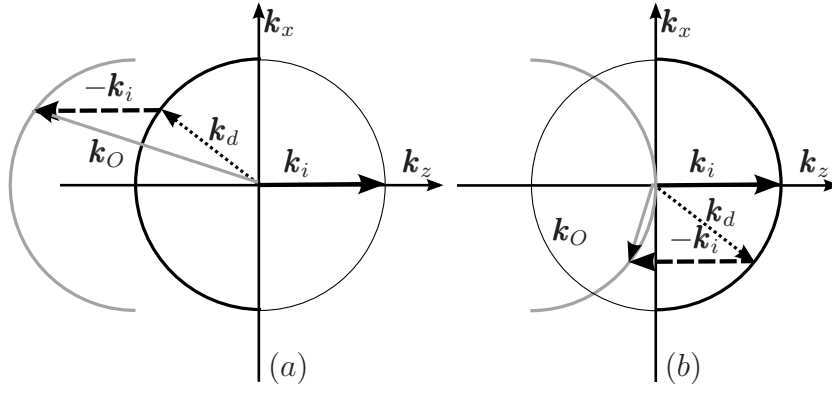


FIG. 3.5 – Schémas en coupe 2D illustrant la relation vectorielle entre composantes du champ diffusé (en noir et en gras) et composantes du support de fréquence objet (en gris et en gras), selon une détection des composantes réfléchies (a) et transmises (b) de l’onde diffusée. Sur ces schémas sont également présentés le vecteur incident \mathbf{k}_i en noir et en gras, un vecteur d’onde diffusé \mathbf{k}_d en pointillés et en noir et le vecteur \mathbf{k}_O résultant en gris. Le vecteur $-\mathbf{k}_i$ est présenté en tirets.

En résumé, lorsqu’un objet $O(x, y, z)$ est illuminé par une onde plane cohérente de vecteur d’onde donné \mathbf{k}_i , la transformée de Fourier 2D du champ diffusé par l’objet pris dans un plan $P : z = z_c$ donne les valeurs de la transformée de Fourier 3D $\hat{O}(\alpha, \beta, \gamma)$ de l’objet sur une surface décrivant, une demi-sphère S_O^\pm de rayon k et de centre $-\mathbf{k}_i$ [Wolf, 1969 ; Dändliker et Weiss, 1970].

3.2.3 \mathbf{k} -vecteurs et fréquences spatiales

Revenons sur la relation (3.28). Les termes de cette relation sont liés au domaine des fréquences spatiales par le rapport $1/2\pi$ sachant que $|\mathbf{k}_i| = |\mathbf{k}_d| = k = 2\pi/\lambda$. On obtient la relation suivante dans l’espace réciproque :

$$\mathbf{f}_O = \mathbf{f}_d - \mathbf{f}_i \quad (3.29)$$

où $\mathbf{f}_i = \mathbf{k}_i/2\pi$ représente la fréquence spatiale de l’onde d’illumination, $\mathbf{f}_d = \mathbf{k}_d/2\pi$ la fréquence spatiale de l’onde diffusée et $\mathbf{f}_O = \mathbf{k}_O/2\pi$ la fréquence spatiale de la permittivité de l’objet.

Le lien de proportionnalité existant entre support des fréquences spatiales et support des composantes objets indique que le support des fréquences spatiales de l’objet se construit sur des supports sphériques de façon analogue.

Il existe un lien entre dimensions du support de fréquence et résolution. Plus le support de fréquence sera étendu, meilleure sera la résolution. Sur la Figure 3.6 est

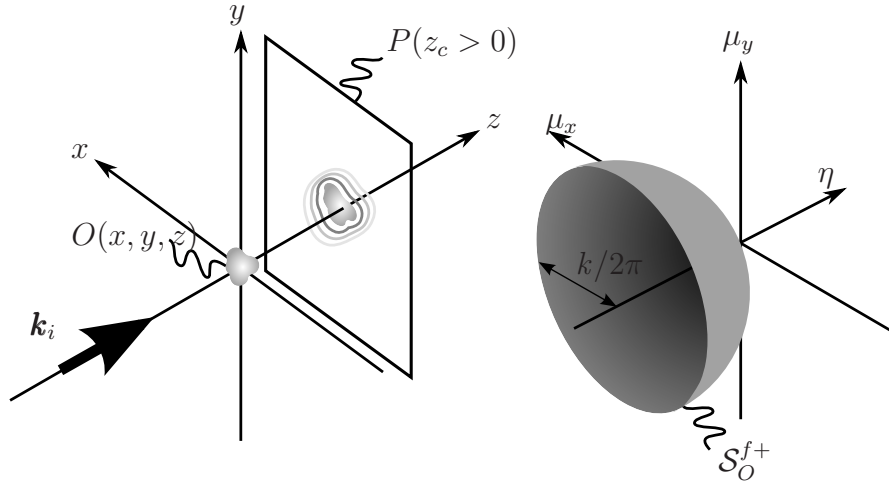


FIG. 3.6 – Schéma illustrant en 3D à gauche, la configuration pour une détection de l’onde diffusée transmise, à droite, le support 3D des fréquences accessibles pour une telle configuration. On obtient une demi-sphère S_O^{f+} de rayon $k/2\pi$ et de centre $-\mathbf{k}_i/2\pi$. Notons que le support est d’épaisseur nulle.

représentée la demi-sphère des fréquences spatiales détectées de l’objet. On notera $\mu_{x,y}$ les fréquences latérales et η les fréquences longitudinales [Streibl, 1985]. Bien que les composantes 2D détectées sur le plan P permettent de placer les fréquences spatiales de l’objet sur un support tridimensionnel, celui-ci n’est en réalité qu’une surface dont la dimension le long de l’axe η est très limitée. Ceci impliquera le manque de résolution le long de cet axe.

Pour améliorer la résolution, il faut donc élargir le support objet. Pour cela il existe plusieurs techniques que nous allons présenter.

3.3 Techniques de tomographie en transmission

Comme nous l’avons vu, il existe une méthode qui permet de reconstruire la distribution d’indices optiques au sein d’un spécimen. Cependant, dans la configuration qui nous a servie de base théorique (une seule incidence de l’onde d’illumination, normale au plan de détection fixe), les composantes objet (ou fréquences spatiales) ne décrivent pas un support suffisant pour résoudre l’objet le long de l’axe z , limitant les possibilités d’imagerie tridimensionnelle.

Pour résoudre ce problème il existe des méthodes qui permettent de mesurer d’autres supports objet et donc « d’élargir la bande passante » du système.

3.3.1 Rotation de l'objet sur lui même

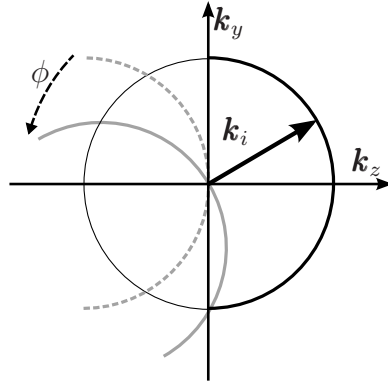


FIG. 3.7 – Schéma en coupe 2D selon le plan k_y, k_z illustrant la rotation du support objet en transmission, induit par une rotation de l'objet d'un angle θ le long de l'axe y .

Une première possibilité consiste à faire tourner l'objet sur lui-même autour d'un axe. En raison de la symétrie circulaire du support autour de l'axe z , la rotation de l'objet autour de cet axe présente peu d'intérêt. En revanche, une rotation de l'objet autour d'un axe du plan transversal permet d'accéder à d'autres fréquences comme indiqué sur la Figure 3.7.

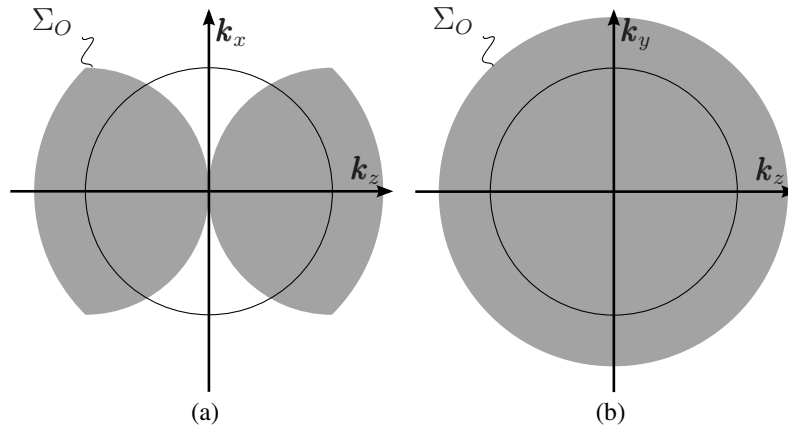


FIG. 3.8 – Schémas en coupe 2D donnant (en gris) l'ensemble des supports accessibles Σ_O pour une rotation de l'objet autour de l'axe x et une détection de la partie transmise de l'onde diffusée. La coupe est représentée selon le plan k_x, k_z en (a) et selon le plan k_y, k_z en (b). Sur (a) et (b) le cercle en noir correspond à la sphère d'Ewald.

La Figure 3.8 montre les coupes selon les plans $\mathbf{k}_x, \mathbf{k}_z$ et $\mathbf{k}_x, \mathbf{k}_y$ du support Σ_O obtenu pour une rotation complète de l'objet autour de l'axe y . Sur cette figure, on constate bien que le support objet est élargi. En revanche, on peut noter la présence d'un double cône de fréquences manquantes le long de l'axe de rotation x .

3.3.2 Rotation de l'ensemble illumination/détecteur

Il est également possible de faire tourner en même temps l'illumination et la détection autour de l'objet, à l'instar de ce qui se fait pour les scanners en imagerie médicale.

Du point de vue du support de fréquences alors accessibles, ce cas se ramène à celui cité précédemment et qui consiste à faire tourner l'objet. On pourra tout de même noter que la mise en œuvre d'une telle technique dans le domaine de la microscopie s'avère complexe. En effet le montage étant basé sur un interféromètre (contrairement au cas du scanner), on préférera maintenir l'ensemble illumination/détecteur fixe.

3.3.3 Variation de la longueur d'onde d'illumination

Nous nous intéresserons maintenant à une modification de la longueur d'onde d'illumination, soit une variation de la norme du vecteur d'onde $k = |\mathbf{k}_i|$.

Nous avons vu que les composantes du champ diffusé décrivaient une sphère S_d^\pm de rayon k . Les composantes de \hat{O} décrivent alors une sphère S_O^\pm de même rayon et de centre $-\mathbf{k}_i$. Une variation de la longueur d'onde d'illumination entraîne donc une variation du rayon de la sphère S_O^\pm décrite par les composantes objet, ainsi qu'un déplacement de son centre.

La Figure 3.9 donne les positions du support objet accessible en fonction de la longueur d'onde et à partir de la détection du champ diffusé transmis. On peut constater que grâce à une variation de la longueur d'onde sur une plage recouvrant le domaine visible (approximé ici à des longueurs d'onde de 400 à 800 nm) il est possible d'accéder à des fréquences objets supplémentaires mais de façon limitée [Dändliker et Weiss, 1970].

3.3.4 Balayage angulaire de l'illumination

Nous avons considéré, jusqu'à présent, une illumination donnée avec une onde d'illumination de direction fixe vis à vis du plan de détection. Modifier la direction de l'onde d'illumination tout en conservant l'objet et le plan P fixé aura pour effet

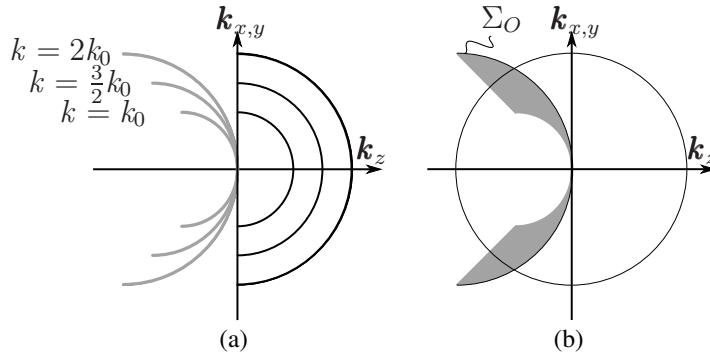


FIG. 3.9 – Schéma 2D en coupe $\mathbf{k}_{x,y}, \mathbf{k}_z$ illustrant l’effet d’une variation de la longueur d’onde d’illumination sur les composantes objet accessibles à partir de la détection du champ diffusé transmis. (a) : Les composantes du champ diffusé sont représentées en noir et en gris, les composantes objet reconstruites en gris et en gras. (b) la surface Σ_O en gris représente la coupe 2D du support obtenu pour une variation continue de la longueur d’onde d’illumination entre k_0 et $2k_0$. Le cercle en (b) représente en coupe les dimensions de la sphère d’Ewald pour $k = 2k_0$ à titre de comparaison. Notons que les supports présentés sont circulaire-symétrique le long de l’axe z .

de modifier la direction du vecteur \mathbf{k}_i . Par conséquent, la sphère supportant les composantes objet S_O^\pm verra sa position modifiée [Dändliker et Weiss, 1970].

La Figure 3.10(a) illustre le déplacement du support objet en transmission pour un changement d’incidence de l’illumination. On constate que ce changement d’incidence permet de décrire de nouveaux supports, c’est à dire d’accéder à de nouvelles fréquences.

La Figure 3.10(b) donne l’ensemble des supports objet théoriquement accessible par une variation continue de l’incidence de l’onde d’illumination entre $-\pi/2$ et $\pi/2$. On peut constater que faire varier l’incidence de l’onde d’illumination permet d’agrandir de façon significative le support objet, c’est à dire les fréquences objet. On pourra noter que l’on voit des fréquences longitudinales manquantes selon l’axe k_z . On retrouve le « cône manquant » décrit précédemment pour la FTO du microscope en transmission.

Ce montage présente l’intérêt de maintenir la détection et le spécimen à une position fixe dans la mesure où ce sont des éléments physiques difficiles à déplacer avec une précision suffisante. Il semble en effet plus approprié de faire varier l’illumination puisque, dans ce cas, la stabilité de l’interféromètre et du spécimen est assurée.

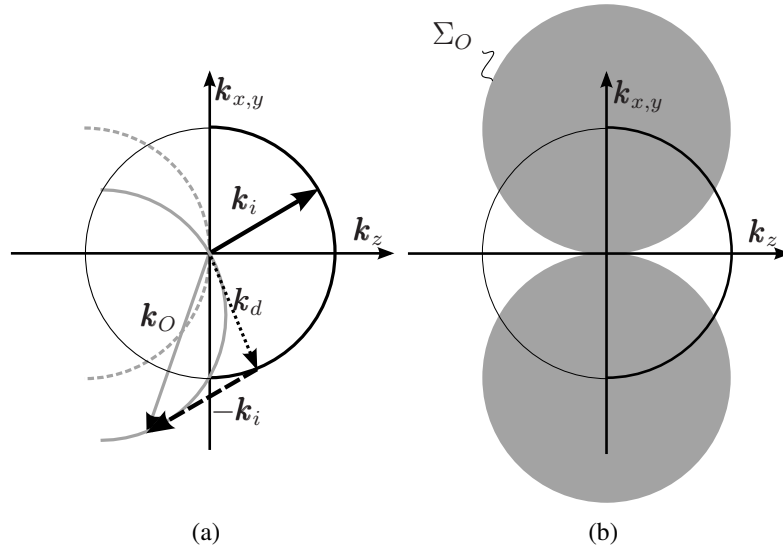


FIG. 3.10 – Schémas 2D en coupe $k_{x,y}, k_z$ illustrant l'effet d'un changement de direction de l'illumination selon une détection des composantes transmises. (a) Le support des composantes du champ diffusé est représenté en noir et en gras, le support des composantes objet en gris. La position pour une incidence normale au plan P est tracée en tirets gris. Sont également présentés le vecteur incident \mathbf{k}_i en noir et en gras, un vecteur d'onde diffusé \mathbf{k}_d en pointillés et en noir et le vecteur \mathbf{k}_O résultant en gris. Le vecteur $-\mathbf{k}_i$ est présenté en tirets noirs. (b) La surface Σ_O en gris représente la coupe 2D du support obtenu pour une variation continue de la direction de l'onde d'illumination entre $-\pi/2$ et $\pi/2$. Le cercle représente en coupe les dimensions de la sphère d'Ewald à titre de comparaison. Les supports décrits en (a) et (b) présentent une symétrie circulaire le long de l'axe z

3.3.5 Effet des contraintes angulaires, ouverture numérique

Pour illustrer les différentes techniques de tomographie, nous nous sommes placé dans le cas purement théorique d'un plan de détection de dimensions infinies. Dans la pratique le capteur aura une taille limitée. La taille du capteur pose une contrainte angulaire sur les composantes du champ diffusé détectables. En microscopie, cette contrainte angulaire est liée à la notion d'ouverture numérique NA_{obj} de l'objectif, que nous avons présentée dans la première partie de ce document.

A cause de la limitation due à l'ouverture numérique de la détection, les composantes du champ diffusé détectées ne correspondent plus à une demi-sphère mais à une calotte de sphère comme décrit dans la Figure 3.11.

S'il existe une contrainte angulaire sur la détection, il peut également en exister une en illumination (particulièrement dans la configuration avec incidence variable

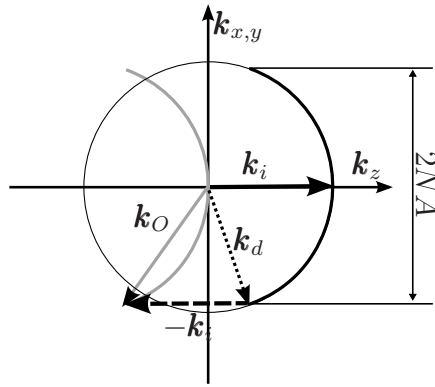


FIG. 3.11 – Schéma illustrant en coupe 2D la limitation induite par l’ouverture numérique. Les composantes du champ diffusé transmis détectables ne sont plus supportées que par une calotte de sphère (en noir et en gras). Il en va, par construction, de même pour le support objet (en gris).

à l’illumination et avec objet et détecteur fixes). En microscopie, cette contrainte angulaire se traduit par l’ouverture numérique du condenseur NA_{cond} . Dans ce cas le support de fréquences accessibles verra sa taille réduite comme illustré dans la Figure 3.12 .

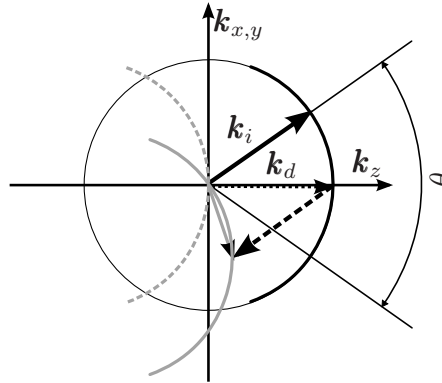


FIG. 3.12 – Schéma illustrant en coupe 2D la limitation induite par une contrainte angulaire sur l’incidence de l’illumination. Les composantes du champ diffusé transmis détectables ne sont plus supportés que par une calotte de sphère (en noir et en gras). Cependant, la distance du support objet détectable le plus éloigné en terme de fréquence (en gris) est limitée en raison de l’angle d’ouverture θ .

Les dimensions et formes de supports accessibles en fonction des contraintes angulaires sur l’illumination et la détection sont tout à fait similaires aux supports fréquentiels décrits pour la microscopie de fluorescence par [Streibl, 1985].

Il faut bien noter que l'illumination étant cohérente et les coefficients de Fourier mesurés en amplitude et en phase, les supports objets collectés selon les différentes méthodes présentées, s'additionnent de façon cohérente. Par conséquent, les supports totaux de fréquences définissent directement à la bande passante du système. Ceci est à comparer avec les techniques utilisant une illumination et/ou une détection incohérente, où l'addition des diverses contributions se fait de façon incohérente. Dans ce cas, il apparaît une atténuation dans la transmission des hautes fréquences.

Le support total obtenu donnant directement la bande passante du système, il est donc possible d'évaluer sa résolution en fonction des paramètres de d'illumination et de détection.

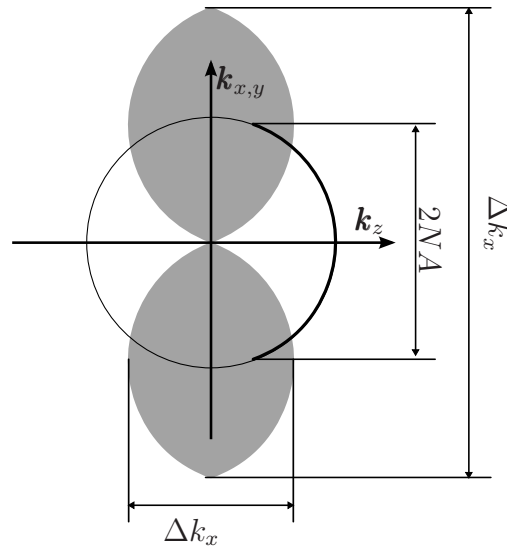


FIG. 3.13 – Schéma donnant une coupe 2D des dimensions du support total recueilli en transmission pour une illumination d'incidence variable, limitée à $NA = 1,4$ (pour un objectif immergé dans une huile d'indice $n = 1,515$) et une détection limitée par la même contrainte angulaire.

La Figure 3.13 donne les dimensions 2D du support total recueilli en transmission pour une illumination d'incidence variable limitée à 68° et une détection limitée par la même contrainte angulaire, c'est à dire un objectif et un condenseur d'ouverture numérique $NA_{obj} = NA_{cond} = 1,4$ immergés dans une huile d'indice $n = 1,515$. Les dimensions se calculent alors comme suit :

$$\begin{aligned}
\Delta k_x &= 8\pi NA/\lambda \\
\Delta k_z &= \frac{4\pi}{\lambda}(1 - \sqrt{1 - NA^2/n^2})
\end{aligned}
\tag{3.30}$$

où λ est la longueur d'onde d'illumination. La relation de proportionnalité qui existe entre les normes des \mathbf{k} -vecteurs et les fréquences spatiales donne une bande passante telle que :

$$\begin{aligned}
\Delta\mu_x &= 4NA/\lambda \\
\Delta\eta &= \frac{2}{\lambda}(1 - \sqrt{1 - NA^2/n^2})
\end{aligned}$$

Par inversion directe, on obtient alors la résolution théorique d'un tel système pour $\lambda = 633 \text{ nm}$ (pour un laser Hélium-Néon) :

$$\begin{aligned}
r_{x,y} &= 113 \text{ nm} \\
r_z &= 338 \text{ nm}
\end{aligned}$$

Rappelons à titre de comparaison que pour un microscope en transmission en lumière incohérente et dans les même conditions, on aurait [Lauer, 2002] :

$$\begin{aligned}
r_{x,y} &= 226 \text{ nm} \\
r_z &= 676 \text{ nm}
\end{aligned}$$

Dans ce chapitre, nous avons étudié une méthode qui permet de reconstruire, sous la première approximation de Born, la distribution 3D des indices optiques d'un spécimen à partir de l'enregistrement 2D du front d'onde diffusé par celui-ci lorsqu'il est illuminé par une onde plane cohérente. Dans ce type de reconstruction, les fréquences spatiales de l'objet sont supportées par une calotte de sphère qui ne permet pas d'obtenir une résolution suffisante, particulièrement le long de l'axe optique.

La mise en œuvre de techniques de tomographie permettent alors d'élargir le support de fréquence et d'améliorer ainsi la résolution finale. Nous avons étudié les différentes propositions de telles configurations en transmission.

On retiendra que la résolution d'un système de microscopie optique tomographique diffractive dépend de la configuration choisie et des paramètres du système : longueur d'onde, ouvertures numériques. Ces éléments sont donc à prendre en compte dans la réalisation d'un montage expérimental.

Nous allons maintenant présenter le montage expérimental que nous avons réalisé, basé sur la dernière technique de tomographie présentée, et qui permet de combiner cette technique de microscopie avec la microscopie confocale de fluorescence.

Chapitre 4

Construction d'un microscope tomographique optique diffractif

Les configurations théoriques que nous avons présentées dans le chapitre précédent ont toutes fait l'objet de mises en œuvre expérimentales. Le but de chaque montage est d'étendre le plus possible l'ensemble des supports objets détectés.

Parmi les montages réalisés, un grand nombre utilise une méthode de reconstruction différente de celle que nous avons exposée, et qui se base sur une approximation à l'ordre 0 du phénomène de diffraction.

Le modèle que nous avons présenté se base sur la supposition que l'objet est faiblement diffusant. Ceci constitue une approximation au premier ordre (approximation de Born). Il est toutefois possible dans certains cas de faire une approximation à l'ordre 0. Ceci sous-entend que la phase enregistrée au travers du champ diffusé est directement proportionnelle à la longueur du trajet optique [Charrière et coll., 2006b]. En d'autres termes, la diffraction, au sens strict du terme, est considérée comme négligeable. L'enregistrement du front d'onde sert alors à extraire directement une information de phase. La reconstruction est ensuite réalisée par un algorithme de retro-projection basé sur une transformée de Radon.

Cette approximation est possible dans le cas d'objets non diffractants [Slaney et coll., 1984] ainsi que dans le cas d'une faible ouverture numérique à la détection. En effet plus l'ouverture numérique sera faible, plus la courbure du support objet sera faible et pourra être approximée par un plan. On parlera alors de projection plutôt que de diffusion, ce qui revient à faire une approximation à l'ordre 0.

Parmi les montages existants, l'une des solutions qui est le plus couramment choisie consiste à faire tourner l'échantillon [Woodford et coll., 1996 ; Charrière

et coll., 2006b; Gorski et Osten, 2007]. Nous avons vu que cette technique permettait d'obtenir un support de fréquences étendu le long de l'axe z . Dans ce type de montage, le spécimen doit être monté dans un micro-tube. L'encombrement du dispositif implique l'utilisation d'objectifs à grande profondeur de champ et donc à faible ouverture numérique. De ce fait, la plupart des reconstructions [Charrière et coll., 2006b; Gorski et Osten, 2007; Fauver et coll., 2005] sont alors réalisées par une approximation à l'ordre 0 et se base sur une transformée de Radon et une retro-projection. Notons que [Gorski et Osten, 2007] ont réalisé une comparaison des deux modes de reconstruction, tandis que [Woodford et coll., 1996] ont réalisé une reconstruction selon le modèle présenté dans le chapitre précédent. Ces techniques ont fait apparaître l'intérêt de la méthode de [Wolf, 1969] vis à vis des franges de diffraction. En effet, dans les reconstructions par retro-projection, on utilise souvent un filtre afin de faire disparaître ces franges. Dans le cas d'une reconstruction telle que celle que nous avons présentée, le phénomène de diffraction est pris en compte et la reconstruction permet d'éliminer en grande partie ces franges.

D'autres méthodes ont été utilisées, comme utiliser simultanément plusieurs illuminations, et/ou utiliser une variation de la longueur d'onde d'illumination [Fercher et coll., 1979; Mico et coll., 2007]. Ces techniques ont l'avantage de pouvoir faire une acquisition simultanée de plusieurs supports objet, mais présentent l'inconvénient de limiter le nombre de ces supports.

Dans d'autres cas, on peut se baser sur une connaissance du spécimen observé pour simplifier la collection des données ou la reconstruction [Kawata et coll., 1987; Chaumet et coll., 2004]. Par exemple, [Kawata et coll., 1987] ont proposé une méthode d'illumination et de détection simplifiée (balayage angulaire réduit et enregistrement en holographie hors-axe) pour des objets supposés purement déphasant. En effet, supposer que l'on observe un tel l'objet permet de baser la reconstruction des fréquences sur une symétrie des composantes de Fourier détectées. Le balayage peut alors être simplifié.

Les méthodes mises en œuvres peuvent également varier selon le mode de détection du champ diffusé. On notera trois alternatives. La première consiste à enregistrer le champ diffusé par des méthodes d'holographie en ligne plutôt que par décalage de phase [Devaney et Schatzberg, 1992]. Notons que dans ce cas, il demeure une difficulté liée à l'estimation du front d'onde à la fois en amplitude et en phase. La deuxième utilise l'imagerie à contraste de phase en lumière incohérente [Noda et coll., 1992]. Ceci implique de supposer le spécimen observé comme purement déphasant dans la mesure où le contraste obtenu doit être relié unique-

ment à la phase et non à l'absorption. La troisième et dernière méthode consiste à remplacer l'holographie par décalage de phase par l'holographie hors-axe [Charrière et coll., 2006b]. Cette méthode, bien que plus simple de mise en œuvre, présente l'inconvénient de limiter le champ et la résolution transversale [Yamaguchi et Zhang, 1997].

Parmi les montages existants, la réalisation la plus aboutie reste sans doute celle de [Lauer, 2002]. Dans ce montage le champ diffusé transmis est détecté par holographie à décalage de phase, tandis qu'un balayage angulaire sur l'incidence de l'illumination est réalisé. Dans cet article [Lauer, 2002], il est également proposé une étude théorique d'un montage en réflexion. Un tel montage est actuellement en cours de réalisation à l'institut Fresnel à Marseille [Giovannini et coll., 2007]. Notons également que [Fukutake et Milster, 2007] ont aussi proposé un montage combinant une détection à la fois en transmission et en réflexion.

4.1 Microscope Holographique

La première étape de la réalisation de notre montage expérimental a tout d'abord consisté à mettre en œuvre un microscope holographique. Le principe d'un tel microscope consiste à enregistrer, à travers un objectif de microscope, le front d'onde diffusé par un objet illuminé par une onde plane cohérente.

La Figure 4.1 montre le schéma de principe d'un montage de microscope holographique. Une source cohérente est divisée en deux bras : un bras d'illumination et un bras de référence. L'onde d'illumination est focalisée dans le plan focal arrière d'un condenseur, traverse le condenseur et en ressort plane pour illuminer le spécimen. Une partie de cette onde d'illumination est alors diffusée. L'objectif collecte à la fois les parties diffusées et non diffusées de l'onde issue de l'objet. La partie diffusée est renvoyée à l'infini par l'objectif puis focalisée par la lentille de Telan sur le détecteur pour y former une image, après avoir traversé le cube recombineur. La partie non diffusée est focalisée par l'objectif dans le plan focal arrière de la lentille de Telan pour finalement atteindre le détecteur comme une onde plane. L'onde de référence est plane lorsqu'elle atteint le cube recombineur puis le détecteur et interfère avec les parties diffusée et non diffusée de l'onde objet.

L'objectif final du montage expérimental que nous avons réalisé est de combiner de la microscopie de fluorescence confocale et la microscopie tomographique optique diffractive (MTOD) sur un même appareil. Nous avons donc choisi de construire notre instrument sur un bâti de microscope de fluorescence. Il faut noter cependant qu'un tel choix présente certaines contraintes expérimentales.

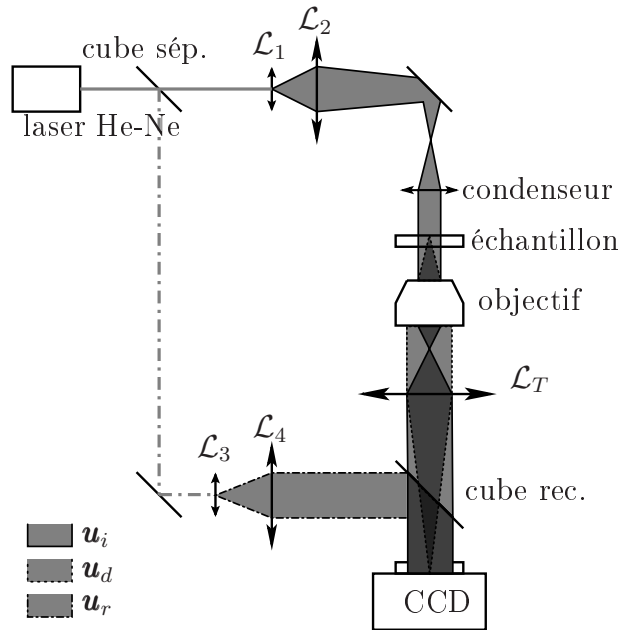


FIG. 4.1 – Schéma de principe d'un microscope holographique. Abréviations utilisées : *cube sép.* cube séparateur, *cube rec.* cube recombineur.

4.1.1 Montage sur le bâti IX71

Le bâti dont le laboratoire s'est équipé devait donc offrir à la fois une conception suffisamment avancée pour permettre de faire de la microscopie de fluorescence avec des objectifs à immersion (grandes ouvertures numériques) mais aussi des possibilités d'adaptation à un montage pour la microscopie tomographique. Notre choix s'est porté sur un microscope de recherche inversé fourni par Olympus qui présente l'avantage d'offrir plusieurs ports d'entrée-sortie exploitables en plus de ceux nécessaires à la microscopie confocale.

La Figure 4.2 montre la configuration de base du bâti sur lequel nous avons réalisé notre montage expérimental. À l'origine, un premier sélecteur (miroir escamotable) permet de sélectionner ou une sortie vers le port droit (noté C) ou vers les ports A , B , D et binoculaire. Un second sélecteur (cube séparateur 100/0%) permet de choisir une sortie vers le port binoculaire ou vers le port gauche. La tête confocale que le laboratoire s'est procurée équipe le port gauche (A). Nous avons donc choisi d'équiper le port arrière (B) avec le montage de tomographie. Pour cela, il a fallu ajouter un cube séparateur 100/0% au deuxième sélecteur. Désormais, le port binoculaire et le port D sont condamnés, tandis que le sélecteur permet de choisir ou le port A ou le port B selon que l'on veut utiliser la fluorescence ou la tomographie.

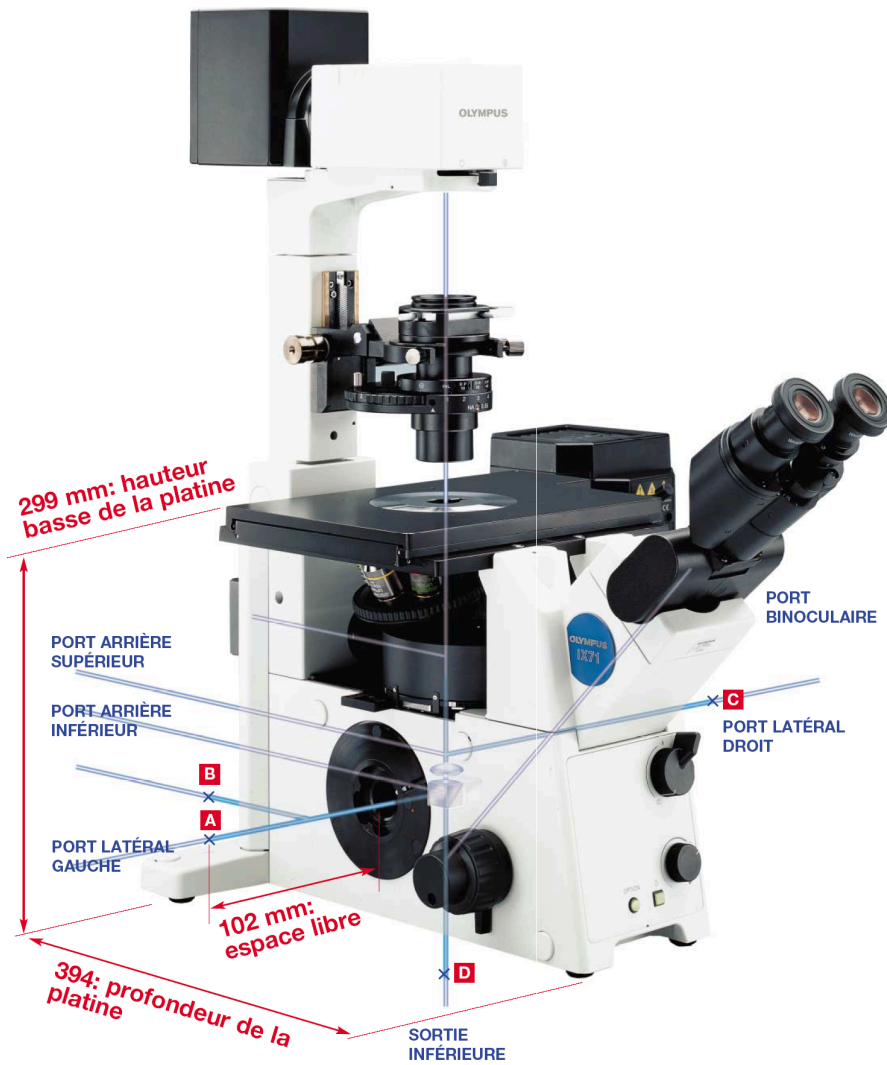


FIG. 4.2 – Microscope IX-71, principaux trajets optiques et entrées/sorties : 9 axes d'entrée/sortie dont 3 ports d'entrées indépendants et 5 plans images directs accessible de façon alternative sur le côté gauche, le côté droit, le fond et/ou l'arrière.

Afin d'insérer un tel bâti dans le bras d'un interféromètre, il a fallu procéder à des adaptations. Tout d'abord, une nouvelle colonne d'illumination adaptable sur le bâti permettant de placer des éléments optiques pour la mise en forme du faisceau et capable de supporter le condenseur a donc été usinée.

Une autre contrainte est liée à la configuration verticale du bâti, alors que l'essentiel des autres parties de l'interféromètre est prévu pour être disposé horizontalement sur une table optique. Afin de faciliter le transport de l'onde d'illumination, nous avons donc opté pour l'utilisation de fibre optique dans les deux bras de l'interféromètre.

Nous avons utilisé des fibres monomodes, de longueur 2 m , clivées à plat et montées sur des connecteurs standards type FC. Les fibres présentent une ouverture numérique comprises entre $0,1$ et $0,14$ (données constructeur) et une longueur d'onde de coupure de $550 \pm 50\text{ nm}$. Pour réaliser l'injection, nous utilisons des objectifs $5\times$ qui présentent une ouverture numérique de $0,1$.

Contrairement à [Lauer, 2002], nous avons choisi d'enregistrer les hologrammes dans le plan image plutôt que dans le plan conjugué. Ceci présente l'avantage de faciliter les opérations de mise au point et limite le nombre d'images à acquérir. En effet, dans son montage, Lauer doit doubler le nombre d'images à acquérir en raison de la forte dynamique qui existe dans le plan conjugué. Cependant, il existe une autre contrainte qui tient à l'encombrement des éléments optiques autour du bâti. En effet, l'onde objet en sortie de bâti est focalisée par la lentille de Telan à une distance de 102 mm du bâti. En raison de cette faible distance il n'est matériellement pas possible de placer le capteur CCD dans le plan image de la lentille de Telan. C'est pourquoi nous avons dû utiliser un doublet de lentilles en configuration afocale afin de gagner l'espace nécessaire. On notera d'autre part que ce doublet de lentille permet également d'adapter le grandissement du système. Ceci, nous le verrons peut présenter un intérêt vis à vis du problème de l'échantillonnage.

La Figure 4.3 présente un schéma de notre dispositif expérimental de microscopie holographique. Un faisceau laser He-Ne est séparé en deux ondes par un cube séparateur de faisceau. Les deux ondes sont injectées dans les fibres monomodes. En sortie de la fibre du bras d'illumination, les lentilles \mathcal{L}_1 et \mathcal{L}_2 focalisent l'onde dans le plan focal arrière du condenseur. L'onde ressort plane du condenseur pour illuminer l'échantillon. Ce dernier diffracte une partie de l'onde d'illumination générant une onde diffusée. Les partie diffusée et non diffusée de l'onde d'illumination sont collectées par l'objectif. En sortie d'objectif, une lentille de Telan (\mathcal{L}_T) assure

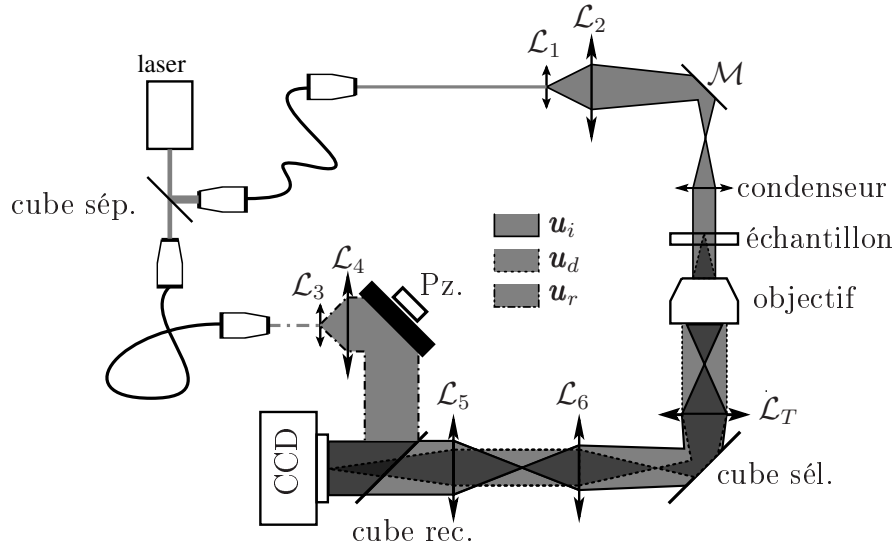


FIG. 4.3 – Schéma de notre microscope holographique expérimental. Dans un souci de clarté, l’injection dans les fibres n’a pas été détaillée. Abréviations utilisées : *cube s'ep.* cube séparateur, *cube rec.* cube recombineur, *cube s'el.* cube de sélection du bâti, *Pz.* actuateur piezo-électrique. \mathcal{M} représente, dans un premier temps, un miroir de renvoi fixe.

la mise en forme de l’onde en sortie de bâti. Tandis que l’onde d’illumination ressort plane, l’onde diffusée est focalisé pour former une image à 102 mm du bâti. Le doublet de lentille $\mathcal{L}_5, \mathcal{L}_6$ placé en configuration afocale, permet de reformer l’image dans le plan du capteur CCD. L’onde diffusée forme alors une image sur le capteur, tandis que l’onde d’illumination arrive plane. Le rapport de focale des lentilles \mathcal{L}_5 et \mathcal{L}_6 permet de jouer sur le grandissement de l’image formée.

En sortie de fibre du bras de référence, les lentilles \mathcal{L}_3 et \mathcal{L}_4 forment un faisceaux collimaté. Cette dernière atteint un miroir monté sur un actuateur piezo-électrique qui permet de réaliser l’holographie à décalage de phase. L’onde est ensuite renvoyée vers le cube recombineur pour atteindre le capteur CCD où elle interfère avec les parties diffusées et non diffusées de l’onde d’illumination.

Le laser Hélium-Néon de 20 mW que nous utilisons était présent dans les stocks de matériel du laboratoire. Notons que c’est un matériel ancien qui présente une puissance en deçà de la valeur nominale et une longueur de cohérence de 50 cm environ. Si la puissance offerte par cette source ne présente pas une contrainte particulière, la longueur de cohérence en est une. En effet, afin que les ondes objet et référence interfèrent au niveau du capteur, il est nécessaire d’assurer une longueur égale à 50 cm près des deux bras de l’interféromètre. En raison de la longueur des trajets du bras objet autour et dans le bâti, on obtient au final un interféromètre dont les bras présentent une longueur de l’ordre du mètre. Ceci le

rend très sensible aux vibrations et aux perturbations atmosphériques.

Afin de résoudre le problème des vibrations, la table optique sur laquelle a été réalisée le montage expérimental a été isolée du sol par un système pneumatique. Ceci permet d'éviter la transmission de vibrations hautes fréquences depuis le sol. La structure en nid d'abeille de la table optique assure le reste de l'isolation aux vibrations.

D'autre part, afin d'éviter les flux d'air et les dépôts de poussière sur les éléments optiques, une bâche a été placée au dessus du montage expérimental.

4.1.2 Holographie à décalage de phase : calibration expérimentale

Pour enregistrer le front d'onde diffusé, nous avons recours à l'holographie à décalage de phase.

Afin de réaliser le décalage de phase de l'onde de référence, nous modifions la longueur du chemin optique parcouru. Pour cela, nous utilisons un miroir monté sur un élément piezo-électrique dont nous contrôlons l'extension au moyen d'un générateur de tension.

L'élément piezo-électrique a pour dimensions $5 \times 5 \times 2 \text{ mm}$. Son extension pour une tension de 100 V est donnée par le fabricant à $2,2 \mu\text{m}$ garanti à 20% près. Ce renseignement permet de donner un ordre de grandeur utile dans le choix du matériel, mais qui est insuffisamment précis pour notre application. C'est pourquoi nous devons réaliser un étalonnage de notre actuateur piezo-électrique.

Nous avons choisi d'utiliser une méthode à 4 sauts de phases successifs. Outre le fait que cette méthode limite le nombre d'images à acquérir comparativement aux méthodes à 5 sauts, elle est facile de mise en œuvre et permet de calibrer *in situ* la réponse de l'élément piezo-électrique aux échelons de tension. En effet, si l'on observe les équations (3.3), on s'aperçoit que pour un saut de phase de $\pi/2$, on trouve l'égalité suivante :

$$\mathcal{I}_0 - \mathcal{I}_1 = \mathcal{I}_3 - \mathcal{I}_2 \quad (4.1)$$

On peut alors établir un critère d'erreur ϵ sur le déphasage :

$$\epsilon = \sum_{\text{pixels}} [(\mathcal{I}_0 - \mathcal{I}_1) - (\mathcal{I}_3 - \mathcal{I}_2)]^2 \quad (4.2)$$

Afin de calibrer l'élément piezo-électrique, on calculera alors ce critère pour des séries de 4 hologrammes avec un saut de tension de ΔV entre chaque hologramme, soit 4 consignes de tension $0, \Delta V, 2\Delta V, 3\Delta V$. Le saut de tension ΔV adéquat pour un déphasage de $\pi/2$ étant celui qui minimise le critère ϵ .

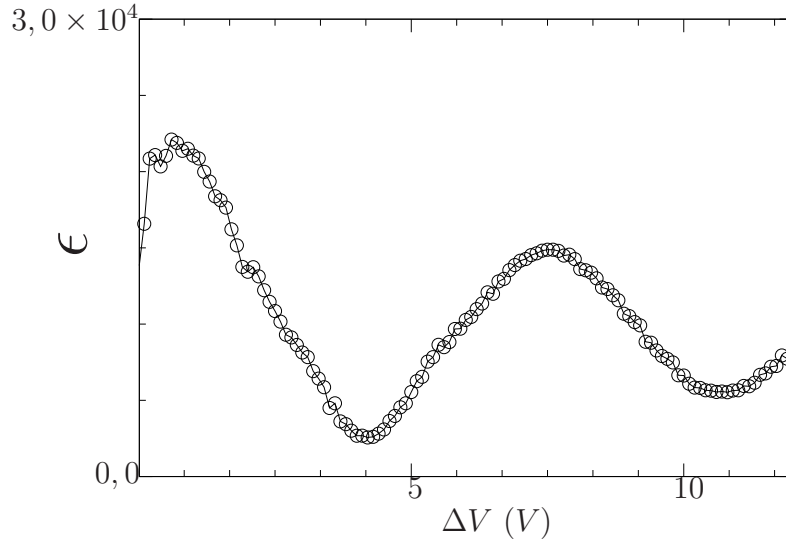


FIG. 4.4 – Courbe de calibration de l'élément piezo-électrique. La valeur du critère ϵ est donné en fonction du saut de tension ΔV . On repère un minimum pour $\Delta V = 4,2$ V.

La Figure 4.4 donne une courbe de calibration de l'élément piezo-électrique. La valeur du critère ϵ est représentée en fonction du saut de tension ΔV appliqué entre chacun des 4 hologrammes de la série. On constate à la lecture de la courbe que la valeur de ΔV minimisant le critère ϵ est de $4,2$ V. On retiendra donc cette valeur pour réaliser un saut de phase de $\pi/2$.

4.1.3 Holographie numérique : CCD et condition d'échantillonnage

Afin d'enregistrer les hologrammes, nous utilisons un capteur CCD 8 bits noir et blanc une taille de 748×570 pixels. Le rapport signal à bruit est donné par le constructeur comme supérieur à 58 dB. La taille des pixels est de $11 \mu m$. Notons que les capteurs CCD possèdent une vitre de protection. Lors d'une utilisation en interférométrie, la présence de cette vitre génère des franges parasites qui sont gênantes dans le cadre de notre application. Notre capteur CCD a donc été modifié et nous utilisons le capteur CCD à nu.

La caméra est reliée à un PC par un port analogique via une carte d'acquisition NI-IMAQ, fournie par National Instrument.

L'utilisation d'un capteur CCD pour l'enregistrement des hologrammes implique un échantillonnage du signal. Il est donc nécessaire de s'assurer que cet échantillonnage est correct.

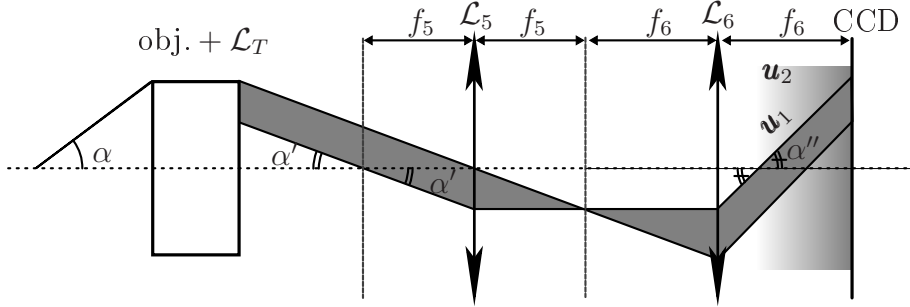


FIG. 4.5 – Géométrie du problème d'échantillonnage. On a ajouté en sortie de bâti un doublet de lentille $\mathcal{L}_5, \mathcal{L}_6$. Le lien entre α et α'' permet de calculer la plus petite modulation que devra détecter le capteur CCD.

Dans notre montage, on enregistre une composante plane \mathbf{u}_1 formant un angle α avec l'axe optique, collectée par l'objectif, et traversant le doublet afocal $\mathcal{L}_5, \mathcal{L}_6$ pour atteindre le capteur CCD avec un angle α'' où elle doit interférer avec l'onde de référence plane \mathbf{u}_2 atteignant le capteur CCD avec une incidence nulle. La Figure 4.5 décrit la géométrie du problème.

Nous cherchons tout d'abord à relier les angle α et α'' . La relation des sinus d'Abbe nous donne :

$$n \sin \alpha = G \sin \alpha' \quad (4.3)$$

où n est l'indice du milieu d'immersion et G le grandissement fourni par l'ensemble objectif/Telan. D'autre part, pour un rayon passant par le foyer objet de \mathcal{L}_5 on a :

$$f_5 \tan \alpha' = f_6 \tan \alpha'' \quad (4.4)$$

où f_5 et f_6 sont les distances focales respectives des lentilles \mathcal{L}_5 et \mathcal{L}_6 . Aux petits angles on peut écrire :

$$\begin{aligned} \tan \alpha' &= \sin \alpha' \\ \tan \alpha'' &= \sin \alpha'' \end{aligned}$$

Il vient alors :

$$\sin \alpha' = \frac{f_6}{f_5} \sin \alpha'' \quad (4.5)$$

La relation des sinus d'Abbe devient alors :

$$n \sin \alpha = \frac{Gf_6}{f_5} \sin \alpha'' \quad (4.6)$$

Ce qui nous permet de relier les angle α et α'' .

Intéressons nous maintenant au problème d'échantillonnage. L'interférence des deux ondes planes détectées sur le capteur CCD fait apparaître une modulation régulière dont l'interfrange i dépend de la longueur d'onde λ et de l'angle α''

$$i = \frac{\lambda}{\sin \alpha''} \quad (4.7)$$

La plus petite période détectable possible correspond à un angle α'' maximum (noté α''_m), ce qui équivaut à un angle α maximum, soit, par définition, $n \sin \alpha = NA$. On peut alors écrire :

$$\sin \alpha''_m = \frac{NAf_5}{Gf_6} \quad (4.8)$$

Pour réaliser un échantillonnage correct, il faut que :

$$i \geq 2d \quad (4.9)$$

où d représente la plus grande distance entre deux pixels consécutifs sur la CCD (i.e. 2 pixels en diagonale). Si on remplace i par son expression en fonction de NA on obtient alors la condition suivante :

$$\frac{\lambda G f_6}{NA f_5} \geq 2d \quad (4.10)$$

ce qui se traduit par la condition suivante sur les focales des lentilles \mathcal{L}_1 et \mathcal{L}_2 :

$$\frac{f_5}{f_6} \leq \frac{\lambda G}{2dNA} \quad (4.11)$$

La Figure 4.6 montre la géométrie du capteur CCD. On considère des pixels carrés de côté T_p . La plus grande distance entre deux pixels consécutifs est alors $d = \sqrt{2}T_p$. Les pixels de notre CCD ayant des cotés de $11 \mu m$, pour une longueur d'onde de $633 nm$, un objectif d'ouverture numérique 1.4 immergé dans une huile d'indice $n = 1.515$ et offrant un grandissement de 100, la condition sur le rapport de focales sera donc :

$$f_5/f_6 \leq 2,9 \quad (4.12)$$

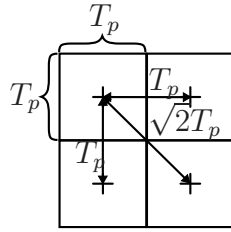


FIG. 4.6 – Schéma illustrant les distances entre pixels consécutifs : la plus grande distance entre deux pixel consécutifs sur la diagonale est bien de $\sqrt{2}T_p$.

4.1.4 Reconstruction

Nous venons de présenter un montage de microscopie holographique à partir duquel nous sommes capables d’enregistrer une série de quatre hologrammes. D’après les éléments théoriques présentés dans le chapitre précédent, nous avons mis en place un algorithme qui permet de reconstruire la distribution d’indice tridimensionnelle de l’objet observé.

Les principales étapes de cet algorithme sont reprises dans la Figure 4.7. A partir des 4 hologrammes mesurés, on calcule la valeur du champ diffusé dans le plan de la CCD. On réalise ensuite une transformée de Fourier 2D pour obtenir les composantes 2D de ce champ. Le module de l’image complexe alors obtenue fait apparaître un maximum qui correspond à la partie non diffusée de l’onde d’illumination. Les coordonnées 2D de ce maximum permettent de retrouver les trois composantes du vecteur d’illumination \mathbf{k}_i grâce à la condition d’élasticité. Ces composantes donnent alors le centre de la sphère qui supporte les fréquences spatiales de l’objet. Comme nous enregistrons l’onde diffusée en transmission, limitée par l’ouverture numérique de l’objectif, le support de fréquence se limite à une calotte de sphère. Les composantes 2D de l’onde diffusée sont donc numériquement disposées sur cette calotte de sphère. Une transformée de Fourier 3D inverse nous donne finalement une distribution 3D complexe de la permittivité de l’objet.

La Figure 4.8 montre un exemple de reconstruction tridimensionnelle d’un spécimen illuminé par une seule onde plane cohérente en incidence oblique, selon la méthode décrite précédemment. Le spécimen est une frustule de diatomée (*Coccinodus sp*). On peut constater sur la coupe $x - y$ (Fig. 4.8(a)) que les bords du spécimen sont mal définis et que des franges sont présentes. Ceci est confirmé sur la Figure 4.8(b). En effet, sur cette coupe $x - z$, on ne distingue que les franges caractéristiques du phénomène de diffraction : la forme du spécimen n’est pas résolue. On notera de plus que ces franges sont inclinées par rapport à l’axe z , ce qui traduit l’inclinaison de l’onde d’illumination.

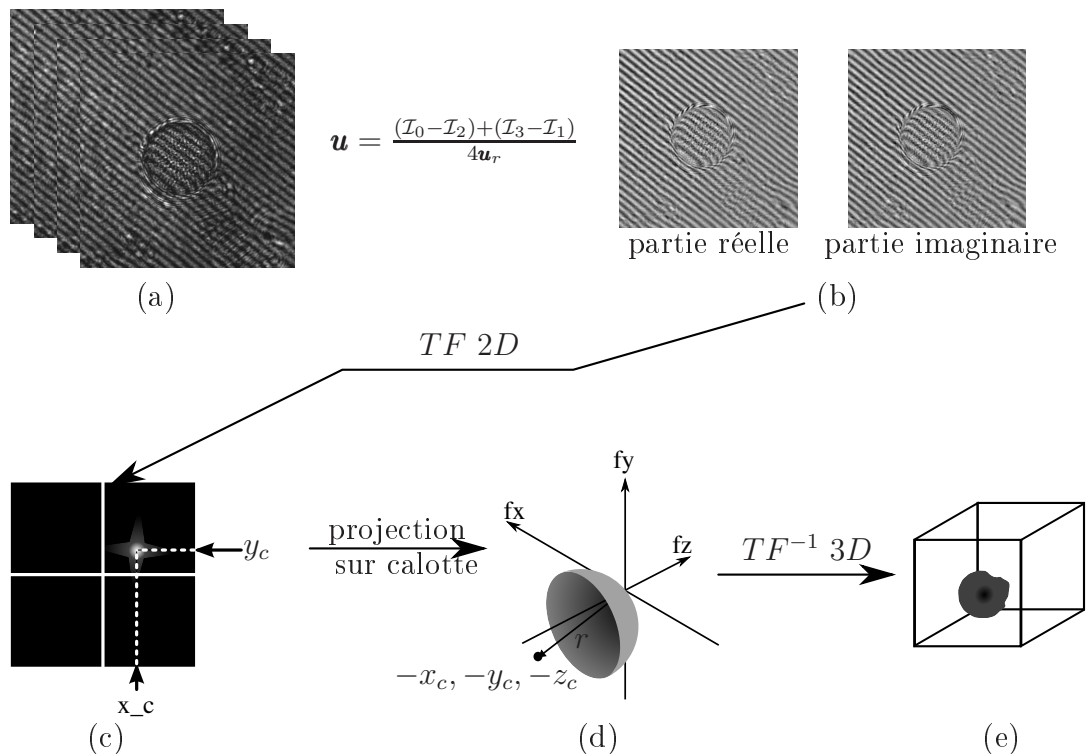


FIG. 4.7 – Schéma récapitulant des étapes de l’algorithme de reconstruction. A partir des 4 hologrammes enregistrés (a), on calcule les parties réelle et imaginaire du champ diffusé sur le plan du capteur CCD (b). Une transformée de Fourier numérique nous donne alors les composantes 2D du champ dans le domaine de Fourier (c). Il apparaît alors un maximum d’intensité qui correspond à la partie non diffusée de l’onde d’illumination. Les coordonnées de ce maximum permettent de retrouver les coordonnées 3D du centre de la calotte sphère supportant les fréquences objet. Les valeurs complexes obtenues dans (c) sont alors projetées sur cette calotte de sphère (d). Une transformée de Fourier 3D inverse donne alors la valeur complexe de la fonction de permittivité de l’objet (e).

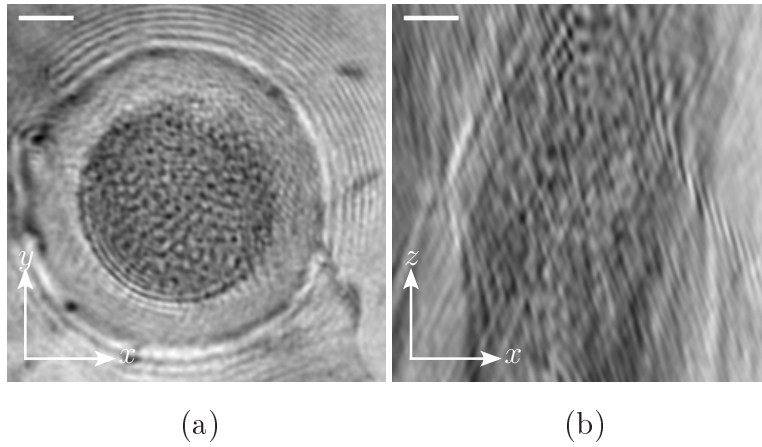


FIG. 4.8 – Images en microscopie holographique de la partie imaginaire d’une frustule de diatomée (*Coccinodus sp*) illuminée en incidence oblique. La reconstruction a été réalisée pour un seul angle d’illumination. La Figure (a) donne la coupe le long du plan $x - y$ et (b) le long du plan $x - z$. La barre d’échelle représente $4\mu m$.

Ce premier résultat confirme les limites que nous avons mises en évidence dans le chapitre précédent. En effet, si le support de fréquences objet est bien inscrit dans un volume, son élongation le long de l’axe f_z demeure limitée. Par conséquent, la résolution est limitée, particulièrement le long de cet axe, comme nous venons de l’observer.

Pour améliorer la résolution, nous décrivons par la suite la mise œuvre d’un montage de tomographie.

4.2 Microscope tomographique

Pour étendre le support de fréquences objet collectées, nous avons choisi une méthode de tomographie en transmission où l’objet est fixe et où l’on fait varier l’incidence de l’illumination. Nous allons maintenant présenter le montage de microscopie tomographique optique diffractive (MTOD) que nous avons réalisé et qui permet d’élargir le support de fréquences dans le but d’améliorer la résolution.

4.2.1 Balayage angulaire de l’illumination

Nous avons vu dans le chapitre précédent que dans ce cas, les dimensions du support collecté dépendait de l’ouverture numérique du condenseur et de l’objectif. Notre montage utilise donc un objectif et un condenseur à immersion offrant tous les deux une ouverture numérique de $NA = 1,4$.

D'autre part, nous avons utilisé un support mécanique qui permet de faire varier l'inclinaison du miroir \mathcal{M} (c.f. Fig. 4.3). L'inclinaison du miroir permet de contrôler la position du point focal en sortie de \mathcal{L}_2 dans le plan focal arrière du condenseur. Nous pouvons ainsi contrôler l'angle d'incidence de l'onde d'illumination en sortie du condenseur. Grâce au grandissement fourni par ce dernier, une petite variation de l'inclinaison du miroir entraîne une grande variation de l'illumination au niveau de l'échantillon. Typiquement, une variation de 5° de l'orientation du miroir de part et d'autre de la normale permet de couvrir la totalité de l'ouverture numérique en sortie de condenseur, soit un angle d'illumination de 68° pour une huile d'immersion d'indice $n = 1,515$.

Afin de remplir le support de fréquences étendu, il est nécessaire de faire un grand nombre d'acquisitions pour un grand nombre d'angles d'illumination couvrant la totalité de l'ouverture numérique du condenseur. C'est pourquoi, il a été nécessaire d'automatiser notre montage.

L'automatisation du montage expérimental nécessite de pouvoir commander l'inclinaison du miroir \mathcal{M} , les échelons de tensions appliqués à l'actuateur piezo-électrique ainsi que l'acquisition des images par le capteur CCD. Dans ce but, le support mécanique du miroir \mathcal{M} a été équipé de deux moteurs pas à pas. Ces moteurs sont commandés par deux contrôleurs, eux même reliés avec un PC par une liaison *RS232*. Le générateur de tension qui permet de contrôler l'élément piezo-électrique générant le décalage de phase a été relié au même PC par une liaison *GPIB*. Enfin, le capteur CCD est relié par une liaison analogique à une carte d'acquisition du PC.

Il a ensuite fallu mettre en place une interface de commande de ces différents éléments selon leurs protocoles respectifs. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser le logiciel Labview qui nous a permis de configurer rapidement les liaisons entre le PC et les éléments à commander et de programmer une séquence d'acquisition répondant à nos besoins. La Figure 4.9 résume la structure de l'interface d'automatisation ainsi que les protocoles utilisés.

Typiquement, la configuration actuelle permet de réaliser l'acquisition pour 1000 incidences (soit 4000 hologrammes) en 40 *mn*. Le temps d'acquisition de 4 hologrammes (une incidence) est de 500 *ms* tandis que les déplacement des moteurs est de 3 *s* pour une longue course et de 1 *s* pour un déplacement entre deux positions voisines. La durée totale d'acquisition est donc fortement allongée par le temps de déplacement des moteurs pas-à-pas en raison du temps nécessaire à leur stabilisation.

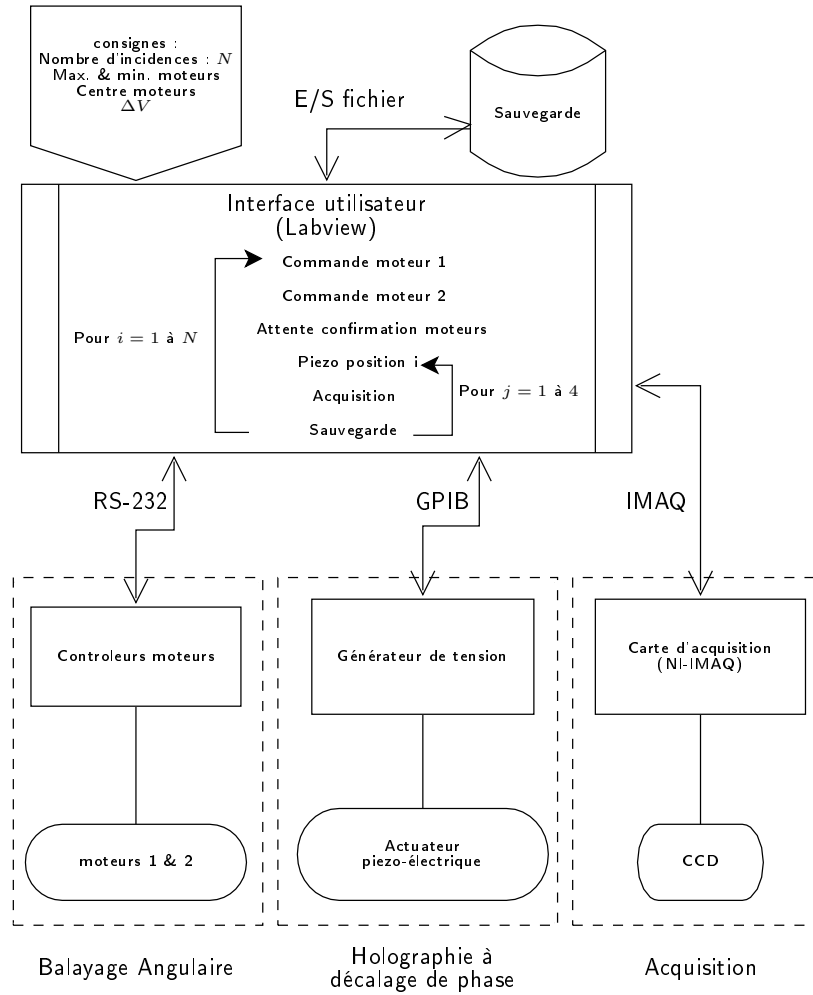
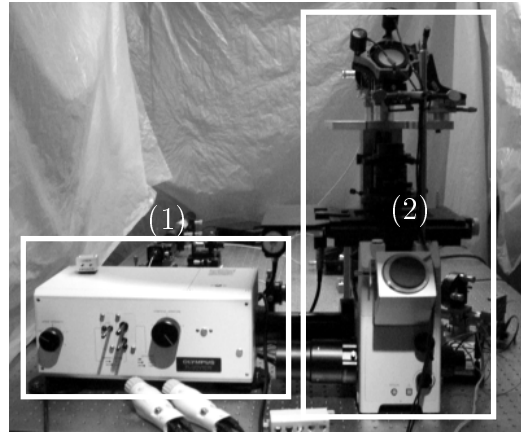
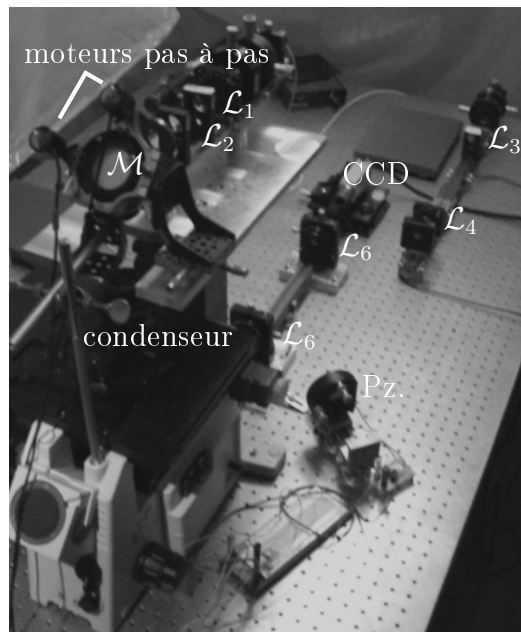


FIG. 4.9 – Schéma illustrant l'automatisation du montage expérimental de tomographie

La Figure 4.10 montre le montage expérimental dans son ensemble. La partie confocale est positionnée sur le port de gauche, tandis que le montage de tomographie utilise la colonne d'illumination que nous avons reconstruite et le port arrière. Le montage actuel occupe une grande partie de la table optique. Une évolution sera de le condenser, pour faciliter les réglages et sa robustesse.



(a)



(b)

FIG. 4.10 – Photographie du montage expérimental. (a) La tête confocale (1) se positionne sur la gauche du bâti (2). (b) Vue d'ensemble du bâti avec le montage tomographique. On retrouve les principaux éléments présentés dans la Figure 4.3.

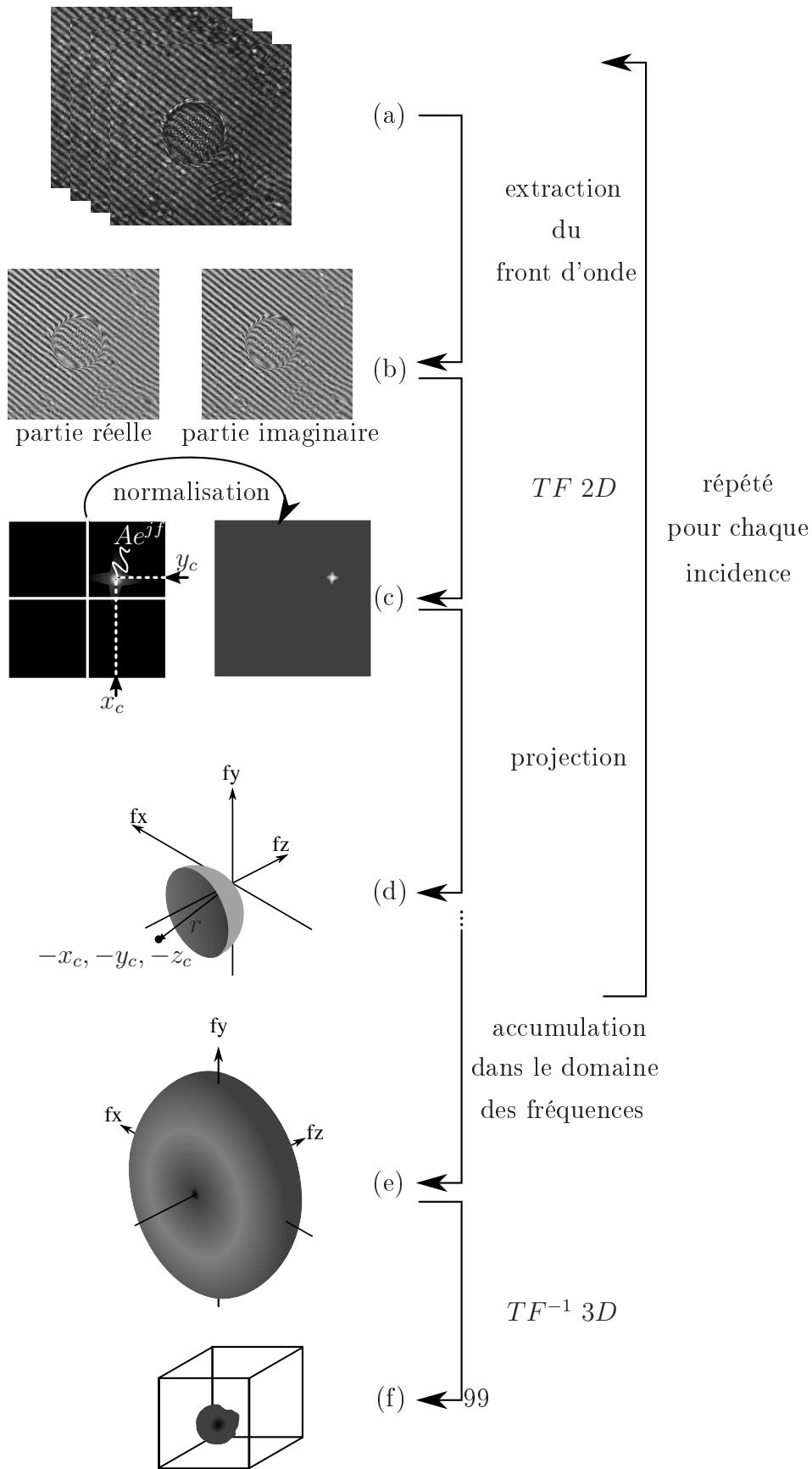


FIG. 4.11 – Schéma récapitulatif des étapes de l’algorithme de reconstruction des données tomographiques. (Voir texte pour détails)

4.2.2 Reconstruction des données

Le montage tomographique nous permet d'acquérir un grand nombre d'hologrammes de l'échantillon obtenus pour un grand nombre d'incidences de l'onde d'illumination. L'étape suivante consiste à reconstruire le support étendu des fréquences objet à partir de cette série d'hologrammes.

La Figure 4.11 décrit l'algorithme de reconstruction. A partir des 4 hologrammes obtenus pour une incidence (a) on calcule la valeur du champ diffusé dans le plan de la CCD (b). On réalise ensuite une transformée de Fourier 2D pour obtenir les composantes 2D du champ diffusé (c). Le module de l'image complexe alors obtenue fait apparaître un maximum qui correspond à la partie non diffusée de l'onde d'illumination. Les coordonnées 2D de ce maximum permettent de retrouver les trois composantes du vecteur d'illumination \mathbf{k}_i grâce à la condition d'élasticité (d). Ces composantes donnent alors le centre de la calotte de sphère supportant les fréquences de l'objet pour l'angle d'illumination considéré. Les composantes 2D de l'onde diffusée sont donc numériquement disposées sur cette calotte de sphère (e). Les étapes (a) à (e) sont répétées autant de fois qu'il y a d'angles d'illumination. Les fréquences objets sont alors accumulées dans un support de fréquences objet étendu (f). Au final une transformée de Fourier 3D inverse nous donne une distribution 3D complexe de la permittivité de l'objet (g).

Deux remarques importantes doivent être faites au sujet de cet algorithme.

La première concerne les mouvements du miroir. Si dans le cas d'une seule incidence la phase de l'onde d'illumination ne pose pas de soucis dans les étapes de reconstruction, il en va différemment dans le cas d'une reconstruction de données tomographiques. En effet, les mouvements mécaniques du miroir \mathcal{M} provoquent inévitablement un déphasage parasite pour chaque angle de l'onde d'illumination. Afin d'assurer une reconstruction correcte, il est donc impératif de corriger ces déphasages en normalisant l'amplitude complexe du champ diffusé. Pour cela à l'étape (d) on divise l'ensemble du champ complexe par sa valeur au niveau du maximum d'intensité (qui correspond à la partie non diffusée de l'onde d'illumination).

La deuxième remarque concerne l'accumulation des fréquences objets dans le support étendu. Le remplissage du support implique que certaines fréquences sont obtenues de façon redondante. Contrairement à la microscopie classique en transmission, la technique d'imagerie et la structure séquentielle de la reconstruction nous permettent ici de dénombrer les fréquences redondantes et ainsi d'en calculer la moyenne.

4.3 Résultats expérimentaux

4.3.1 Comparaison du microscope holographique avec la MTOD

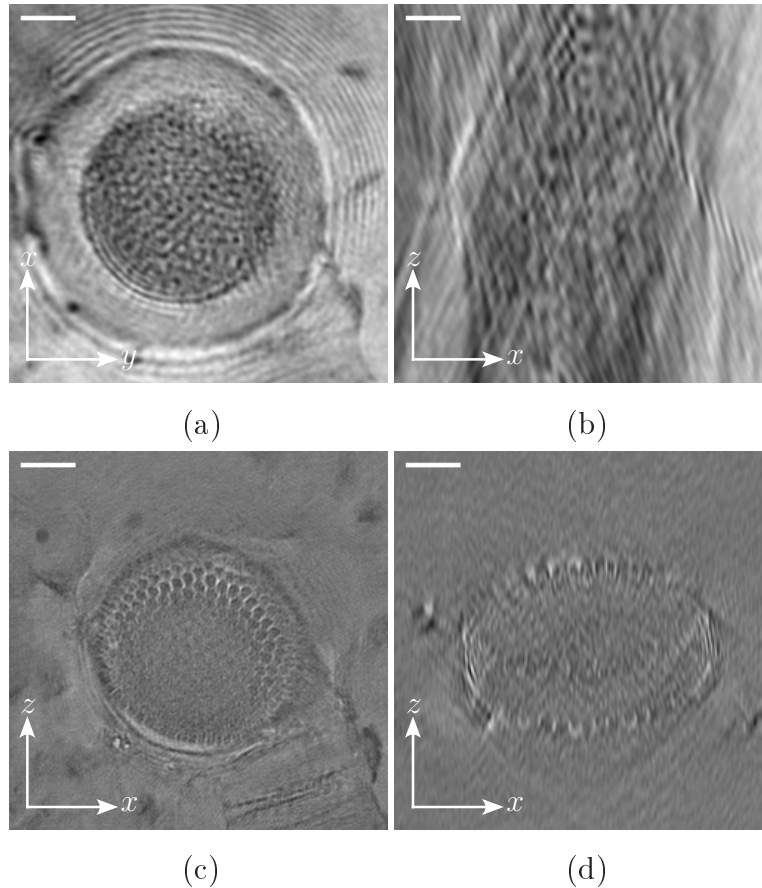


FIG. 4.12 – Images en MTOD de la partie imaginaire d’une frustule de diatomée (*Coccinodus sp*) pour une série de 1000 angles d’illumination couvrant la totalité de l’ouverture numérique du condenseur ($NA = 1.4$ dans une huile d’indice $n = 1.515$). (a) montre la coupe le long du plan $x - y$ et (b) le long du plan $x - z$ de la partie imaginaire de l’image obtenue en microscopie holographique, (c) et (d) les coupes correspondantes en MTOD. La barre d’échelle représente $4\mu m$.

La Figure 4.12 montre une comparaison des images d’une frustule de *Coccinodus sp* obtenues en microscopie holographique (a,b) (cf Fig. 4.8) et des images obtenues en MTOD (c,d) pour une série de 1000 angles d’illumination qui couvrent la totalité de l’ouverture numérique du condenseur ($NA = 1,4$ dans une huile d’immersion d’indice $n = 1,51$). Si l’on compare les coupes dans le plan $x - y$ (a) et (c) on peut noter une nette amélioration de la résolution dans le cas de la MTOD.

En effet les bords de la frustule sont mieux définis et les franges ont disparu. D'autre part on peut noter que la structure fine du spécimen apparaît et on note la présence d'alvéoles. Dans la coupe (a) cette structure fine apparaît sous forme d'une granulosité couvrant l'ensemble du spécimen. Dans le cas de la coupe (c), les alvéoles ne sont présentes que dans la partie supérieure du spécimen. En fait l'objet est légèrement incliné par rapport au champ observé. Dans le cas de la coupe (a) on voit les structures présentes dans les différents plans. Dans la coupe (c) les alvéoles n'apparaissent pas au centre du spécimen parcequ'elles se trouvent dans un autre plan qui est discriminé. Ceci est confirmé dans les coupes selon le plan $x-z$ (b,d). Si dans la coupe (b) on ne voit que des franges de diffraction, dans la coupe (d) la structure de l'objet apparaît. La MTOD couplée à une technique de reconstruction adaptée permet donc bien d'obtenir une image tridimensionnelle de l'objet observé.

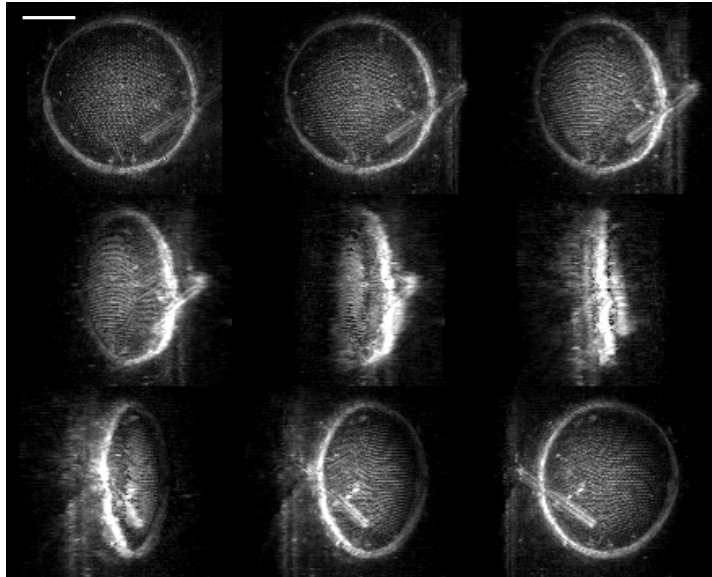


FIG. 4.13 – Planche regroupant des images en module d'une frustule de diatomée (*Coccinodus sp.*). Chaque image est une projection en (x, y) du maximum d'intensité de l'image 3D. L'angle de projection entre chaque image varie de 8° autour de l'axe y . La barre d'échelle représente $10\mu m$

La planche de la Figure 4.13 donne une meilleure idée des capacités d'imagerie 3D de notre système. La planche représente une série d'images en module d'une frustule de diatomée de la même espèce (*Coccinodus sp.*). Chaque image représente

une projection du maximum d'intensité de l'image 3D sous différents angles. Entre chaque image, l'angle de projection varie de 8° autour de l'axe y . On peut noter la présence d'une deuxième diatomée en forme de bâtonnet qui apparaît sur la droite de la *Coccinodus sp* dans la première image. Sa position qui varie dans la série de projection permet de se faire une meilleure idée de l'organisation du volume observé.

4.3.2 Étude expérimentale de la résolution

Dans le chapitre précédent nous avons mené une étude théorique de la résolution d'un système MTOD basée sur un calcul à partir des dimensions du support de fréquence. Nous souhaitons maintenant savoir si notre système présente des capacités de résolution latérale en accord avec les résultats théoriques obtenus.

Pour cela, nous avons étudié la réponse du système à un bord. La Figure 4.14 montre une planche résumant une telle étude menée sur les motifs d'une mire type USAF¹. Cette mire a été réalisée par un dépôt d'or sur une lame de verre par une méthode de photogravure. La Figure 4.14(a) résume l'étude de la résolution pour un système de microscopie holographique, la Figure 4.14(b) pour notre système MTOD. Les images représentent des coupes $x - y$ de la partie réelle des résultats de la reconstruction. Les courbes représentent les profils correspondants obtenus le long de la ligne représentée en tirets blanc. Pour chaque courbe, une partie correspondant à une transition de bord a été agrandie. La résolution expérimentale peut-être évaluée selon deux critères. Le premier critère consiste à dénombrer les pixels séparant les minimums et les maximums de la zone de transition (critère le plus défavorable). Il est également possible d'évaluer les niveaux moyens de part et d'autre du bord (représentés en pointillés sur les parties agrandies des courbes) et de dénombrer le nombre de pixels séparant ces deux niveaux dans la zone de transition (critère le plus favorable).

Selon le critère pic à pic, on trouve 6 pixels dans le cas du microscope holographique et 3 pixels dans le cas MTOD. Pour une taille de pixel de 110 nm on obtient une transition en 660 nm pour le microscope holographique et en 330 nm pour le MTOD. Selon le critère des niveaux moyens, on trouve 4 pixels dans le cas du microscope holographique, soit une transition en 440 nm , et 1 pixel pour le MTOD, soit une transition en 110 nm .

En théorie, la résolution latérale d'un système MTOD dans les mêmes conditions (condenseur et objectif d'ouverture numérique $NA = 1,4$ immergés dans une huile

¹Aimablement fournie par le Dr Rodolphe Jaffiol de l'Institut Jacques Delaunay de l'Université de Technologie de Troyes

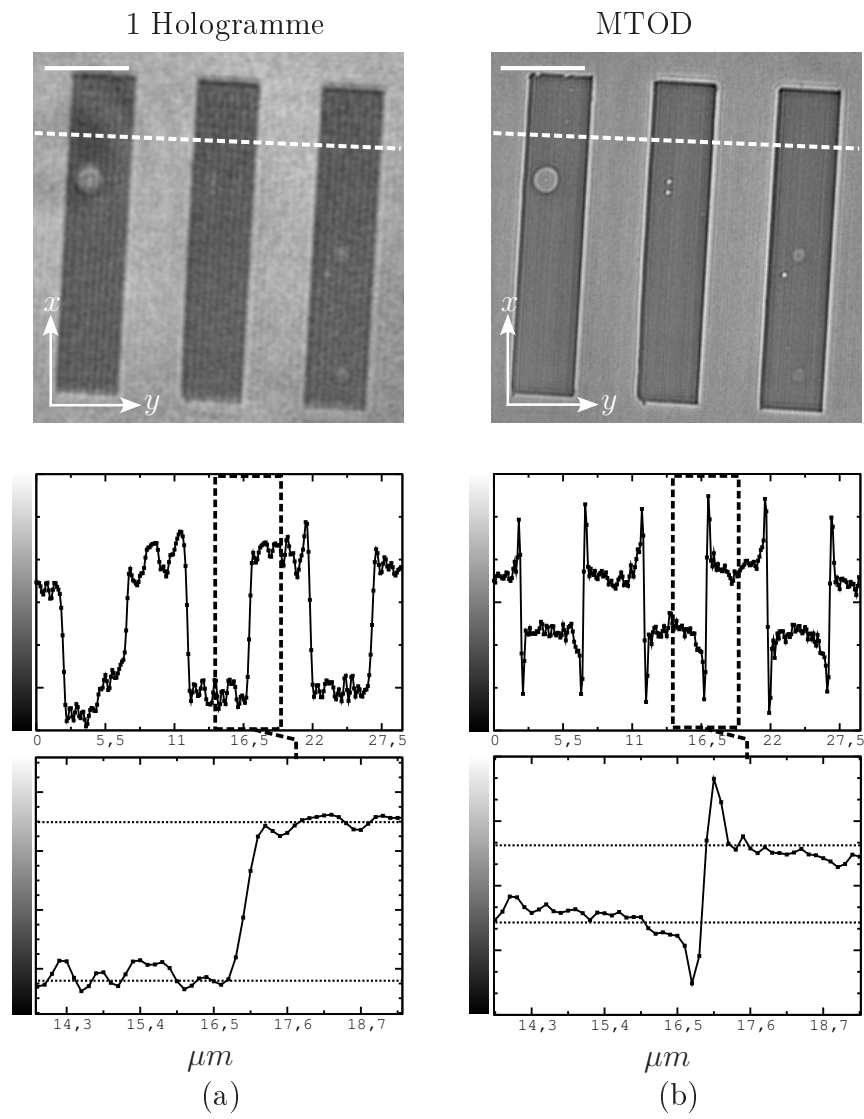


FIG. 4.14 – Étude comparative de la résolution à partir de la réponse à un bord. La barre d'échelle représente $5\mu m$ (voir texte pour détails)

d'indice $n = 1,151$ et longueur d'onde d'illumination $\lambda = 633 \text{ nm}$) a été calculée dans le chapitre précédent à :

$$r_{x,y} = 113 \text{ nm} \quad (4.13)$$

On peut noter que selon le critère pic à pic, notre système fournit une résolution moins bonne que ce qui est théoriquement prévu, tandis qu'elle est comparable selon le critère des niveaux moyens. La résolution expérimentale réelle se trouve certainement entre ces deux valeurs. Ce que l'on peut retenir, c'est que le fait de réaliser une tomographie permet d'améliorer la résolution latérale par rapport à la microscopie holographique. Dans la mesure où le support de fréquence voit ses dimensions latérales doubler selon que l'on utilise la microscopie holographique ou la MTOD, la résolution devrait, en théorie, être améliorée d'un facteur 2 selon que l'on utilise l'une ou l'autre technique. Les mesures réalisées montrent effectivement une amélioration dans des proportions comparables.

Notons enfin que l'objet utilisé dans cette étude présente des propriétés optiques particulières dans la mesure où il est métallique et présente des bords francs. Il est donc possible de s'interroger sur le fait qu'il remplit les conditions de la première approximation de Born.

4.3.3 Observation expérimentale de l'indice complexe

Dans le chapitre précédent, nous avons également vu que les images reconstruites selon la méthode présentée par [Wolf, 1969] correspondaient à la permittivité de l'objet, c'est à dire à la distribution tridimensionnelle des indices optiques au sein du spécimen. Nous venons de montrer que les images que nous obtenions offraient une résolution suffisante pour permettre une imagerie tridimensionnelle. Il convient maintenant de s'interroger sur la capacité de notre système à traduire les variations de la permittivité au sein du spécimen.

La Figure 4.15 montre une planche d'images obtenues sur des objets absorbants ou déphasants. Les images (a) et (b) montrent respectivement des coupes transversales des parties réelles et imaginaires de la reconstruction de graduations d'un micromètre objectif. Ces graduations consistent en un dépôt de peinture que nous considérons totalement absorbante. Les images (c) et (d) montrent respectivement les mêmes coupes pour la reconstruction d'un échantillon constitué de deux polymères de même épaisseur placés côte à côte² et dont l'indice de réfraction est différent. Le polymère de gauche présente un indice de réfraction $n_1 = 1,48$, celui

²Cet échantillon a été aimablement préparé par le Dr Lavinia Balan du Département de Photochimie Générale de l'École Nationale Supérieure de Chimie de Mulhouse

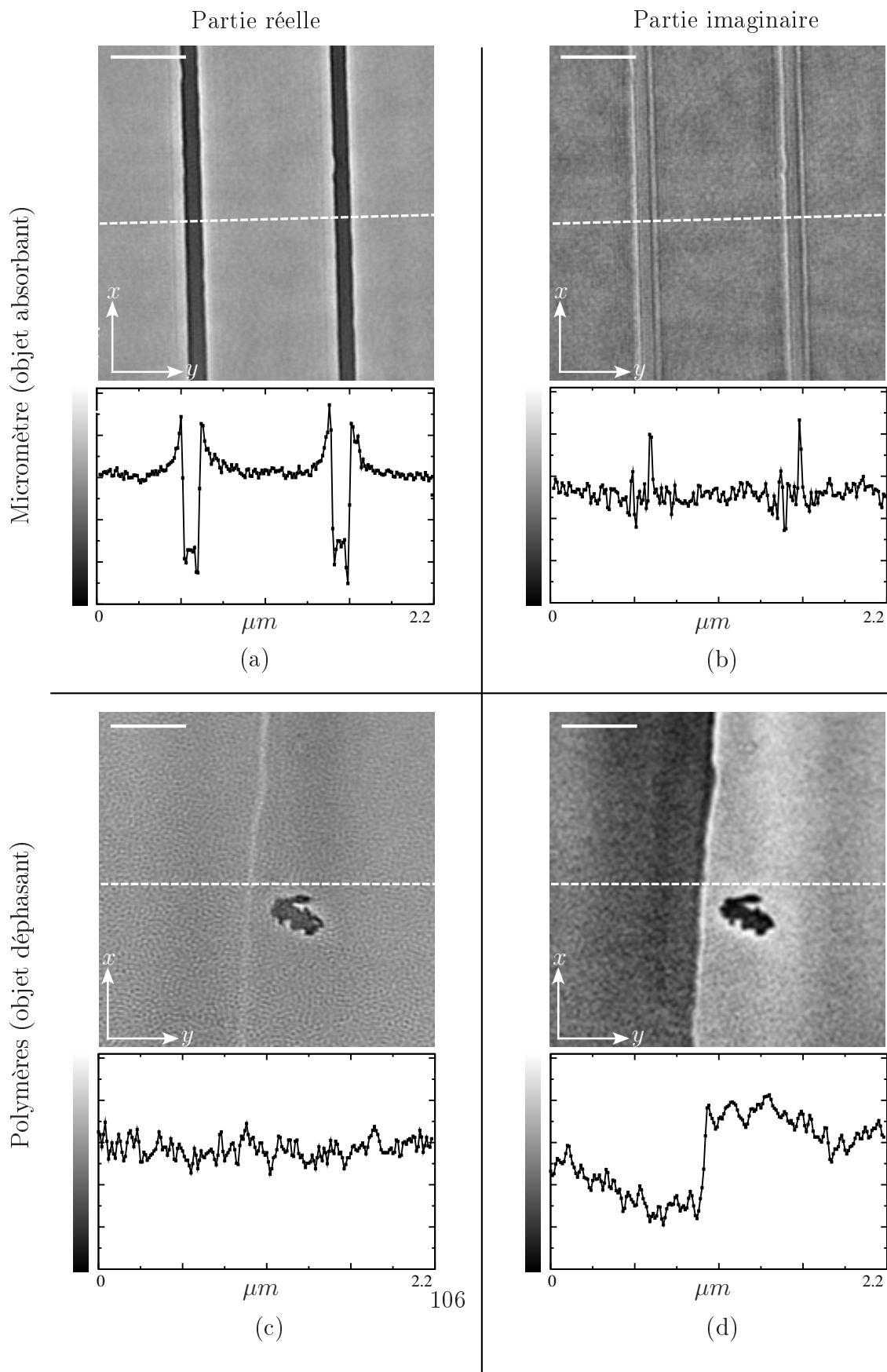


FIG. 4.15 – Observation expérimentale de l'indice complexe : comparaison des parties réelles et imaginaires pour des objets absorbants et déphasants. (voir texte pour détail)

de droite un indice de $n_2 = 1,54$. Les courbes présentent le profil de niveaux de gris le long de la ligne repérée en tirets blancs sur les images.

Dans le cas du micromètre objectif, les graduations entraînent une variation significative des niveaux de gris dans la partie réelle, tandis que cette variation est quasiment nulle dans la partie imaginaire. Dans le cas des polymères, la variation d'indice de réfraction se traduit par une variation significative du contraste de la partie imaginaire tandis que la partie réelle ne présente aucun contraste.

L'étude de ces images et de ces profils montrent qu'une variation de l'absorption se traduit par une variation des niveaux de gris dans la partie réelle alors qu'une variation de l'indice de réfraction se traduit par une variation dans la partie imaginaire. Ceci est conforme au cadre théorique que nous avons exposé dans le chapitre précédent. On peut donc espérer qu'une calibration du système permettrait de quantifier les données en absorption et en réfraction. De telles mesures présenteraient l'avantage d'obtenir une information sur les propriétés physiques du spécimen observé, autres que celles concernant sa morphologie. Il faut cependant être prudent dans la mesure où tous les spécimens peuvent ne pas convenir pour ce type de mesure. [Slaney et coll., 1984] a présenté une étude théorique qui montre qu'au delà de certaines dimensions ou de certaines variations d'indice, la première approximation de Born est mise quantitativement en défaut.

La Figure 4.16 présente les coupes transversales de la partie réelle (a) et imaginaire (b) d'une image de cellules d'un épithélium buccal. On peut constater sur les agrandissements (1) et (2) de la zone autour du noyau que selon que l'on observe l'absorption ou la réfraction, certaines structures sont présentes ou non.

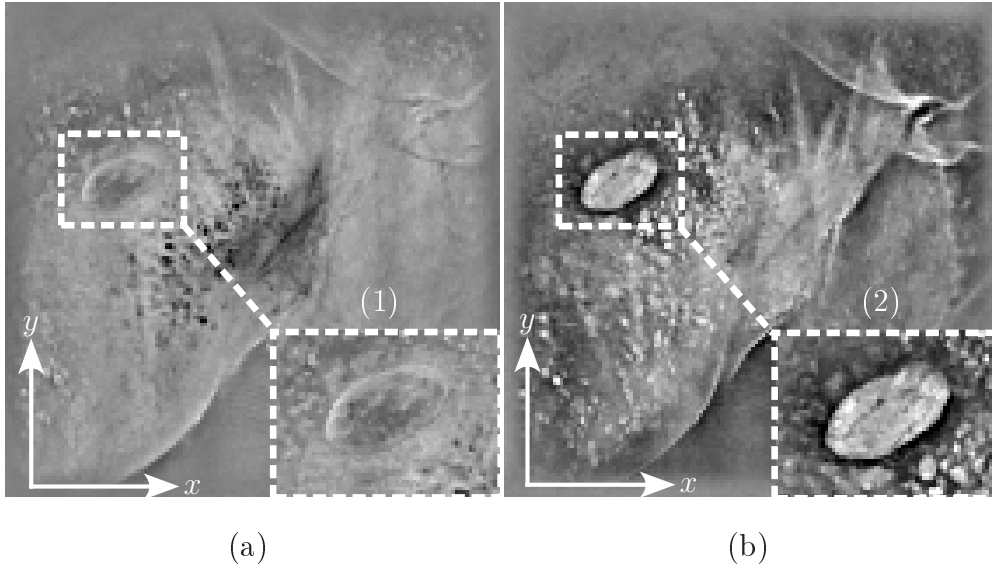


FIG. 4.16 – Exemple d'indices complexes sur un cas biologique. (a) et (b) présentent des coupes transversales des parties réelles et imaginaires d'images de cellules épithéliales buccales. Les agrandissement (1) et (2) montrent des structures dans et autour d'un noyau qui apparaissent ou non selon que l'on regarde la partie réelle ou imaginaire.

4.3.4 Couplage avec la microscopie confocale

Un des objectifs fixés au début de ce travail était de coupler la microscopie tomographique optique diffractive avec la microscopie confocale. Notre montage expérimental a été conçu en fonction de cet objectif.

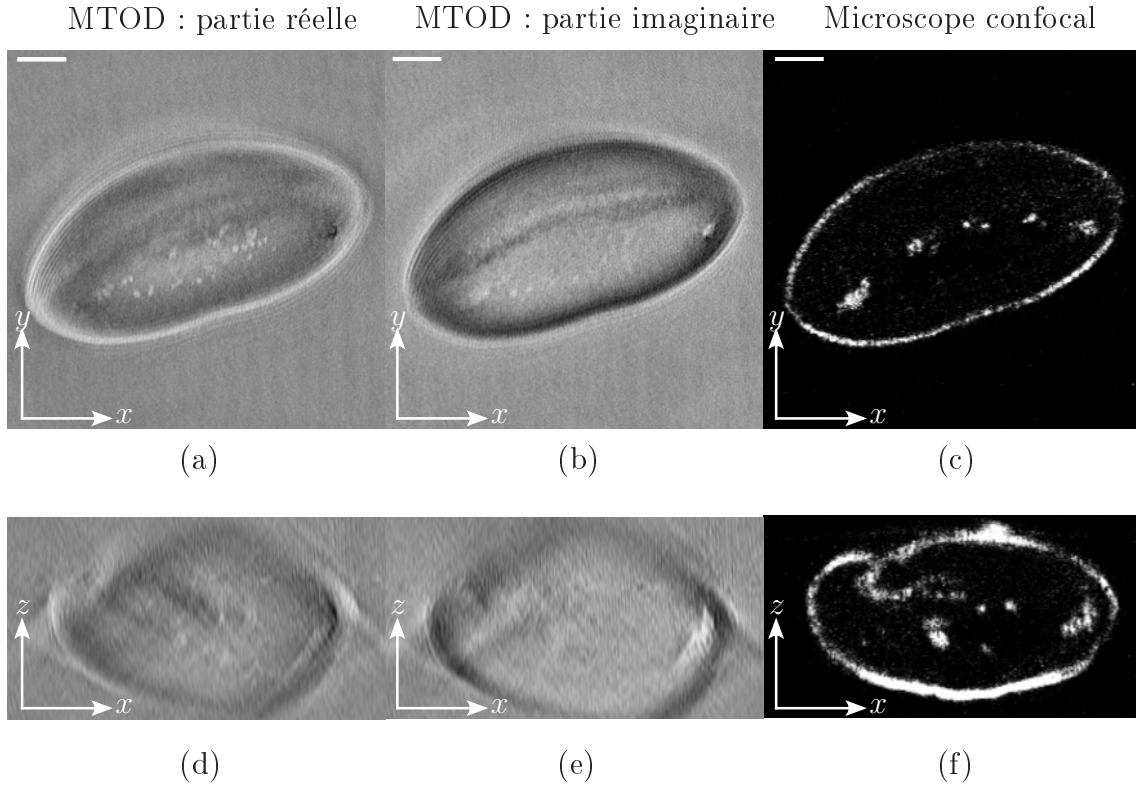


FIG. 4.17 – Combinaison MTOD/Microscopie confocale, images en coupe $x - y$ et $x - z$ d'un grain de pollen de perce-neige. (a,c) partie réelle en MTOD, (b,d) partie imaginaire, (c,e) image en microscopie confocale en autofluorescence. Les barres d'échelle représentent $4\mu m$

La Figure 4.17 présente les coupes transversales (a-c) et longitudinales (d-f) des images d'un grain de pollen de perce-neige obtenues en MTOD (a,b),(d,e) et en microscopie confocale par autofluorescence (c),(f). Les coupes (a) et (d) présentent la partie réelle de l'image obtenue en MTOD, tandis que les coupes (b) et (e) représentent la partie imaginaire. Il est clairement visible sur les coupes (d-f) que la résolution longitudinale obtenue en MTOD est moins bonne que celle des images en microscopie confocale. Ceci s'explique par le fait que le support de fréquences transmis par notre système présente un cône manquant caractéristique des microscopes en transmission, ce qui n'est pas le cas du microscope confocal.

Les images obtenues par couplage des deux techniques de microscopie n'ont pas encore fait l'objet d'une analyse poussée. Nous espérons cependant pouvoir mettre en évidence l'apport d'information qu'apporte le fait d'utiliser deux techniques de microscopie.

4.4 Perspectives d'évolution

Nous venons de présenter la réalisation d'un système de MTOD qui offre des capacités d'imagerie tridimensionnelle à partir de la permittivité d'objets faiblement diffusants. Plusieurs pistes d'améliorations ou d'évolutions de ce système peuvent être envisagées.

Un des intérêts essentiels du système de microscopie que nous présentons est sa capacité à fournir une information sur la distribution d'indice. Une étape importante serait donc de réaliser une calibration précise. Pour cela, il est nécessaire de disposer de spécimens présentant des variations d'indice connus. Une collaboration avec le département de Photochimie Générale de l'École Nationale Supérieure de Chimie de Mulhouse est en cours.

Une limite importante que nous avons notée est la lenteur de l'acquisition qui le rend sensible aux problèmes de variations de l'environnement ou du spécimen dans le temps. Nous avons vu que cette durée d'acquisition dépendait essentiellement du temps que mettent les moteurs pas à pas pour réaliser le balayage angulaire. Une première piste d'amélioration serait donc de passer à un système de balayage plus rapide en utilisant par exemple un balayage continu réalisé par un système galvanométrique [Choi et coll., 2007].

Afin d'améliorer la vitesse d'acquisition il est également envisageable d'extraire le front d'onde diffusé plus rapidement. Pour cela plusieurs pistes sont possibles. Une première solution serait de disposer d'une caméra rapide. Une autre consisterait à remplacer l'holographie à sauts de phase par l'holographie hors-axe, ce qui réduirait le nombre d'hogrammes à acquérir. Nous avons cependant écarté cette technique au départ parcequ'elle exigeait un champ de détection plus important. Une autre piste consisterait à utiliser un système acousto-optique pour réaliser le déphasage de l'onde de référence [Choi et coll., 2007] ce qui permettrait d'acquérir plus rapidement les différents hologrammes nécessaires à l'holographie à sauts de phase. Enfin, la dernière solution consisterait à enregistrer simultanément les 4 hologrammes en utilisant un système comparable à celui présenté dans la référence [Dunsby et coll., 2003]

En MTOD, la résolution longitudinale, bien qu'améliorée par rapport à celle d'un microscope holographique, est limitée en raison d'un cône de fréquences manquantes le long de l'axe optique. Cette résolution longitudinale peut-être améliorée en détectant la partie réfléchie de l'onde diffusée en plus de la partie transmise [Lauer, 2002; Fukutake et Milster, 2007]. Pour cela, il serait nécessaire de concevoir un nouveau système qui utiliserait deux objectifs opposés frontalement. L'illumination pourrait être alors réalisée à travers l'un des objectif avec une ouverture numérique comparable à celle du condenseur, les parties transmises et réfléchies de l'onde diffusée étant détectées à travers les deux objectifs. Notons qu'un tel système a été récemment présenté, sans avoir encore fait l'objet d'une réalisation aboutie [Fukutake et Milster, 2007].

Dans ce chapitre, nous avons présenté une première réalisation de microscope holographique dont nous avons vu qu'elle présentait un intérêt limité en raison de son manque de résolution longitudinale.

Nous avons par la suite présenté le montage tomographique que nous avons réalisé. Ce montage permet d'étendre le support de fréquences objet obtenu par rapport au microscope holographique et permet donc de réaliser une imagerie tridimensionnelle.

Les résultats expérimentaux que nous avons présentés nous ont permis d'évaluer les capacités de notre système tant en terme de résolution que de réponse aux variations d'indices optiques.

Nous avons également présenté des résultats récents qui montrent la capacité de notre système à réaliser sur un même spécimen l'imagerie en MTOD et en microscopie confocale.

Enfin, nous avons proposé des possibilités d'améliorations de notre montage expérimental ainsi que des perspectives concernant les évolutions possibles de cette technique de microscopie.

Conclusion

La microscopie de fluorescence est devenue un outil de choix dans l'observation du vivant. L'utilisation de marqueurs spécifiques permet en effet d'étudier isolément certaines structures et fonctions cellulaires. Grâce à la microscopie confocale en particulier, il est également possible d'obtenir des images tridimensionnelles. Cependant, nous avons pu constater que la résolution offerte demeurerait limitée.

Dans ce manuscrit, nous avons présenté une première possibilité d'amélioration de cette résolution qui porterait sur l'utilisation d'objectifs à forte ouverture numérique et une préparation particulière du spécimen.

Puis, nous avons brièvement rappelé les dernières techniques d'amélioration de la résolution qui utilisent une illumination structurée obtenue par le phénomène d'interférence à l'excitation du spécimen.

Nous avons alors proposé deux nouvelles techniques d'illumination structurée visant à améliorer la résolution latérale uniquement. La première consiste à utiliser une lame de phase, la deuxième une illumination à trois faisceaux mettant en jeu des interférences latérales. Les résultats obtenus montrent qu'il est possible d'obtenir un gain sensible le long d'un axe du plan transversal.

L'amélioration de la résolution passe aussi par des traitements numériques et en particulier la déconvolution.

Nous avons donc étudié des méthodes numériques permettant d'améliorer de façon isotrope la résolution du système confocal 3-faisceaux que nous avons proposé. La technique de fusion par moyenne nous est apparue peu adaptée à ce cas. La technique de fusion dans le domaine de Fourier étudiée apporte déjà des améliorations sensibles. La technique de déconvolution à noyaux multiples apporte une amélioration significative tant du point de vue de la résolution que de la robustesse au bruit et qu'au choix des paramètres utilisés.

Nous avons également pu noter que de nombreuses techniques de microscopie 2D ou 3D présentaient des réponses impulsionnelles asymétriques et pourraient donc constituer d'autres applications possibles des méthodes numériques que nous avons proposées.

Nous avons ensuite évoqué le rôle du spécimen dans le processus de formation d'image et noté que son rôle n'était pas neutre. Nous avons donc étudié une technique dite de microscopie holographique. Cette technique se décompose en deux étapes. La première consiste à enregistrer l'onde diffusée par le spécimen à la fois en amplitude et en phase. La seconde dite de reconstruction et effectuée numériquement dans le cadre de la première approximation de Born, donne la distribution 3D des indices optiques du spécimen. Mais, la résolution obtenue n'est pas suffisante pour extraire une distribution d'indice tridimensionnelle.

Nous avons donc étudié, d'un point de vue théorique, certaines techniques de tomographie qui permettent d'élargir le support de fréquences et d'améliorer ainsi la résolution finale. Nous avons étudié les différentes propositions de telles configurations en transmission.

Ensuite, nous avons dans un premier temps, présenté une réalisation de microscope holographique dont nous avons vu qu'elle présentait un intérêt limité, puis le montage tomographique en transmission que nous avons construit.

Ce montage permet d'étendre le support de fréquences objet obtenu par rapport au microscope holographique et permet donc d'obtenir réellement une imagerie tridimensionnelle.

Les résultats expérimentaux que nous avons présentés nous ont permis d'évaluer les capacités de notre système en terme de résolution. Celle-ci a été évaluée expérimentalement à partir d'une réponse à un bord. Nous avons également montré que notre système était capable de mesurer des variations d'indices optiques comme prévu par la théorie. Enfin, nous avons couplé notre MTOD avec une tête confocale. Nous sommes donc maintenant en mesure de faire les deux types d'imagerie sur le même spécimen. Ce résultat ouvre la voie à une mise en œuvre des techniques de déconvolution adaptative étudiée au laboratoire (thèse B. Colicchio, 2004; thèse E. Maalouf, en cours).

Les travaux présentés dans ce manuscrit devraient connaître plusieurs développements. Tout d'abord nous envisageons de mettre en œuvre et de valider expérimentalement les techniques d'illuminations structurées proposées ainsi que les méthodes de reconstruction envisagées.

Notre montage expérimental de microscopie tomographique optique diffractive devra être calibré en indice. Améliorer la vitesse d'acquisition sera un point crucial. Nous avons pour cela envisagé l'utilisation de configurations optiques autre que l'holographie à décalage de phase.

Enfin, notre microscope fourni aux biologistes une information jusqu'alors non disponible : la distribution d'indice au sein du spécimen. Nous pensons que cette

information supplémentaire pourrait offrir des opportunités nouvelles dans l'étude des spécimens biologiques.

Bibliographie

- E. ABBE,
« Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung »,
Archives für Microscopische Anatomie, vol. 9, p. 413, 1873.
- K. ATKINSON,
The Numerical Solution of Integral of Equations of the Second Kind,
Cambridge university press, 1997.
- B. BAILEY, D. L. FARKAS, D. LANSING TAYLOR ET FREDERICK LANNI,
« Enhancement of axial resolution in fluorescence microscopy by standing-wave excitation. »,
Nature, vol. 366, p. 44, 1993.
- B. BAILEY, V. KRISHNAMURTHI, D. L. FARKAS, D. L. TAYLOR ET F. LANNI,
« Three-dimensional imaging of biological specimens with standing wave fluorescence microscopy »,
Dans *Proceedings of SPIE*, C. J. COGSWELL ET K. CARLSSON (coordinateurs),
vol. 2184, p. 208, SPIE, 1994.
- F. CHARRIÈRE, A. MARIAN, F. MONTFORT, J. KUEHN, T. COLOMB,
E. CUCHE, P. MARQUET ET C. DEPEURSINGE,
« Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy »,
Optics Letters, vol. 31, p. 178, 2006a.
- F. CHARRIÈRE, N. PAVILLON, T. COLOMB, C. DEPEURSINGE, T. J. HEGER,
E. A. D. MITCHELL, P. MARQUET ET B. RAPPAZ,
« Living specimen tomography by digital holographic microscopy : morphometry of testate amoeba »,
Optics Express, vol. 14, p. 7005, 2006b.
- P. C. CHAUMET, K. BELKEBIR ET A. SENTENAC,
« Superresolution of three-dimensional optical imaging by use of evanescent-waves »,

- Optics Letters*, vol. 29, p. 2740, 2004.
- W. CHOI, C. FANG-YEN, K. BADIZADEGAN, S. OH, N. LUE, R. R. DASARI ET M. S. FELD,
 « Tomographic phase microscopy », *Nature Methods*, vol. 4, p. 717, 2007.
- A. CHOMIK,
Deconvolution 3D orientée vers la reconstruction d'objets biologiques observés en microscopie optique de fluorescence,
 Thèse de doctorat, Université de Haute-Alsace, 1997.
- A. CHOMIK, C. DIETERLEN, A. XU, O. HAEBERLÉ, J. MEYER ET S. JACQUEY,
 « Quantification in optical sectioning microscopy : a comparison of some deconvolution algorithms in view of 3d image segmentation », *Journal of Optics*, vol. 28, p. 225, 1997.
- E. CHUNG, D. KIM ET P. T. SO,
 « Extended resolution wide-field optical imaging : objective-launched standing-wave total internal reflection fluorescence microscopy », *Optics Letters*, vol. 31, p. 945, 2006.
- B. COLICCHIO, O. HAEBERLÉ, C. XU, A. DIETERLEN ET G. JUNG,
 « Improvement of the lls and map deconvolution algorithms by automatic determination of optimal regularization parameters and pre-filtering of original data », *Optics Communications*, vol. 244, p. 37, 2005.
- B. COLICCHIO,
Déconvolution adaptative en microscopie tridimensionnelle de fluorescence,
 Thèse de doctorat, Université de Haute-Alsace, 2004.
- J. CONCHELLO,
 « Superresolution and convergence properties of the expectation-maximization algorithm for maximum-likelihood deconvolution of incoherent images. », *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 15, p. 2609, 1998.
- R. DÄNDLIKER ET K. WEISS,
 « Reconstruction of three-dimensional refractive index from scattered waves », *Optics Communications*, vol. 1, p. 323, 1970.
- G. DEMOMENT ET J. IDIER,
Problèmes inverses et problèmes mal-posés. Approche bayésienne pour les problèmes inverses.,

- vol. Série traitement du signal et de l'image, Hermès, 2001.
- A. J. DEVANEY ET A. SCHATZBERG,
« Coherent optical tomographic microscope »,
Dans *Proceedings of SPIE*, vol. 1767, p. 62, San Diego, CA, USA, SPIE, 1992.
- C. DUNSBY, Y. GU ET P. FRENCH,
« Single-shot phase-stepped wide-field coherencegated imaging »,
Optics Express, vol. 11, p. 105, 2003.
- M. FAUVER, E. SEIBEL, J. R. RAHN, M. MEYER, F. PATTEN, T. NEUMANN
ET A. NELSON,
« Three-dimensional imaging of single isolated cell nuclei using optical projection
tomography »,
Optics Express, vol. 13, p. 4210, 2005.
- A. F. FERCHER, H. BARTELT, H. BECKER ET E. WILTSCHKO,
« Image formation by inversion of scattered field data : experiments and com-
putational simulation »,
Applied Optics, vol. 18, p. 2427, 1979.
- J. T. FROHN, H. F. KNAPP ET A. STEMMER,
« True optical resolution beyond the Rayleigh limit achieved by standing wave
illumination »,
Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 97, p. 7232, 2000.
- N. FUKUTAKE ET T. D. MILSTER,
« Proposal of three-dimensional phase contrast holographic microscopy »,
Optics Express, vol. 15, p. 12662, 2007.
- D. GABOR,
« Microscopy by reconstructed wave-fronts »,
*Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical
Sciences*, vol. 197, p. 454, 1949.
- D. C. GHIGLIA,
« Space-invariant deblurring given n independently blurred images of a common
object »,
Journal of the Optical Society of America A, vol. 1, p. 398, 1984.
- S. F. GIBSON ET F. LANNI,
« Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion
objective lens used in three-dimensional light microscopy »,
Journal of the Optical Society of America A, vol. 8, p. 1601, 1991.

- H. GIOVANNINI, A. SENTENAC, P. C. CHAUMET, F. MAFFEZZINI, D. KONAN,
F. DRESK ET V. LAUER,
« Far-field reflexion microscope using optical diffraction tomography - applica-
tion to profilometry »,
Dans *Proceedings of FOM*, 2007.
- W. GORSKI ET W. OSTEN,
« Tomographic imaging of photonic crystal fibers »,
Optics Letters, vol. 32, p. 1977, 2007.
- F. GOUDAIL, O. RUCH ET P. REFREGIER,
« Deconvolution of several versions of a scene perturbed by different defocus
blurs : Influence of kernel diameters on restoration quality and on robustness to
kernel estimation »,
Applied Optics, vol. 39, p. 6602, 2000.
- M. G. L. GUSTAFSSON,
« Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured
illumination microscopy »,
Journal of Microscopy, vol. 198, p. 82, 2000.
- M. G. L. GUSTAFSSON, D. A. AGARD ET J. W. SEDAT,
« Sevenfold improvement of axial resolution in 3d wide-field microscopy using
two objective lenses »,
Dans *Proceedings of SPIE*, T. WILSON ET C. J. COGSWELL (coordinateurs),
vol. 2412, p. 147, SPIE, 1995.
- M. G. L. GUSTAFSSON, D. A. AGARD ET J. W. SEDAT,
US patent 5671085, 1997.
- O. HAEBERLÉ,
« Focusing of light through a stratified medium : a practical approach for com-
puting microscope point spread functions. Part I : Conventional microscopy »,
Optics Communications, vol. 216, p. 55, 2003.
- O. HAEBERLÉ ET B. SIMON,
« Improving the lateral resolution in confocal fluorescence microscopy using
laterally interfering excitation beams »,
Optics Communications, vol. 259, p. 400, 2006.
- O. HAEBERLÉ, F. BICHA, C. SIMLER, A. DIETERLEN, C. XU, B. COLICCHIO,
S. JACQUEY ET M. P. GRAMAIN,
« Identification of acquisition parameters from the point spread function of a
fluorescence microscope »,

- Optics Communications*, vol. 196, p. 109, 2001.
- O. HAEBERLÉ, M. AMMAR, H. FURUKAWA, K. TENJIMBAYASHI ET P. TÖRÖK,
 « The point spread function of optical microscopes imaging through stratified media »,
Optics Express, vol. 11, p. 2964, 2003.
- O. HAEBERLÉ, A. SENTENAC ET H. GIOVANNINI,
Modern Research and Educational Topics in Microscopy, vol. 2,
 Formatex édition, 2005.
- O. HAEBERLÉ,
 « Focusing of light through a stratified medium : a practical approach for computing microscope point spread functions : Part ii : confocal and multiphoton microscopy »,
Optics Communications, vol. 235, p. 1, 2004.
- O. HAEBERLE ET B. SIMON,
 « The point spread function of fluorescence microscopes imaging through a layered or an inhomogeneous medium »,
 Dans *Proceedings of SPIE*, vol. 5462, p. 11, Strasbourg, France, SPIE, 2004.
- R. HEINTZMANN ET C. G. CREMER,
 « Laterally modulated excitation microscopy : improvement of resolution by using a diffraction grating »,
 Dans *Proceedings of SPIE*, I. J. BIGIO, H. SCHNECKENBURGER, J. SLAVIK, K. SVANBERG ET P. M. VIALLET (coordinateurs), vol. 3568, p. 185, SPIE, 1999.
- S. W. HELL,
 Increasing the Resolution of Far-Field Fluorescence Light Microscopy by Point Spread Functional Engineering,
 Dans *Nonlinear and Two-Photon Induced Fluorescence*, LAKOWICZ J. R. (coordinateur), vol. 5 de *Topics in fluorescence spectroscopy*, Plenum Press, New York, 1997.
- S. W. HELL ET E. H. K. STELZER,
 « Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope »,
Journal of the Optical Society of America A, vol. 9, p. 2159, 1992.
- T. J. HOLMES,
 « Blind deconvolution of quantum-limited incoherent imagery : maximum-likelihood approach »,
Journal of the Optical Society of America A, vol. 9, p. 1052, 1992.

- T. HOLMES,
 « Maximum-likelihood image restoration adapted for noncoherent optical imaging »,
Journal of the Optical Society of America A, vol. 5, p. 666, 1988.
- T. HOLMES ET Y. LIU,
 « Richardson-lucy/maximum likelihood image restoration algorithm for fluorescence microscopy : further testing »,
Applied Optics, 1989.
- T. HOLMES ET N. O'CONNOR,
 « Blind deconvolution of 3D transmitted light brightfield micrographs. »,
Journal of Microscopy, vol. 200 (Pt 2), p. 114, 2000.
- M. HOMEM, N. MASCARENHAS, L. COSTA ET C. PREZA,
 « Biological image restoration in optical-sectioning microscopy using prototype image constraints »,
Real-Time Imaging, p. 475, 2002.
- J. HUISKEN, J. SWOGER, F. D. BENE, J. WITTBRODT ET E. H. K. STELZER,
 « Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. »,
Science, vol. 305, p. 1007, 2004.
- B. HUNT,
 « Prospects for image restoration »,
Journal of Modern Physics C, vol. 5, p. 151, 1994.
- P. JANSSON, W. BLASS, G. HALSEY, B. FRIEDEN ET S. HOWARD,
Deconvolution with applications in spectroscopy,
 ACADEMIC PRESS, INC, 1984.
- S. KAWATA, O. NAKAMURA ET S. MINAMI,
 « Optical microscope tomography. i. support constraint »,
Journal of Optical Society of America A, vol. 4, p. 292, 1987.
- S. KIKUCHI, K. SONOBE, D. SHINOHARA, N. OHYAMA, S. MASHIKO ET Y. HIRAOKA,
 « A double-axis microscope and its three-dimensional image position adjustment based on an optical marker method »,
Optics Communications, vol. 129, p. 237, 1996.
- T. A. KLAR ET S. W. HELL,
 « Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy »,

- Optics Letters*, vol. 24, p. 954, 1999.
- T. A. KLAR, E. ENGEL ET S. W. HELL,
« Breaking abbe's diffraction resolution limit in fluorescence microscopy with stimulated emission depletion beams of various shapes »,
Physical Review E, vol. 64, p. 066613, 2001.
- V. KRISHNAMURTHI, B. BAILEY ET F. LANNI,
« Image processing in 3d standing-wave fluorescence microscopy »,
Dans *Proceedings of SPIE*, C. J. COGSWELL, G. S. KINO ET T. WILSON
(coordinateurs), vol. 2655, p. 18, SPIE, 1996.
- V. LAUER,
« New approach to optical diffraction tomography yielding a vector equation of diffraction tomography and a novel tomographic microscope »,
Journal of Microscopy, vol. 205, p. 165, 2002.
- S. LI, J. T. KWOK ET Y. WANG,
« Combination of images with diverse focuses using the spatial frequency »,
Information Fusion, vol. 2, p. 169, 2001.
- L. LUCY,
« An iterative technique for the rectification of observed distributions »,
The Astronomical Journal, vol. 79, p. 745, 1974.
- B. M. MACCALLUM,
« Blind deconvolution by simulated annealing »,
Optics Communications, vol. 75, p. 101, 1990.
- P. MARSH, D. BURNS ET J. GIRKIN,
« Practical implementation of adaptive optics in multiphoton microscopy »,
Optics Express, vol. 11, p. 1123, 2003.
- J. MCNALLY, T. KARPOVA, J. COOPER ET J. CONCHELLO,
« Three-dimensional imaging by deconvolution microscopy »,
Methods, vol. 19, p. 373, 1999.
- E. MEINEL,
« Origins of linear and nonlinear recursive restoration algorithms »,
Journal of the Optical Society of America A, vol. 3, p. 787, 1986.
- V. MICO, Z. ZALEVSKY ET J. GARCIA,
« Synthetic aperture microscopy using off-axis illumination and polarization coding »,
Optics Communications, vol. 276, p. 209, 2007.

- M. MINSKY,
« Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope »,
Scanning, vol. 10, p. 128, 1988.
- M. P. MORSE ET H. FESHBACK,
Methods of Theoretical Physics,
1953.
- M. NAGORNI ET S. W. HELL,
« Coherent use of opposing lenses for axial resolution increase in fluorescence microscopy. I. Comparative study of concepts. »,
Journal of the Optical Society of America A, vol. 18, p. 36, 2001a.
- M. NAGORNI ET S. W. HELL,
« Coherent use of opposing lenses for axial resolution increase. II. Power and limitation of nonlinear image restoration. »,
Journal of the Optical Society of America A, vol. 18, p. 49, 2001b.
- T. NODA, S. KAWATA ET S. MINAMI,
« Three-dimensional phase contrast imaging by a computed-tomography microscope »,
Applied Optics, vol. 31, p. 670, 1992.
- J. B. PAWLEY,
« Limitations on optical sectioning in live-cell confocal microscopy »,
Scanning, vol. 24, p. 241, 2002.
- W. RICHARDSON,
« Bayesian-based iterative method of image restoration »,
Journal of the Optical Society of America A, vol. 62, p. 55, 1972.
- P. ROMAN,
Advanced Quantum Theory,
Addison-Wesley, 1965.
- B. SIMON ET O. HAEBERLÉ,
« Multi-kernel deconvolution applied to confocal fluorescence microscopy with engineered point spread function »,
Journal of the European Optical Society - Rapid Publications, vol. 1, 2006.
- M. SLANEY, A. KAK ET L. LARSEN,
« Limitations of imaging with first-order diffraction tomography »,
Microwave Theory and Techniques, IEEE Transactions on, vol. 32, p. 860, 1984.

- N. STREIBL,
« Three-dimensional imaging by a microscope »,
Journal of Optical Society of America A, vol. 2, p. 121, 1985.
- J. SWOGER, J. HUISKEN ET E. H. K. STELZER,
« Multiple imaging axis microscopy improves resolution for thick-sample applications »,
Optics Letters, vol. 28, p. 1654, 2003.
- A. N. TIKHONOV ET V. Y. ARSENIN,
Solutions of Ill-Posed Problems,
Wiley, 1977.
- P. TÖRÖK ET P. VARGA,
« Electromagnetic diffraction of light focused through a stratified medium »,
Applied Optics, vol. 36, p. 2305, 1997.
- P. VAN CITTERT,
« Zum einfluss der spaltbreite auf die intensitätsverteilung in spektrallinien II »,
Z. Physik, vol. 69, 1931.
- P. J. VERVEER,
Computational and Optical Methods for Improving Resolution and Signal Quality in Fluorescence Microscopy,
Thèse de doctorat, Technische Universiteit Delft, 1998.
- V. WESTPHAL, L. KASTRUP ET S. HELL,
« Lateral resolution of 28 nm ($\lambda / 25$) in far-field fluorescence microscopy »,
Applied Physics B : Lasers and Optics, vol. 77, p. 377, 2003.
- E. WOLF,
« Three-dimensional structure determination of semi-transparent objects from holographic data »,
Optics Communications, p. 153, 1969.
- P. WOODFORD, T. M. TURPIN, M. W. RUBIN, J. LAPIDES ET C. H. PRICE,
« Synthetic aperture microscope : experimental results »,
Dans *Proceedings of SPIE*, vol. 2751, p. 230, Orlando, FL, USA, SPIE, 1996.
- I. YAMAGUCHI ET T. ZHANG,
« Phase-shifting digital holography »,
Optics Letters, vol. 22, p. 1268, 1997.

Résumé

Mots clés : microscopie de fluorescence, microscopie holographique, microscopie tomographique optique diffractive, synthèse d'ouverture, déconvolution, traitement d'image.

Le travail de cette thèse porte sur l'amélioration des techniques de microscopies optiques 2D et 3D.

Dans une première partie des travaux, j'ai proposé une technique d'illumination structurée focalisée et des traitements numériques spécifiques permettant un gain de la résolution latérale d'un facteur deux en microscopie confocale de fluorescence.

La deuxième partie des travaux a consisté à réaliser un montage expérimental de microscopie tomographique optique diffractive qui permet, après une étape de reconstruction numérique, l'imagerie de spécimen transparents en trois dimensions. La caractérisation du montage expérimental a montré que cette technique permettait d'obtenir une information jusqu'alors inaccessible : la cartographie des indices optiques au sein du spécimen observé. En outre un gain en résolution vis à vis des techniques de microscopie plus classiques a été obtenu.

Abstract

Keywords : fluorescence microscopy, holographic microscopy, diffractive optical tomographic microscopy, synthetic aperture, deconvolution, image processing.

This work concerns the improvement of 2D and 3D optical microscopy techniques.

In a first part, I propose a focused structured illumination technique with specific numerical processing allowing an improvement of a factor two of the lateral resolution in confocal fluorescence microscopy.

The second part of work consisted in carrying an experimental diffractive optical tomographic microscopy set-up. This one allows, after a stage of numerical processing of the images, to image 3D transparent specimens. The characterization of the experimental set-up showed that this technique allowed to obtain information not accessible before : the cartography of the optical indices within the specimen observed. Moreover an improvement of the resolution with respect to the more traditional techniques of microscopy was obtained.

