

UNIVERSITE DE HAUTE-ALSACE

MEMOIRE

Présenté pour obtenir l'

Habilitation à Diriger les Recherches

par

Olivier HAEBERLÉ

**DE LA PHYSIQUE DE L'EMISSION PHOTONIQUE
AU TRAITEMENT DES IMAGES :
CONTRIBUTION A L'AMELIORATION DE LA
RESOLUTION EN MICROSCOPIE OPTIQUE**

Date de soutenance: 14 Décembre 2004

Commission d'examen :

Claude Boccara	rapporteur externe
Joseph Braat	rapporteur externe
Philippe Réfrégier	rapporteur externe
Carmelo Pirri	rapporteur interne
Michel de Mathelin	
Serge Jacquy	

SOMMAIRE

*“-N’avez vous point quelques principes, quelques commencements des Sciences ?
- Oh ! oui, je sais lire et écrire.”*

Molière, Le Bourgeois Gentilhomme

INTRODUCTION	1
INTERLUDE	5
CHAPITRE I ET DIEU CREA LE PHOTON...	7
1.1 Introduction	8
1.2 Rayonnement Smith-Purcell	9
1.2.1 Le champ incident	9
1.2.2 Le champ réfléchi	11
1.2.3 Le spectre du rayonnement Smith-Purcell	12
1.2.4 Emission par un faisceau d’électrons	16
1.2.5 Théoreme de réciprocité	16
1.2.6 Simulations	17
1.2.7 Rayonnement Smith-Purcell d’un cristal photonique	20
1.3 Rayonnement de Transition	23
1.3.1 Développement du champ en ondes planes	23
1.3.2 Théorème de réciprocité	27
1.3.3 Equation intégrale	31
1.3.4 Une application : le diagnostic de faisceau	38
1.4 Rayonnement de Transition Diffractif	42
1.4.1 Dispositif expérimental	43
1.4.2 Résultats	45
1.4.3 Modèle semi-empirique	50
1.5 Microscope à Rayonnement de Transition	54
1.6 Conclusion	55
REFERENCES	61

CHAPITRE II VOIR DE PLUS EN PLUS PETIT... 63

2.1	Introduction	64
2.1.1	Un peu d'histoire	64
2.1.2	Constitution d'un microscope de fluorescence	64
2.1.3	Le microscope conventionnel	66
2.1.4	Le microscope confocal	66
2.1.5	Excitation multi-photonique	67
2.1.6	Imagerie 3-D	68
2.2	Réponse Impulsionnelle Optique : Modèle de Gibson et Lanni	69
2.3	Réponse Impulsionnelle Optique : Modèle de Török et Varga	73
2.4	Réponse Impulsionnelle Optique : Modèle de Haeberlé et al.	77
2.5	Simplification des modèles vectoriels	80
2.6	Modélisation du microscope confocal de fluorescence	84
2.6.1	Applications biologiques	85
2.6.2	Cristallographie	88
2.7	Application au Microscope θ polarisé	91
2.8	Microscopie à Objectifs Multiples	97
2.8.1	Introduction	97
2.8.2	Microscopes 4Pi croisés	101
2.8.3	Microscope 4Pi modifié	102
2.9	Identification des paramètres d'acquisition	106
2.9.1	Problématique	106
2.9.2	Méthode	107
2.9.3	Simulations	108
2.9.4	Résultats expérimentaux	110
2.9.5	Conclusion	111
2.10	Microscopie θ en réflexion	112
2.11	Conclusion	116

REFERENCES 119

CHAPITRE III CONVOLUER... DECONVOLUER.. C'EST TOUJOURS TRAVAILLER. 121

3.1	Introduction	122
3.2	Déconvolution : équation intégrale en 2D ou 3D	125
3.2.1	Modèles déterministes	125
3.2.2	Modèles Bayésien	126
3.2.3	Présentation de quelques algorithmes	127
3.2.3.1	Linear Least square Solution (LLS)	127
3.2.3.2	Algorithme de Carrington	128

3.2.3.3	Maximum A Posteriori (MAP)	129
3.2.3.4	Maximum Likelihood-Expectation Maximization (ML-EM)	129
3.3	Adéquations des algorithmes existants	130
3.3.1	Efficacité de reconstruction des algorithmes de déconvolution	130
3.3.2	Convolution non invariante	134
3.3.3	Sensibilité aux conditions initiales	140
3.3.3.1	Variation de l'indice de l'huile d'immersion.	140
3.3.3.2	Limitation de l'ouverture numérique	142
3.3.3.3	Epaisseur de la lamelle.	143
3.4	Discussion	145
3.5	Améliorations apportées	146
3.5.1	Automatisation des algorithmes	146
3.5.2	Préfiltrage des données	149
3.6	Conclusion	159
REFERENCES		163
CHAPITRE IV PROJET DE RECHERCHES		165
4.1	Introduction	166
4.2	Production des photons	167
4.3	Instrumentation	169
4.4	Modèles de formation des images	171
4.5	Traitement de l'image	173
4.6	Extensions possibles de ces travaux	175
CONCLUSION		177
REMERCIEMENTS		179

INTRODUCTION



Martin Schongauer "Tentation de Saint Antoine"

— *Est-ce la physique que vous voulez apprendre?*

— *Qu'est ce qu'elle chante, cette physique?*

— *La physique est celle qui explique les principes des choses naturelles et les propriétés du corps; qui discourt de la nature des éléments, des métaux, des minéraux, des pierres, des plantes et des animaux, et nous enseigne les causes de tous les météores, l'arc -en-ciel, les feux volants, les comètes, les éclairs, le tonnerre, la foudre, la pluie, la neige, la grêle, les vents et les tourbillons.*

— *il y a trop de tintamarre là-dedans, trop de brouillamini."*

Molière, Le Bourgeois Gentilhomme

"Je ne chercherais pas à obtenir un doctorat... Toute cette comédie finit par m'ennuyer"

Albert Einstein à son ami Michel Besso,, 1901

"Lorsque vous êtes architecte, si vous ne vous intéressez qu'à l'architecture, vous manquez beaucoup de choses..."

Li Peng

J'ai choisi d'illustrer cette introduction par trois citations qui, je pense, illustrent bien les difficultés que peut rencontrer le jeune chercheur au début de sa carrière.

Face à la complexité du monde qui nous entoure (à chaque découverte mieux révélée et qui plus est toujours croissante du fait de l'activité humaine !), l'impression de solitude face aux mystères peut décourager l'individu le mieux intentionné. Les progrès des sciences et techniques se faisant à un rythme toujours plus effréné, cette impression est sans doute amenée à se renforcer dans le futur. Ainsi, il faut maîtriser un nombre toujours plus grand d'outils dans des domaines très différents pour espérer pouvoir apporter sa maigre contribution.... La tentation est alors grande d'accuser le fouilli des étendues restées vierges pour se réfugier dans la citadelle rassurante et apparemment solide des choses connues à un instant donné. Je pense au contraire que l'inconnu doit attirer l'homme curieux si l'on veut espérer un progrès. Cette quête ne doit cependant pas se faire au hasard, et tout l'art du chercheur est de se lancer dans des voies inexplorées, mais en s'étant assuré qu'il possédait (sans doute) les outils lui permettant de s'affranchir des obstacles qui se dresseront. La recherche ne sera pas pour autant forcément couronnée de succès, mais au moins le voyage aura été intéressant !

Un autre danger, probablement plus redoutable encore, qui surgira est l'abattement face à l'institution qu'est devenu le monde de la recherche. Que peut le chercheur seul, isolé, face à un système qui n'est pas fait quoiqu'on en dise pour accepter l'originalité et la nouveauté ? Celles-ci ne sont souvent pleinement acceptées que lorsqu'elles confortent les chapelles déjà bien établies! La difficulté à obtenir un poste, le besoin de devoir justifier parfois jusqu'à l'absurde ses recherches (pas toujours fructueuses il est vrai, il faut alors être capable de se remettre en cause), l'envahissante bureaucratie qui étouffe l'initiative, le manque de moyens, la concurrence rude (mais saine!) des collègues et malheureusement parfois l'incompréhension voire l'incompétence des hiérarchies sont autant d'ennemis redoutables. La tentation est alors grande de vouloir abandonner....

Le meilleur remède à ce spleen est à mon avis à chercher dans la satisfaction du travail bien fait. Toute contribution, même modeste, mérite sa place dans le grand édifice de la connaissance, pour peu qu'elle soit honnête et sérieuse. Le plaisir de comprendre est immense, et la sensation de maîtriser un sujet la meilleure des récompenses. Et, très humainement, la reconnaissance des pairs est une agréable satisfaction.

Enfin, la curiosité est essentielle, et doit porter sur sa propre discipline, mais l'ouverture d'esprit consiste surtout à aller voir "chez les autres" pour bien entendu prendre ce qu'il y a de bon à prendre, mais aussi apporter et faire essaimer ses propres travaux. La spécialisation toujours croissante des recherches tend à enfermer dans son domaine, alors que les progrès viennent bien souvent de "fertilisations croisées".

Il est d'autre part aussi du devoir du scientifique moderne de faire connaître ses travaux au grand public. Et le travail de vulgarisation, souvent considéré comme faisant partie des "basses œuvres", est au contraire un difficile exercice nécessitant non seulement une rigoureuse maîtrise des connaissances, mais aussi un effort d'adaptation et de présentation. Dans la période actuelle qui voit un désintérêt du grand public ainsi que des étudiants pour la chose scientifique alors que notre monde de plus en plus technique nécessiterait au contraire une culture plus large et plus solide pour pouvoir être compris, le scientifique doit savoir se souvenir que c'est ce même grand public qui lui permet d'exercer sinon sa passion, du moins son métier !

Ce document retrace un début de carrière de recherche, commencée durant ma thèse au Central Bureau for Nuclear Measurements en Belgique (1991-1994), et poursuivie à l'Université de Haute-Alsace (1997), à l'Institute for Reference Materials and Measurements (1997-1998) et enfin à l'UHA depuis Octobre 1998.

Les travaux sur la physique des milieux fractals que j'ai pu mener lors de mon séjour au Laboratoire de la Matière Condensée du CNRS à l'Ecole Polytechnique (Palaiseau) ne sont pas exposés dans ce manuscrit, car relativement éloignés. Cette période a cependant aussi été très enrichissante et formatrice.

Malgré la diversité des sujets abordés, un fil conducteur se dégage. J'ai donc choisi de regrouper mes travaux dans ce document de manière thématique. J'ai essayé d'apporter un soin particulier à souligner les passerelles que j'ai rencontrées entre ces travaux, ainsi que les pistes qui se sont ouvertes vers d'autres voies, même si celles-ci sont souvent restées largement inexplorées. Ainsi le lecteur plus familiarisé avec un domaine pourra j'espère apercevoir les liens avec un domaine apparemment plus exotique.

Ce document devant servir à mettre en évidence une "maîtrise" de la recherche, les développements sont très détaillés. Le lecteur rebuté par l'aspect très théorique de certains travaux dont il n'est pas un spécialiste pourra cependant "oublier" les nombreuses équations parcourant ce manuscrit et se concentrer sur les explications. Au contraire, le lecteur intéressé par un domaine précis trouvera dans ce document une description précise des phénomènes rencontrés et une bibliographie sinon exhaustive, du moins détaillée.

La première partie décrit les travaux que j'ai menés dans le domaine des sources de rayonnement photonique basées sur les accélérateurs d'électrons. Le fil d'Ariane dans ce chapitre sera l'analogie qui existe entre certains effets souvent connus seulement de la communauté de la physique des accélérateurs, et leurs équivalents en optique. Dans ce domaine, une bonne connaissance de l'optique permet en effet non seulement d'expliquer certains phénomènes, mais aussi d'en prévoir de nouveaux.

Dans la seconde partie, la physique des systèmes imageurs est traitée, en mettant l'accent tout particulièrement sur la microscopie optique. Celle-ci s'est en effet largement spécialisée et diversifiée pour palier à certaines limitations initiales. Sont ainsi apparues la microscopie confocale, puis multi-photon qui ont permis de dépasser en résolution le microscope de fluorescence classique. Le couplage de ces instruments avec les techniques de prise d'image modernes et l'ordinateur a ouvert la voie à l'observation en trois dimensions. En particulier, les modèles de formation d'images en microscopie seront présentés, et on montrera comment on peut par exemple préciser le protocole expérimental de prise de vue, un point important pour les biologistes et pour les spécialistes de traitement d'images. La connaissance des phénomènes optiques que j'ai acquise en thèse et post-doc m'a aussi conduit à généraliser certains concepts et à proposer un nouveau type de microscope à objectifs multiples à la résolution inégale, ainsi qu'un modèle rigoureux de formation d'images en microscopie de fluorescence.

Enfin dans la troisième partie, certains apports du traitement d'image à la microscopie sont présentés. En effet si les améliorations instrumentales ont permis un progrès énorme, une avancée supplémentaire est encore possible par traitement numérique de l'information. On peut ainsi corriger certains défauts instrumentaux pour améliorer encore la résolution, ou "plus simplement" faciliter l'interprétation des images obtenues. Ont été en particulier étudiés l'adéquation des modèles de formation d'images avec les techniques de déconvolution et certaines possibilités d'augmenter la facilité d'utilisation de ces algorithmes par le non-spécialiste.

Enfin, dans la quatrième partie, je préciserai certaines perspectives apparaissant au vu des travaux présentés dans ce manuscrit. Ces perspectives représentent en particulier les thèmes que j'aimerai continuer à étudier dans le cadre d'une carrière universitaire de recherche, en me basant sur mes travaux passés et actuels.

La conclusion présente quelques réflexions plus personnelles sur le monde de la recherche et de l'enseignement, issues de mes diverses expériences...

INTERLUDE

“En théorie, il n’y a pas de différence entre la théorie et la pratique, mais en pratique, il y a une différence...”

Yogi Berra (un joueur de base-ball)



Giuseppe Arcimboldo

Afin de faciliter la lecture de ce manuscrit et de mieux identifier mes participations aux différents travaux exposés, j’ai introduit une échelle en “lemmings” 🐾 ces sympathiques petits êtres qui pour survivre doivent s’en remettre entièrement à vos décisions..... :

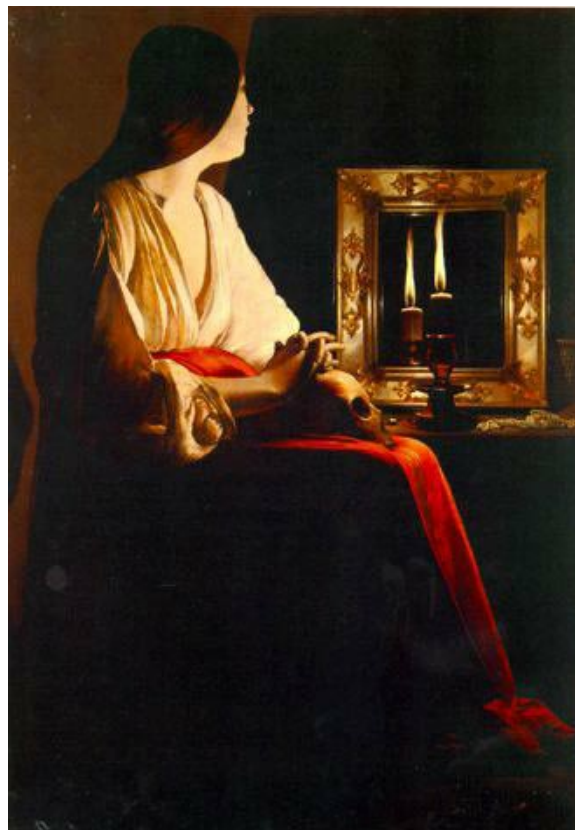
participation marginale :	🐾	(petite contribution à une étude, rédaction d’un papier, utilisation d’un modèle théorique)
contribution minoritaire :	🐾 🐾	(contribution à une étude, participation à une expérience, adaptation directe d’une technique ou d’une théorie existante)
contribution paritaire :	🐾 🐾 🐾	(souvent réalisation d’une idée originale non-personnelle, ou idée originale concrétisée par des collègues)
contribution majoritaire :	🐾 🐾 🐾 🐾	(par exemple idée originale personnelle et réalisation avec une contribution des collègues)
contribution quasi-exclusive :	🐾 🐾 🐾 🐾 🐾	(idée originale et réalisation personnelle de nouveaux développements théoriques ou expérimentaux)

Le choix des lemmings n’est évidemment pas innocent :-)

CHAPITRE I ET DIEU CREA LE PHOTON...

"It is difficult to point to another single device that has brought more important experimental information to every field of science than the diffraction grating. The physicist, the astronomer, the chemist, the biologist, the metallurgist, all use it as a routine tool of unsurpassed accuracy and precision, as a detector of atomic species to determine the characteristics of the heavenly bodies and the presence of atmospheres in the planets, to study the structures of molecules and atoms, and to obtain a thousand and one items of information without which modern science would be greatly handicaped."

G. R. Harrison (cité par J. Strong, *J. Opt. Soc. Am.* **50**, 1148 (1960))



Georges de la Tour "Madeleine aux deux flammes"

1.1 Introduction

On peut considérer que la maîtrise du feu par nos lointains ancêtres marque le début du développement des sources photoniques. Celles-ci resteront cependant cantonnées jusqu'au XVI^{ème} siècle à la notion d'éclairage. Le renouveau pour les sciences apparut à la renaissance et l'explosion des techniques à partir du XIX^{ème} siècle a multiplié la demande pour de nouvelles sources, qui dès leur apparition ont entraîné de nouveaux progrès et découvertes. La mise en évidence de rayonnements invisibles (infra-rouge puis UV et rayons X) ayant les mêmes propriétés que la lumière a décuplé le champ d'observation comme le champ d'application. James Clark Maxwell donne alors une description unifiant les différents phénomènes connus en donnant naissance à l'électromagnétisme. Le point culminant de ces recherches a sans conteste été l'invention du laser dans les années 60. Cependant, cette source aux propriétés étonnantes et qui a trouvé sa place de la médecine à l'astronomie en passant par la vie de tous les jours avec le Compact Disc n'a pas pu satisfaire l'appétit toujours entretenu des scientifiques ou des industriels pour de nouvelles sources. Deux domaines spectraux sont particulièrement concernés : l'UV et les rayons X d'une part, l'infra-rouge lointain et les ondes millimétriques d'autre part.

Les rayonnements de courte longueur d'onde permettent l'étude des propriétés des composants de la matière à une très petite échelle (atomes, molécules) et sont donc d'une importance capitale en physique des surfaces et interfaces ou en physico-chimie par exemple. D'un point de vue plus appliquée, la miniaturisation toujours plus poussée des composants électroniques demande des méthodes de gravure plus fine, et les sources UV actuellement utilisées seront probablement remplacées par des sources à rayons X. Construire ces sources à un coût abordable est encore un défi à l'heure actuelle.

Le rayonnement infra-rouge est important par exemple pour comprendre la structure de certains composés organiques fragiles qui seraient détruits par une exposition aux rayonnements ionisants. Dans ce domaine, il existe un fossé s'étendant d'environ 10 μm à quelques mm de longueur d'onde pour lequel il n'existe pas de source accordable en fréquence, polarisée et relativement simple. Ce manque motive de nombreuses recherches visant à satisfaire une demande sans doute non moins importante que la précédente. On peut aussi penser au vu de l'histoire que la disponibilité de sources dans ce domaine entraînera des découvertes insoupçonnées à l'heure actuelle.

Les principales limitations qui affectent les sources classiques dans ces deux domaines spectraux sont la difficulté d'obtenir l'émission des photons d'une part, et des problèmes de transparence des milieux d'émission d'autre part. Une solution élégante (mais non exhaustive) à ces problèmes consiste à provoquer l'émission photonique dans le vide (transparence) par des électrons libres, c'est à dire arrachés à la matière (choix de la longueur d'onde d'émission). L'expérience accumulée par la communauté de la physique des particules, en particulier la maîtrise des accélérateurs d'électrons a ainsi permis l'émergence d'outils extrêmement puissants, tels les anneaux synchrotrons. Les recherches ne se sont cependant pas arrêtées, en particulier le besoin de sources plus compactes, moins chères s'est fait sentir. L'étude et le développement de telles sources a été le thème de recherche du groupe Radiation Physics de l'Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) de l'Union Européenne à Geel en Belgique de 1988 à 1999. J'ai participé à ces travaux en tant qu'Attaché de Recherche d'Octobre 1997 à Septembre 1998, après y avoir effectué ma thèse de doctorat de 1991 à 1994.

1.2 Rayonnement Smith-Purcell

En 1942, Franck fit la prévision qu'un électron passant près d'une structure périodique émettrait un rayonnement électromagnétique polarisé [1]. En 1953, Smith et Purcell obtinrent la première vérification expérimentale, avec un faisceau d'électrons d'environ 300 keV passant au ras d'un réseau de diffraction optique [2]. Salisbury émit les mêmes idées en 1949, indépendamment, et démontra le phénomène dans le domaine submillimétrique et millimétrique [3].

Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer le phénomène. Smith et Purcell l'expliquèrent par le mouvement périodique des charges induites à la surface du réseau par le faisceau d'électron. Ce modèle a été amélioré par Salisbury [4] et par Ishiguro et Tako [5], qui ont considéré le dipôle vibrant constitué par l'électron en déplacement et son image électromagnétique. Plusieurs expériences ont été menées dans le domaine millimétrique par Bradshaw [6], dans le proche infra-rouge par Ishiguro et Tako [5], et dans l'infra-rouge, le visible et l'ultra-violet par Salisbury [7]. Ces recherches n'obtinrent pas les résultats espérés, et il apparut rapidement que les modèles théoriques surestimaient largement l'intensité observable. A une époque où le laser n'existait pas, on comprend parfaitement l'intérêt que pouvait constituer une source accordable en fréquence, polarisée et relativement simple à mettre en œuvre.

En 1960, Toraldo di Francia fit le parallèle entre l'effet Cherenkov et le rayonnement de Smith-Purcell [8]. Dans son approche, le champ électromagnétique généré par l'électron en mouvement est décrit par une superposition d'ondes évanescentes. Il unifia ainsi un ensemble de phénomènes où une perturbation appliquée à ce champ évanescent permet l'émergence d'ondes propagatives. Dans le cas de l'effet Cherenkov, la perturbation est appliquée par le phénomène de réfraction des ondes [9]. Dans le cas du rayonnement de transition, c'est le phénomène de réflexion [10]. Enfin, la diffraction peut aussi intervenir, par exemple quand l'électron passe près d'un obstacle [11]. Si cet obstacle est périodique, on parle de rayonnement Smith-Purcell [2].

On comprend aisément que le traitement de cet effet est intimement lié aux théories rigoureuses de la diffraction de la lumière par les structures périodiques. Ces théories étaient quasi-inexistantes (à part pour certaines structures particulières) à l'époque de Smith et Purcell. Il faudra attendre le modèle de Van de Berg [12][13][14], qui a montré qu'on pouvait traiter le problème vectoriel comme la superposition de deux problèmes scalaires liés aux deux modes fondamentaux de polarisation. A l'aide d'une formulation par fonction de Green, Van den Berg dérive deux équations intégrales du deuxième type à résoudre sur la surface du réseau. Les deux solutions sont recombinaées pour redonner la solution vectorielle, la méthode étant valable pour tout profil de réseau.

Les modèles théoriques existants supposaient tous un électron se propageant parallèlement à la surface, et perpendiculairement aux traits du réseau. Ma contribution a été de généraliser l'étude de cet effet au cas de trajectoires faisant un angle quelconque avec les traits du réseau, mais toujours parallèle à la surface. Nous avons aussi publié les premiers calculs dans le domaine relativiste, montrant l'intérêt d'une telle source. Cette partie expose les travaux que j'ai mené dans ce domaine.

1.2.1 Le champ incident

La Figure 1.1 décrit la géométrie considérée. L'électron est considéré comme une charge ponctuelle se déplaçant dans le vide, parallèlement à la surface d'un réseau de diffraction. Nous nous limiterons dans cette étude au cas parfaitement conducteur. Le réseau est périodique de période D selon l'axe x d'un repère cartésien dont l'axe y est parallèle aux traits du réseau et l'axe z perpendiculaire à la surface. Les sommets du réseau appartiennent au plan $(x-y)$. La charge se déplace selon une trajectoire $z=z_0=\text{const}$ et Ψ_1 est l'angle entre l'axe x et la projection de la trajectoire sur le plan $(x-y)$. L'électron se déplace à vitesse constante $\mathbf{v}_0 = v_0 \cos \Psi_1 \mathbf{i}_x + v_0 \sin \Psi_1 \mathbf{i}_y$.

Nous adoptons la description de Van den Berg dans laquelle les champs incidents électrique $\mathbf{E}^i = \mathbf{E}^i(x,y,z,t)$ et magnétique $\mathbf{H}^i = \mathbf{H}^i(x,y,z,t)$ sont représentés par des intégrales de Fourier :

$$\begin{aligned}
\mathbf{E}^i(x, y, z, t) &= (2\pi^2)^{-1} \text{Re} \left(\int_0^\infty d\omega \int_{-\infty}^\infty \mathbf{E}^i(x, z; \beta, \omega) \exp(i\beta y - i\omega t) d\beta \right) \\
\mathbf{H}^i(x, y, z, t) &= (2\pi^2)^{-1} \text{Re} \left(\int_0^\infty d\omega \int_{-\infty}^\infty \mathbf{H}^i(x, z; \beta, \omega) \exp(i\beta y - i\omega t) d\beta \right)
\end{aligned}
\tag{1.1}$$

Les composantes de Fourier satisfont aux équations de Maxwell :

$$\begin{aligned}
(\nabla + i\beta \mathbf{i}_y) \times \mathbf{H}^i + i\omega \epsilon_0 \mathbf{E}^i &= \mathbf{J} \\
(\nabla + i\beta \mathbf{i}_y) \times \mathbf{E}^i - i\omega \mu_0 \mathbf{H}^i &= 0
\end{aligned}
\tag{1.2}$$

avec $\nabla = \partial_x \mathbf{i}_x + \partial_z \mathbf{i}_z$ et $\mathbf{J} = \mathbf{J}(x, z; \beta, \omega)$ étant la transformée de Fourier de la distribution de courant :

$$\begin{aligned}
\mathbf{J}(x, y, z, t) &= qv_0 \cos \Psi_1 \delta(x - v_0 \cos \Psi_1 t, y - v_0 \sin \Psi_1 t, z - z_0) \mathbf{i}_x \\
&\quad + qv_0 \sin \Psi_1 \delta(x - v_0 \cos \Psi_1 t, y - v_0 \sin \Psi_1 t, z - z_0) \mathbf{i}_y
\end{aligned}
\tag{1.3}$$

avec $q = -e$ la charge de l'électron. On obtient :

$$\begin{aligned}
\mathbf{J}(x, z, \beta, \omega) &= q\delta(z - z_0) \exp\left((i\omega - i\beta v_0 \sin \Psi_1) \frac{x}{v_0 \cos \Psi_1}\right) \mathbf{i}_x \\
&\quad + q\delta(z - z_0) \tan \Psi_1 \exp\left((i\omega - i\beta v_0 \sin \Psi_1) \frac{x}{v_0 \cos \Psi_1}\right) \mathbf{i}_y
\end{aligned}
\tag{1.4}$$

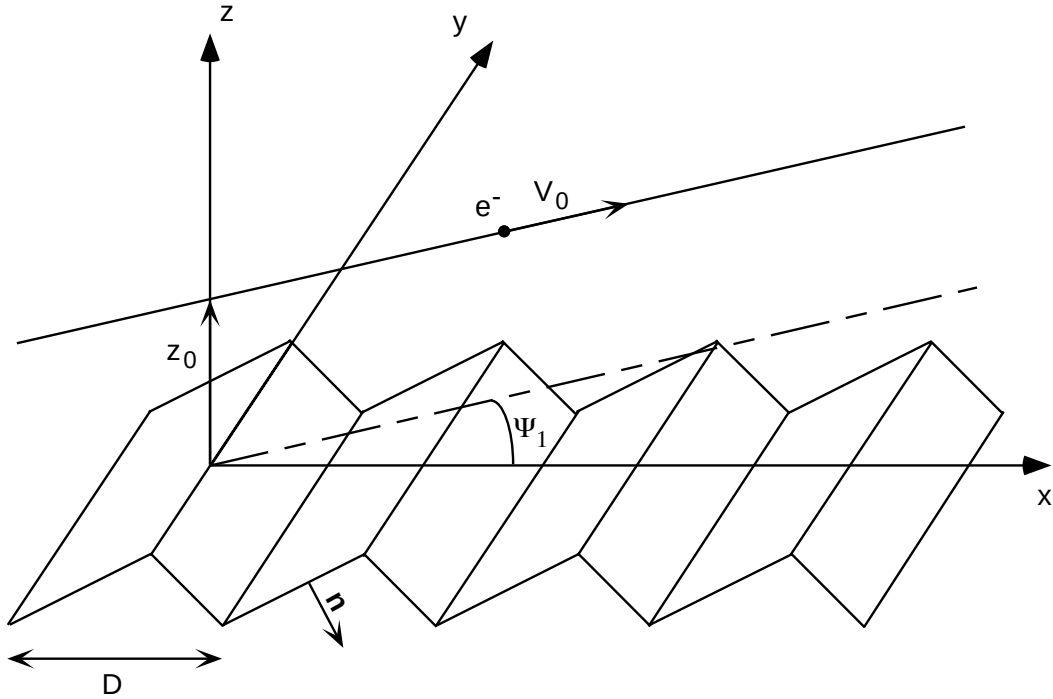


FIGURE 1.1. Configuration considérée pour l'effet Smith-Purcell.

On montre alors que les composantes en x et z des champs de Fourier $\mathbf{E}^i$ and $\mathbf{H}^i$ s'expriment en fonction de leurs composantes selon l'axe y E_y^i et H_y^i seulement. D'autre part, E_y^i and H_y^i satisfont aux équations de Helmholtz :

$$(\partial_x^2 + \partial_z^2)E_y^i + (k_0^2 - \beta^2)E_y^i = -i\omega\mu_0 J_y + \frac{\beta}{\omega\epsilon_0}(\partial_x J_x + i\beta J_y) \quad (1.5)$$

$$(\partial_x^2 + \partial_z^2)H_y^i + (k_0^2 - \beta^2)H_y^i = -\partial_z J_x \quad (1.6)$$

avec $k_0 = \omega_0/c_0$. On résout ces équations pour obtenir :

$$H_y^i = -\frac{1}{2}q \cdot \text{sign}(z - z_0) \cdot \exp(i\alpha_0 x + i\gamma_0 |z - z_0|) \quad (1.7)$$

$$E_y^i = E1_y^i + E2_y^i \quad (1.8)$$

$$E1_y^i = \frac{1}{2}q \left(\frac{\mu_0}{\epsilon_0} \right)^{1/2} \frac{\beta \alpha_0}{k_0 \gamma_0} \cdot \exp(i\alpha_0 x + i\gamma_0 |z - z_0|)$$

$$E2_y^i = \frac{1}{2\gamma_0} q \left(-\mu_0 \omega + \frac{\beta^2}{\omega \epsilon_0} \right) \tan \Psi_1 \exp(i\alpha_0 x + i\gamma_0 |z - z_0|) \quad (1.9)$$

avec :

$$\alpha_0 = \frac{\omega - \beta v_0 \sin \Psi_1}{v_0 \cos \Psi_1} \quad (1.10)$$

$$\gamma_0 = i(\alpha_0^2 + \beta^2 - k_0^2)^{1/2} \text{ with } (\alpha_0^2 + \beta^2 - k_0^2)^{1/2} \geq 0$$

La vitesse de l'électron dans le vide étant inférieure à celle de la lumière, $c_0 > v_0$ et donc $\alpha_0^2 + \beta^2 > k_0^2$. Par conséquent, γ_0 est imaginaire pur et les équations (1.7) et (1.9) représentent des ondes planes évanescentes : l'électron libre ne rayonne pas. Si l'électron passe près d'un réseau, les ondes évanescentes sont diffractées et peuvent donner naissance à des ondes propagatives qui constituent le rayonnement Smith-Purcell.

1.2.2 Le champ réfléchi

Les champs réfléchis sont donnés par $\mathbf{E}^r = \mathbf{E} - \mathbf{E}^i$ et $\mathbf{H}^r = \mathbf{H} - \mathbf{H}^i$, avec $\mathbf{E} = \mathbf{E}(x, y, z, t)$ et $\mathbf{H} = \mathbf{H}(x, y, z, t)$ les champs totaux au dessus du réseau. Comme pour les champs incidents, ils sont écrits sous forme d'intégrales de Fourier et $\mathbf{E}^r(x, z; \beta, \omega)$ et $\mathbf{H}^r(x, z; \beta, \omega)$ satisfont les équations de Maxwell sans source :

$$(\nabla + i\beta \mathbf{i}_y) \times \mathbf{H}^r + i\omega\epsilon_0 \mathbf{E}^r = 0$$

$$(\nabla + i\beta \mathbf{i}_y) \times \mathbf{E}^r - i\omega\mu_0 \mathbf{H}^r = 0 \quad (1.11)$$

Pour un réseau parfaitement conducteur, le problème vectoriel se réduit à l'étude des deux cas fondamentaux de polarisation : les polarisations électrique et magnétique.

Les champs réfléchis $E_y^r(x, z; \beta, \omega)$ et $H_y^r(x, z; \beta, \omega)$ peuvent s'écrire sous forme de développement de Rayleigh :

$$E_y^r(x, z; \beta, \omega) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} E_{y,n}^r(\beta, \omega) \exp(i\alpha_n x + i\gamma_n z) \quad \text{for } 0 < z < \infty \quad (1.12)$$

$$H_y^r(x, z; \beta, \omega) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} H_{y,n}^r(\beta, \omega) \exp(i\alpha_n x + i\gamma_n z)$$

avec $\alpha_n = \alpha_0 + 2\pi n/D$, $\gamma_n = (k_0^2 - \beta^2 - \alpha_n^2)^{1/2}$ avec $\text{Re}(\gamma_n) \geq 0$ et $\text{Im}(\gamma_n) \geq 0$.

Les champs totaux devant satisfaire aux conditions aux limites :

$$E_y = 0 \quad (1.13)$$

$$\mathbf{n} \cdot \nabla H_y = 0 \quad (1.14)$$

On a donc réduit l'étude du rayonnement Smith-Purcell à un calcul des amplitudes des ondes diffractées, aussi appelé *problème du réseau*. On ne s'étendra pas sur ce problème particulier, pour lequel de nombreuses méthodes spécialisées ont été mises au point, pour des profils de réseaux très divers. En particulier, le lecteur trouvera dans l'ouvrage de Petit [22] un exposé complet sur le sujet. Pour son application particulière au cas d'une onde incidente évanescence qui nous intéresse ici, la lecture de [15]-[21] apportera de précieux éléments.

Dans la suite, on supposera le problème du réseau résolu, compte tenu des paramètres de l'électron (trajectoire, énergie) du profil du réseau de diffraction, et donc que les coefficients des développements de Rayleigh sont connus.

1.2.3 Le spectre du rayonnement Smith-Purcell

Le rayonnement de Smith-Purcell détectable à grande distance est constitué des ondes diffractées propagatives, c'est à dire des ondes pour lesquelles $\text{Im}(\gamma_n) = 0$.

On a donc $\alpha_n^2 + \beta^2 \leq k_0^2$ pour ces ondes propagatives et alors: $-k_0 \leq \beta \leq k_0$. De l'équation (1.10) on déduit que $\alpha_0 > k_0$. D'autre part on a $\alpha_n = \alpha_0 + 2\pi n/D$ et de la définition $\gamma_n^2 = k_0^2 - \beta^2 - \alpha_n^2$, on déduit que seuls certains ordres négatifs $n < 0$ du développement de Rayleigh sont effectivement propagatifs.

Il est alors naturel d'introduire le référentiel (θ_n, φ_n) de la Figure 1.2 (dans l'exemple dessiné $\varphi_n \leq 0$). On démontre alors que pour les ondes propagatives :

$$\begin{aligned} \alpha_n &= k_0(\cos \Psi_1 \cos \theta_n - \sin \Psi_1 \sin \theta_n \sin \varphi_n) \\ \beta &= k_0(\sin \Psi_1 \cos \theta_n + \cos \Psi_1 \sin \theta_n \sin \varphi_n) \\ \gamma_n &= k_0 \sin \theta_n \cos \varphi_n \end{aligned} \quad (1.15)$$

avec $0 \leq \theta_n \leq \pi$ et $-\pi/2 \leq \varphi_n \leq \pi/2$

On établit alors facilement la relation de dispersion donnant la longueur d'onde émise :

$$\lambda = \frac{-D}{n \cos \Psi_1} (c_0/v_0 - \cos \theta_n) \quad (1.16)$$

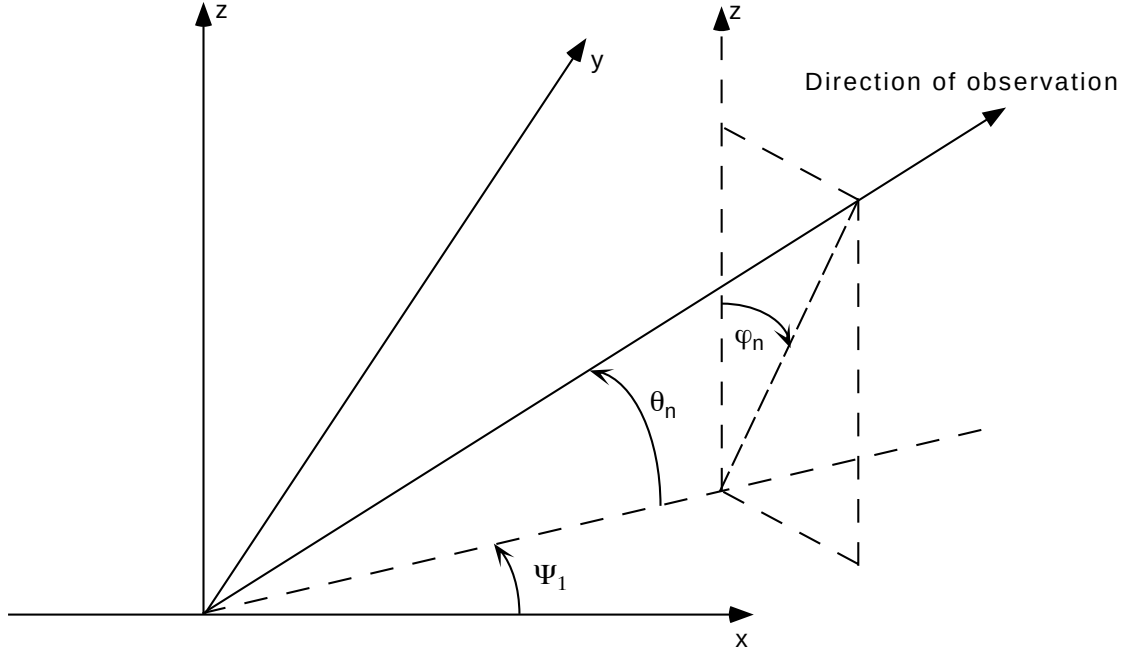


FIGURE 1.2. Direction d'émission de l'ordre n dans le référentiel (θ_n, φ_n) .

On a donc émission de photons à longueur d'onde constante selon un cône d'ouverture q_n et ayant pour axe la projection de la trajectoire de l'électron sur le plan $(x-y)$. En effectuant une rotation du réseau selon l'axe z (on change donc l'angle Ψ_1), on change la période apparente du réseau, telle que vue par l'électron. L'équation (1.16) montre qu'un ajustage continu de la longueur d'onde est possible, sans avoir à changer la direction d'observation ou l'énergie des électrons, contrairement au cas où ceux-ci se propagent perpendiculairement aux traits du réseau.

Pour calculer le spectre de Smith-Purcell, on fait appel à la propriété suivante, aisément démontrable [22] : si S est une surface parfaitement conductrice de période D et (U, U') un couple de fonctions satisfaisant l'équation de Helmholtz et une des deux conditions aux limites (1.13), (1.14), alors :

$$\int_{x_1}^{x_1 + D} \{U \partial_z U' - U' \partial_z U\} dx = 0 \quad \text{pour } (0 < z < z_0) \quad (1.17)$$

On applique cette relation aux couples de fonctions $(E_y; \bar{E}_y)$ et $(H_y; \bar{H}_y)$ pour obtenir :

$$\begin{aligned} \sum_{\text{real } \gamma_n} E_{y,n}^r \bar{E}_{y,n}^r \gamma_n &= 2K \cdot \text{Re}(E_{y,0}^r \exp(i\gamma_0 z_0)) \\ \sum_{\text{real } \gamma_n} H_{y,n}^r \bar{H}_{y,n}^r \gamma_n &= -q \cdot \text{Re}(H_{y,0}^r \exp(i\gamma_0 z_0)) \end{aligned} \quad (1.18)$$

avec :

$$K = \frac{1}{2} q \left(\frac{\mu_0}{\epsilon_0} \right)^{1/2} \frac{\beta}{k_0} \alpha_0 + \frac{1}{2} q \left(-\mu_0 \omega + \frac{\beta^2}{\omega \epsilon_0} \right) \tan \Psi_1 \quad (1.19)$$

Dans un problème de diffraction "classique", le réseau est illuminé par une onde plane propagative et on calcule la distribution des ondes diffractées et leurs intensités. Un premier test pour vérifier la validité des résultats

obtenus est l'application du théorème de conservation de l'énergie : la somme des énergies diffractées doit être égale à l'énergie incidente. Dans le cas du rayonnement de Smith-Purcell, ce théorème s'applique au système (électron + champ électromagnétique) et il prend donc une autre forme. Les relations données par l'équation (1.18) constituent l'équivalent du critère de répartition de l'énergie en spectroscopie, et peuvent être utilisées pour vérifier la validité des résultats obtenus.

On calcule alors les pertes de l'électron lorsqu'il passe une période du réseau (on considérera que ces pertes sont négligeables devant l'énergie cinétique de la particule). On dira que les pertes sont égales au travail mécanique des forces électromagnétiques agissant sur l'électron [13] :

$$W = -\int \mathbf{F} \cdot d\mathbf{s} \quad (1.20)$$

$$\text{avec la force de Lorentz : } \mathbf{F} = q \cdot (\mathbf{E}^r + \mathbf{v}_o \times \mathbf{H}^r)$$

Le travail de la force magnétique est nul et en séparant les contributions des composantes x et y du champ électrique, on a :

$$W = W_x + W_y \quad (1.21)$$

$$W_x = - \int_{t_1}^{t_1 + D/(v_o \cos \Psi_1)} q v_o \cos \Psi_1 \cdot E_x^r(v_o t \cos \Psi_1, v_o t \sin \Psi_1, z_0, t) dt \quad (1.22)$$

$$W_y = - \int_{t_1}^{t_1 + D/(v_o \cos \Psi_1)} q v_o \sin \Psi_1 \cdot E_y^r(v_o t \cos \Psi_1, v_o t \sin \Psi_1, z_0, t) dt \quad (1.23)$$

La composant x du champ réfléchi est donné par :

$$E_x^r(x, y, z, t) = (2\pi)^{-1} Re \left(\int_0^\infty d\omega \int_{-\infty}^\infty E_x^r(x, z; \beta, \omega) \exp(i\beta y - i\omega t) d\beta \right) \quad (1.24)$$

Le développement de Rayleigh nous dit d'autre part que :

$$E_x^r(x, z, \beta, \omega) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} E_{x,n}^r(\beta, \omega) \cdot \exp(i\alpha_n x + i\gamma_n z) \quad (1.25)$$

En combinant (1.23), (1.24) et (1.25), on obtient :

$$W_x = -\frac{q v_o \cos \Psi_1}{2\pi^2} Re \left(\sum_{n=-\infty}^{\infty} \int_{t_1}^{t_1 + \frac{D}{v_o \cos \Psi_1}} \exp\left(\frac{i2\pi n}{D} v_o \cos \Psi_1 t\right) dt \int_0^\infty d\omega \int_{-\infty}^\infty E_{x,n}^r \exp(i\gamma_n z_0) d\beta \right) \quad (1.26)$$

Seul le terme n=0 donne une contribution non nulle à l'intégration, et on obtient la composante x de l'ordre 0 à partir des équations de Maxwell. On obtient alors :

$$W_x = -\frac{qD}{2\pi^2} Re \left(\int_0^\infty d\omega \int_{-\infty}^\infty (k_0^2 - \beta^2)^{-1} (-\beta \alpha_0 E_{y,0}^r + \omega \mu_0 \gamma_0 H_{y,0}^r) \exp(i\gamma_0 z_0) d\beta \right) \quad (1.27)$$

Le calcul de W_y se fait de manière similaire :

$$W_y = -\frac{qD}{2\pi^2} \tan \Psi_1 \operatorname{Re} \left(\int_0^\infty d\omega \int_{-\infty}^\infty E_{y,0}^r \exp(i\gamma_0 z_0) d\beta \right) \quad (1.28)$$

En insérant (1.18) dans (1.27) et (1.28) on obtient pour les deux composantes du travail mécanique :

$$W_x = \frac{qD}{2\pi^2} \int_0^\infty d\omega \int_{-\infty}^\infty (k_0^2 - \beta^2)^{-1} \cdot \left(\frac{\beta \alpha_0}{2K} \sum_{\operatorname{real} \gamma_n} E_{y,n}^r \bar{E}_{y,n}^r + \frac{\omega \mu_0}{q} \sum_{\operatorname{real} \gamma_n} H_{y,n}^r \bar{H}_{y,n}^r \right) d\beta \quad (1.29)$$

$$W_y = \frac{qD}{2\pi^2} \tan \Psi_1 \int_0^\infty d\omega \int_{-\infty}^\infty \left(\frac{1}{2K} \sum_{\operatorname{real} \gamma_n} E_{y,n}^r \bar{E}_{y,n}^r \right) d\beta \quad (1.30)$$

et finalement, après simplification, on obtient pour le travail total :

$$W = \frac{D}{2\pi^2} \int_0^\infty d\omega \int_{-\infty}^\infty (k_0^2 - \beta^2)^{-1} \cdot \sum_{\operatorname{real} \gamma_n} (\epsilon_0 E_{y,n}^r \bar{E}_{y,n}^r + \mu_0 H_{y,n}^r \bar{H}_{y,n}^r) \omega \gamma_n d\beta \quad (1.31)$$

En fait, on peut réécrire cette expression sous la forme [15], [19] :

$$W = \frac{D}{\pi^2} \int_0^\infty d\omega \int_{-\infty}^\infty \sum_{\operatorname{real} \gamma_n} \left(\frac{1}{2} \mathbf{E}_n^r \times \bar{\mathbf{H}}_n^r \right) \cdot \mathbf{i}_z d\beta \quad (1.32)$$

La partie réelle du vecteur de Poynting complexe: $\mathbf{P}_n = \frac{1}{2} \mathbf{E}_n^r \times \bar{\mathbf{H}}_n^r$ représentant la densité surfacique de puissance rayonnée dans l'ordre n.

Un calcul long mais direct montre qu'on peut écrire la puissance émise dans l'ordre n dans un angle solide $d\Omega$ dans la direction (θ, φ) par un électron par seconde passant une période D du réseau à l'altitude z_0 comme :

$$\left(\frac{dP}{d\Omega} \right)_n = \frac{q^2 D^2}{2\epsilon_0 |n| \lambda^3} \sin^2 \theta \cos^2 \varphi |R_n(\theta, \varphi)|^2 \exp(-z_0/h_{int,n}) \quad (1.33)$$

$$|R_n(\theta, \varphi)|^2 = \frac{4}{q^2 (1 - \Delta^2)} \exp(2|\gamma_0|z_0) \left\{ \left(\frac{\epsilon_0}{\mu_0} \right) (E_{y,n}^r \bar{E}_{y,n}^r + H_{y,n}^r \bar{H}_{y,n}^r) \right\} \quad (1.34)$$

$$\Delta = \frac{\beta}{k_0} = \cos \theta \sin \Psi_1 + \sin \theta \sin \varphi \cos \Psi_1 \quad (1.35)$$

$$h_{int,n}(\theta, \varphi) = \frac{\lambda_n \cos \Psi_1}{4\pi} [(c_o/v_o - \Delta \sin \Psi_1)^2 + \cos^2 \Psi_1 (\Delta^2 - 1)]^{-1/2} \quad (1.36)$$

Le terme $|R_n(\theta, \varphi)|^2$ s'appelle facteur de radiation et joue un rôle clef dans le calcul du rayonnement Smith-Purcell puisqu'il est caractéristique de la configuration considérée (énergie, trajectoire de l'électron, profil du réseau). Le paramètre $h_{int,n}(\theta, \varphi)$ peut être considéré comme le domaine d'interaction effectif : si l'électron passe près du réseau (de l'ordre de $h_{int,n}(\theta, \varphi)$) il contribue au rayonnement de Smith-Purcell. Si il passe loin du réseau, c'est à dire plusieurs fois ce paramètre, aucun rayonnement significatif ne sera produit.

1.2.4 Emission par un faisceau d'électrons

Le terme $\exp(2|\gamma_0|z_0)$ dans l'équation (1.34) a été introduit pour compenser la dépendance en z_0 des champs réfléchis $E_{y,n}^r$ et $H_{y,n}^r$ introduit par la dépendance en z_0 des champs incidents (1.7)-(1.9). Avec cette définition le facteur de radiation ne dépend pas de z_0 et l'on obtient la puissance émise par un faisceau d'électrons en intégrant l'équation (1.33) par rapport au profil du faisceau en x et en z et en multipliant le résultat obtenu par le nombre de période du réseau (on supposera le réseau suffisamment long pour que le calcul avec l'hypothèse réseau infini soit valable ; dans la pratique, quelques dizaines de traits suffisent).

Pour un faisceau d'électrons de profil gaussien, de largeurs σ_y et σ_z et passant au dessus d'un réseau de période D (l'axe du faisceau se trouvant à une altitude z_0 au dessus du réseau qui est lui-même protégé contre les électrons à $z < 0$ par un blindage), on obtient l'expression donnant la puissance émise dans l'ordre n par unité d'angle solide dans la direction (η, ζ) :

$$\frac{dP}{d\Omega} = \frac{ei_0LD}{\epsilon_0|n|^3\lambda^3} \cdot \cos^2\eta \cos^2\zeta \cdot |R_{-1}|^2 \cdot \frac{1}{2} \operatorname{erf}\left(\frac{B}{\sqrt{8}\sigma_y}\right) \exp\left(\frac{c^2}{4} - s_0\right) \left\{ 1 - \operatorname{erf}\left(\frac{c}{2} - \frac{s_0}{c}\right) \right\} \quad (1.37)$$

$i_0 = J_0 2\pi\sigma_y\sigma_z$ étant le courant total. On a posé $c = \sqrt{2}\sigma_z/h_{int}$ et $s_0 = z_0/h_{int}$. On suppose que le faisceau d'électrons a une divergence nulle. Ce point constitue une limite du modèle. On peut cependant supposer qu'avec les accélérateurs modernes à très faible divergence et pour une émission dans l'infrarouge lointain, l'erreur introduite par cette simplification est minime. Les contraintes seront cependant rédhibitoires dans le domaine des rayons X par exemple [23].

1.2.5 Théoreme de réciprocité

Considérons les deux expériences décrites par la Figure 1.4 où l'électron se déplace à la vitesse $\mathbf{v}_0 = v_0 \cos\Psi_1 \mathbf{i}_x + v_0 \sin\Psi_1 \mathbf{i}_y$ dans le premier cas, et à la vitesse $\mathbf{v}'_0 = -\mathbf{v}_0$ dans le second. On remarquera que la seconde configuration est obtenue à partir de la première par une rotation du réseau de 180° autour de l'axe z . L'application de la relation (1.17) aux champs électrique et magnétique dans les deux configurations permet de démontrer les propriétés suivantes :

Les coefficients de l'ordre zéro dans le développement de Rayleigh sont identiques :

$$\begin{aligned} {}_{180}E_{y,0}^r(\beta, \omega) &= E_{y,0}^r(\beta, \omega) \\ {}_{180}H_{y,0}^r(\beta, \omega) &= H_{y,0}^r(\beta, \omega) \end{aligned} \quad (1.38)$$

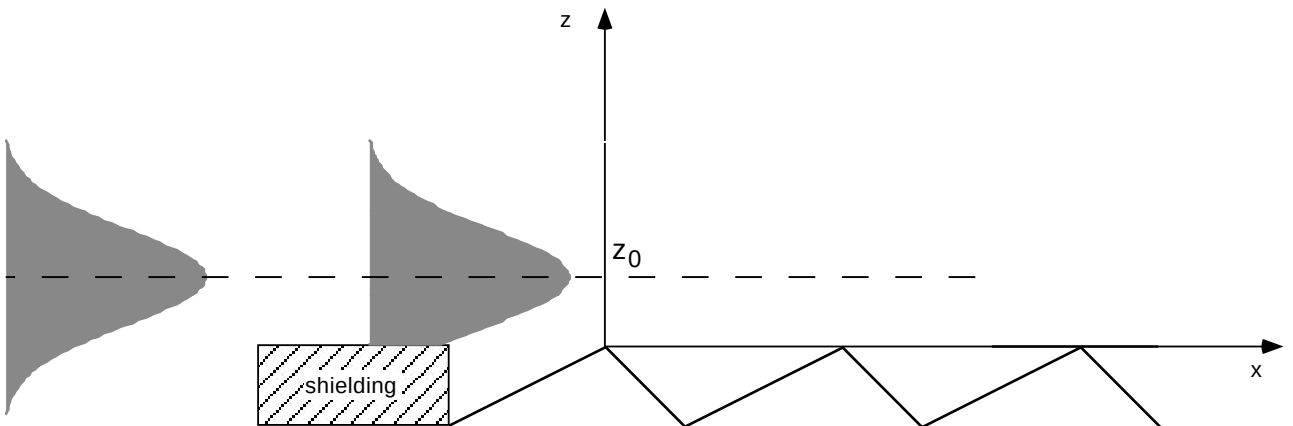


FIGURE 1.3. Géométrie adoptée pour le calcul de l'émission par un faisceau gaussien.

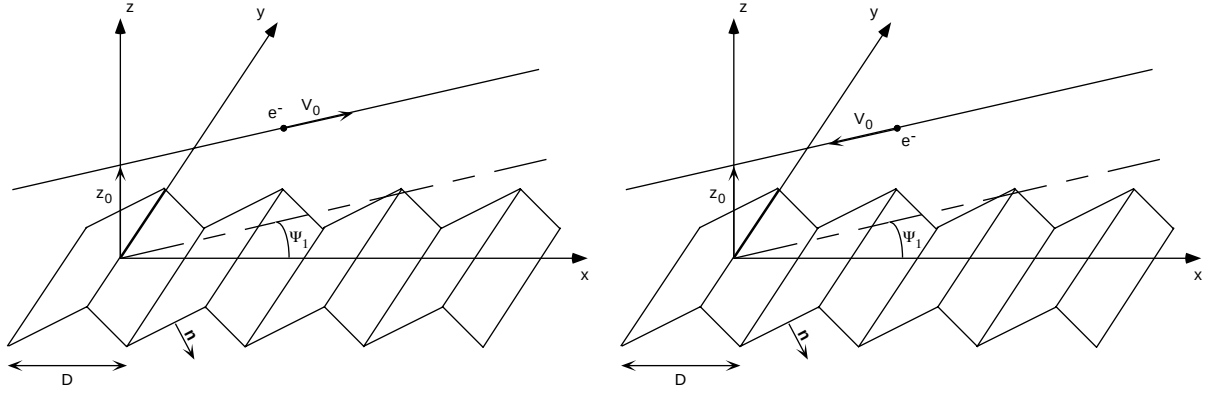


FIGURE 1.4. Deux expériences Smith-Purcell complémentaires.

$$\begin{aligned} {}_{180}E_{y,0}^r(\beta, \omega) &= E_{y,0}^r(\beta, \omega) \\ {}_{180}H_{y,0}^r(\beta, \omega) &= H_{y,0}^r(\beta, \omega) \end{aligned} \quad (1.39)$$

Si un seul ordre de diffraction est propagatif, les coefficients pour l'ordre -1 sont aussi inchangés, et donc le facteur de radiation est le même :

$$|R_{-1}|^2 = |{}_{180}R_{-1}|^2 \quad (1.40)$$

La puissance émise est la même dans les deux situations :

$$\left(\frac{dP}{d\Omega}\right)_{-1} = {}_{180}\left(\frac{dP}{d\Omega}\right)_{-1} \quad (1.41)$$

Il est à noter que ces propriétés sont vraies même si le profil du réseau n'est pas symétrique. Elles étaient connues en spectroscopie sous le nom de théorème de réciprocité. Leur généralisation au cas des ondes évanescentes est une nouveauté [20]. Ces propriétés restent évidemment valables dans le cas de l'émission Smith-Purcell par un faisceau d'électrons. En ce sens, elles constituent un test pour le modèle de l'émission Smith-Purcell proposé par Van den Berg [13], et généralisé par Haeberlé *et al* [15],[19].

Le réseau utilisé pour démontrer cette propriété [20] à un profil non-symétrique, fractal self-affine en un point, étudié durant mon séjour au Laboratoire de Physique de la Matière Condensée à l'Ecole Polytechnique.

1.2.6 Simulations

Notre modèle de rayonnement Smith-Purcell nécessite la résolution d'un problème de réseau. De nombreuses méthodes ont été mises au point pour étudier l'efficacité des réseaux utilisés en spectroscopie. L'onde incidente est alors réelle propagative, alors que pour le rayonnement Smith-Purcell, elle est évanescente. Néanmoins, les formalismes s'adaptent de manière directe. Des programmes ont été écrits pour trois types de réseaux, qui ont permis l'étude théorique de l'effet Smith-Purcell par des électrons d'énergie 1 à 100 MeV.

En particulier a été mis en évidence l'intérêt d'utiliser des électrons dans la gamme d'énergie 1 à 10 MeV. La Figure 1.5 montre les diagrammes d'émission obtenu pour un faisceau d'électrons d'énergie 5 MeV, de courant crête $i_0=10$ A et de profil gaussien avec $\sigma_x=\sigma_y=1.5$ mm. Ce faisceau passe à une altitude $z_0=1.5$ mm au dessus de réseaux peu profonds de divers profils sinusoidaux ou lamellaires. Ainsi, un jeu de réseaux permet d'adapter l'émission aux besoins expérimentaux, en jouant sur le profil du spectre Smith-Purcell. Le réseau sinusoidal émet plus aux courtes longueurs d'ondes, tandis que l'émission des trois réseaux lamellaires considérés est concentrée dans trois pics à différentes longueurs d'onde.

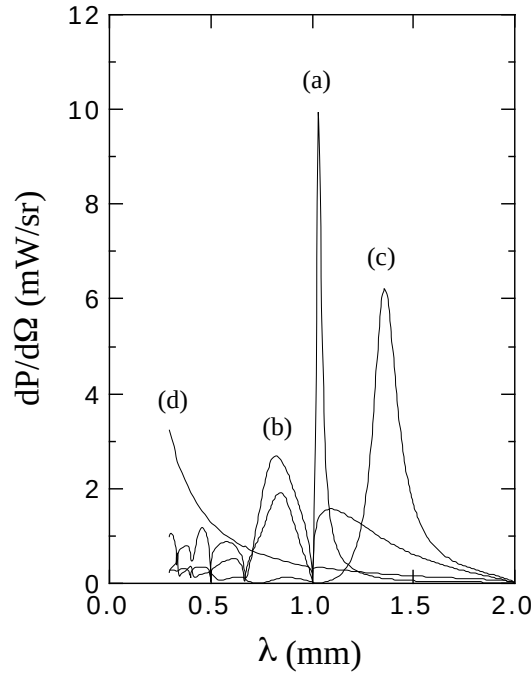


FIGURE 1.5. Spectres Smith-Purcell dans l'ordre -1 pour $\zeta=0^\circ$ et $\Psi_1=0^\circ$. Réseaux avec $B=5$ cm, $L=10$ cm, $D=1$ mm. Faisceau d'électron à 5 MeV, Gaussien avec $\sigma_y=\sigma_z=1.5$ mm et $z_0=1.5$ mm. Courant crête: 10 A. (a) réseau lamellaire avec $h/D=0.1$, $a/D=0.1$; (b) réseau lamellaire avec $h/D=0.1$, $a/D=0.5$; (c) réseau lamellaire avec $h/D=0.1$, $a/D=0.9$; (d) réseau sinusoïdal avec $h/D=0.1$.

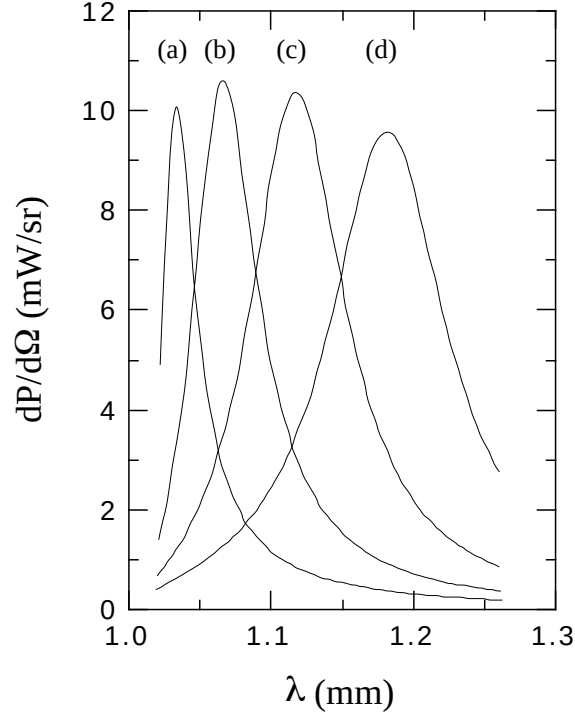


FIGURE 1.6. Spectres Smith-Purcell dans l'ordre -1 pour $\zeta=0^\circ$ et $\Psi_1=0^\circ$ pour un réseau lamellaire avec $B=5$ cm, $L=10$ cm, $D=1$ mm, $h/D=0.1$ et $a/D=0.1$. Faisceau Gaussien avec $\sigma_y=\sigma_z=1.5$ mm et $z_0=1.5$ mm. Courant crête: 10 A. Energie de faisceau : (a) 5 MeV, (b) 6 MeV, (c) 7 MeV, and (d) 8 MeV.

On peut aussi d'adapter de manière continue l'émission en jouant sur l'énergie du faisceau incident, comme le montre la Figure 1.6 : le pic d'émission est déplacé de 1.04 à 1.18 mm lorsque l'énergie du faisceau d'électron augmente de 5 MeV à 8 MeV.

La Figure 1.5 appelle à commentaire. En collimatant le rayonnement Smith-Purcell dans un angle solide $\Delta\Omega = \cos(\eta)\Delta\eta\Delta\zeta$, on obtient un rayonnement quasi-monochromatique de largeur de bande $\Delta\lambda/\lambda = \cos(\eta)\Delta\eta[\beta^{-1} - \sin(\eta)]^{-1}$ dans le premier ordre de diffraction. En utilisant un faisceau d'énergie 5 MeV, de courant crête 10 A, de profil Gaussien avec $\sigma_y = \sigma_z = 1.5$ mrad, le centre du faisceau étant à une altitude $z_0 = 1.5$ mm, en interaction avec un réseau lamellaire de paramètres $h/D = a/D = 0.1$, on obtient un flux de photons crête de $5 \cdot 10^{13}$ photons/s dans un angle solide de 1 μ sr (voir maximum de la courbe 1.5 (a) à $\lambda = 1$ mm). Cette émission est quasi-monochromatique avec une largeur de bande $\Delta\lambda/\lambda \sim 10^{-3}$. A titre de comparaison, un corps noir parfait de 1 cm^2 de surface à 2000 K émet un flux de 10^8 photons/s/ μ sr à $\lambda = 1$ mm pour la même largeur de bande. Cependant, il est difficile d'obtenir avec un corps noir des impulsions de courtes durées. L'utilisation d'un petit accélérateur de particule pulsé permettrait sans problème la génération d'impulsions picosecondes, voire femtosecondes si l'on considère les derniers développements concernant les photocathodes pompées par laser.

La Figure 1.7 montre le spectre d'émission Smith-Purcell calculé pour un électron d'énergie 2 MeV, en interaction avec un réseau lamellaire de paramètres $h/D = 0.1$ et $a/D = 0.5$ et un faisceau de profil Gaussien avec $\sigma_y = \sigma_z = 1.5$ mm et $z_0 = 1.5$ mm et de courant crête : 10 A , arrivant avec un angle $\Psi_1 = 10^\circ$ par rapport au réseau. L'intervalle angulaire d'observation considéré est $-45^\circ \leq \varphi_n \leq 45^\circ$ et $45^\circ \leq \theta_n \leq 135^\circ$ (cf. Fig. 1.2). Les résultats sont présentés en fonction de l'angle φ_n et de la longueur (cf. Eq. (1.16)). Le maximum d'émission est de 5.5 mW à une longueur d'onde d'environ 0.7 mm aux environs de $\varphi_n = 0^\circ$. Contrairement au cas $\Psi_1 = 0^\circ$ généralement traité, l'émission n'est pas symétrique par rapport à l'angle φ_n ou, ce qui est équivalent, par rapport à la trajectoire de l'électron. L'émission est concentrée au voisinage des anomalies de Wood-Rayleigh, mais le maximum d'émission n'est pas observé pour $\varphi_n = 0^\circ$, en particulier aux courtes longueurs d'ondes, dans la direction avant.

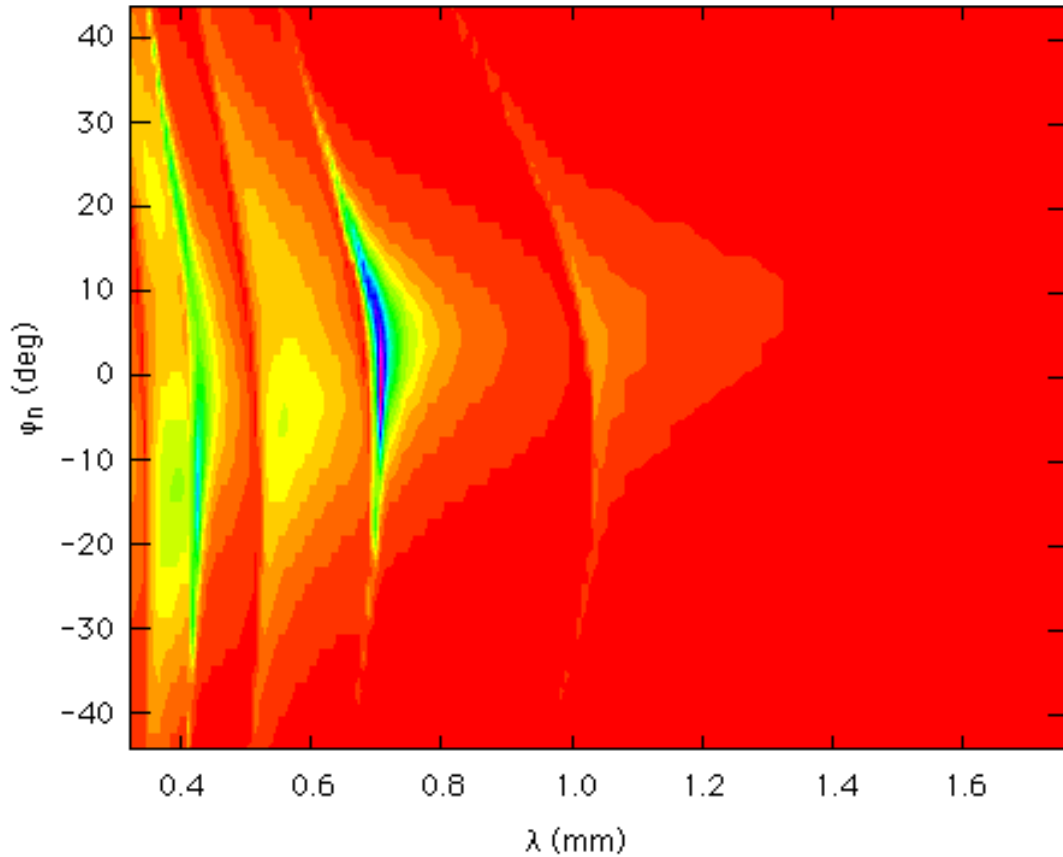


FIGURE 1.7. Rayonnement Smith-Purcell dans l'ordre -1 en fonction de la longueur d'onde et de l'angle d'observation φ_n pour $\Psi_1 = 10^\circ$ et un faisceau de 2 MeV en interaction avec un réseau lamellaire de paramètres $h/D = 0.1$ et $a/D = 0.5$. Mêmes paramètres de faisceau que pour la Figure 1.5.

1.2.7 Rayonnement Smith-Purcell d'un cristal photonique

Depuis leur découverte par Yablanovitch [24], les cristaux photoniques ont eu de multiples applications, d'abord dans le domaine millimétrique, et maintenant dans l'infra-rouge et le visible grâce aux progrès des nanotechnologies. Lors de mon séjour au Japon en 2002, nous avons proposé avec le Pr. Ohtaka du Center for Frontier Science, Chiba University, d'étudier l'application des cristaux photoniques comme radiateur Smith-Purcell [25]. La structure de bandes interdites des cristaux photoniques laissent à penser qu'il doit être possible de concentrer le rayonnement Smith-Purcell produit par un électron passant parallèlement à la surface d'un cristal photonique dans les bandes autorisées, et par la même d'obtenir un rayonnement plus monochromatique et plus intense. Cet effet a été prédit et mesuré pour les cristaux photoniques utilisés comme réflecteur.

Le formalisme est très proche de celui utilisé pour les réseaux. Le champ incident considéré est évidemment le même, la principale différence vient du fait que pour une structure périodique 3D, la condition de propagation sur le vecteur d'onde s'écrit maintenant :

$$k_x(n_x, n_y) = \left(k_x - n_x \frac{2\pi}{D}, q_y - n_y \frac{2\pi}{D}, \Gamma n_x n_y \right) \quad (1.42)$$

La composante selon l'axe z, qui détermine le caractère propagatif ou évanescent de l'onde diffractée s'écrit donc :

$$\Gamma n_x n_y = \sqrt{k^2 - \left(k_x - n_x \frac{2\pi}{D} \right)^2 - \left(q_y - n_y \frac{2\pi}{D} \right)^2} \quad (1.43)$$

On a donc maintenant deux paramètres permettant de calculer les directions de diffraction. Ces deux paramètres vont définir des zones dans l'espace k des ondes propagatives (zones de Bloch), qui sont l'équivalents pour un cristal photonique des cônes de propagation décrit au Paragraphe 1.2.3 pour le rayonnement Smith-Purcell d'un réseau. Cette solution cinématique ne donne cependant pas les intensités émises : il faut résoudre le problème électromagnétique complet.

Tout comme pour le calcul de l'effet Smith-Purcell d'un réseau j'avais adapté les méthodes utilisées en théorie des réseaux en optique, la résolution du problème de la diffraction d'une onde plane évanescence par un cristal photonique est dérivée directement du problème classique concernant une onde plane propagative. On peut alors calculer non-seulement la structure de bande du cristal photonique mais aussi le rayonnement émis.

L'énergie émise par l'électron lorsqu'il a parcouru une période du cristal se calcule comme précédemment. En écrivant le bilan dans le repère de la Figure 1.2, on obtient :

$$W(h) = \int_0^\pi \sin \theta(h) d\theta(h) \int_0^{2\pi} \Xi(h) |\Lambda(h)|^2 \exp(-2|\Gamma|(D+a)) d\phi(h) \quad (1.44)$$

avec :

$$\Xi(h) = \pi \frac{e^2}{\epsilon_0} \left(\frac{d}{\lambda^3 h_x} \right) \sin^2 \theta(h) \cos^2 \phi(h) \quad (1.45)$$

$$|\Lambda(h)|^2 = \frac{8 \exp(2|\Gamma|(D+a))}{\mu_0 c e^2 \sin \theta(h) \cos \phi(h)} \times \frac{1}{2} \operatorname{Re} \left\{ \mathbf{E}(h) \times \mathbf{H}^*(h) \right\} \quad (1.46)$$

On a donc la puissance émise par unité d'angle solide pour une période d :

$$\frac{dW(h)}{d\Omega} = \Xi(h) |\Lambda(h)|^2 \exp(-2|\Gamma|(D + a)) \quad (1.47)$$

que l'on dénomme section efficace du rayonnement Smith-Purcell. Les équations (1.44) à (1.47) sont très similaires à celles développées pour le rayonnement Smith-Purcell d'un réseau, et permettent donc une comparaison des deux phénomènes.

Pour nos calculs, nous avons considéré un cristal cubique tel que décrit par la Figure 1.8. On considère un cristal photonique cubique de période d , constitué de sphères diélectriques (Si_3N_4 de constante diélectrique $\approx 3.0^2$) de diamètre a . L'électron se déplace parallèlement à la surface du cristal, à une altitude $D+a$ du plan x - y . Le cristal est supposé infini dans les directions x et y . Le cristal consiste en N couches de billes.

Pour un cristal constitué de 2^N couches, les calculs ont été effectués à l'aide de la méthode du doublement des couches [26]-[25]. Nous pouvons donc traiter des cristaux d'épaisseur finie, ce qui est important d'un point de vue expérimental, car seul ce type de cristaux est envisageable dans la pratique. L'étude complète de la structure de bandes a été publiée dans [26]. Les principaux résultats pour la bande h_{10} (premier ordre de diffraction selon l'axe x , ordre zéro selon l'axe y) sont présentés Figure 1.9 pour un électron de vitesse $\beta=0.9$, faiblement relativiste. Notons le spectre très piqué dans ce cas (à comparer à la Figure 1.5 par exemple), et l'absence d'émission tant que la ligne h_{10} (ligne pointillée) ne coupe pas le cône de lumière. La partie droite montre un agrandissement, mettant en évidence des anomalies lorsqu'un nouvel ordre de diffraction apparaît. Ces structures sont similaires aux anomalies de Wood-Rayleigh dans le cas d'un réseau de diffraction.

Pour comparer l'efficacité d'un cristal photonique par rapport à un réseau de diffraction, on a considéré l'arrangement décrit par la Figure 1.10, avec un réseau de même périodicité, dont les traits correspondent aux espaces entre les billes, et les dents aux billes. Pour ce type de réseau, la méthode d'expansion modale est bien adaptée [12][13].

La Figure 1.10 montre les résultats obtenus. Notons que l'énergie totale émise est similaire dans les deux cas. Cela confirme notre idée de départ, à savoir que la puissance totale émise est à peu près constante, mais qu'elle est concentrée dans des pics étroits et intenses dans le cas du cristal photonique. Ces structures sont donc des candidats intéressants pour la réalisation de sources efficaces, quasi-monochromatique dans le domaine infra-rouge lointain, ondes millimétriques. Par contre, elles sont moins intéressantes pour réaliser des sources accordables en fréquence. Ces calculs ont été effectués pour un cristal à une couche de sphères. Généralement, le facteur Q de ces structures augmentent avec le nombre de couches. On peut donc penser qu'un cristal épais conduirait à une efficacité encore meilleure.

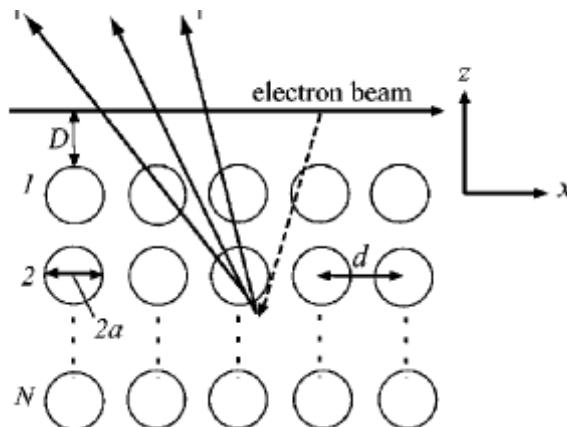


FIGURE 1.8. Schéma de la configuration considérée pour l'étude de l'effet Smith-Purcell d'un cristal photonique.

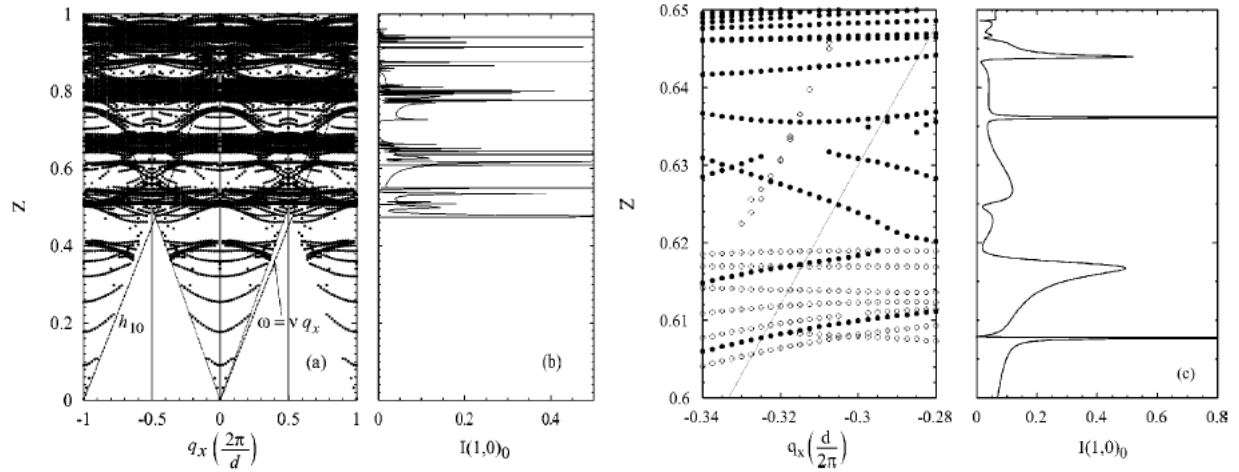


FIGURE 1.9. Structure de bande et spectre d'émission pour la configuration considérée.

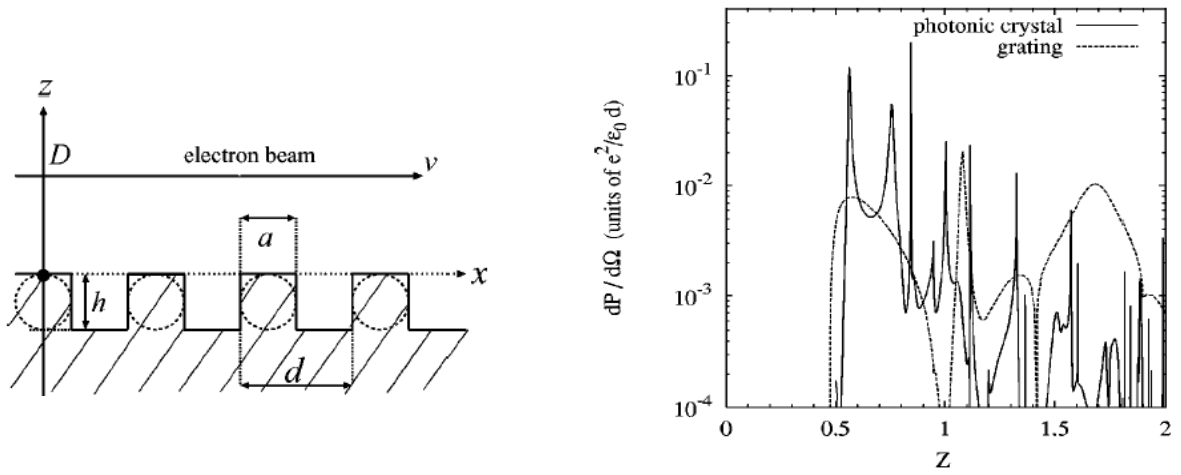


FIGURE 1.10. Configuration considérée pour la comparaison cristal photonique – réseau de diffraction, et spectres d'émission associés. Le cristal concentre l'émission en une série de pics intenses, mais l'énergie totale émise est similaire dans les deux cas.

1.3 Rayonnement de Transition

Le rayonnement de transition est émis lorsqu'une particule chargée traverse l'interface séparant deux milieux ayant des propriétés diélectriques différentes. Il semble que Lilienfeld ait observé ce rayonnement dès 1919 lors de son étude du rayonnement X émis par les rayons cathodiques (identifiés plus tard comme des faisceaux d'électrons) heurtant l'anode [32]. Frank et Ginzburg en donnèrent une interprétation théorique en 1945 en tant que configuration particulière du rayonnement de Vavilov-Cherenkov [10] émis lorsqu'une particule se déplace dans un milieu matériel à une vitesse supérieure à celle de la lumière dans ce milieu.

Les développements théoriques permettant de décrire le phénomène sont beaucoup plus anciens que dans le cas du rayonnement Smith-Purcell. On simplifie grandement l'étude en considérant que l'interface séparant les deux milieux est plane. On peut alors utiliser l'ensemble des travaux de l'optique "classique", c'est à dire que les propriétés optiques de la matière peuvent être utilisées pour décrire le rayonnement de transition. En particulier, on retrouve les notions d'indice optique, d'angle d'incidence et d'angle de réflexion avec les coefficients de Fresnel associés (dans le cas de l'effet Smith-Purcell, la notion d'angle d'incidence est absente, le champ incident étant décrit comme une superposition d'ondes planes *évanescences*).

Ce rayonnement a été depuis grandement étudié tant d'un point de vue théorique que pratique, et de nombreuses applications lui ont été trouvées. Dans le domaine optique, le rayonnement de transition est une source intense dès que l'énergie des électrons dépasse quelque MeV. Dans les années 70 Louis Wartski a ainsi proposé et étudié son utilisation dans le domaine de la physique des faisceaux de particules chargées en construisant des systèmes de diagnostic de faisceaux [34][35]. L'application d'un principe optique simple, le phénomène d'interférence, a permis d'en augmenter grandement les performances par l'utilisation de l'interféromètre de Wartski [36]. En physique des particules, le rayonnement de transition est utilisé comme détecteur de particules, en complément aux détecteurs Cherenkov. Plus récemment a été considérée la possibilité d'utiliser le rayonnement de transition comme source de rayonnement photonique. Ainsi Mel Piestrup a proposé et démontré l'utilisation du rayonnement de transition à des fins de lithographie à rayons X [37]. Plus récemment, l'étude de sources dans l'infra-rouge lointain a été entreprise [38]. Des systèmes de diagnostic de faisceau basés sur la spectroscopie de Fourier infra-rouge ont aussi été construits [39].

Cependant, très peu de travaux ont été consacrés à l'étude du rayonnement de transition pour le cas d'une interface quelconque [40]. La difficulté jusqu'à une époque récente à décrire correctement les phénomènes de diffusion par une interface rugueuse et l'absence de formalisme simple (ce qui nécessite donc le recours à l'ordinateur) explique ce manque. Les travaux menés à la fin de ma thèse et complétés lors de mon second séjour à l'IRMM ont mené au développement d'un modèle de rayonnement de transition valide pour une surface quelconque. Tout d'abord, un rappel des théories "classiques" du rayonnement de transition est donnée, en mettant l'accent sur les développements qui limitent leur application au cas des interfaces planes. Enfin, le modèle développé pour une surface quelconque est expliqué en détail.

1.3.1 Développement du champ en ondes planes

On utilisera ici l'approche de Pafomov et Ter-Mikaelian [41][42]. La Figure 1.11 montre la géométrie utilisée pour décrire le rayonnement émis lorsque une particule chargée se déplaçant à vitesse constante v arrive sur l'interface séparant le vide ($\epsilon_1 = \epsilon_0, \mu_0$) d'un milieu diélectrique d'indice ($\epsilon_2 = \epsilon_0 \epsilon_p, \mu_0$). L'origine du référentiel (x, y, z) se situe au point d'impact. La trajectoire de la particule fait un angle Φ avec l'axe x situé sur la surface. La direction d'émission est définie par le vecteur d'onde $\mathbf{k}$ repéré par les angles (θ, τ) par rapport aux axes z et x , respectivement. On part des équations de Maxwell :

$$\epsilon_0 \nabla \mathbf{E} = \rho \quad (1.48)$$

$$\nabla \mathbf{H} = 0 \quad (1.49)$$

$$\nabla \times \mathbf{E} + \mu_0 \frac{\partial \mathbf{H}}{\partial t} = 0 \quad (1.50)$$

$$\nabla \times \mathbf{H} = \mathbf{J} + \epsilon_0 \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} \quad (1.51)$$

avec $\mathbf{J} = ev\delta(\mathbf{r} - \mathbf{vt})$ la densité de courant due à l'électron en mouvement. Contrairement au cas du rayonnement Smith-Purcell où une transformation de Fourier selon le temps t et l'axe des traits du réseau y était suffisante, il faut maintenant appliquer une transformation selon les quatre dimensions considérées (x, y, z, t) .

$$\mathbf{G}(\mathbf{k}, \omega) = \frac{1}{(2\pi)^4} \iiint \mathbf{G}(\mathbf{r}, t) \exp[-i(\mathbf{k}\mathbf{r} - \omega t)] d^3\mathbf{r} dt \quad (1.52)$$

où $\mathbf{G}$ représente un champ. On obtient alors pour la densité de courant :

$$\mathbf{J}(\mathbf{k}, \omega) = \frac{ev}{(2\pi)^3} \delta(\omega - \mathbf{k}\mathbf{v}) \quad (1.53)$$

En réécrivant et recombinaut les équations de Maxwell (1.50) et (1.51) pour le champ électrique incident dû à l'électron en mouvement, on obtient :

$$\mathbf{k}(\mathbf{k}E_1^{elec}(\mathbf{k}, \omega)) - k^2 E_1^{elec}(\mathbf{k}, \omega) = -i\omega\mu_0 \mathbf{J}(\mathbf{k}, \omega) \quad (1.54)$$

On obtient alors pour le champ incident en combinant (1.53) et (1.54) :

$$E_1^{elec}(\mathbf{k}, \omega) = \frac{ie\mu_0}{(2\pi)^3} \frac{\delta(\omega - \mathbf{k}\mathbf{v})}{k^2 - (\omega^2/c^2)\epsilon_1} [\omega\mathbf{v} - \mathbf{k}c^2] \quad (1.55)$$

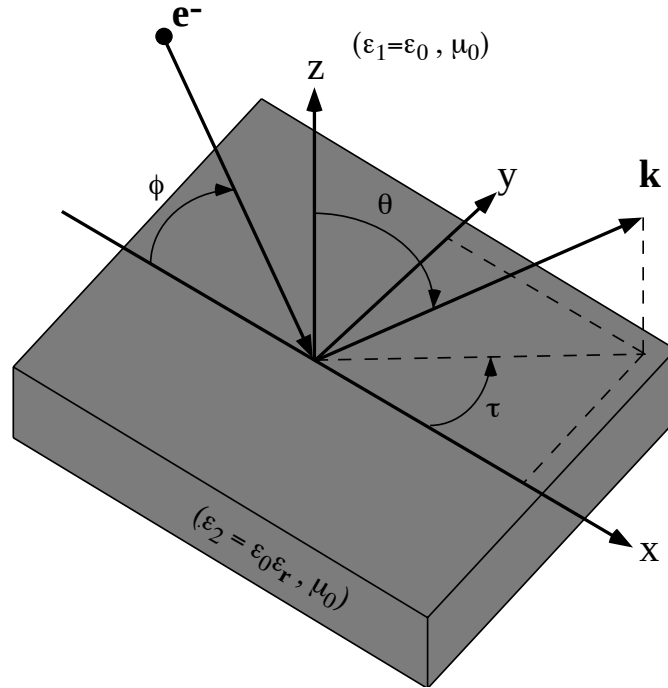


FIGURE 1.11. Géométrie utilisée pour décrire le rayonnement de transition émis par un électron arrivant sur l'interface séparant le vide ($\epsilon_1 = \epsilon_0, \mu_0$) d'un milieu diélectrique ($\epsilon_2 = \epsilon_0 \epsilon_r, \mu_0$).

On obtient en résolvant les équations de Maxwell sans source la solution pour le champ réfléchi :

$$\mathbf{E}_1^{phot}(\mathbf{k}, \omega) = \mathbf{E}_1'(\mathbf{k}, \omega) \delta(k^2 - (\omega^2/c^2)\epsilon_1) \quad (1.56)$$

On obtient alors bien évidemment dans le milieu 2 :

$$\mathbf{E}_2^{elec}(\mathbf{k}, \omega) = \frac{ie\mu_0}{(2\pi)^3} \frac{\delta(\omega - \mathbf{k}\mathbf{v})}{k^2 - (\omega^2/c^2)\epsilon_2} [\omega\mathbf{v} - \mathbf{k}c^2] \quad (1.57)$$

$$\mathbf{E}_2^{phot}(\mathbf{k}, \omega) = \mathbf{E}_2'(\mathbf{k}, \omega) \delta(k^2 - (\omega^2/c^2)\epsilon_2) \quad (1.58)$$

Pour obtenir l'expression du rayonnement de transition, il convient alors d'écrire la continuité des champs électrique (tangentielle et normale) et magnétique (tangentielle et normale). C'est un calcul classique, très long et fastidieux, mais ne présentant pas en soit de difficulté majeure. Le lecteur intéressé pourra trouver un développement très détaillé dans le rapport très complet par Couillaud [43]. On rappelle ici juste les grandes lignes, en soulignant les points qui limitent la validité du calcul au cas des surfaces parfaitement planes.

On décompose le champ incident en composante normale et tangentielle sur l'interface :

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}_t(\mathbf{r}, t) + \mathbf{E}_n(\mathbf{r}, t) \quad (1.59)$$

On écrit alors la continuité des composantes tangentielles et normales des champs électriques et magnétiques sur l'interface :

$$\mathbf{E}_{t,1}^{elec}(\mathbf{r}, t) + \mathbf{E}_{t,1}^{phot}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}_{t,2}^{elec}(\mathbf{r}, t) + \mathbf{E}_{t,2}^{phot}(\mathbf{r}, t) \quad (1.60)$$

$$\mathbf{H}_{t,1}^{elec}(\mathbf{r}, t) + \mathbf{H}_{t,1}^{phot}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{H}_{t,2}^{elec}(\mathbf{r}, t) + \mathbf{H}_{t,2}^{phot}(\mathbf{r}, t) \quad (1.61)$$

$$\mathbf{D}_{n,1}^{elec}(\mathbf{r}, t) + \mathbf{D}_{n,1}^{phot}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{D}_{n,2}^{elec}(\mathbf{r}, t) + \mathbf{D}_{n,2}^{phot}(\mathbf{r}, t) \quad (1.62)$$

$$\mathbf{B}_{n,1}^{elec}(\mathbf{r}, t) + \mathbf{B}_{n,1}^{phot}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{B}_{n,2}^{elec}(\mathbf{r}, t) + \mathbf{B}_{n,2}^{phot}(\mathbf{r}, t) \quad (1.63)$$

On réécrit maintenant ces équations dans l'espace de Fourier. Pour l'équation (1.60), on obtient :

$$\begin{aligned} & \iiint \left[\frac{-ie\mu_0 c^2}{(2\pi)^3} \frac{\delta(\omega - \mathbf{k}\mathbf{v})}{k^2 - k_1^2} (\mathbf{k}_x + \mathbf{k}_y) + \frac{ie\mu_0}{(2\pi)^3} \frac{\delta(\omega - \mathbf{k}\mathbf{v})}{k^2 - k_1^2} \omega v_x \mathbf{i}_x \right] \exp[i(\mathbf{k}\mathbf{r} - \omega t)] \\ & + [\mathbf{E}_{1,x}'(\mathbf{k}, \omega) + \mathbf{E}_{1,y}'(\mathbf{k}, \omega)] \delta(k^2 - k_1^2) \exp[i(\mathbf{k}\mathbf{r} - \omega t)] d^3 k d\omega \\ & = \iiint \left[\frac{-ie\mu_0 c^2}{(2\pi)^3} \frac{\delta(\omega - \mathbf{k}\mathbf{v})}{k^2 - k_2^2} (\mathbf{k}_x + \mathbf{k}_y) + \frac{ie\mu_0}{(2\pi)^3} \frac{\delta(\omega - \mathbf{k}\mathbf{v})}{k^2 - k_2^2} \omega v_x \mathbf{i}_x \right] \exp[i(\mathbf{k}\mathbf{r} - \omega t)] \\ & + [\mathbf{E}_{2,x}'(\mathbf{k}, \omega) + \mathbf{E}_{2,y}'(\mathbf{k}, \omega)] \delta(k^2 - k_2^2) \exp[i(\mathbf{k}\mathbf{r} - \omega t)] d^3 k d\omega \end{aligned} \quad (1.64)$$

$$\text{Avec } k_n^2 = (\omega^2/c^2)\epsilon_n.$$

On intègre alors cette expression par rapport à k_z , et on évalue le résultat obtenu sur la surface ($z=0$). La présence de la fonction de Dirac dans l'équation (1.64) implique que le résultat obtenu sera nul pour toute valeur de k_z autre que :

$$\chi_{1,2}^2 = \frac{\omega^2}{c^2} \varepsilon_{1,2} - q^2 = \frac{\omega^2}{c^2} \varepsilon_{1,2} \cos^2 \theta \quad (1.65)$$

avec $\mathbf{q} = \mathbf{k}_x + \mathbf{k}_y$.

C'est ici qu'apparaît la limitation de la méthode. En effet l'évaluation des intégrales de Fourier dans l'équation (1.64) n'est faisable analytiquement que pour une interface présentant une géométrie plane.

Le reste du calcul consiste à écrire le résultat de l'évaluation de l'équation (1.64) (ainsi que ses équivalents pour la continuité des autres composantes des champs) dans un référentiel approprié. On peut alors séparer les composantes parallèle, c'est à dire la composante pour laquelle le champ E est parallèle au plan d'observation, et perpendiculaire, c'est à dire la composante pour laquelle le champ E est perpendiculaire au plan d'observation du champ électrique total pour calculer la puissance rayonnée.

Notons ici la convention propre aux physiciens de la physique des radiations qui consiste à appeler polarisation parallèle celle où le champ E est parallèle au plan d'observation. Les opticiens des réseaux appellent composante parallèle celle dont le champ E est parallèle à la surface de réflexion. La composante parallèle en rayonnement de transition est donc la polarisation H ou transverse magnétique des opticiens en rayonnement Smith-Purcell. La composante perpendiculaire en rayonnement de transition n'est rien d'autre que la polarisation E ou transverse électrique des opticiens. Pourquoi faire simple quand on peut faire compliqué.....

On rappelle les expressions classiques de Pafomov qui donnent l'intensité des composantes parallèle et perpendiculaire du rayonnement de transition émis dans le vide, lorsqu'un électron pénètre l'interface séparant le vide d'un milieu diélectrique :

$$\frac{d^2 I_{\parallel}}{d\omega d\Omega} = \frac{e^2}{4\pi^3 c \varepsilon_0} \cdot \frac{\beta_z^2 \cos^2 \theta}{\sin^2 \theta} \cdot \frac{|1 - \varepsilon|^2}{((1 - \beta_x \cos \tau \sin \theta)^2 - (\beta_z \cos \theta)^2)^2} \cdot \left| \frac{(1 - \beta_z \sigma - \beta_z^2 - \beta_x \cos \tau \sin \theta) \sin^2 \theta + \beta_x \beta_z \sigma \cos \tau \sin \theta}{(1 - \beta_x \cos \tau \sin \theta - \beta_z \sigma)(\sigma + \varepsilon \cos \theta)} \right| \quad (1.66)$$

$$\frac{d^2 I_{\perp}}{d\omega d\Omega} = \frac{e^2}{4\pi^3 c \varepsilon_0} \cdot \frac{\beta_z^2 \cos^2 \theta}{\sin^2 \theta} \cdot \frac{\beta_x^2 \beta_z^4 \cos^2 \theta \sin^2 \tau |1 - \varepsilon|^2}{((1 - \beta_x \cos \tau \sin \theta)^2 - (\beta_z \cos \theta)^2)^2} \cdot \frac{1}{|(1 - \beta_x \cos \tau \sin \theta - \beta_z \sigma)(\sigma + \varepsilon \cos \theta)|^2} \quad (1.67)$$

avec $\beta_z = \beta \sin \Phi$, $\beta_x = \beta \cos \Phi$, $\varepsilon = \varepsilon_2$, $\sigma = \sqrt{\varepsilon - \sin^2 \theta}$ et $\beta = v/c$.

Lorsque l'on passe au cas limite d'un électron pénétrant l'interface séparant le vide d'un milieu parfaitement conducteur ($\varepsilon \rightarrow \infty$), on obtient :

$$\frac{d^2 I_{\parallel}}{d\omega d\Omega} = \frac{e^2}{4\pi^3 c \varepsilon_0} \cdot \frac{\beta_z^2 \cos^2 \theta}{\sin^2 \theta} \cdot \frac{\beta_z^2 |\sin \theta - \beta_x \cos \tau|^2}{((1 - \beta_x \cos \tau \sin \theta)^2 - (\beta_z \cos \theta)^2)^2} \quad (1.68)$$

et :

$$\frac{d^2 I_{\perp}}{d\omega d\Omega} = \frac{e^2}{4\pi^3 c \epsilon_0} \cdot \frac{\beta_x^2 \beta_z^4 \cos^2 \theta \sin^2 \tau}{((1 - \beta_x \cos \tau \sin \theta)^2 - (\beta_z \cos \theta)^2)^2} \quad (1.69)$$

Les expressions ainsi obtenues correspondent à la résolution directe d'un problème d'électromagnétisme par la voie la plus classique : écriture du champ incident, écriture du champ réfléchi, et en tenant compte des conditions aux limites, on "recolle" les solutions. C'est la même démarche qui avait été adoptée dans le cas du rayonnement de Smith-Purcell. Ainsi, on avait fait apparaître le facteur de radiation qui est l'équivalent dans le cas du rayonnement Smith-Purcell (onde incidente évanescence) des coefficients de réflexions en spectroscopie (onde incidente propagative).

1.3.2 Théorème de réciprocité

Telles qu'elles sont écrites, et à cause de la méthode de résolution, il est impossible de reconnaître dans les expressions (1.66) et (1.67) les coefficients de Fresnel caractéristiques du phénomène de réflexion d'une onde sur une surface plane. Une réécriture est nécessaire.

Une autre approche du phénomène permet d'introduire les coefficients de Fresnel de manière beaucoup plus naturelle. L'utilisation du théorème de réciprocité de Carson [44][45] en électromagnétisme permet de grandement simplifier le problème [42][46][47]. Ce théorème de réciprocité s'énonce ainsi :

Si $\mathbf{j}$ et $\mathbf{j}'$ sont deux courants engendrant les champs électriques $\mathbf{E}$ et $\mathbf{E}'$, on a :

$$\int_{R^3} \mathbf{E}(\omega, X') \mathbf{j}'(\omega, X') d^3 X' = \int_{R^3} \mathbf{E}'(\omega, X') \mathbf{j}(\omega, X') d^3 X \quad (1.70)$$

L'intégrale dans un volume du produit scalaire d'un champ $\mathbf{E}(\omega, X)$ produit par un courant $\mathbf{j}(\omega, X)$ avec un courant $\mathbf{j}'(\omega, X)$ est égale à l'intégrale dans ce même volume du produit scalaire du champ $\mathbf{E}'(\omega, X)$ produit par le courant $\mathbf{j}'(\omega, X)$ avec le courant $\mathbf{j}(\omega, X)$.

Pour l'application du théorème au problème qui nous intéresse, on prendra pour $\mathbf{j}(\omega, X)$ le courant produit par l'électron en mouvement. Pour $\mathbf{j}'(\omega, X)$ on considérera une *gedanken* source monochromatique de polarisation et pulsation appropriées à la place de notre détecteur.

On aborde alors le problème en deux étapes de la manière suivante :

- L'électron est animé d'un mouvement rectiligne et uniforme de vitesse $\mathbf{v}$ dans le vide, et s'arrête brusquement au point $(x=0, y=0, z=0)$ à l'instant $t=0$.
- Au même instant, il acquiert brusquement une vitesse $\mathbf{v}$ et se meut d'un mouvement rectiligne et uniforme dans le milieu d'indice n .

Le problème est alors ramené à un problème très classique qui consiste à calculer le rayonnement à grande distance émis par une particule chargée, animée d'un mouvement rectiligne et uniforme selon une trajectoire semi-infinie dans un milieu homogène.

C'est par exemple de cette manière que l'on peut calculer le rayonnement émis lors du processus de désintégration beta : un noyau atomique instable de numéro atomique Z se transforme spontanément en un autre noyau de numéro atomique $(Z \pm 1)$, avec émission d'un électron et d'un neutrino :

$$Z \rightarrow (Z \pm 1) + e^{\pm} + \nu \quad (1.71)$$

La création brutale d'un électron s'accompagne d'un rayonnement électromagnétique appelé rayonnement de Bremsstrahlung interne.

Dans ces conditions, l'énergie rayonnée s'écrit :

$$\frac{d^2 W}{d\omega d\Omega} = \frac{e^2 \omega^2 n}{4\pi^2 c} \cdot \beta^2 \sin^2 \Psi \left| \int_0^{+\infty} \exp[i\omega t(1 - \beta n \cos \Psi)] dt \right|^2 \quad (1.72)$$

soit :

$$\frac{d^2 W}{d\omega d\Omega} = \frac{e^2 n}{4\pi^2 c} \cdot \frac{\beta^2 \sin^2 \Psi}{(1 - \beta n \cos \Psi)^2} \quad (1.73)$$

Le cas où la particule est brusquement arrêtée à l'instant $t=0$ (intégration de $-\infty$ à 0) redonne le même résultat. L'angle Ψ est alors l'angle entre la trajectoire de l'électron et la direction d'émission considérée.

Le rayonnement observable à grande distance dans le premier milieu est donc la superposition de trois contributions (Figure 1.12(a)) :

le rayonnement émis dans le premier milieu dans la direction d'observation définie par le vecteur d'onde $\mathbf{k}$

le rayonnement émis dans le premier milieu dans la direction définie par le vecteur d'onde $\mathbf{k}'$ et se réfléchissant sur l'interface,

le rayonnement émis dans le second milieu dans la direction définie par le vecteur d'onde $\mathbf{k}''$ et se propageant dans le premier milieu après réfraction sur l'interface.

Le théorème de réciprocité de Carson permet alors de calculer la distribution angulaire et spectrale du rayonnement à partir de trois ondes réiproques [47] (voir Figure 1.12(b)) :

$$\mathbf{E}(-t, \mathbf{r}) = \begin{cases} \mathbf{E} e^{i(\omega t - \mathbf{k} \cdot \mathbf{r})} + \mathbf{E}' e^{i(\omega t - \mathbf{k}' \cdot \mathbf{r})} & \text{pour } z > 0 \\ \mathbf{E}'' e^{i(\omega t - \mathbf{k}'' \cdot \mathbf{r})} & \text{pour } z < 0 \end{cases} \quad (1.74)$$

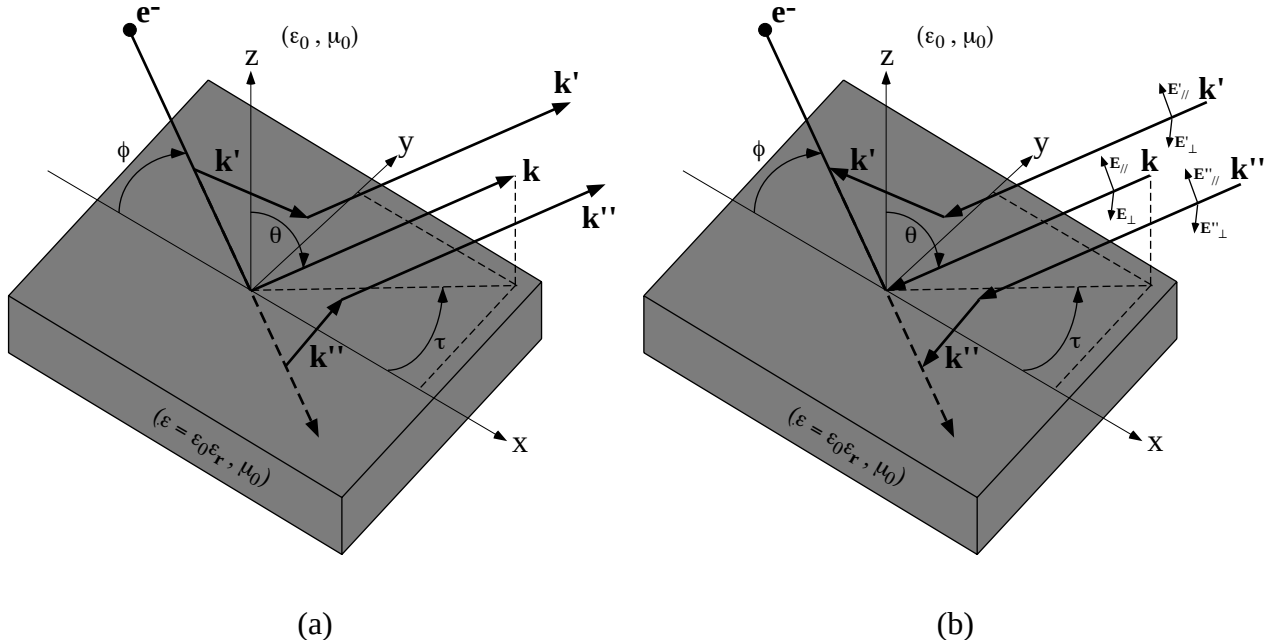


FIGURE 1.12. (a) Rayonnement de transition produit par une charge traversant l'interface séparant le vide d'un milieu d'indice n . (b) Ondes réiproques obtenues par application du théorème de Carson pour démontrer les Equations (1.91) à (1.94). A comparer à la Figure 1.11.

Pour calculer la distribution du rayonnement de transition émis, il suffit donc par le théorème de Carson de calculer les trois contributions réciproques :

d'une onde incidente provenant de la direction d'observation et interagissant avec le courant $\mathbf{j}(\omega, X)$ dû à l'électron,

d'une onde provenant de la direction d'observation et réfléchi sur la surface avant d'interagir avec le courant $\mathbf{j}(\omega, X)$ dû à l'électron,

d'une onde provenant de la direction d'observation et réfractée à la traversée de l'interface séparant les deux milieux avant d'interagir avec le courant $\mathbf{j}(\omega, X)$ dû à l'électron.

En prenant l'axe z perpendiculaire à la surface et le plan d'observation contenant les vecteurs $\mathbf{k}$, $\mathbf{k}'$ et $\mathbf{k}''$ comme plan (x - z), on peut écrire :

$$\mathbf{k} = (k_x, 0, k_z) \quad (1.75)$$

$$\mathbf{k}' = (k_x, 0, -k_z) \quad (1.76)$$

$$\mathbf{k}'' = (k_x, 0, k''_z) \quad (1.77)$$

$$k''_z = (n_2^2 \omega^2 - k_x^2)^{1/2} \quad (1.78)$$

avec $n_2^2 = \epsilon_0 \epsilon_r \mu_0$. Si le milieu 2 est absorbant (c'est à dire $\text{Im}(n_2) \neq 0$) ou si l'onde subit une réflexion totale, alors k''_z possède une partie imaginaire positive correspondant à l'atténuation de l'onde $\mathbf{E}''$ lorsque $z \rightarrow \infty$.

Dans le cas d'une interface plane, les champs $\mathbf{E}$, $\mathbf{E}'$ et $\mathbf{E}''$ qui sont des champs réciproques propagatifs ou évanescents sont tout simplement liés par les formules de Fresnel.

C'est là la limitation même de cette méthode par ailleurs très élégante : en effet l'interaction des champs E' et E'' avec l'électron n'est définie de manière simple que si les champs sont simplement réfléchis (E') ou réfractés (E'') à la surface, ce qui n'est le cas que pour une interface plane. Si celle-ci est quelconque, il faudrait étudier l'interaction de l'électron avec un champ de structure très complexe résultant de l'interaction d'ondes planes avec une surface irrégulière.

Dans le cas de l'interface plane, on a pour la composante parallèle (polarisation H) :

$$\mathbf{E}_{//} = \frac{1}{k}(k_z, 0, -k_z) = \frac{\mathbf{y} \times \mathbf{k}}{k} \quad (1.79)$$

$$\mathbf{E}'_{//} = \frac{1}{k'}(k'_z, 0, -k'_z)r_{//} = r_{//} \frac{\mathbf{y} \times \mathbf{k}'}{k'} \quad (1.80)$$

$$\mathbf{E}''_{//} = \frac{1}{k''}(k''_z, 0, -k''_z)t_{//} = t_{//} \frac{\mathbf{y} \times \mathbf{k}''}{k''} \quad (1.81)$$

avec les coefficients de Fresnel en réflexion $r_{//}$ et transmission $t_{//}$ liés par les relations :

$$\frac{\epsilon'}{k'} t_{//} = \frac{\epsilon_0}{k} \cdot \frac{2}{1 + \rho_{//}} \quad (1.82)$$

$$r_{//} = \frac{1 - \rho_{//}}{1 + \rho_{//}} \quad (1.83)$$

$$\rho_{//} = \frac{k_z''/\epsilon_0\epsilon_r}{k_z/\epsilon_0} \quad (1.84)$$

Pour la composante perpendiculaire (polarisation E), on obtient :

$$\mathbf{E}_{\perp} = \mathbf{y} \quad (1.85)$$

$$\mathbf{E}'_{\perp} = r_{\perp}\mathbf{y} \quad (1.86)$$

$$\mathbf{E}''_{\perp} = t_{\perp}\mathbf{y} \quad (1.87)$$

avec les coefficient de Fresnel en réflexion $r_{\perp}$ et en transmission $t_{\perp}$:

$$t_{\perp} = \frac{2}{1 + \rho_{\perp}} \quad (1.88)$$

$$r_{\perp} = \frac{1 - \rho_{\perp}}{1 + \rho_{\perp}} \quad (1.89)$$

$$\rho_{\perp} = \frac{k_z''}{k_z} \quad (1.90)$$

En insérant les champs $\mathbf{E}$, $\mathbf{E}'$ et $\mathbf{E}''$ donnés par les équations (1.79) à (1.90) dans l'expression (1.74), on obtient par le théorème de réciprocité l'expression de la distribution spectrale et angulaire du rayonnement émis dans le vide :

$$\frac{d^2W}{d\omega d\Omega} = \left(\frac{d^2W}{d\omega d\Omega} \right)_{//} + \left(\frac{d^2W}{d\omega d\Omega} \right)_{\perp} \quad (1.91)$$

avec :

$$\left(\frac{d^2W}{d\omega d\Omega} \right)_{//,\perp} = \frac{\alpha}{4\pi^2} n \mu \omega^2 |A_{//,\perp}|^2 \quad (1.92)$$

dans lequel :

$$A_{//} = -\mathbf{y} \times \mathbf{v} \cdot \left[-\frac{1}{k} \cdot \frac{\mathbf{k}}{\omega + \mathbf{k} \cdot \mathbf{v}} - \frac{r_{//}}{k'} \cdot \frac{\mathbf{k}'}{\omega + \mathbf{k}' \cdot \mathbf{v}} + \frac{t_{//}}{k''} \cdot \frac{\mathbf{k}''}{\omega + \mathbf{k}'' \cdot \mathbf{v}} \right] \quad (1.93)$$

et :

$$A_{\perp} = -\mathbf{y} \cdot \mathbf{v} \cdot \left[\frac{1}{\omega + \mathbf{k} \cdot \mathbf{v}} + \frac{r_{\perp}}{\omega + \mathbf{k}' \cdot \mathbf{v}} - \frac{t_{\perp}}{\omega + \mathbf{k}'' \cdot \mathbf{v}} \right] \quad (1.94)$$

Ces expressions font apparaître très clairement le rôle particulier des coefficients de Fresnel dans l'établissement des formules du rayonnement de transition à l'aide du théorème de réciprocité. En effet, la Figure 1.12 représente un électron se propageant du vide vers un milieu d'indice n , entraînant l'émission d'un rayonnement dans le milieu et qui émerge finalement dans le vide, alors que les équations (1.93) et (1.94) utilisent les coefficients de Fresnel en transmission $t_{\perp}$ et $t_{//}$ pour une onde se propageant du vide vers le milieu.

1.3.3 Equation intégrale

Les deux approches classiques précédemment exposées sont limitées au cas des interfaces planes, soit à cause de la difficulté de résoudre les conditions aux limites (méthode de Pafomov), soit à cause de l'introduction explicite des coefficients de Fresnel (théorème de réciprocité). Très peu de travaux ont été consacrés à l'étude du rayonnement de transition pour une interface rugueuse par exemple. Les derniers travaux expérimentaux de ma thèse ont suggéré l'intérêt de l'étude du rayonnement de transition d'un réseau en tant que nouvelle source de rayonnement électromagnétique accordable en fréquence. Cette étude a été menée à bien d'un point de vue essentiellement expérimental durant la thèse de Pascal Henri que j'ai co-dirigée à Geel [48]. Ces travaux (sur lesquels nous reviendrons dans le prochain paragraphe) ont permis de caractériser plus précisément cet effet. Pour pouvoir mettre un cadre théorique à cette étude, un modèle décrivant le rayonnement de transition d'une surface quelconque était nécessaire. Ce modèle a été mis au point avec la collaboration de Yoshitake Takakura, du Laboratoire des Systèmes Photoniques de l'Ecole Nationale Supérieure de Physique de Strasbourg.

La Figure 1.13 montre la configuration considérée. Un électron arrive à vitesse constante sur l'interface séparant le vide d'un milieu parfaitement conducteur. On considère seulement le rayonnement dans le plan d'incidence. L'origine du repère (x,y,z) lié à la surface se trouve au point d'impact. Le repère (X,Y,Z) est lié à la trajectoire de l'électron (voir Figure 1.14). Le direction d'incidence est repérée par l'angle Φ entre la trajectoire de l'électron et l'axe x . La direction d'émission des photons est repérée par l'angle θ par rapport à l'axe z .

Là encore, l'électron est modélisé par une charge ponctuelle se déplaçant à vitesse constante v_0 . Le courant associé au déplacement est donné par :

$$\mathbf{J}(X, Y=y, Z, t) = qv_0\delta(X-v_0t, Z)\mathbf{u}_x \quad (1.95)$$

Le champ électromagnétique *total* est donné par les équations de Maxwell :

$$\nabla \times \mathbf{E} + \mu_0 \frac{\partial \mathbf{H}}{\partial t} = 0 \quad (1.96)$$

$$\nabla \times \mathbf{H} = \mathbf{J} + \epsilon_0 \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} \quad (1.97)$$

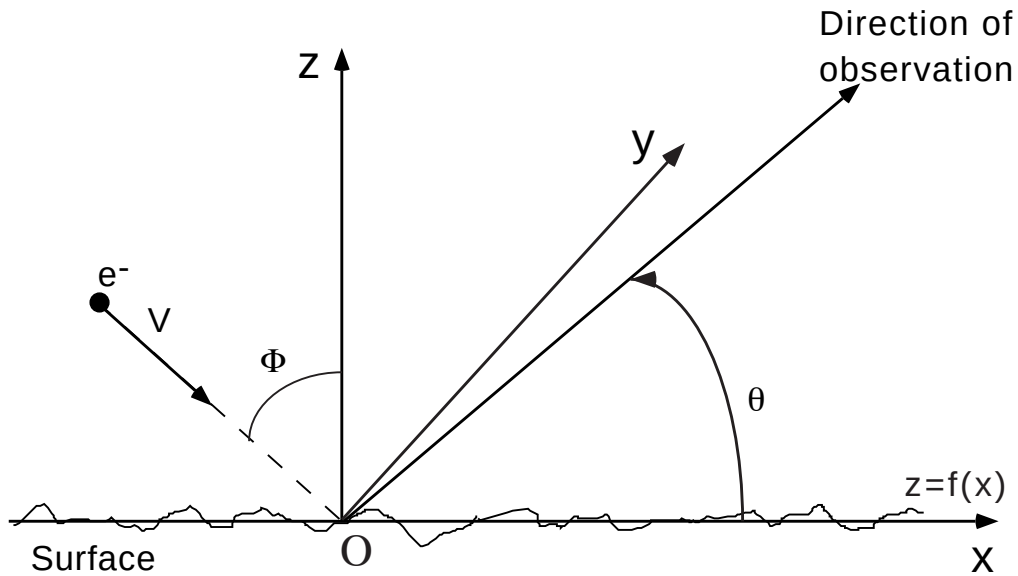


FIGURE 1.13. Configuration considérée pour le rayonnement de transition d'une surface quelconque.

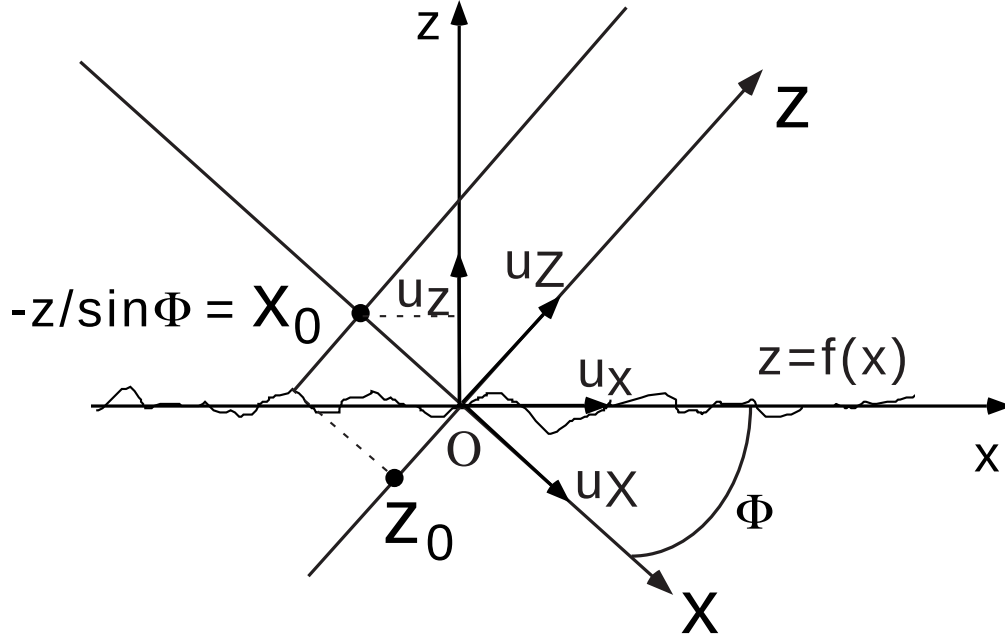


FIGURE 1.14. Repère (x,y,z) lié à la surface et repère (X,Y,Z) lié à la trajectoire de l'électron.

Note : dans l'approche de Van den Berg décrivant le rayonnement de Smith-Purcell, les équations (1.96) et (1.97) servent à calculer le champ *incident*. On cherche alors la solution du problème en le traitant comme un problème de réseau, l'onde incidente étant dans ce cas une onde évanescence, la particule chargée étant négligée. Cette approche se justifie par le fait que l'électron se déplace dans l'espace libre selon une trajectoire infinie. Cette approche ne peut être utilisée ici, car l'électron heurte la surface, et une interaction entre la surface et la particule doit donc apparaître. Dans cette nouvelle approche, nous chercherons donc à calculer le champ *total*, duquel nous séparerons la composante rayonnant à l'infini, qui constitue le rayonnement de transition.

Comme précédemment, on introduit la transformation de Fourier :

$$\begin{aligned}
 \mathbf{E}^i(x, y, z, t) &= (2\pi^2)^{-1} \text{Re} \left(\int_0^\infty d\omega \int_{-\infty}^\infty \mathbf{E}^i(x, z; \beta, \omega) \exp(i\beta y - i\omega t) d\beta \right) \\
 \mathbf{H}^i(x, y, z, t) &= (2\pi^2)^{-1} \text{Re} \left(\int_0^\infty d\omega \int_{-\infty}^\infty \mathbf{H}^i(x, z; \beta, \omega) \exp(i\beta y - i\omega t) d\beta \right) \\
 \mathbf{J}^i(x, y, z, t) &= (2\pi^2)^{-1} \text{Re} \left(\int_0^\infty d\omega \int_{-\infty}^\infty \mathbf{J}^i(x, z; \beta, \omega) \exp(i\beta y - i\omega t) d\beta \right)
 \end{aligned} \tag{1.98}$$

Les composantes de Fourier obéissent aux équations :

$$\begin{aligned}
 (\nabla + i\beta \mathbf{i}_y) \times \mathbf{H} + i\omega \epsilon_0 \mathbf{E} &= \mathbf{J} \\
 (\nabla + i\beta \mathbf{i}_y) \times \mathbf{E} - i\omega \mu_0 \mathbf{H} &= 0
 \end{aligned} \tag{1.99}$$

$$\mathbf{J}(X, Z; \beta, \omega) = q \exp(i\alpha_0 X) \delta(Z) \mathbf{u}_x \tag{1.100}$$

q étant la charge de l'électron et $\alpha_0 = \omega/\nu_0$. Le courant $\mathbf{J}$ ayant une seule composante selon $\mathbf{u}_x$ et ne dépendant pas de β , les composantes en (x,z) (ou en (X,Z) d'ailleurs) du champ électromagnétique peuvent s'écrire comme fonction des seules composantes en y (en Y). En appliquant l'opérateur rotationnel aux équations de Maxwell, on obtient les équations de Helmholtz, qui s'écrivent pour les composantes en y :

$$(\partial_x^2 + \partial_z^2)E_y + (k_0^2 - \beta^2)E_y = (\mu_0/\varepsilon_0)^{1/2}(\beta/k_0)\partial_x J_x \quad (1.101)$$

$$(\partial_x^2 + \partial_z^2)H_y + (k_0^2 - \beta^2)H_y = -\partial_z J_x \quad (1.102)$$

avec $k_0 = \omega_0/c_0$. On considère le rayonnement dans le plan d'incidence. On a alors $\beta=0$ et les équations précédentes se réduisent à :

$$(\partial_x^2 + \partial_z^2)E_y + k_0^2 E_y = 0 \quad (1.103)$$

$$(\partial_x^2 + \partial_z^2)H_y + k_0^2 H_y = -\partial_z J_x \quad (1.104)$$

En conséquence, la composante en y du champ électrique est nulle et le champ magnétique a une seule composante selon l'axe y : le champ est donc polarisé TM et on peut exprimer l'ensemble des six composantes du champ électromagnétique en fonction de $H_y(x, y; 0, \omega) = u(x, z)$.

Le problème consiste à trouver un champ $u(x,z)$ qui obéit à l'équation de Helmholtz avec second membre :

$$(\partial_x^2 + \partial_z^2)u + k_0^2 u = -\partial_z J_x \quad (1.105)$$

Il doit satisfaire la condition de rayonnement quand $z \rightarrow +\infty$: l'énergie du champ doit rester finie à l'infini. Comme on considère une interface parfaitement conductrice, on a la condition aux limites de Neumann :

$$\mathbf{n} \cdot \nabla u = 0 \quad (1.106)$$

Un tel problème est classique en électromagnétisme et sa résolution se fait selon une démarche bien établie [49]. Il se transforme en problème aux limites lorsqu'on introduit la fonction de Green G obéissant à l'équation :

$$\Delta G + k_0^2 G = -4\pi\delta(x-x', z-z') \quad (1.107)$$

On reconnaît là le champ créé par une charge ponctuelle située au point $(x-x')$. On multiplie alors l'équation (1.105) par $G(x-x', z-z')$ et l'équation (1.107) par $u(x', z')$. On soustrait les deux équations obtenues pour avoir :

$$\begin{aligned} \iint_{\Sigma} [G\Delta u - u\Delta G]dx'dz' + \iint_{\Sigma} G\partial_z J_x dx'dz' &= 4\pi u(x, z) \quad \text{si } z > f(x) \\ &= 0 \quad \text{si } z < f(x) \end{aligned} \quad (1.108)$$

Σ étant une surface fermée délimitée par le contour $\Gamma = \Gamma_1 + \Gamma_2$ comme décrit sur la Figure 1.15. Notons que G devant satisfaire à la condition de radiation, on a l'intégrale sur Γ_2 qui doit tendre vers 0 lorsque le rayon R tend vers l'infini. On applique alors la deuxième identité de Green [50] à l'intégrale contenant le terme $[G\Delta u - u\Delta G]$ dans l'équation (1.108) et en faisant tendre R vers l'infini, on obtient :

$$\begin{aligned} u^{(i)} + \frac{1}{4\pi} \int_{\Gamma_1} [G(\mathbf{n} \cdot \nabla' u) - u(\mathbf{n} \cdot \nabla' G)]dl' &= u(x, z) \quad \text{si } z > f(x) \\ &= 0 \quad \text{si } z < f(x) \end{aligned} \quad (1.109)$$

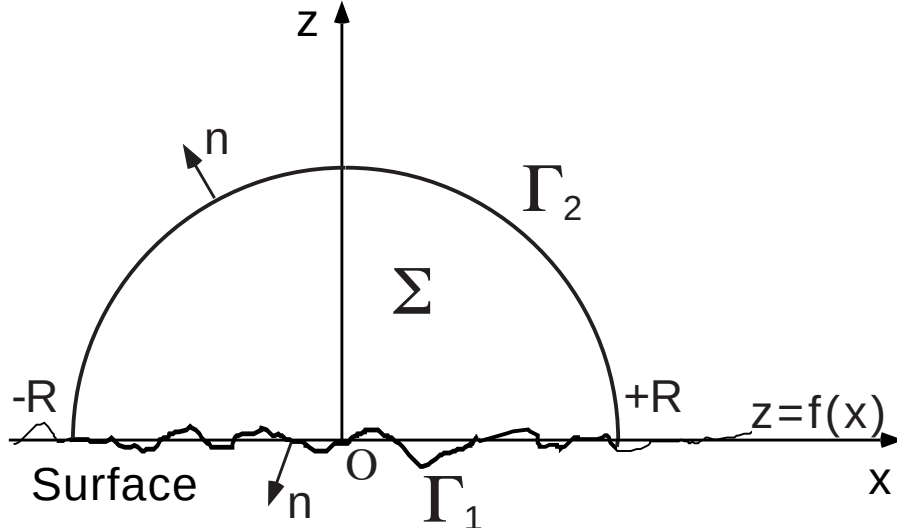


FIGURE 1.15. Contour d'intégration pour l'application du théorème de Green

avec :

$$u^{(i)}(x, z) = \frac{1}{4\pi} \iint_{\Sigma} G(x-x', z-z') \partial_z J_x dx' dz' \quad (1.110)$$

L'interprétation physique de l'équation (1.109) est la suivante : sous l'action du champ incident $u^{(i)}$, les charges se répartissent sur l'interface Γ_1 de sorte à annuler le champ dans le matériau infiniment conducteur à $z < f(x)$. Cette propriété est traduite par le *théorème d'extinction* [51]. En tenant compte de la condition aux limites de Neumann (1.106), on obtient :

$$\begin{aligned} u^{(i)} - \frac{1}{4\pi} \int_{\Gamma_1} u(\mathbf{n} \cdot \nabla' G) dl' &= u(x, z) \quad \text{si } z > f(x) \\ &= 0 \quad \text{si } z < f(x) \end{aligned} \quad (1.111)$$

Le passage à la limite $z = f(x)$ donne, en tenant compte de la singularité de l'intégrant ($\mathbf{n} \cdot \nabla' G$ étant une fonction de Hankel du premier ordre) :

$$u^{(i)}(x, f(x)) - \frac{1}{4\pi} \int_{\Gamma_1} u(x', f(x')) (\mathbf{n} \cdot \nabla' G) dl' = \frac{1}{2} u(x, f(x)) \quad (1.112)$$

Cette équation est valable pour tout profil $z = f(x)$, tant que la dérivée seconde $f''(x)$ existe. On retrouve là une limite connue de cette approche par équation intégrale [22].

Il reste donc à calculer le champ incident. L'équation (1.110) exprime le champ incident à l'aide d'une fonction de Green. On cherche alors une représentation intégrale de $u^{(i)}$. A l'aide d'une rotation Φ autour de l'axe y , on obtient (u_x, u_y) de (u_X, u_Y) , et comme :

$$\partial_z J_x(X, Z) = q \exp(i\alpha_0 X) \delta'(Z) \quad (1.113)$$

on réécrit l'équation (1.110) :

$$\begin{aligned}
u^{(i)}(x, z) &= \frac{q}{4\pi} \iint_{\Sigma} \exp(i\alpha_0 X') \delta'(Z') \times \\
&\quad G(x - X' \cos \Phi - Z' \sin \Phi, z + X' \sin \Phi - Z' \cos \Phi) \partial_z J_x(dz') dX' dZ' \\
&= \frac{q}{4\pi} \int_{-\infty}^0 \exp(i\alpha_0 X') dX' \int_{Z_0}^{\infty} dZ' \delta'(Z') \times \\
&\quad G(x - X' \cos \Phi - Z' \sin \Phi, z + X' \sin \Phi - Z' \cos \Phi)
\end{aligned} \tag{1.114}$$

La borne d'intégration Z_0 étant choisie telle que décrit à la Figure 1.14. En tenant compte du fait que selon la théorie des distributions $\langle \delta', \varphi \rangle = -\langle \delta, \varphi' \rangle$ [52], on a :

$$\begin{aligned}
u^{(i)}(x, z) &= -\frac{q}{4\pi} \int_{-\infty}^0 \exp(i\alpha_0 X') dX' \times \\
&\quad \left. \frac{d}{dZ'} \right|_{Z'=0} G(x - X' \cos \Phi - Z' \sin \Phi, z + X' \sin \Phi - Z' \cos \Phi)
\end{aligned} \tag{1.115}$$

On écrit maintenant G sous la forme d'un développement de Weyl en ondes planes [53] :

$$G(x, z) = i \int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{\gamma} \exp(i\alpha x + i\gamma |z|) d\alpha \tag{1.116}$$

avec $k_0^2 = \alpha^2 + \gamma^2$. On peut alors réécrire le champ incident sous la forme :

$$\begin{aligned}
u^{(i)}(x, z) &= -\frac{q}{4\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \exp(i\alpha x) d\alpha \int_{-\infty}^0 dX' \left[\frac{\alpha}{\gamma} \sin \Phi + \text{sign}(z + X' \sin \Phi) \cos \Phi \right] \times \\
&\quad \exp[i(\alpha_0 - \alpha \cos \Phi) + i\gamma |z + X' \sin \Phi|]
\end{aligned} \tag{1.117}$$

La présence de la fonction $\text{sign}(z + X' \sin \Phi)$ amène à séparer l'intégrale selon X' en deux parties. En tenant compte du fait que $v_0/c < 1$ et en utilisant la transformée de Fourier de la fonction de Heaviside :

$$\int_0^{\infty} \exp(-i\omega t) dt = VP\left(\frac{1}{i\omega}\right) + \pi\delta(\omega) \tag{1.118}$$

(VP signifiant Valeur Principale au sens de Cauchy), on obtient :

$$\begin{aligned}
u^{(i)}(x, z) &= -\frac{q}{4\pi} \{ \exp(-i\alpha_0 / \sin \Phi z) \times \\
&\quad \int_{-\infty}^{\infty} \frac{d\alpha}{\gamma} \exp[i\alpha(x + z \cot \Phi)] \left[\frac{\alpha \sin \Phi - \gamma \cos \Phi}{i(\alpha_0 - \alpha \cos \Phi - \gamma \sin \Phi)} - \frac{\alpha \sin \Phi + \gamma \cos \Phi}{i(\alpha_0 - \alpha \cos \Phi + \gamma \sin \Phi)} \right] + \\
&\quad \int_{-\infty}^{\infty} \frac{d\alpha}{\gamma} \exp[i\alpha x + i\gamma z] \left[\frac{\alpha \sin \Phi + \gamma \cos \Phi}{i(\alpha_0 - \alpha \cos \Phi + \gamma \sin \Phi)} \right] \}
\end{aligned} \tag{1.119}$$

L'équation (1.119) mérite que l'on développe son interprétation. Deux points importants sont à souligner.

Tout d'abord, le champ incident est écrit comme la somme de deux intégrales représentant une superposition d'ondes, mais dont les intégrands décrivent des ondes de natures différentes. La première intégrale présente une singularité lorsque $z = -x \tan \Phi$. On reconnaît là l'équation de la trajectoire de l'électron. Comme son intégrant ne satisfait pas à l'équation de Helmholtz sans second membre (la somme des composantes au carré n'est pas égale au vecteur d'onde au carré), cette intégrale représente en fait la composante non radiative de $u(i)$. La seconde intégrale représente une superposition d'ondes planes. Elle décrit le champ émis par une particule en mouvement à vitesse constante qui est soudainement arrêtée lorsqu'elle arrive sur l'interface. On retrouve là la description classique du rayonnement de transition telle que formalisée à l'aide du théorème de réciprocité. Cette composante directe ne dépend pas de la géométrie de la surface.

Secondement, les calculs précédents ont été menés pour un contour d'intégration G_1 situé au dessus de la surface $z \geq f(x)$. De plus, on a utilisé une condition aux limites de Neumann standard. Or la particule heurte la surface, et donc une singularité apparaît au point d'impact O. Cette singularité devrait être prise en compte lors de l'écriture de la condition aux limites. Pour résoudre ce problème, on fait appel au théorème d'extinction. Celui-ci nous enseigne que l'équation (1.109) est aussi valide au dessous de la surface $z \leq f(x)$. On introduit alors une singularité du même ordre, que l'on fixe égale à l'opposée de la singularité de $u(i)$ de telle sorte que les deux singularités s'annulent sur la surface $z = f(x)$ au point O. Finalement, une condition aux limites de Neumann standard peut effectivement être utilisée. Pour une surface parfaitement plate et parfaitement conductrice, on peut utiliser la charge image, de signe opposée à la charge incidente, et qui s'annihile avec elle sur la surface. Lorsque la surface est rugueuse, une telle charge image ne peut être invoquée. La composante singulière évoquée plus haut peut être interprétée comme l'image généralisée de la charge en déplacement.

Il est à noter que nous tenons là l'explication de l'échec de la description de l'effet Smith-Purcell comme étant l'émission de rayonnement par le dipôle constitué par la charge en mouvement et son image dans le réseau [2]-[5]. Cette approche suppose la même charge image ponctuelle que lorsque l'interface est plane. Il faudrait utiliser une image généralisée.

L'expression du rayonnement de transition se retrouve à partir de l'équation (1.112). Pour une surface parfaitement plane $z = f(x) = 0$, celle-ci se réduit à $2u^{(i)}(x, 0) = u(x, 0)$. La solution du problème radiatif est alors donnée par :

$$u^{(i)}(x, z) - \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} u^{(i)}(x', 0) \frac{\partial}{\partial z'} G(x - x', z) dx' = u(x, z) \quad (1.120)$$

En utilisant le développement de Weyl (1.116), on obtient :

$$\frac{\partial}{\partial z'} G(x - x', z) = - \int_{-\infty}^{\infty} \exp(i\alpha(x - x') + i\gamma z) d\alpha \quad \text{for } z > 0 \quad (1.121)$$

et alors :

$$u(x, z) = u^{(nr)}(x, z) - \frac{q}{4\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \exp(i\alpha x + i\gamma z) \times \left[\frac{\alpha \sin \Phi - \gamma \cos \Phi}{i(\alpha_0 - \alpha \cos \Phi - \gamma \sin \Phi)} + \frac{\alpha \sin \Phi + \gamma \cos \Phi}{i(\alpha_0 - \alpha \cos \Phi + \gamma \sin \Phi)} \right] d\alpha \quad \text{for } z > 0 \quad (1.122)$$

Dans l'équation (1.122), le terme $u^{(nr)}(x, z)$ représente la composante non-radiative du champ incident $u^{(i)}$, donnée par la première intégrale dans l'équation (1.119). On intègre l'équation (1.122) par la méthode de la selle de cheval [54], ce qui permet d'écrire la puissance rayonnée en champ lointain :

$$|u^{(sc)}(r, \theta)|^2 = \left| \frac{q}{\sqrt{2\pi k_0 r}} \times \frac{\beta_0 \sin \Phi (\sin \theta - \beta_0 \cos \Phi)}{(1 - \beta_0 \cos \Phi \sin \theta)^2 - (\beta_0 \sin \Phi \cos \theta)^2} \right|^2 \quad (1.123)$$

Cette expression présente bien la même dépendance angulaire que l'équation (1.69) dans le cas $\tau = 0$.

L'équation (1.122) présente une particularité : la composante radiative du champ $u(x,z)$ est écrite comme un développement en ondes planes résultant d'un phénomène d'interférence entre la composante radiative de $u(i)$ donnée par la seconde intégrale dans l'équation (1.119) et le champ émis par la surface sous l'action de la composante incidente du même champ $u(i)$. Du point de vue de l'opticien, il s'agit là d'un cas très inhabituel de phénomène de diffraction. Cependant, on reconnaît l'interprétation classique du rayonnement de transition tel que décrit par le théorème de réciprocité, qui décrit le champ radiatif comme la superposition d'un champ direct et d'un champ réfléchi par la surface parfaitement conductrice [34][41][42]. Cette approche originale ne remplace donc pas les modèles précédents, mais les complète par un éclairage nouveau [55].

La figure suivante illustre probablement bien l'état d'esprit du lecteur à cet instant.

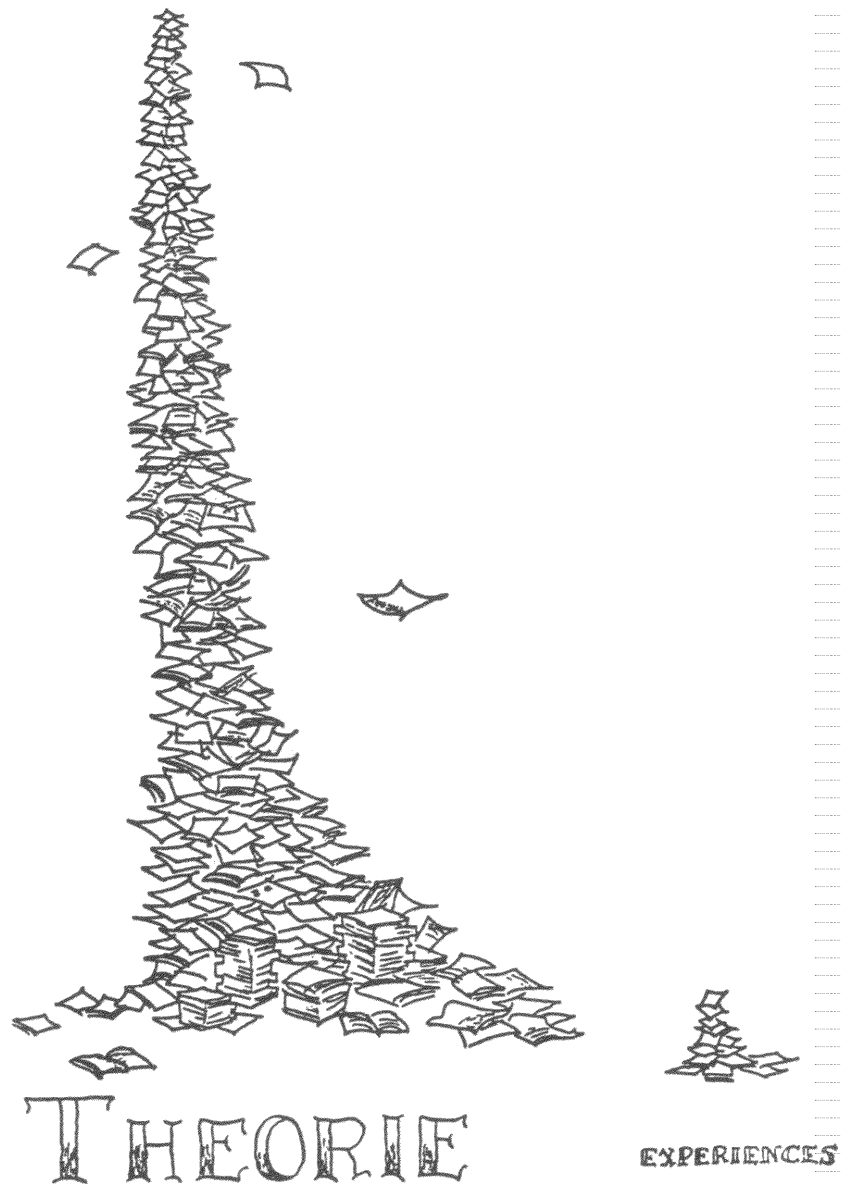


Illustration de la couverture du "Courrier du Cern" n°5 (Avril 1975)

1.3.4 Une application : le diagnostic de faisceau

La connaissance des caractéristiques du rayonnement de transition permet d'envisager diverses applications. Ainsi, des sources de rayonnement X basées sur le rayonnement de transition ont été construites, donnant lieu à diverses démonstrations de faisabilité [37]. Cependant, les intensités obtenues étant faibles, on peut douter de la mise en œuvre prochaines de telles sources. Le rayonnement de transition a aussi été étudié dans le domaine de l'infra-rouge lointain, et des résultats prometteurs ont été obtenus [38][39].

Mais c'est encore dans le domaine du visible que les résultats les plus intéressants ont été obtenus, en utilisant le rayonnement de transition comme moyen de diagnostic des faisceaux de particules chargées. Après les travaux pionniers de Louis Wartski en France, le rayonnement de transition est apparu comme un moyen simple et très efficace de mesurer la taille d'un faisceau de particules chargées, mais aussi son énergie et sa divergence [35][36]. L'utilisation d'un détecteur ultra-rapide (comme une caméra à balayage de fente) permet aussi de mesurer la taille longitudinale du faisceau. Ces mesures permettent donc de caractériser entièrement le faisceau, et donc de déterminer son émittance.

La machine installée à l'IRMM n'était pas équipée en tels moyens de diagnostic. Nous avons alors décidé d'y installer un dispositif de diagnostic du faisceau basé sur le rayonnement de transition. L'originalité de notre installation, par rapport à d'autres réalisations [56] est double :

D'une part, l'utilisation d'une lame séparatrice et de deux caméras (une caméra CCD, et une caméra à intensificateur à tube Vidicon) permet de mesurer *simultanément* la position et la taille du faisceau, en effectuant la focalisation sur le radiateur OTR, et l'énergie et la divergence du faisceau, en saisissant l'image de la divergence angulaire du faisceau OTR par une focalisation à l'infini. Enfin, l'utilisation d'une mire, d'un élément diffractif et d'un faisceau laser permet très aisément de calibrer le système en taille comme en énergie.

Une application a été écrite qui analyse les deux images disponibles pour retrouver les paramètres du faisceau, par trois étudiants que j'ai encadrés [57]-[59]. Elle est dérivée du programme NIH Image, un freeware du domaine public développé par Wayne Rasband du National Institute of Health et dédié à la capture et l'analyse d'images. Ce programme tourne sur Macintosh et depuis récemment sur PC. Sur Macintosh, les sources sont disponibles, ce qui permet de le modifier (programmation en Pascal Objet sous CodeWarrior). Il dispose aussi d'un langage macro très puissant, mais plus lent.

Cette application tourne sur un Macintosh IIfx (!) équipé d'une carte d'acquisition DataTranslation DT2255 QuickCapture, placé à environ 50 mètres des caméras, elles-mêmes installées sur un banc optique de 10 mètres transportant l'image OTR du faisceau à travers le mur du bunker. Ce dispositif permet une analyse toutes les 5 secondes environ, ce qui est amplement suffisant pour nos besoins. La Figure 1.16 montre schématiquement l'implantation des systèmes de diagnostic sur l'accélérateur GELINA.

La Figure 1.17 montre une capture d'écran de OTR4.0, le programme d'analyse de faisceau basé sur le rayonnement de transition écrit à l'IRMM. Le faisceau avait une énergie de 94 MeV, un profil gaussien de largeur 0,89 cm en x et 0,83 cm en y (largeur à mi-hauteur), pour une divergence de 4,3 mrad en x et 5 mrad en y. Ce programme a aussi été utilisé pour affiner les réglages de l'accélérateur durant les expériences sur le rayonnement Smith-Purcell [15], principalement pour assurer au faisceau une forme adaptée et une divergence la plus faible possible au niveau du réseau.

Les physiciens utilisant la machine pour leurs expériences de neutronique se sont heurtés à un problème de stabilité du faisceau de neutron (spectre des neutrons émis), attribué à une instabilité de la position du faisceau d'électrons sur la cible. Nous avons alors écrit une application dérivée de OTR4.0, assurant le suivi de la position du faisceau d'électron sur la cible (BeamTracker 1.0). Pour cela, un autre radiateur OTR a été installé près de la source de neutron. Une analyse est effectuée toutes les 2 s. Les données relatives à la position du faisceau sont stockées dans un fichier pour permettre le traitement des données enregistrées par les diverses expériences de neutronique en conjonction avec la position du faisceau, et de rejeter les éventuelles acquisitions incorrectes. La Figure 1.18 montre une capture d'écran de cette application. Elle montre le faisceau à l'échelle 1 (plein champ de la caméra) et une fenêtre flottante avec un agrandissement de 4x, centrée sur le centre de gravité du faisceau. La position du faisceau pour les 10 premières minutes d'observation est donnée sur les graphes.

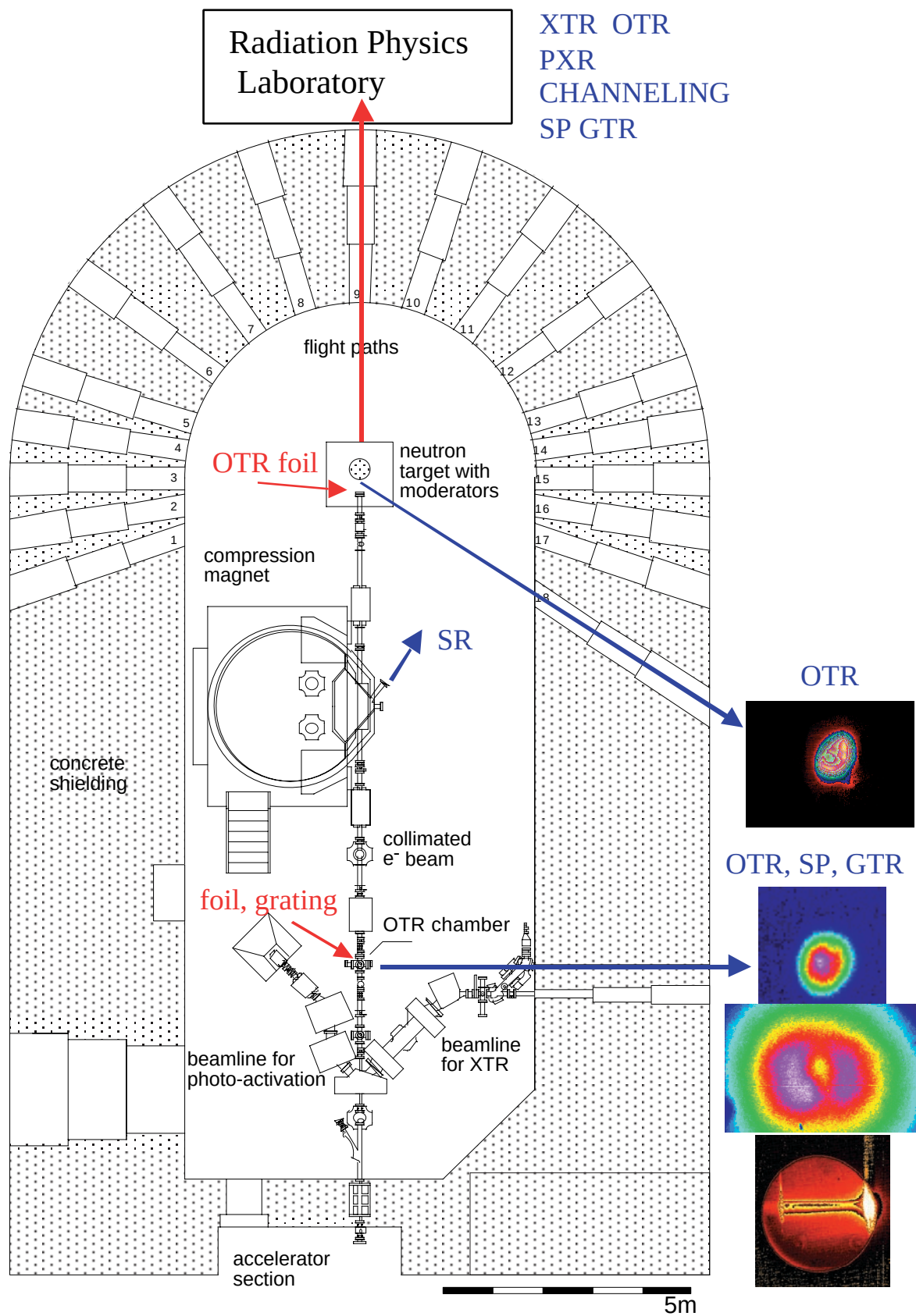


FIGURE 1.16. Hall d'expérience couplé à l'accélérateur linéaire d'électrons GELINA de Geel

Le diamètre typique du faisceau est de l'ordre du centimètre. La position du centre du faisceau peut varier d'environ ± 2 mm en horizontal (x) et ± 1 mm en vertical (y) lorsqu'on laisse l'accélérateur fonctionner librement. Ces dérives ont été attribuées à des changements dans les paramètres de fonctionnement du linac dus à des variations thermiques dans les cavités accélératrices pendant les premières heures de fonctionnement, et à des changements dans les paramètres des quadripôles de focalisation probablement explicables par des dérives dans leurs alimentations de puissance. La vitesse de dérive est cependant relativement lente : moins de 1 mm/mn en x comme en y, ce qui permet aux opérateurs de maintenir facilement le faisceau à une position prédéterminée dans un rectangle de ± 0.4 mm en x et ± 0.2 mm en y, et ce pendant plusieurs heures.

Les ruptures de faisceau, principalement dues à des problèmes de vide, ou à des pannes d'alimentation sont une autre sources d'instabilité dans la position du faisceau. Elles sont généralement palliées très rapidement, mais souvent la machine redémarre avec une position de faisceau légèrement différente. Il est alors important de recentrer la faisceau aux valeurs d'avant la panne pour assurer la continuité des mesures.

Ce système a été testé sur plusieurs mois et a donné entière satisfaction : au démarrage, les opérateurs peuvent plus facilement régler la machine, et peuvent maintenant rapidement détecter d'éventuels changements dans les paramètres de fonctionnement du linac (position, focalisation, intensité du faisceau) en regardant simplement l'image OTR. Ce programme a d'autre part permis de mettre en évidence et de caractériser les variations de position du faisceau de l'accélérateur GELINA et en particulier de relier les plus importantes d'entre-elles aux fluctuations de températures dans le circuit de refroidissement. Ainsi, non seulement une correction des variations de position est possible, mais de plus des solutions à leur cause principale peuvent être proposées. Une automatisation de la machine (asservissement des bobines de centrage sur l'ordinateur) était envisagée lorsque j'ai quitté l'IRMM. Elle devait permettre d'alléger le travail des opérateurs faisant fonctionner la machine.

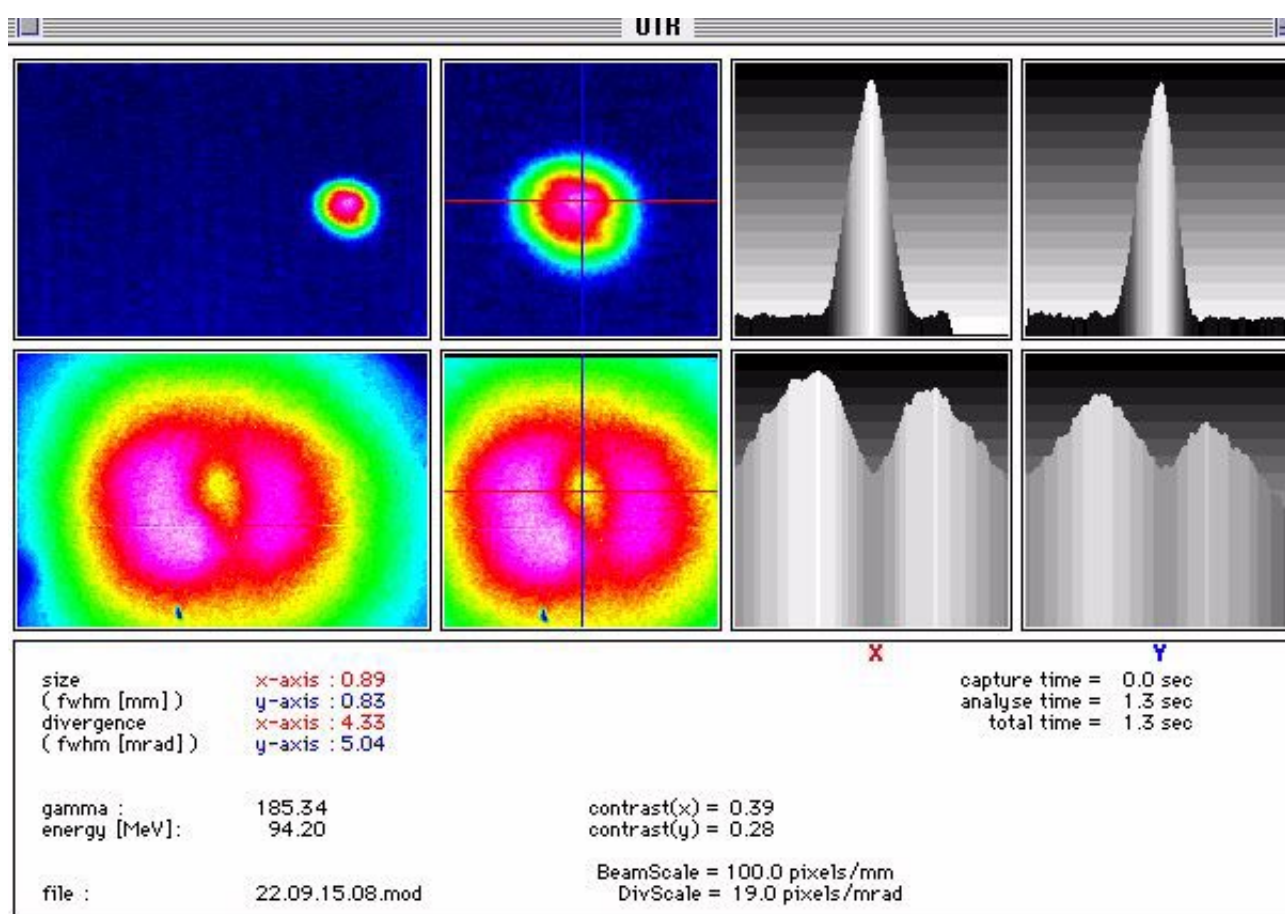


FIGURE 1.17. Analyse (taille, énergie et divergence) par rayonnement de transition d'un faisceau d'électron issu de GELINA à l'aide du programme OTR4.0.

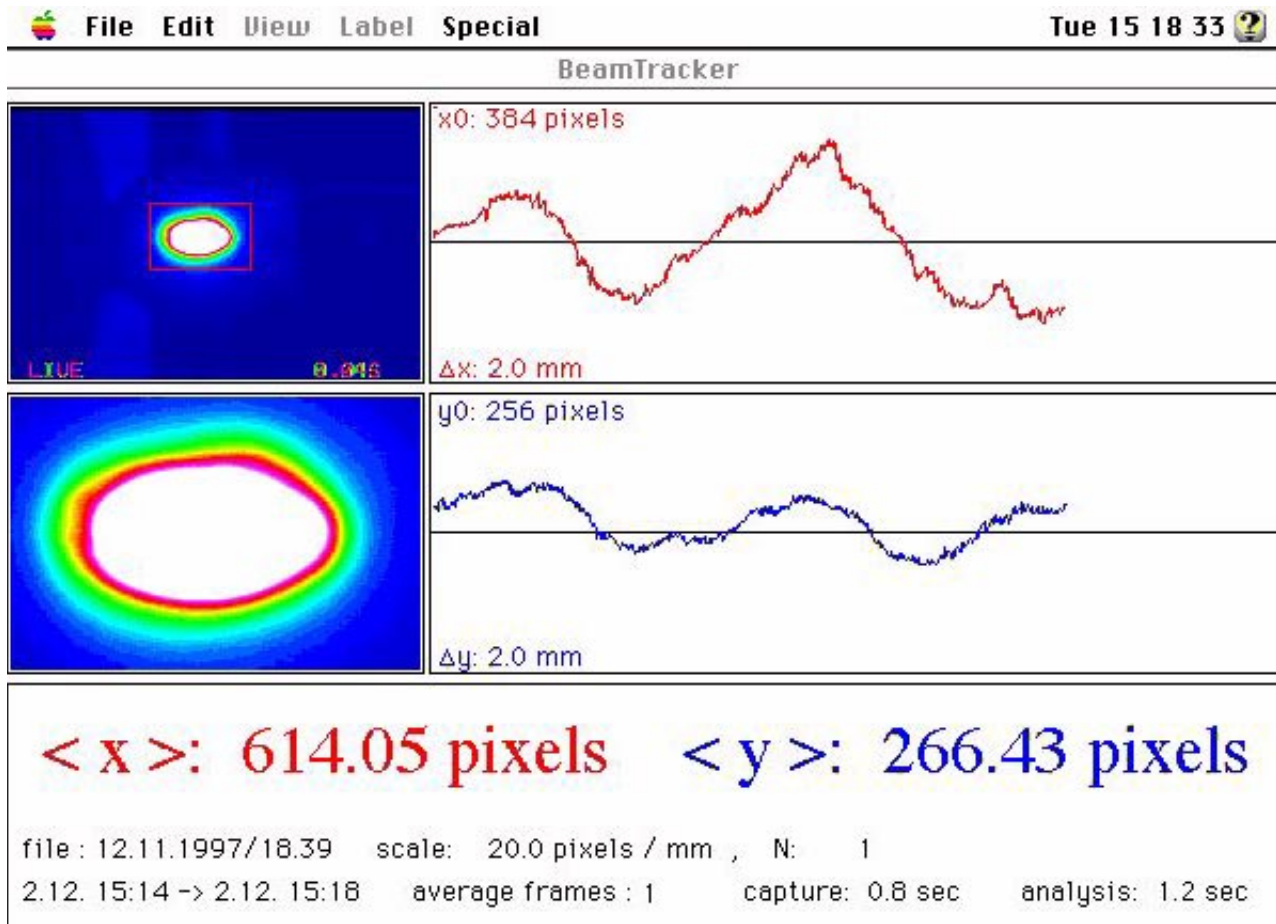


FIGURE 1.18. Suivi par rayonnement de transition de la position sur la cible à neutrons du faisceau d'électron issu de GELINA à l'aide du programme BeamTracker.

1.4 Rayonnement de Transition DiffRACTIF

Ces dernières années ont été marquées par l'émergence de nouvelles sources dans le domaine infra-rouge lointain - ondes millimétriques, basées sur le rayonnement de transition ou l'effet Smith-Purcell. Ces deux effets ont été décrits. Ils constituent des candidats intéressants, mais limités par certains aspects. Ainsi, si le rayonnement de transition est une source dont l'intensité croît en γ^2 , concentrée dans un cône d'ouverture $1/\gamma$ (γ étant le facteur de Lorentz), l'émission est un continuum. Ceci impose donc l'utilisation d'un monochromateur pour des études telle que la spectroscopie infra-rouge par exemple. Le rayonnement de Smith-Purcell est quasi-monochromatique s'il est collecté dans un petit angle solide autour de la direction de référence. Mais son intensité décroît exponentiellement avec la distance de l'électron par rapport à la surface, la distance caractéristique étant de l'ordre de $\beta\gamma\lambda/4\pi$. De ce fait, pour un faisceau d'électrons de diamètre plus grand que $\gamma\lambda$, l'efficacité est faible par rapport au rayonnement de transition pour lequel tous les électrons interagissent avec la surface.

Une solution élégante pour pallier aux problèmes inhérents à l'effet Smith-Purcell (hauteur d'interaction limitée) et au rayonnement de transition (large spectre d'émission) pourrait être de combiner leurs caractéristiques en produisant du rayonnement de transition (efficacité d'interaction) sur un réseau de diffraction (monochromaticité). On espère, par analogie avec l'optique diffractive classique, que l'utilisation d'une surface périodique va entraîner l'émission de rayonnement dans différents ordres de diffraction, l'ordre 0 ayant essentiellement les mêmes caractéristiques que pour une surface plane, tandis que par effet de réseau, les ordres diffractés sont essentiellement monochromatiques (cf. Figure 1.19).

L'échec des mesures sur le rayonnement Smith-Purcell à la fin de ma thèse avait montré la voie : il était possible d'observer un rayonnement "monochromatique" loin de la direction de la réflexion spéculaire en utilisant un réseau [15]. Une discussion avec Peter Rullhusen (durant le "pot" de thèse!!) souligna l'intérêt d'une étude systématique du rayonnement émis par un électron heurtant un réseau de diffraction. Il fallut attendre la thèse de Pascal Henri, et mon retour à l'IRMM en 1997 pour mener à bien une première étude systématique [48]. Les résultats encourageants obtenus ont alors motivé les travaux menés avec Yoshitake Takakura sur le rayonnement de transition émis par un électron frappant une surface quelconque, travaux qui ont permis de décrire le rayonnement de transition d'un réseau ou Grating Transition Radiation (GTR).

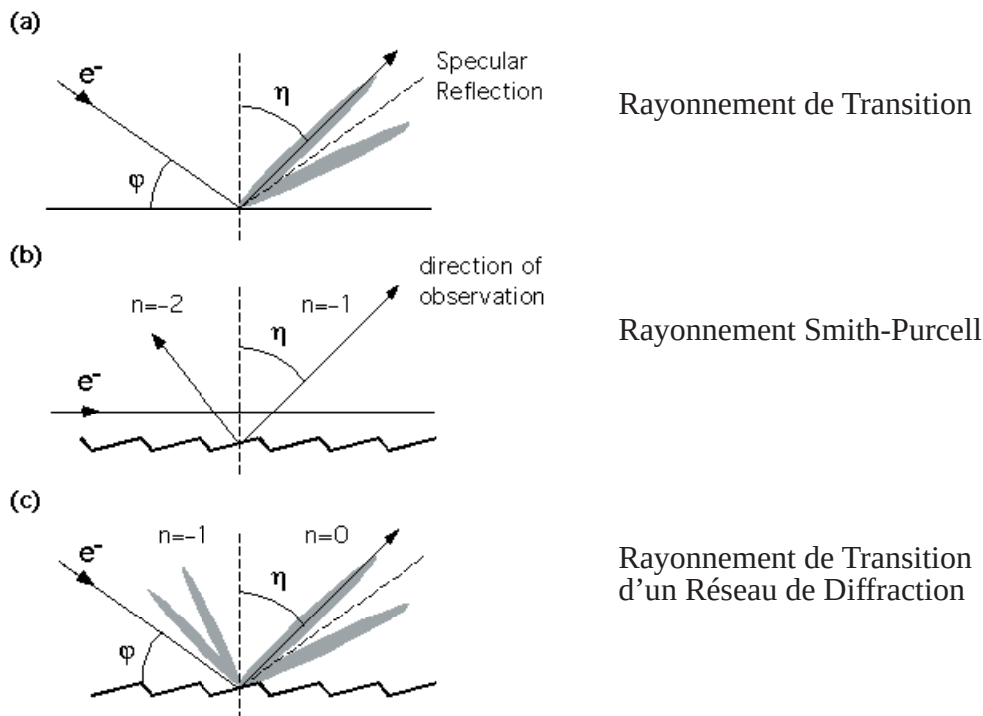


FIGURE 1.19. Comparaison Rayonnement de Transition, Rayonnement Smith-Purcell et Rayonnement de Transition DiffRACTIF.

1.4.1 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé pour caractériser le rayonnement de transition d'un réseau lors des expériences à Gent (en 1998) est essentiellement celui qui avait été déjà utilisé à Geel en 1994 [15]. La Figure 1.20 en donne le principe : le réseau est monté sur un support rotatif. La direction du faisceau étant fixe, on change donc simultanément l'angle d'incidence des électrons sur le réseau φ et l'angle d'observation η , dans un montage habituellement appelé montage à déviation constante Ψ . Les nouveautés résident dans le fait que l'énergie étant beaucoup plus basse, il sera possible d'observer le cône d'émission (alors qu'il était intégré par le dispositif d'observation à Geel), d'observer à deux angles de déviation constante $\Psi=90^\circ$ ou $\Psi=120^\circ$, et enfin d'observer le rayonnement en dehors du plan d'incidence $\zeta=0^\circ$.

La Figure 1.21 montre l'implantation du dispositif d'observation à Gent [48]. On a utilisé une série de filtres à bande étroite (longueur d'onde centrale s'échelonnant de 400 nm à 700 nm tous les 50 nm, avec une largeur à mi-hauteur de ± 5 nm) pour caractériser spectralement le rayonnement observé [15], et un polariseur linéaire pour étudier les propriétés de polarisation du champ électromagnétique émis. Une caméra CCD intensifiée C5985 Hamamatsu à fenêtre amincie (sensibilité accrue dans l'infra-rouge proche) a été utilisée à Gent (une caméra à tube intensificateur Vidicon LH 4036-25 de LHESA ELECTRONIQUE avait été utilisée à Geel). L'ensemble polariseur, filtres et caméra est monté sur un banc optique inclinable pour l'observation du rayonnement émis hors du plan d'incidence. Le support de réseaux est monté sur un dispositif d'insertion à moteurs pas à pas commandé depuis le Macintosh d'acquisition via une interface de commande écrite en langage Labview [15]. Ce programme permet le positionnement précis en rotation et en translation via une liaison RS232. Il commande aussi la sélection du filtre à bande étroite. La reproductibilité du positionnement est de 0,5 mm en translation et $0,1^\circ$ en rotation. L'acquisition des images est faite à l'aide du programme NIHImage1.6 via une carte AG5 Scion sur un Macintosh 8600/250. L'ensemble des éléments du banc optique : filtres, polariseur, camera (LHESA ou Hamamatsu) avec son objectif et fenêtre de quartz, a été calibré au Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) [48]. Les réseaux Zeiss utilisés pour les expériences ont été gravés dans une couche de 100 μm de SiC déposée sur un support en graphite de $10 \times 50 \times 50 \text{ mm}^3$ et un dépôt de 100 nm d'aluminium assure une haute réflectivité.

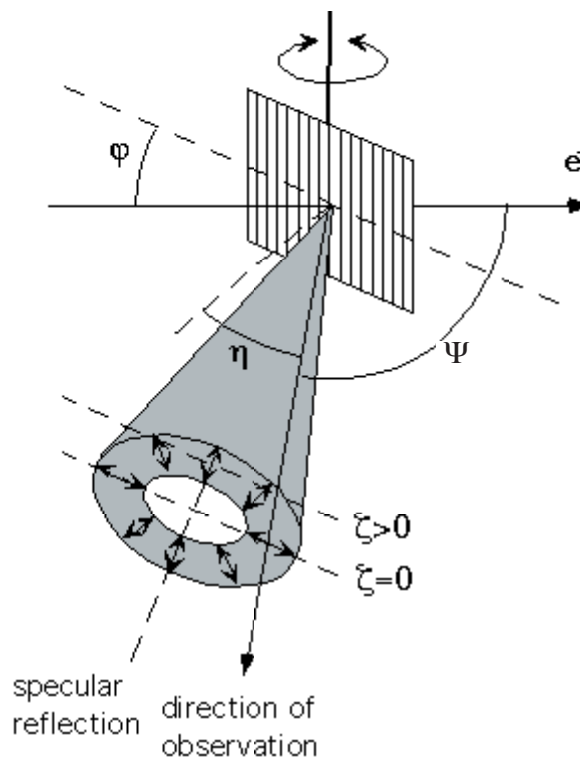


FIGURE 1.20. Principe des expériences Smith-Purcell réalisées à Geel ($\zeta = 0^\circ$, $\Psi = 90^\circ$) et à Gent (ζ variable, $\Psi = 90^\circ$ ou 120°)

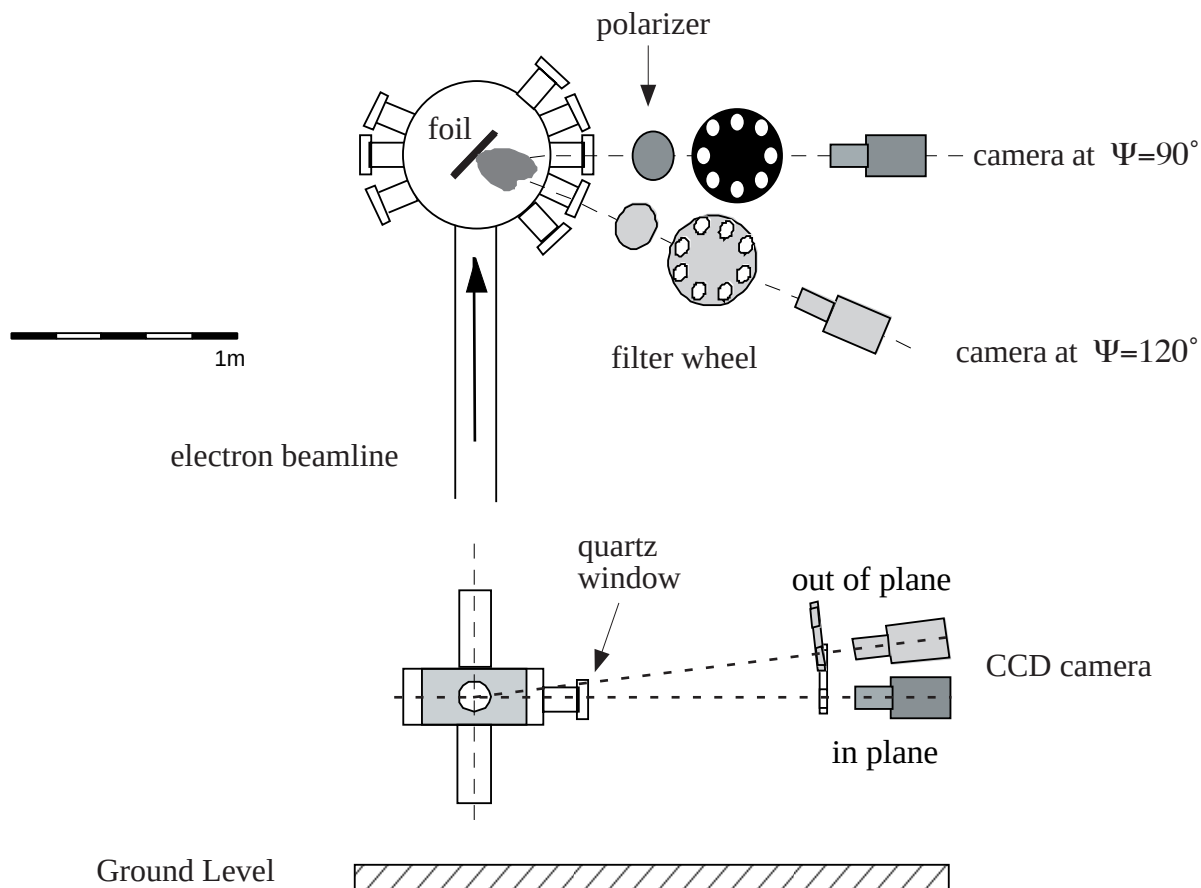


FIGURE 1.21. Schéma d'implantation du banc optique installé sur l'accélérateur de Gent.

Cinq réseaux ont été utilisés, de périodes et de profils différents. La Table 1 résume les caractéristiques de ces réseaux. Leurs profils et périodes ont été mesurés au microscope à effet de force atomique (AFM).

Les expériences réalisées à Gent ont utilisé un faisceau d'énergie 3 à 13 MeV, et sont donc parfaitement complémentaires aux expériences qui avaient été réalisées à Geel avec un faisceau d'énergie 20 à 120 MeV [15]. Pour obtenir un faisceau d'électrons bien défini en taille et de faible divergence, deux collimateurs en graphite de 2 mm de diamètre ont été placés à 1 m l'un de l'autre dans la ligne de faisceau. Ainsi un faisceau de diamètre de l'ordre du mm et de divergence de l'ordre du mrad a été obtenu. L'intensité maximale du faisceau est de 2 mA moyen (pour environ 5 μ A utilisés durant les expériences). L'accélérateur est pulsé avec une largeur de pulse variable de 1 à 10 ms, et une fréquence de répétition ajustable de 1 à 1000 Hz.

TABLE 1. Caractéristiques des réseaux utilisés dans les expériences GTR

Réseau	Période	Caractéristiques
Triangulaire symétrique	555.5 nm	$h/D = 0.1$
Triangulaire symétrique	555.5 nm	$h/D = 0.54$
Lamellaire	500 nm	$h/D = 0.1$ $a/D = 0.5$
Blazé	500 nm	$h/D = 0.1$ angle de blaze : 7.3°
Blazé	500 nm	$h/D = 0.2$ angle de blaze : 12.4°

1.4.2 Résultats

Deux séries d'expériences ont été menées à haute énergie (20 à 110 MeV) sur l'accélérateur linéaire de l'IRMM à Geel [15] et à plus basse énergie (3 à 13 MeV) sur l'accélérateur linéaire de Gent [48].

Les principaux résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication [60] et sont :

autour de la direction de la réflexion spéculaire, le rayonnement observé présente des caractéristiques identiques (spectre, polarisation, dépendance en énergie) au rayonnement de transition d'une surface plane ($\Psi = 90^\circ$ et $\Psi = 120^\circ$),

une émission de rayonnement quasi-monochromatique a été observé loin de la direction de la réflexion spéculaire,

à haute énergie ($E > 20$ MeV) et pour un angle d'incidence du faisceau faible ($\varphi < 6^\circ$), le rayonnement produit présente des caractéristiques similaires au rayonnement Smith-Purcell en spectre, polarisation et dépendance énergétique ($\Psi = 90^\circ$)[15],

à basse énergie ($E < 13$ MeV) et pour des angles d'incidence plus élevés ($\varphi > 10^\circ$) et pour un angle de déviation constante $\Psi = 120^\circ$, on observe loin de la direction de la réflexion spéculaire une émission constituée d'un pic intense et d'une structure similaire au double lobe d'émission OTR,

le rayonnement émis dans l'ordre 0 près de la direction de la réflexion spéculaire est très peu sensible au profil du réseau, par contre le rayonnement émis à grande incidence (ordre -1) est plus sensible au profil.

La Figure 1.22(a) montre l'intensité mesurée à $\lambda = 400$ nm avec un réseau de période 500 nm avec un angle de blaze de 12.4° et pour un faisceau d'énergie 5 MeV et un angle de déviation constante de $\Psi = 120^\circ$. Les résultats sont donnés en unités arbitraires en fonction de l'angle d'incidence φ du faisceau sur le réseau. On constate que l'ordre 0 est émis dans la direction de la réflexion spéculaire comme un continuum avec de petites variations seulement en fonction de la longueur d'onde, comme pour le rayonnement de transition classique. On constate un pic d'émission pour $\varphi = 45^\circ$. Autour de $\varphi = 32^\circ$, on observe une structure en double lobe similaire à l'ordre 0 : c'est l'ordre -1, correspondant à l'effet diffractif attendu.

La Figure 1.22(b) montre les émissions observées à $\lambda = 400, 450, \dots, 650, 700$ nm, superposées. On observe une succession de pics d'émission, l'angle φ du maximum diminuant quand la longueur d'onde augmente. Il est à noter que l'intensité de ces lignes quasi-monochromatique est plus grande que celle du rayonnement type OTR au voisinage de la direction de réflexion spéculaire.

Des courbes similaires ont été obtenues pour tous les réseaux utilisés lors des observations à $\Psi = 120^\circ$. Lors des observations à $\Psi = 90^\circ$, les mêmes caractéristiques ont été mesurées, mais la plage de longueur d'onde pour lesquelles l'effet diffractif a été observé était réduite à $\lambda = 400, 450, \dots, 550$ nm.

Enfin, le même type de rayonnement avait été observé lors des expériences à Geel avec des faisceaux d'énergie 20 à 110 MeV. La Figure 1.23 montre les courbes relevées pour $E = 85$ MeV avec les réseaux à 1800 traits/mm en fonction de l'angle d'incidence φ . Les données mesurées brutes (sans filtre) et avec filtre sont données. Notons que dans ce cas l'acceptance angulaire du système de mesure était supérieure à l'ouverture du cône OTR ce qui explique l'observation d'un pic unique à $\varphi = 45^\circ$ [15]. On observe dans ce cas l'émission de trois pics à 550, 500 et 450 nm pour $\varphi = 2.3^\circ, 6^\circ$ et 10° respectivement. Notons aussi que dans ce cas, et contrairement aux observations à faible énergie, le rayonnement de transition dans l'ordre 0 est beaucoup plus intense que le rayonnement dans l'ordre -1.

Plusieurs expériences ont été effectuées pour différentes énergies entre 3 et 13 MeV à Gent et entre 20 et 120 MeV à Geel. Ces expériences ont permis de caractériser la dépendance énergétique du rayonnement de transition diffractif dans cette gamme d'énergie. Pour l'ordre 0, on retrouve une dépendance identique à celle du rayonnement de transition d'une surface plane. La Figure 1.24(a) (cercles pleins) décrit les résultats obtenus à Gent, montrant la dépendance en γ^2 caractéristique du rayonnement de transition dans le domaine relativiste. La Figure 1.24(b) donne les résultats obtenus à Geel. Dans ce cas, le rayonnement détecté est intégré angulairement par le détecteur. La courbe théorique dans les conditions de l'expérience est donnée sur la même figure. A part un point à 30 MeV, la correspondance est très bonne.

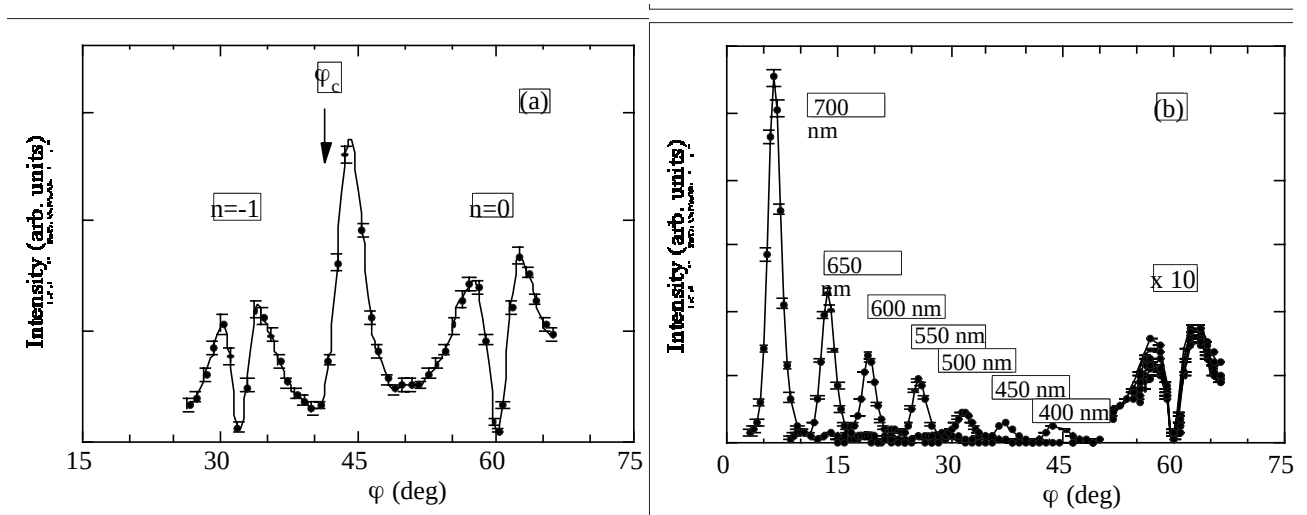


FIGURE 1.22. Rayonnement observé avec un angle de déviation constante $\Psi = 120^\circ$ pour un faisceau d'énergie 5 MeV et le réseau blazé à 12.4° de période 500 nm. (a) : $\lambda = 400$ nm. (b) Superposition des mesures à différentes longueurs d'onde. La contribution de l'ordre 0 dans (b) a été multiplié par un facteur 10.

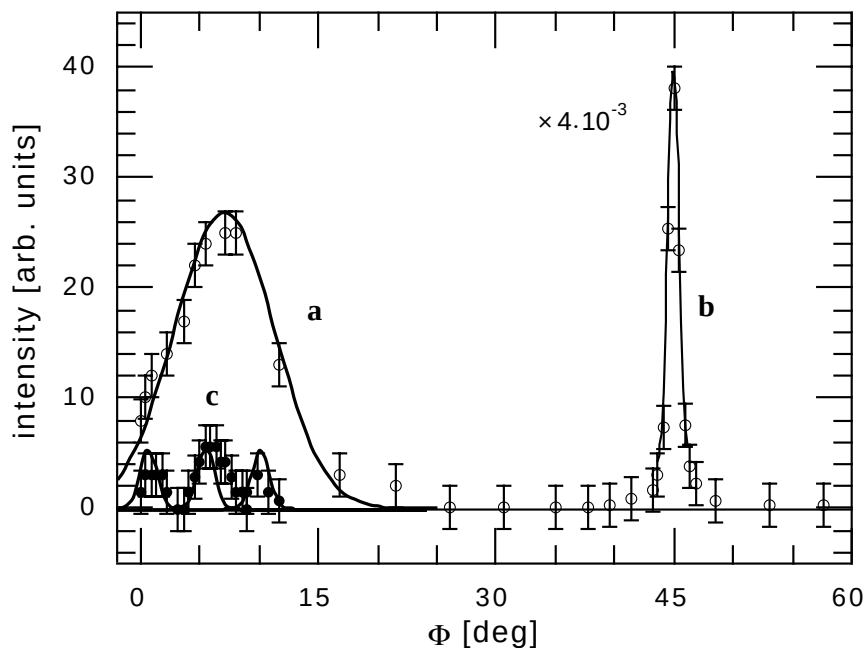


FIGURE 1.23. Emission pour un réseau à 1800 traits/mm en fonction de l'angle d'incidence Φ à 85 MeV. Cercles ouverts : sans filtre. Cercles pleins : à 550, 500, 450 nm (gauche à droite). (a) Courbe pleine : guide pour l'œil. (b) intensité dans l'ordre 0. (c) Courbe pleine : guide pour l'œil

L'étude du rayonnement émis dans l'ordre -1 a montré que le comportement global était similaire à celui du rayonnement Smith-Purcell lorsque l'angle d'incidence du faisceau est faible ($\Phi < 6.5^\circ$ dans les expériences de Geel). La dépendance en énergie a été déterminée en utilisant l'équation (1.37). Le profil du faisceau est déterminé à l'aide du moniteur OTR décrit précédemment, et ajusté à une gaussienne. L'énergie du faisceau est déterminée à l'aide d'un analyseur magnétique et du programme OTR4.0 quand la qualité du faisceau le permettait. Pour tenir compte de l'angle d'incidence fini du faisceau, l'équation (1.37) a été intégrée numériquement selon la longueur du réseau en supposant une trajectoire parallèle par morceau sur une période D du réseau (stepwise parallel). La divergence du faisceau est négligée dans les calculs.

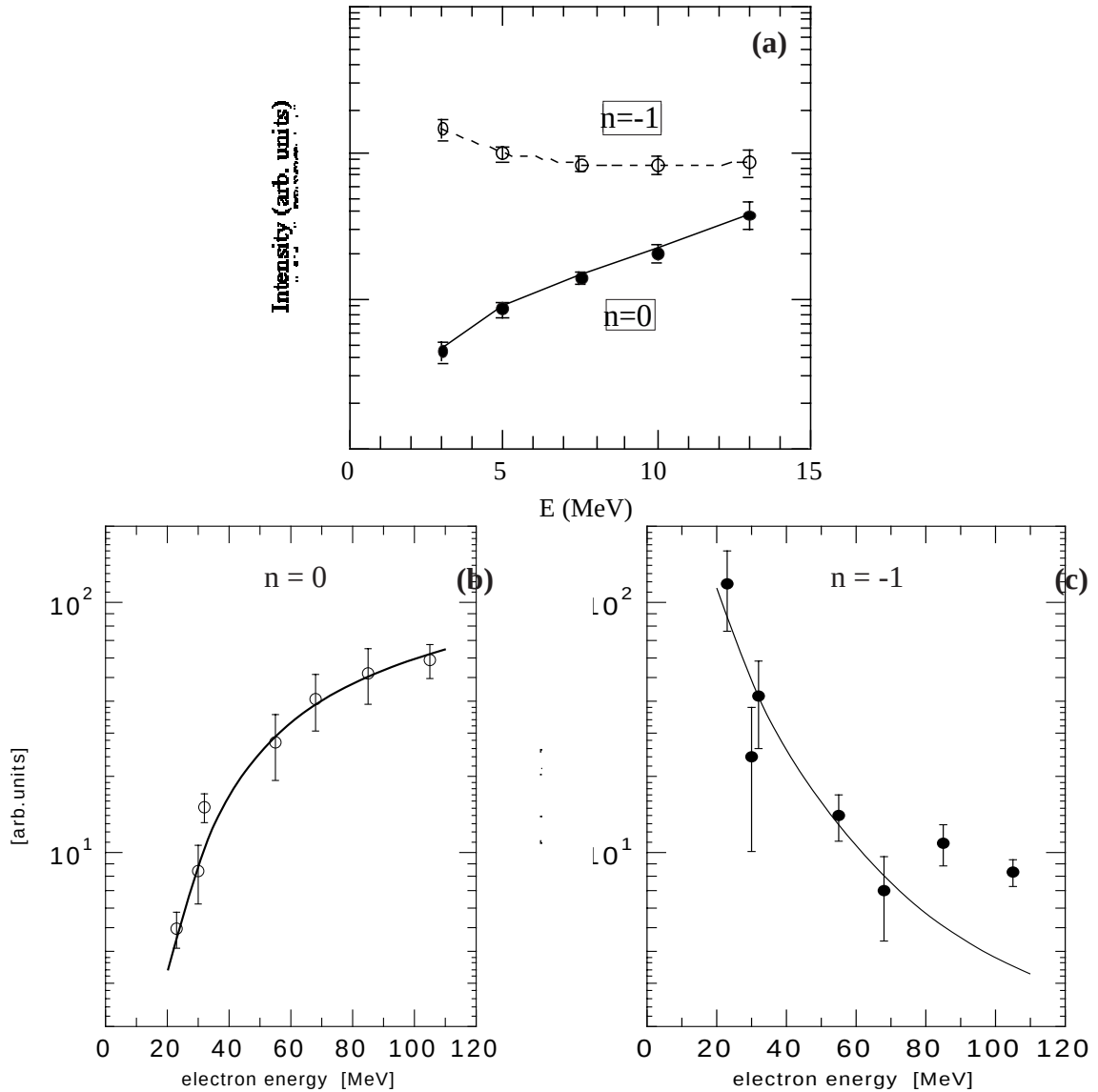


FIGURE 1.24. Dépendance en énergie du rayonnement de transition d'un réseau entre 3 et 120 MeV pour les ordres de diffraction 0 et -1.

La Figure 1.24(c) montre les résultats obtenus pour les deux réseaux SiC à 1800 traits par mm. Les cercles donnent les valeurs du facteur de radiation $|R_{-1}(0, 0)|^2$ dérivées de l'intensité mesurée pour $\Phi < 6^\circ$. La courbe est la dépendance en énergie théorique calculée pour un réseau lamellaire $h/D=0.1$ and $a/D=0.5$ et de période 555.5 nm pour un rayonnement Smith-Purcell pur. Jusqu'à 70 MeV, l'accord obtenu est bon. A plus haute énergie, les différences deviennent notables. On peut sans doute les expliquer par les limitations du modèle utilisé : trajectoire stepwise, divergence angulaire nulle, et surtout hypothèse de conductivité infinie sans aucun doute incorrecte dans le domaine visible.

Les expériences de Gent [48] ont montré que l'intensité observée était à peu près constante dans le domaine d'énergie considéré (3 à 13 MeV). La Figure 1.24(a) (cercles) montre les résultats obtenus pour $\Psi = 90^\circ$ et $\lambda = 550$ nm avec un réseau à 1800 traits/mm pour l'intensité du pic du maximum d'émission. Pour cet angle d'incidence élevé, on ne peut appliquer la même procédure d'analyse que pour les expériences de Geel.

Notons que pour l'ensemble des expériences réalisées de 3 MeV à 120 MeV, aucune variation de la dépendance en énergie du rayonnement détecté en fonction du profil du réseau n'est observable, et ce pour

l'ordre 0 comme pour l'ordre -1. De même, dans le domaine du visible de 400 nm à 700 nm, aucune variation en fonction de la longueur d'onde de la dépendance en énergie du rayonnement détecté n'a été notée.

Pour conclure, on peut dire que les résultats obtenus sont en conformité avec les modèles théoriques du rayonnement de transition pour ce qui est de la dépendance en énergie de l'ordre 0 et l'effet Smith-Purcell pour l'ordre -1 quand il est émis pour un faisceau d'incidence rasante.

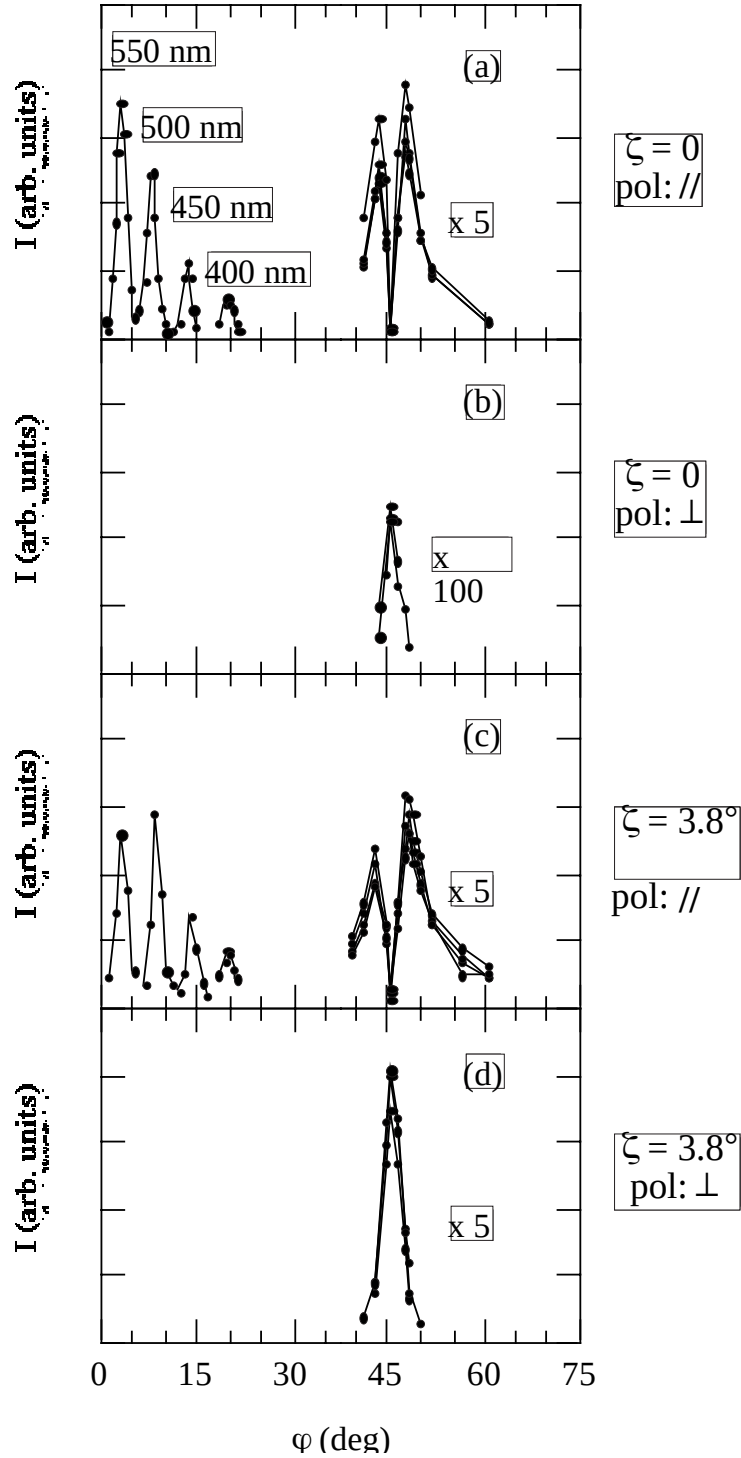


FIGURE 1.25. Polarisation du rayonnement de transition d'un réseau observée pour un faisceau d'énergie 7.5 MeV et les réseaux à 1800 traits/mm. Ordres de diffractions 0 et -1 pour $400 \text{ nm} \leq \lambda \leq 550 \text{ nm}$. Rayonnement est observé dans le plan d'incidence $\zeta = 0^\circ$ et pour $\zeta = 3.8^\circ$ (cf Figures 1.20).

Une autre caractéristique importante du rayonnement est sa polarisation. Pour la caractériser, un polariseur linéaire monté sur support rotatif est installé devant la caméra de détection (Figure 1.21). Le rayonnement est détecté soit dans le plan d'incidence du faisceau d'électrons défini par $\zeta = 0^\circ$, soit pour un angle $\zeta = 3.8^\circ$ ($\approx 1/\gamma$ à 7.5 MeV).

Les Figures 1.25(a) et 1.25(c) montrent les composantes des ordres 0 et -1 observées à 7.5 MeV pour les réseaux de période $D = 555.5$ nm et pour $\zeta = 0^\circ$. On constate que le rayonnement observé est presque complètement polarisé dans le plan d'observation (ou polarisation H : le champ magnétique est parallèle aux traits du réseau, c'est à dire perpendiculaire au plan d'observation). Le rayonnement de transition d'une surface plane présente la même polarisation. C'est aussi le cas du rayonnement Smith-Purcell, mais dans notre expérience, le faisceau arrive avec une incidence élevée ($\phi = 20^\circ$ pour $\lambda = 400$ nm). La faible composante perpendiculaire observée peut sans doute être expliquée par la divergence du faisceau d'électron et l'acceptance du système optique. Les Figures 1.25(b) et 1.25(d) montrent les résultats obtenus pour $\zeta = 3.8^\circ$. La composante parallèle est pratiquement inchangée, aussi bien pour l'ordre 0 que l'ordre -1. Par contre, un pic important apparaît pour l'ordre 0, composante perpendiculaire, alors que pour l'ordre -1, aucun rayonnement n'était détectable dans nos expériences (Figure 1.25(d)).

Dans les expériences à Geel, seul le rayonnement émis pour $\zeta = 0^\circ$ était détectable [15]. Compte-tenu de l'angle d'incidence très faible du faisceau d'électron, on prévoit un rayonnement linéairement polarisé dans le plan d'incidence, comme le rayonnement Smith-Purcell. C'est en effet ce qui est observé à 35, 55, et 97 MeV, comme le montre la Figure 1.26.

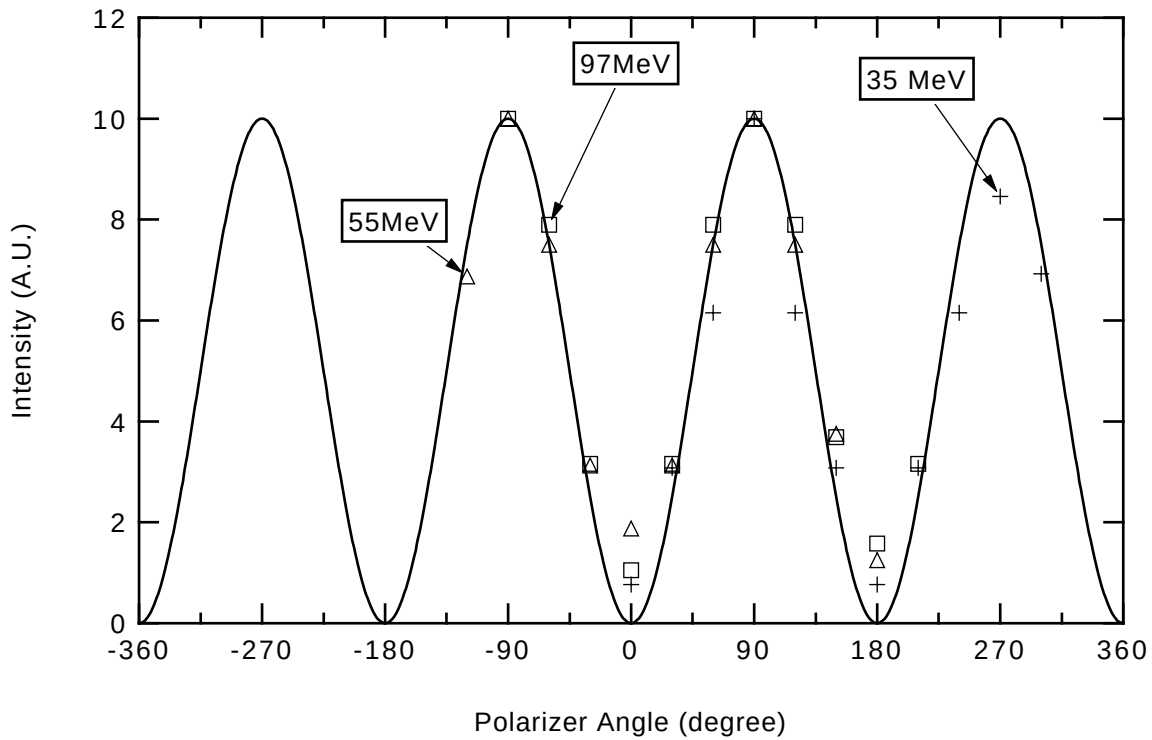


FIGURE 1.26. Polarisation du rayonnement émis par un réseau à 1800 traits/mm pour différentes énergies : (+) 35 MeV, (Δ) 55 MeV et ($\diamond$) 97 MeV

1.4.3 Modèle semi-empirique

La caractérisation qui a été faite du rayonnement de transition d'un réseau, et la connaissance des modèles théoriques disponibles pour le rayonnement de transition et pour l'effet Smith-Purcell permettent de donner un modèle semi-empirique de l'effet étudié. Ce modèle est basé sur les hypothèses suivantes :

Pour l'ordre 0, le rayonnement émis présente les caractéristiques du rayonnement de transition, l'intensité étant pratiquement indépendante du profil du réseau.

Le rayonnement observé loin de la direction de la réflexion spéculaire peut être interprété comme étant l'ordre 0 diffracté par le réseau, selon la relation classique des réseaux :

$$\sin \eta_n = \sin \eta_0 + n \frac{\lambda}{D} \quad (1.124)$$

Quand pour une même longueur d'onde λ un nouvel ordre de diffraction devient propagatif, on observe une anomalie de Wood-Rayleigh, caractérisée par une forte atténuation du rayonnement émis. Dans le cas du montage à déviation constante, on a la relation $\phi = \eta + \theta - \pi/2$, et la position de l'anomalie de Wood-Rayleigh pour laquelle l'ordre 0 devient évanescent (rayonnement de transition émis à incidence rasante dans le cas d'un faisceau arrivant lui-même sous un faible angle d'incidence) est donnée par :

$$\sin \phi_c = 1 - \frac{\lambda}{D} \quad (1.125)$$

La Figure 1.27 illustre la construction des ordres 0 et -1 du rayonnement de transition d'un réseau selon ce modèle semi-empirique, illustrant le rapport existant entre l'apparition de l'ordre 0 propagatif, et l'atténuation observée pour l'ordre -1 (anomalie de Wood-Rayleigh).

Le modèle proposé est basé sur une construction de Huygens pour l'onde diffractée, en se servant de l'analogie connue entre le cas de la diffraction d'une onde plane propagative par un réseau, et celui de la diffraction d'une onde plane évanescente parallèle à la surface du réseau (effet Smith-Purcell).

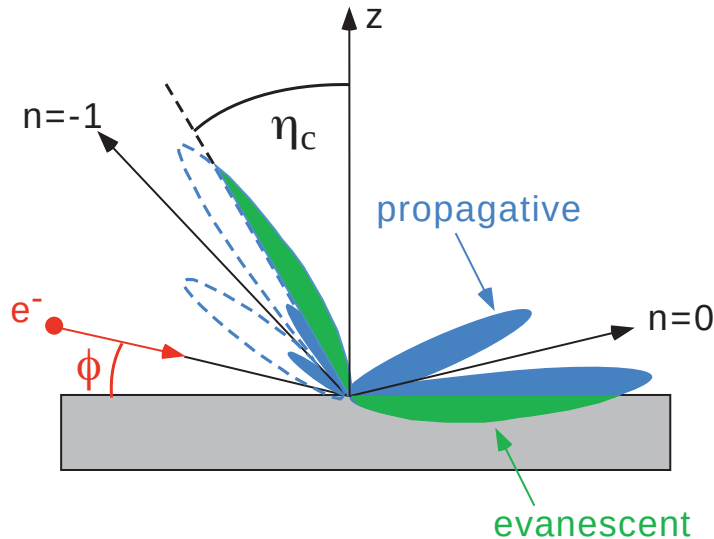


FIGURE 1.27. Modèle semi-empirique de formation du rayonnement de transition d'un réseau.

La Figure 1.28 illustre ce parallèle, et donne la construction dans ce modèle de Huygens des ordres diffractés pour le rayonnement de transition d'un réseau, en établissant le parallèle avec la construction classique des ordres de diffraction dans le cas de la spectroscopie où l'onde incidente est réelle, et le cas déjà étudié du rayonnement Smith-Purcell (onde incidente évanescente se propageant parallèlement à la surface du réseau). Ce modèle prévoit l'observation d'ordres diffractés négatifs et positifs, comme pour le cas de la spectroscopie, mais à l'opposé de l'effet Smith-Purcell pour lequel seuls les ordres négatifs peuvent être propagatifs. Bien évidemment ce modèle ne permet pas de prévoir les amplitudes relatives des différents ordres.

La Figure 1.30 donne le spectre d'émission obtenu avec notre modèle semi-empirique, en mettant arbitrairement un facteur d'atténuation de 90% pour le rayonnement émis au delà de l'angle caractérisant l'anomalie de Wood. On considère un électron d'énergie 5 MeV et un montage à déviation constante $\Psi = 120^\circ$. Les spectres obtenus sont à comparer avec ceux présentés par la Figure 1.29 qui montre les spectres mesurés à Gent avec un réseau blazé à 12.4° et un faisceau de 5 MeV. Il en résulte que notre modèle semi empirique de construction de Huygens tenant compte des anomalies de Wood décrit très bien, malgré ses limitations, la forme générale du spectre d'émission, et en particulier la position du pic d'émission correspondant à l'anomalie. Cela montre que si le développement d'un modèle rigoureux est nécessaire pour décrire correctement l'interaction électron-réseau, de nombreuses propriétés sont déjà accessibles à l'aide de notre modèle semi-empirique.

Le lecteur intéressé trouvera dans la thèse de Pascal Henri, que j'ai supervisée durant mon second séjour à l'IRMM, une étude expérimentale détaillée du rayonnement GTR, portant sur la dépendance en énergie, l'influence du profil du réseau, et la géométrie de détection [48].

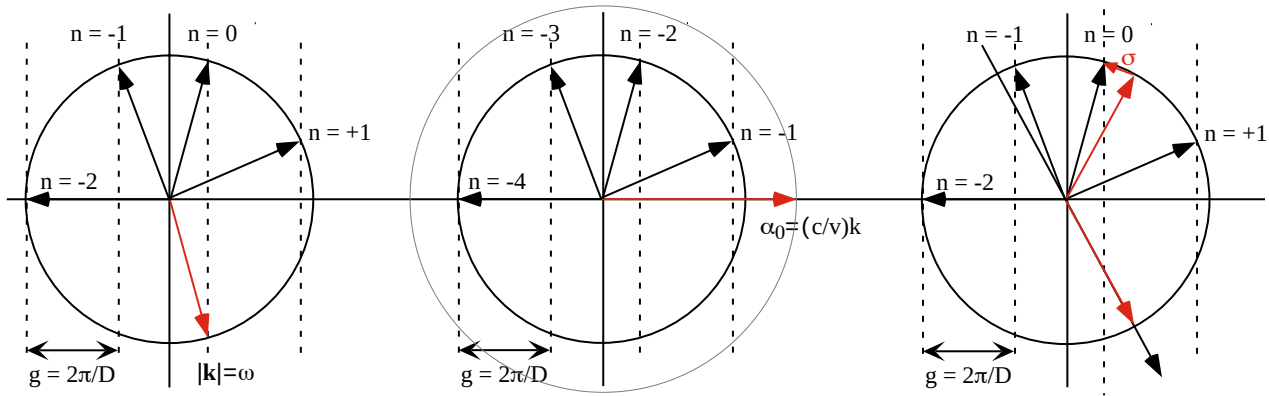


FIGURE 1.28. Construction de Huygens des ordres diffractés pour les cas de diffraction par un réseau (a) d'une onde plane propagative, (b) d'une onde plane évanescente parallèle au réseau (Rayonnement Smith-Purcell), (c) d'une distribution autour de la direction de réflexion spéculaire d'ondes planes : rayonnement de transition d'un réseau.

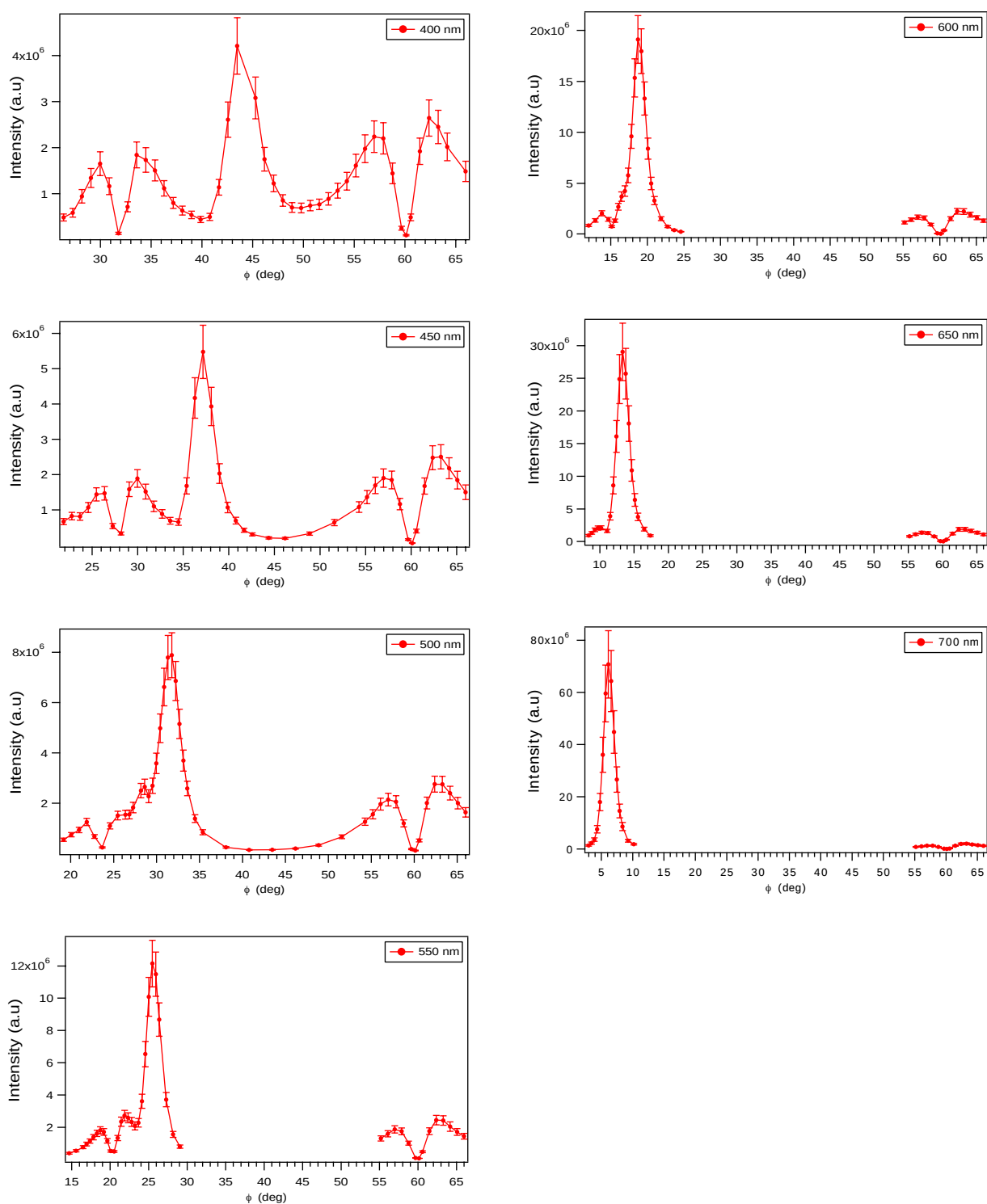


FIGURE 1.29. Spectres d'émission GTR observés dans l'ordre -1 et l'ordre 0 (réflexion spéculaire) de 500 nm à 700 nm par intervalle de 50 nm pour un réseau blazé à 12.4° . Détection par montage à déviation constante avec $\Psi = 120^\circ$. Energie du faisceau d'électron de 5 MeV. On observe une augmentation progressive de l'intensité de l'ordre -1 par rapport à l'ordre 0.

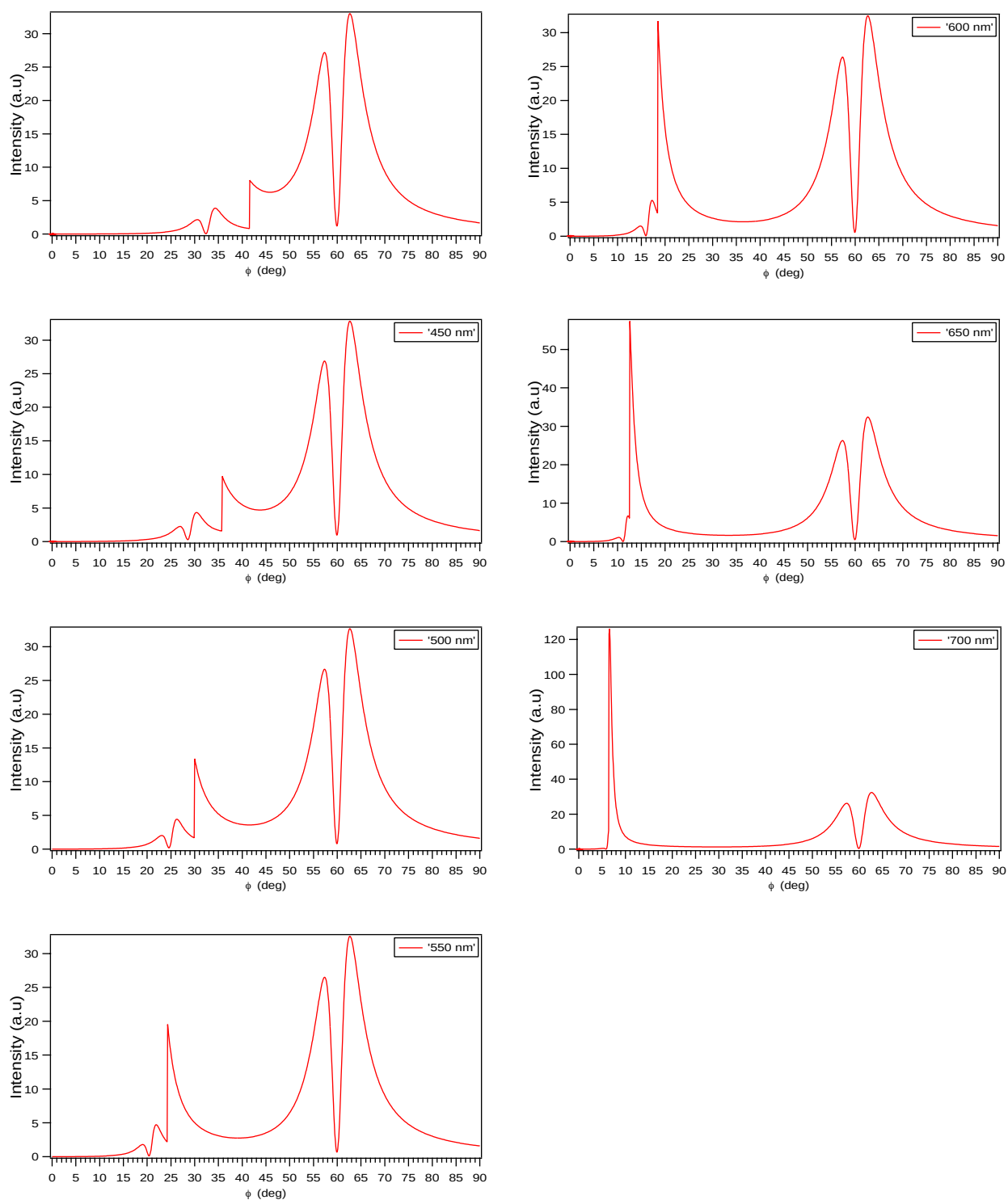


FIGURE 1.30. Construction du spectre d'émission du rayonnement de transition d'un réseau selon notre modèle semi-empirique : à comparer à la Figure 1.22(a) et la Figure 1.29. L'ordre -1 est obtenu par une construction de Huygens par rapport au rayonnement de transition classique. Un coefficient d'atténuation de 90% est appliqué lorsque l'ordre -1 devient propagatif (anomalie de Wood-Rayleigh, voir Figure 1.27 et Figure 1.28).

1.5 Microscope à Rayonnement de Transition

Nous avons vu que le rayonnement de transition pouvait donc être utilisé pour faire du diagnostic de faisceau de particules chargées, pour mesurer la taille du faisceau en focalisant le système de détection sur un radiateur de géométrie connue (plane). De même, en focalisant la détection à l'infini, on mesure l'énergie et la divergence du faisceau incident. C'est là l'utilisation principale de cet effet, avec la détection de particule chargée, similairement au détecteurs Cherenkov.

Une propriété très intéressante du rayonnement de transition est que les photons sont émis à l'endroit exact où la particule chargée frappe le radiateur. Cette propriété, longtemps débattue, a été récemment démontrée de manière rigoureuse [61].

On peut alors proposer l'application "inverse", à savoir envoyer un faisceau de particules d'énergie et de dimensions spatiales (très petites par rapport à la résolution optique) connues sur une cible à caractériser à l'aide d'un dispositif de détection. On peut alors espérer obtenir une image de la cible obtenue dans la partie visible du spectre, en champ lointain, de résolution bien meilleure qu'en microscopie optique classique, limitée par le critère d'Abbe.

L'expérience a été faite par Naoki Yamamoto et ses collègues [62][63]. En utilisant le faisceau d'électrons très fin (50 nm) délivré par un microscope électronique à balayage avec une détection optique, ils ont obtenu une résolution de l'ordre de 100 nm, soit environ la moitié du critère d'Abbe pour un microscope optique opérant dans le visible. La Figure 1.31 donne le principe d'un tel microscope.

Ce travail portait sur la physique des surfaces et interfaces. Son extension à la biologie restera cependant très sévèrement limitée par des contraintes rebutantes : la nécessité d'opérer dans le vide et les problèmes de charge du spécimen interdisent de travailler sur des spécimens vivants. De plus, le rayonnement de transition étant par nature un effet de surface, les analyses 3D ne sont pas possibles. Les limitations sont en fait les mêmes que celles de la microscopie électronique à balayage.

Nous retrouverons aux Chapitre II et Chapitre III, consacrés à la microscopie optique et à ses améliorations matérielles et logicielles, le principe sous-tendant l'amélioration de la résolution dans ce type de microscope, à savoir que la limite dans un microscope optique à balayage n'est pas imposée par l'optique de détection, mais par le plus petit volume dans lequel on provoque l'émission lumineuse. L'ensemble des travaux actuels visant à améliorer la résolution en microscopie optique se basent en effet sur la maîtrise des phénomènes d'émission photonique dans le spécimen.

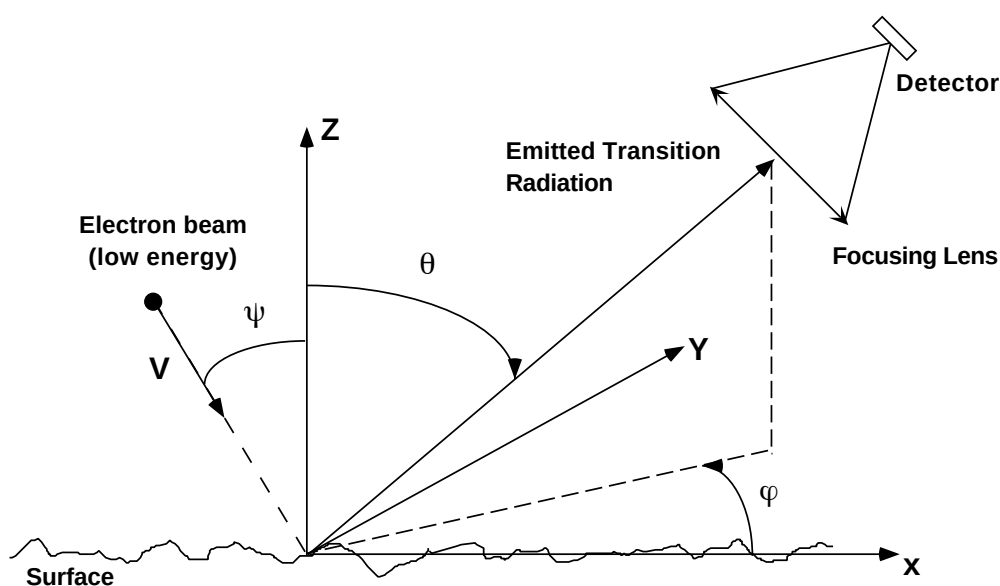


FIGURE 1.31. Principe du microscope à rayonnement de transition.

1.6 Conclusion

L'étude des phénomènes physiques assez fondamentaux décrits dans cette partie m'a amené à aborder des domaines très divers tels l'électromagnétisme, l'optique ou la physique des accélérateurs, avec aussi une composante appliquée à travers la technologie des accélérateurs de particules et leur instrumentation pour le diagnostic de faisceau ou la conception et la réalisation d'expériences de physique des rayonnements. J'ai ainsi pu acquérir une culture scientifique et technique large et solide.

En particulier il faut souligner que les avancées proposées dans le domaine du diagnostic du faisceau ou dans la construction de nouvelles sources photoniques n'ont été possibles qu'à partir d'une connaissance approfondie des phénomènes en jeux et de l'état de l'art des techniques déjà utilisées.

De nombreuses idées sont apparues, certaines ayant été déjà traitées, comme la généralisation à l'incidence oblique du rayonnement Smith-Purcell, ou le développement d'un modèle du rayonnement de transition pour des interfaces de profil quelconque. D'autres sont pour l'instant restées en suspens, je pense en particulier à :

- l'extension du modèle de l'effet Smith-Purcell au cas des surfaces métalliques et diélectriques,

- la généralisation du modèle intégral du rayonnement de transition (3D et surfaces métalliques ou diélectriques),

- l'amélioration du système de diagnostic de faisceau déjà installé au cas des faisceaux de faible émittance, par l'utilisation d'un interféromètre de Wartski.

J'ai pu engager des collaborations avec plusieurs collègues, tels Wim Mondelaers de l'Université de Gent, Norbert Maene du Vlaamse Instituut for Technologish Onderzoek, Yoshitake Takakura du Laboratoire des Systèmes Photoniques de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, et plus récemment avec Floreat Scarlat, de l'Institut de Physique Nucléaire de Bucarest en Roumanie, collaborations fructueuses qui ont vu la publication d'articles en commun. Enfin, lors de mon séjour au Japon en 2002, j'ai pu reprendre ces travaux en collaboration avec le groupe du Pr Kazuo Ohtaka de l'Université de Chiba, et comparer l'efficacité des réseaux de diffraction avec celle des cristaux photoniques, un domaine très prometteur en optique.

J'ai ainsi eu l'occasion de travailler dans une ambiance multi-culturelle très motivante, et de rencontrer des collègues de tous pays, montrant que l'internationale des sciences est une réalité pour qui veut bien ouvrir son esprit.

J'ai eu en charge à plusieurs reprises le suivi du travail d'étudiants du Hoger Instituut der Kempen (Geel-Belgique) en informatique, de l'Ecole Nationale Supérieure de Physique de Strasbourg en physique appliquée et en informatique. Enfin, j'ai effectué l'encadrement d'un étudiant de l'Université Louis Pasteur (ENSPS) effectuant sa thèse à l'IRMM (thèse soutenue en Décembre 99).

Ces travaux ont donné lieu à plusieurs publications écrites et orales ainsi qu'à des présentations par posters et lors de séminaires invités. Ils ont fait l'objet de plusieurs rapports d'activités, et ont donné naissance à deux programmes d'analyse et de suivi de faisceaux de particules chargées, basés sur le rayonnement de transition.

Notons enfin que ces travaux, qui ont été abandonnés en Europe (à l'exception du groupe de physique nucléaire de l'Université de Mainz), ont donné lieu au développement d'une source infra-rouges lointains-ondes terahertz basée sur l'effet Smith-Purcell (voir reproduction de l'article de Laser Focus World) par la société Vermont Photonics (USA) qui travaille en collaboration avec le Dartmouth College (groupe de feu John Walsh et de Keith Woods)...

Journaux à comité de lecture :

“Photonic crystals versus diffraction gratings in Smith-Purcell radiation”

S. Yamaguti, J. Inoue, **O. Haeberlé** and K. Ohtaka, Phys. Rev. B **66**, 195202 (2002)

“Integral method to study transition radiation from surfaces with arbitrary profile”

Y. Takakura and **O. Haeberlé**, Physical Review E **61**, p. 6214 (2000)

“Grating Transition radiation - a source of quasi-monochromatic radiation”

P. Henri, **O. Haeberlé et al.**, Physical Review E **60**, p. 6214 (1999)

“Reciprocity theorem for Smith-Purcell radiation”

O. Haeberlé, Optics Communications **141**, p. 237 (1997)

“Smith-Purcell radiation from electrons moving parallel to a grating at oblique incidence to the rulings”

O. Haeberlé et al., Physical Review E **55**, p. 4675 (1997)

“Calculations of Smith-Purcell radiation generated by electrons of 1-100 MeV”

O. Haeberlé et al., Physical Review E **49**, p. 3340 (1994)

Conférences avec actes :

“The Improved Point Matching Method for triangular metal gratings”

F. Scarlat, M. Facina, C.D. Dinca, V. Manu, A. Karabarbounis, E. Stiliaris, J. Papadakis, Ch. Trikalinos and **O. Haeberlé**, Proceedings of Radiation by Relativistic Electrons in Periodic Structures 4th International Symposium RREPS-99, Lake Baikal (Russia), September 13-16, 1999, in Nucl. Instr. Methods B (2001)

“Grating transition radiation: a new source of monochromatic light using relativistic electrons”

P. Rullhusen, P. Henri, **O. Haeberlé**, N. Maene and W. Mondelaers 12th Intl. Conf. on High-Power Particle Beams, BEAM98 Haifa (Israël), June 7-12, 1998 XXXX

Conférences sans actes :

“Radiation produced by electrons interacting with flat and modulated surfaces”

P. rullhusen, **O. Haeberlé**, P. Henri, W. Mondelaers and N. Maene, First workshop on X-rays from electron beams, Rossendorf (Germany), February 24-26, 2000

“The Point Matching Method for triangular metal gratings”

F. Scarlat, M. Facina, C.D. Dinca, V. Manu, A. Karabarbounis, E. Stiliaris, J. Papadakis, Ch. Trikalinos and **O. Haeberlé**, Radiation by Relativistic Electrons in Periodic Structures 4th International Symposium RREPS-99, Lake Baikal (Russia), September 13-16, 1999

“Transition Radiation from a Grating”

O. Haeberlé, P. Henri, P. Rullhusen, N. Maene and W. Mondelaers 3rd International Workshop on Radiation Physics at Electron Accelerators, 198. WE-Heraeus-Seminar, Tabarz (Germany), June 9-12, 1998

“Experiments on Smith-Purcell radiation using 20-100 MeV electrons”

P. Rullhusen, **O. Haeberlé** and N. Maene 2nd International Workshop on Radiation Physics at Electron Accelerators, 146. WE-Heraeus-Seminar, Bad Honnef (Germany), June 21-23, 1995

Posters :

“Grating transition radiation: a new source of monochromatic light using relativistic electrons”

P. Rullhusen, **O. Haeberlé**, P. Henri, N. Maene and W. Mondelaers 12th Intl. Conf. on High-Power Particle Beams, BEAM98 Haifa (Israël), June 7-12, 1998

“The reciprocity property: a test for the diffraction theory of the Smith-Purcell effect”

O. Haeberlé, Radiation by Relativistic Electrons in Periodic Structures 3rd International Symposium RREPS-97, Tomsk (Russia), September 8-12, 1997

Séminaires invités :

“Smith-Purcell, Transition Radiation and grating Transition Radiation”

Center for Frontier Science, Chiba University, Chiba (Japan), 26. April 2002

“An integral method to study transition radiation from surfaces with arbitrary profile: application to transition radiation from a grating”

Research Institute for Scientific Measurements, Tohoku University, Sendai (Japan), 18. April 2000 (à l’invitation de la Japanese Society for Infrared Spectroscopy)

“Quasi-monochromatic electromagnetic emission by electrons interacting with a grating: Smith-Purcell and grating transition radiation”

Institute for Nuclear Physics, University of Mainz, Mainz (Germany), 19. July 1999

“Transition radiation from a grating: a new source of monochromatic radiation”

Japan Aviation Electronics Topical Meeting 99, Tokyo (Japan), 5. April 1999

“Electromagnetic radiation emitted by electrons interacting with a grating: Smith-Purcell and grating transition radiation”

Research Institute for Scientific Measurements, Tohoku University, Sendai (Japan), 8. April 1999 (à l’invitation de la Japanese Society for Infrared Spectroscopy)

“Etude du rayonnement électromagnétique émis par un électron en interaction avec une surface diffractive”

Séminaire CEA, Service de Physique et Techniques Nucléaires, Bruyères-Le-Chatel (France), 9 Janvier 1995.

“Smith-Purcell radiation generated by relativistic electrons interacting with a diffraction grating”

Optical Science Center, University of Arizona, Tucson (USA), 13. May 1993

Rapports d’activités :

“Radiation Physics”

Annual Progress Reports on Nuclear Data 1992-93-94-98, Joint Research Center, Bruxelles, European Union , Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, JRC-EU

“Etude théorique du rayonnement Smith-Purcell produit par des électrons relativistes”

Rapport d’études pour le Ministère des Affaires Etrangères et de la Coopération, 1993 (Diffusion Restreinte)

Programmes informatiques :

“OTR4.0” G. de Roost, S. Schaeffer, **O. Haeberlé** and P. Rullusen

Programme d’analyse (taille, divergence, énergie) de faisceaux relativistes d’électrons basé sur le rayonnement de transition optique (disponible sur demande).

“BeamTracker”, **O. Haeberlé**, P. Henri and P. Rullhusen

programme de suivi de position de faisceaux relativistes d’électrons basé sur le rayonnement de transition optique (disponible sur demande).

Participation à des jury de thèse :

“Grating Transition Radiation : electromagnetic radiation generated by electrons crossing a diffraction grating” Pascal Henri, Université Louis Pasteur, Strasbourg (1999)

Tunable terahertz source targets molecular vibrations

Kathy Kincade

Terahertz technology originally developed at Dartmouth College (Hanover, NH) nearly two decades ago may have finally found its niche—studying proteins and other large molecules with resonances in the terahertz frequency range (see "Old electron microscope generates infrared light," *Laser Focus World*, October 1998). Licensed to Vermont Photonics (Brattleboro, VT) in 1988, the tunable terahertz-source technology originally devised by Dartmouth physics professor John Walsh has undergone several refinements and improvements, yielding a compact spectroscopic tool, which its developers believe offers some unique capabilities, particularly for molecular biology and proteomics research.

"What we are doing is like a tabletop free-electron laser (FEL) or a nanoklystron that generates a free-space photon field directly," said Mike Mross, president of Vermont Photonics. "With narrow bandwidth, tunability over 0.3 to 3.0 THz, and a 'desktop' footprint, our source offers possibilities for imaging and spectroscopy that are not available using synchrotrons, wiggler FELs, or pulsed terahertz systems."



A tunable terahertz source produces radiation between 1000 and 100 μm (0.3 to 3.0 THz), with continuous-wave power in the microwatt range and bandwidth around 1 cm^{-1} . The system is commonly used with helium-cooled silicon bolometers yielding a signal-to-noise ratio of better than 1000:1.

The original technology licensed from Dartmouth involved a modified scanning-electron microscope (SEM) that yielded far-infrared energy by passing an electron beam over a metal grating, with the electrons being produced by a set of SEM optics. Even then, the wavelength of the source could be tuned from 200 to more than 1000 μm (1.5 to 0.3 THz) with output powers of about a nanowatt. Today the system retains few of its SEM roots, but the underlying configuration is the same: a compact, continuous-wave, narrowband Smith-Purcell tunable terahertz source that now produces several microwatts of power at a bandwidth of around 20 μm with a signal-to-noise ratio of better than 1000:1. Tunability is achieved by adjusting the geometry of the resonance structure or by changing the voltage of the electron beam.

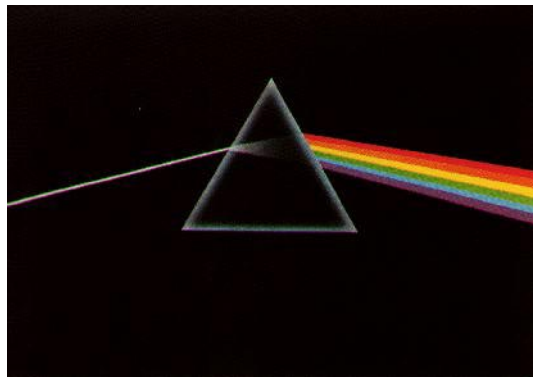
"Continuous-wave powers are in excess of 1 mW and are emitted over a small solid angle from a source area of about 1 mm^2 ," said Thomas Lowell, vice president of Vermont Photonics. "This means that at 400 μm , for example, the source brightness is more than 100 times greater than a mercury arc lamp and about 10 times more than a typical synchrotron source."

Mross and Lowell see multiple molecular research applications for this technology in spectroscopy, imaging, and detection of DNA hybridization states and protein ligand binding states. Research has shown that nanoscale clusters of water molecules support terahertz vibrations and certain organic molecules show strong absorption and dispersion due to rotational and vibrational transitions that are specific to the molecule, thus enabling terahertz fingerprinting. Other potential applications include protein identification for drug discovery, with the terahertz system offering a more-efficient approach to tagging biomarkers.

"It appears that proteins have unique signatures around 1 THz, and researchers are starting to realize that molecules like protein and DNA can resonantly vibrate at frequencies in this range and that those vibrations may actually have something to do with molecular structure and function," Mross said. "While broadband terahertz sources are very good for identifying some protein resonances, you then might want to go in and pump or 'jiggle' these resonances to see how they respond, which is something broadband terahertz cannot do."

Vermont Photonics currently operates two experimental continuous-wave Smith-Purcell tunable terahertz sources at its laboratory. The company is hoping to collaborate with other researchers to begin designing some simple experiments that will demonstrate the utility of this technology for nanoscale research and subcellular function.

Laser Focus World May, 2003



Pink Floyd "Dark Side of the Moon"
Cherchez l'erreur....

REFERENCES

- [1] I.M. Frank, Izv. Akad. Nauk. SSSR Ser. Fiz. **6**, 3 (1942) (*in Russian*)
- [2] S.J. Smith and E.M. Purcell, Phys. Rev. **92**, 1069 (1953)
- [3] W.W. Salisbury, U.S. Patent 2 634 732 filed October 26, 1949 issued April 7, 1953
- [4] W.W. Salisbury, J. Opt. Soc. Am. **52**, 1315 (1962)
- [5] K.Ishiguro and T.Tako, Optica Acta G.B. **8**, 25 (1961)
- [6] J.A. Bradshaw, Proc. Symp. Mil. Waves 8, Brooklyn, N.Y. Polytechnic Press p 223, 1959
- [7] W.W. Salisbury, J. Opt. Soc. Am. **60**, 1279 (1970)
- [8] G. Toraldo Di Francia, Nuovo Cimento **16**, 61 (1960)
- [9] I.E. Tamm and I.M. Frank, Dokl. Akad. Nauk. **14**, 107 (1937)
- [10] I.E. Frank and V.L. Ginzburg, J. Phys. USSR **9**, 353 (1945)
- [11] B.M. Bolotovskii and G.V. Voskresenskii, Sov. Phys. Usp. **9**, 73 (1966)
- [12] P.M. Van den Berg, J. Opt. Soc. Am. **63**, 689 (1973)
- [13] P.M. Van den Berg, J. Opt. Soc. Am. **63**, 1588 (1973)
- [14] P.M. Van den Berg, J. Opt. Soc. Am. **64**, 325 (1974)
- [15] O. Haeberlé, Thèse de Doctorat, *Electromagnetic radiation generated by relativistic electrons interacting with a diffraction grating*, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France (1994)
- [16] K. Woods, PhD, *Smith-Purcell radiation from relativistic electrons: experiment and theory*, Dartmouth College, Hanover, N.H., USA (1995)
- [17] G. Kube, Doktor der Naturwissenschaften Dissertation, *Untersuchung von Smith-Purcell-Strahlung im optischen Spektralbereich mit einem 855 MeV Elektronenstrahl geringer Emittanz*, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, Deutschland (1998)
- [18] O. Haeberlé *et al.*, Phys. Rev. E **49**, 3340 (1994)
- [19] O. Haeberlé *et al.*, Phys. Rev. E **55**, 4675 (1997)
- [20] O. Haeberlé *et al.*, Opt. Comm. **141**, 237 (1997)
- [21] F. Scarlat *et al.*, Nucl. Instrum. Methods B **173**, p. 93 (2001)
- [22] *Electromagnetic Theory of Gratings*, edited by R. Petit (Springer-Verlag, Berlin, 1980)
- [23] M.J. Moran, Phys. Rev. Lett. **69**, 2523 (1992)
- [24] E. Yablonovitch, Phys. Rev. Lett. **58**, 2059 (1987)
- [25] S. Yamaguti, J. Inoue, O. Haeberlé, and K. Ohtaka, Phys. Rev. B **66**, 195202 (2002)
- [26] K. Ohtaka, Phys. Rev. B **19**, 5057 (1979)
- [27] K. Ohtaka, J. Phys. C **13**, 667 (1980)

-
- [28] N. Stefanou, V. Karathanos, and A. Modinos, J. Phys.: Condens. Matter **4**, 7389 (1992)
- [29] V. Yannopapas, A. Modinos, and N. Stefanou, Phys. Rev. **B 60**, 5359 (1999)
- [30] A. Modinos, N. Stefanou, and V. Yannopapas, Opt. Express **8**, 197 (2001)
- [31] K. Ohtaka and Y. Tanabe, J. Phys. Soc. Jpn. **65**, 2276 (1996)
- [32] J.E. Lilienfeld, Phys. Z. **20**, 280 (1919)
- [33] I.M. Frank and V.L. Ginzburg, J. Phys. USSR **9**, 353 (1945)
- [34] L. Wartski, Thèse d'Etat, "Etude du rayonnement de transition", Université Paris-Sud (1976)
- [35] L. Wartski *et al.*, IEEE Trans. Nucl. Sci. **NS20**, 544 (1973)
- [36] L. Wartski *et al.*, J. Appl. Phys. **46**, 3644 (1975)
- [37] M.A. Piestrup *et al.*, SPIE **773**, 37 (1987)
- [38] U. Happek *et al.*, Phys. Rev. Lett. **67**, 2962 (1991)
- [39] Y. Shibata *et al.*, Phys. Rev. E **49**, 785 (1994)
- [40] R. A. Bagiyany and T.M. Ter-Mikaelyan, Sov. Phys. JETP **54**, 666 (1981)
- [41] V.E. Pafomov, Proc. Lebedev Inst. of Physics **44**, 25 (D.V. Skobel'tsyn Ed., Consultants Bureau, New-York, 1971)
- [42] M.L. Ter-Mikaelian, *High energy electromagnetic processes in condensed media* (J. Wiley & Sons Ed., New-York, 1972)
- [43] C. Couillaud, Rapport CEA (citation?)
- [44] P. Lorrain and D. Corson, *Electromagnetic Fields and Waves* (W.H. Freeman, 1970)
- [45] L.D. Landau and E.M. Lifshitz, *Course of Theoretical Physics*, Vol. 8, *Electrodynamics of Continuous Media* (Pergamon Press, 1960)
- [46] V.L. Ginzburg and V.N. Tsytovich, *Transition radiation and transition scattering* (Adam Higen Ed., Bristol & New York, 1990)
- [47] P. Rullhusen *et al.*, *Novel Radiation Sources using Relativistic Electrons* (World Scientific, 1998)
- [48] P. Henri, Thèse de Doctorat, *Grating Transition Radiation*, Université Louis Pasteur (1999)
- [49] J. van Bladel, *Electromagnetic Fields* (McGraw-Hill, New York, 1964)
- [50] P.M. Morse and H. Fehbach, *Methods of Theoretical Physics* (McGraw-Hill, 1953)
- [51] J.J. Stein, Opt. Comm. **2**, 170 (1970)
- [52] L. Schwartz, *Mathematics for Physical Sciences* (Addison-Wesley, London, 1967)
- [53] N. Nio-Vesperinas and N. Garcia, Optica Acta **28**, 1651 (1981)
- [54] J.A. Kong, *Electromagnetic Wave Theory* (John Wiley & Sons Ed., 1986)
- [55] Y. Takakura and O. Haeberlé, Phys. Rev. E **61**, p. 6214 (2000)
- [56] D.W. Rule and R.B. Fiorito, AIP Conf. Proc. **319**, 21 (1994)
- [57] S.Schaeffer, Internal report, GE/LI/1, Nov. 1992 IRMM, Retieseweg, B-2440 Geel
- [58] G. de Roost, dissertation Hoger Instituut der Kempen (HIK) (1993), B-2440 Geel (*in Dutch*)
- [59] N. Ooms, dissertation Hoger Instituut der Kempen (HIK) (1994) B-2440 Geel (*in Dutch*)
- [60] P. Henri, O. Haeberlé *et al.*, Phys. Rev. E **60**, p. 6214 (1999)
- [61] X. Artru, R. Chehab, K. Honkavaara and A. Vaiola, Nucl. Instr. Meth. B **145**, p. 160 (1998)
- [62] N. Yamamoto and A. Toda, Scanning Microsc. **9**, p. 669 (1995)
- [63] N. Yamamoto, A. Toda and K. Araya, J. Electron Microsc. **45**, p. 64 (1996)
-

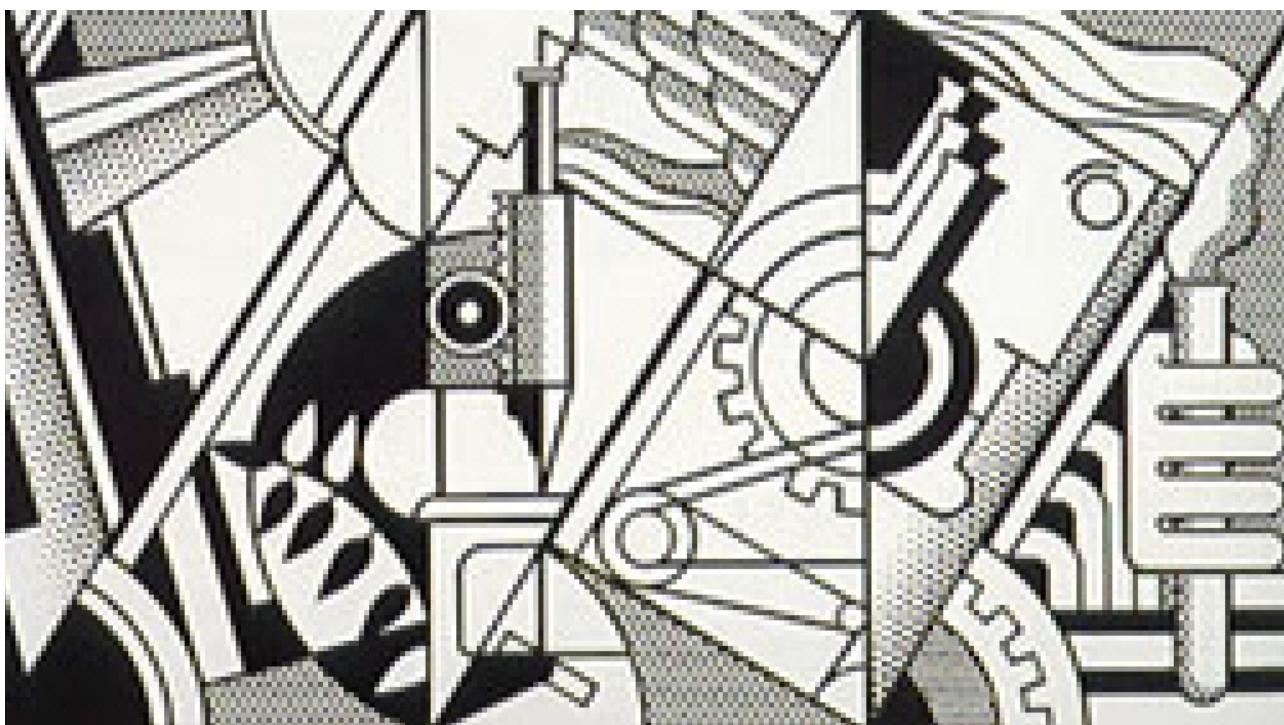
CHAPITRE II VOIR DE PLUS EN PLUS PETIT...

“Bien que tout ceci soit de l’aberration, il y a de la méthode là-dedans”

Polonius, Hamlet, Acte II Scène II

“... nous nous trouvons donc dans la situation d'un homme qui ne pourrait considérer un objet qui l'intéresse qu'à travers des verres de lunettes dont il ignorerait absolument les propriétés optiques.”

Max Planck



Roy Lichtenstein “Peace through Chemistry”

2.1 Introduction

2.1.1 Un peu d'histoire

L'utilisation d'une lentille pour améliorer la vision est très ancienne. Ainsi Pline l'Ancien écrivait : *“Les émeraudes sont habituellement concaves de telle sorte qu'elles peuvent concentrer les rayons lumineux. L'Empereur Néron regardait les combats de gladiateurs à travers une émeraude”*.

Curieusement, il faudra attendre le XIII^{ème} siècle pour voir apparaître les lunettes. On attribue généralement leur invention à un dénommé Amati. Apparues vers 1280-1285 à Florence en Italie, les lunettes seront adoptées très rapidement à travers toute l'Europe. Associer deux lentilles pour augmenter le pouvoir grossissant fut alors une chose naturelle. Le microscope aurait été inventé par Zacharias Jansen, qui vivait à Middleburg en Hollande vers 1595. L'invention de Jansen se propagea très vite à travers l'Europe et en quelques années de nombreux artisans se lancèrent dans la fabrication de microscopes. Pourtant, mis à part certains érudits, tel Galilée, le microscope était plutôt perçu comme un divertissement et non comme un instrument scientifique.

En 1665, la parution de l'ouvrage *Micrographia*, par Robert Hooke attira l'attention sur cet instrument en tant qu'outil pour la recherche scientifique. A partir de cette date, les progrès s'accélérent de façon notable. Au XVIII^{ème} siècle, de nombreuses améliorations sont apportées au microscope qui prend une forme presque définitive. Toutefois, la médiocre qualité des lentilles limitait sévèrement le pouvoir de résolution des microscopes de l'époque. Mais au XIX^{ème} siècle, les progrès de l'optique permirent d'améliorer considérablement les objectifs et oculaires. Vers 1880, des détails aussi petits que 0,2 μm sont enfin accessibles. Sauf cas particulier, les microscopes optiques modernes courants ne font guère mieux.

Les développements ne se sont pourtant pas arrêtés, et chaque année voit de nouveaux progrès s'accomplir. Diverses techniques pour voir des détails encore plus fins ont été mises au point. Certaines concernent l'instrument lui-même, d'autres visent à améliorer a posteriori les résultats de l'observation et seront traités dans le chapitre suivant.

Dans ce chapitre seront décrits les instruments les plus couramment utilisés en microscopie de fluorescence, à savoir le microscope optique, le microscope confocal, et le microscope biphoton. Ces instruments sont à la base des instruments optiques (quoique de plus en plus l'électronique et l'informatique subliment leurs performances), et par là-même les limites de ces instruments sont déterminées par les propriétés physiques des processus de formation d'images, et donc par les phénomènes de diffraction. On retrouve donc dans la description mathématique de ces instruments, d'une part les phénomènes de base de l'optique géométrique (notion de grandissement), et l'optique diffractive d'autre part (tache de diffraction, pouvoir de résolution). Dans cette étude nous nous focaliserons principalement sur la microscopie de fluorescence. Néanmoins, une très grande partie des résultats exposés s'étend aux autres types de microscopie. Nous donnerons donc tout d'abord une description physique de l'instrument, ainsi qu'un rappel sur le principe de la fluorescence permettant la formation des images.

Ensuite, les propriétés d'imagerie du microscope conventionnel seront étudiées à l'aide des théories optiques de la diffraction. Ceci permettra la compréhension de deux évolutions du microscope de fluorescence : le microscope confocal et le microscope multi-photon.

Enfin, certaines solutions nouvelles sont proposées pour encore améliorer la résolution de l'instrument.

2.1.2 Constitution d'un microscope de fluorescence

Depuis son invention, le microscope optique a montré son intérêt dans des champs d'applications aussi variés que la biologie, la physique des matériaux, le contrôle non-destructif, par exemple dans l'industrie de la micro-électronique. De nombreux types de microscopes ont été développés pour satisfaire les besoins toujours plus pointus en imagerie. Sont ainsi apparus les microscopes en transmission ou en réflexion suivant la nature de l'objet observé, les microscopes en lumière polarisée, les microscopes à contraste de phase, particulièrement adaptés aux objets transparents et fins.

Dans tous ces instruments, la lumière interagit avec le spécimen, subissant des réflexions ou réfractions que l'on va détecter pour former une image. Par exemple dans un microscope de Nomarski, on détecte de faibles variations d'indice optique dans un objet transparent. C'est donc la lumière d'éclairage qui est détectée après interaction avec le sujet.

Le microscope de fluorescence est un cas à part dans la mesure où on ne fait pas la détection à la longueur d'onde d'éclairage. Ceci est imposé par le phénomène de fluorescence, et présente ainsi l'avantage de permettre la détection de zones spécifiques qui sont celles qui présenteront une fluorescence. Celle-ci peut être naturelle (fluorescence endogène) ou provoquée par un marqueur. On a ainsi développé une immense variété de sondes spécifiques à telle ou telle zone ou fonction cellulaire.

D'autres types de microscopes utilisent des changements de longueurs d'ondes entre l'excitation et la détection pour obtenir une information du spécimen. Citons par exemple, la génération de seconde ou troisième harmonique, où la réponse non-linéaire des parties non centro-symétrique du spécimen est exploitée, ou la microscopie Raman, basée sur l'effet Raman. D'autre part, le microscope moderne peut être couplé à des techniques d'imagerie rapide (étude de la décroissance temporelle de la fluorescence), multispectrale (étude de co-localisation) ou spectroscopique. Les développements se poursuivent à l'heure actuelle pour combiner ces diverses techniques, et la microscopie donnant traditionnellement des images en 2 dimensions, après avoir évoluée vers la 3D tends vers la 4D (espace + temps, espace + spectroscopie, espace + durée de vie de fluorescence) voire la 5D. Il ne fait aucun doute que les besoins de la recherche feront encore évoluer cet instrument.

Ses grands principes optiques restent cependant sensiblement les mêmes : un microscope est essentiellement composé de deux parties : un objectif et un oculaire. On y adjoint un système d'éclairage et un système de détection (l'œil dans sa version la plus simple). Les microscopes actuels voient leurs performances augmentées par leur couplage aux moyens d'acquisition et de traitement d'images modernes. La Figure 2.1 montre un microscope de fluorescence typique, les trajets des systèmes d'éclairage, d'excitation et de détection étant superposés à la photo. Basées sur ce principe, trois grandes variantes sont utilisées, différant dans la manière d'exciter le spécimen et de détecter la fluorescence : le microscope optique classique, le microscope confocal et le microscope bi-photon.

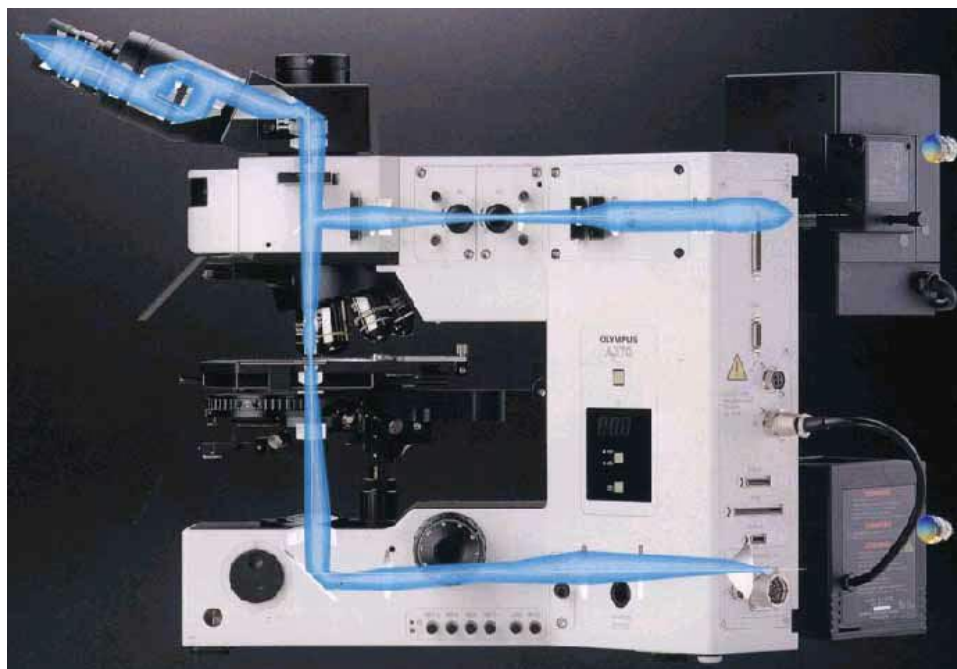


FIGURE 2.1. Microscope de fluorescence typique (Document Olympus Japon)

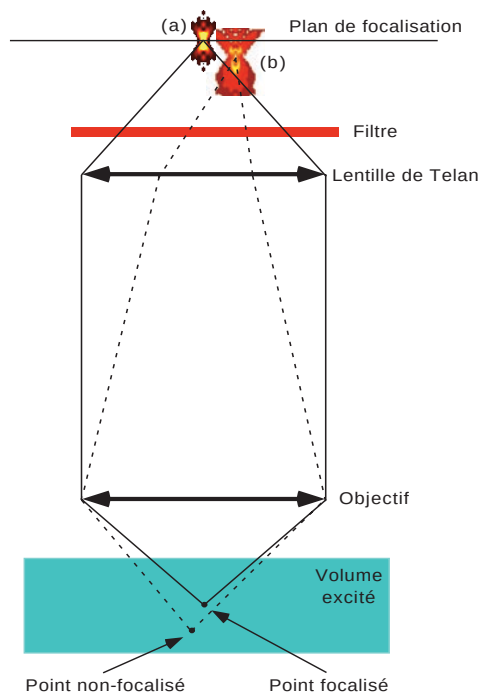


FIGURE 2.2. Microscope conventionnel de fluorescence : le volume d'excitation est infini, le volume de focalisation définit la résolution du microscope.

2.1.3 Le microscope conventionnel

L'excitation du spécimen se fait de manière globale et uniforme, par une lampe (généralement au xénon ou au mercure). 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 2.2 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, 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 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'image du plan observé, est aussi dégradée par les informations des autres plans. Les observations en trois dimensions sont donc difficiles, et il est impératif de restaurer les images avant toute analyse.

2.1.4 Le microscope confocal

Pour palier à ce défaut, on peut utiliser un montage confocal (Figure 2.3) [1][2]. L'illumination est alors faite par un faisceau laser focalisé dans le plan d'observation et qui balaye celui-ci. L'excitation n'est plus globale, mais quasi-ponctuelle. D'autre part, 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.

Ce montage permet de rejeter une très grande partie de la lumière (b) qui provient des plans autres que le plan de focalisation : la résolution verticale 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 terme de résolution, on peut cependant noter trois défauts inhérents à ce système :

- l'acquisition est plus lente , à cause de la nécessité de balayer le spécimen pour former une image,

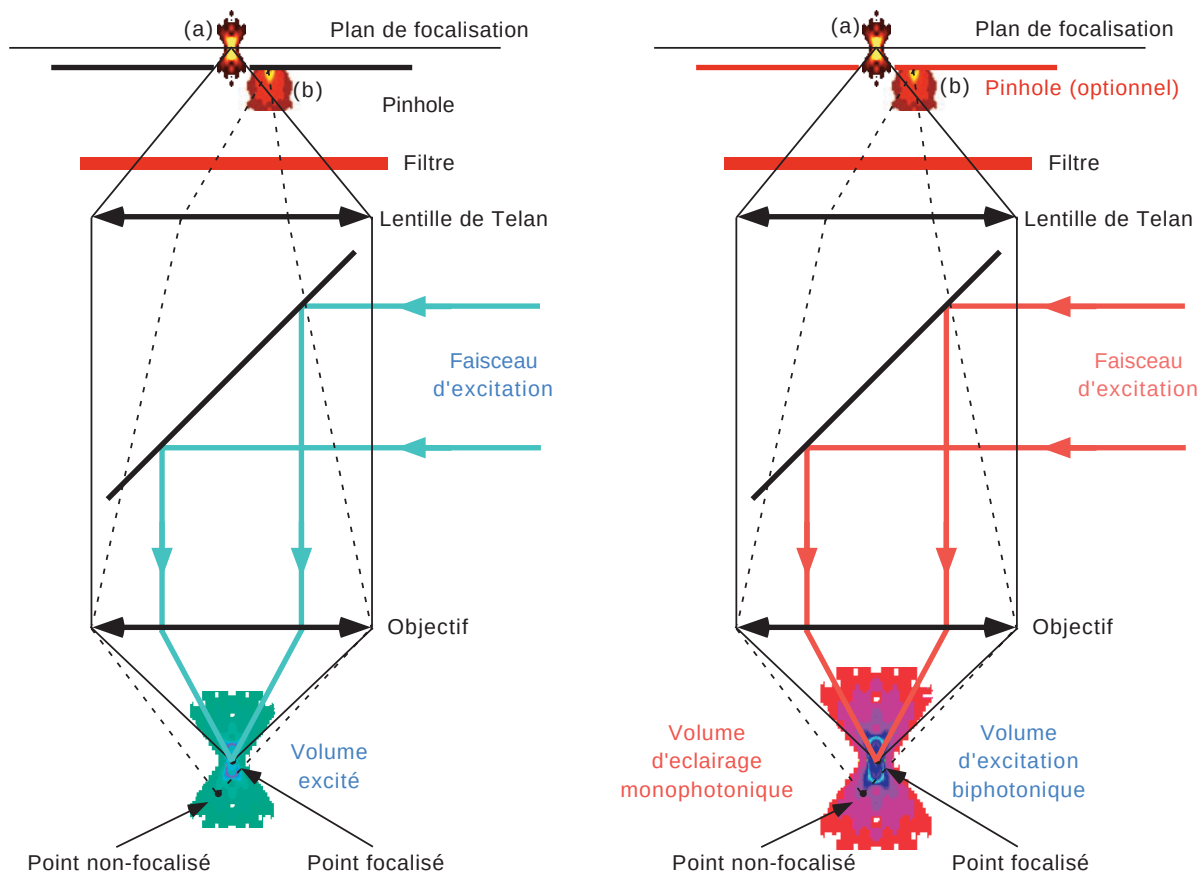


FIGURE 2.3. (a) Microscope confocal de fluorescence : le pinhole permet de rejeter la lumière en provenance des plans autres que le plan focal. (b) Microscope biphoton. L'excitation n'a lieu que dans un tout petit volume autour du point focal, à cause de l'effet non-linéaire

- le rapport signal sur bruit est généralement plus faible que pour le microscope classique,
- l'illumination par un faisceau laser focalisé engendre des intensités locales très grandes qui peuvent endommager le spécimen.

2.1.5 Excitation multi-photonique

Le microscope confocal a constitué un très grand progrès, mais certains problèmes persistent avec les spécimens biologiques vivants. Lorsque les molécules d'un fluorochrome sont excitées, il arrive souvent qu'elles génèrent des radicaux libres toxiques pour le spécimen observé. Ainsi si l'on veut conserver ce spécimen vivant, il faut limiter le temps d'observation et l'intensité lumineuse. D'autre part, la fluorescence diminue avec l'exposition (phénomène de photobleaching). Le microscope bi-photon permet de réduire ces 2 phénomènes.

Pour cela, on utilise le phénomène d'absorption simultanée de deux photons. Ce phénomène a été prévu théoriquement dès 1931 [3] et démontré en 1961 [4], mais il a fallu attendre 1990 pour le voir appliquer à la microscopie [5]. C'est maintenant un outil « courant » [6]. L'énergie nécessaire à la transition est fournie par deux photons délivrant chacun la moitié de l'énergie nécessaire (on peut aussi considérer une excitation triphotonique). Comme la probabilité d'absorption décroît comme le carré de l'excitation, la transition d'excitation n'a lieu que dans un tout petit volume autour du point de focalisation (Figure 2.3). Loin de celui-ci, comme il n'y a pas d'excitation, il n'y a ni photobleaching, ni phototoxicité. La détection peut alors se faire de manière classique (sans pinhole) tout en conservant les capacités de coupes optiques. Un inconvénient est que seul des lasers femtosecondes (type Ti:S) délivrent des impulsions suffisamment puissantes permettant d'induire l'effet biphoton. On retrouve aussi les inconvénients du microscope confocal : relative lenteur d'acquisition, rapport signal sur bruit souvent faible. On peut aussi confocaliser le microscope biphoton pour améliorer la résolution.

2.1.6 Imagerie 3-D

Par construction, le microscope (conventionnel, confocal ou confocal bi-photon) est un instrument fait pour prendre des images en deux dimensions. Par déplacement du plan focal à travers le spécimen, il est cependant possible d'acquérir une pile d'images 2D permettant de former une image en trois dimensions [7]. C'est la technique des coupes sériées (optical sectionning). On peut effectuer ce balayage axial soit en déplaçant l'objet via une platine motorisée, soit en déplaçant l'objectif par rapport au spécimen, généralement à l'aide d'un élément piézo-électrique. La Figure 2.4 décrit un dispositif complet de mesure par coupes sériées. Il 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. Elle peut également servir à traiter et à visualiser ces images, à partir de connaissances sur le système et d'outil de reconstruction.

Pour décrire correctement l'image en 3D ainsi obtenue, il est nécessaire de connaître les caractéristiques du système d'acquisition, et donc de l'objectif qui en est l'élément essentiel. Pour étudier les propriétés de l'objectif, il faut faire appel à la théorie de la diffraction. Cette théorie s'applique aux trois types de microscopes considérés. Les éléments essentiels à retenir sont les suivants :

- la résolution d'un microscope est limitée par la tache de diffraction (tache d'Airy)
- la résolution axiale est moins bonne que la résolution latérale (typiquement 3x moins)
- la présence d'aberrations optiques dégrade encore les performances.

Le paragraphe suivant est consacré à la description de la tache de diffraction à l'aide de différents modèles. Ensuite, les théories développées sont appliquées au cas du microscope confocal et des microscopes à objectifs multiples. Un cas particulier de microscope, qui combine ces développements avec ceux du premier chapitre a déjà été exposé au Chapitre I : le microscope à rayonnement de transition. Enfin, certains résultats expérimentaux sont présentés, en microscopie de fluorescence et en microscopie θ en réflexion.

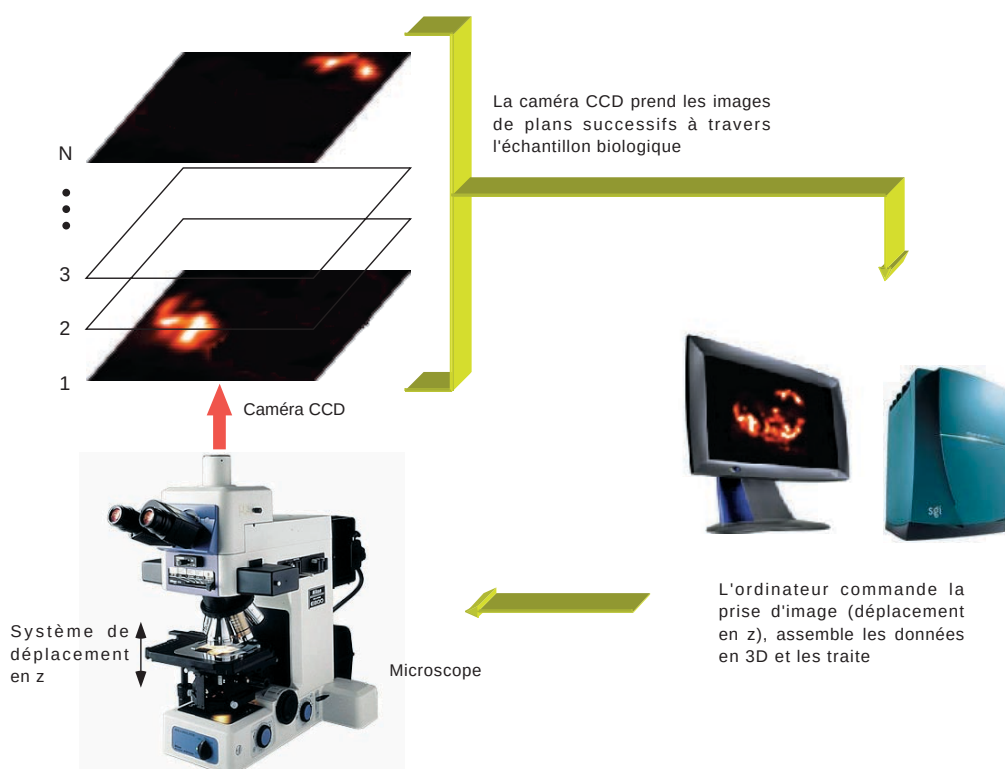


FIGURE 2.4. Principe d'un système d'acquisition en coupes sériées optiques : le microscope est équipé d'un système de déplacement en z permettant de prendre des images de plans successifs à travers l'échantillon. La pile d'image 2D ainsi acquise est assemblée et traitée par ordinateur.

2.2 Réponse Impulsionnelle Optique : Modèle de Gibson et Lanni

Gibson et Lanni ont introduit un modèle scalaire de formation d'image à travers un objectif de microscope optique. Ce modèle, en dépit de certaines limitations, à l'avantage de sa simplicité : il fait apparaître clairement les différentes composantes du système optique considéré, et peut aussi être utilisé pour calculer les Réponses Impulsionnelles Optiques (RIO) ou Point Spread Functions (PSF) de microscopes confocaux et bi-photon [8][9].

Pour établir l'équation permettant de calculer la RIO, on part de l'intégrale de Fresnel-Kirchoff qui décrit la diffraction d'une onde sphérique par une ouverture [10]. Gibson et Lanni calculent alors l'onde diffractée par un objectif de microscope en tenant compte du chemin optique à travers les différentes couches séparant le spécimen de l'objectif et de la symétrie cylindrique du problème :

$$U_p(x_d, y_d, z_d) = \frac{C}{z_d} \int_0^1 \left(k \rho \frac{\sqrt{x_d^2 + y_d^2}}{z_d} \right) \exp(jW(\rho)) \rho d\rho \quad (2.1)$$

où C est une constante complexe, (x_d, y_d, z_d) sont les coordonnées du point d'observation, $W(\rho)$ est un terme de phase décrivant les différences de chemin optiques entre les conditions idéales, préconisées par le constructeur, et les conditions réelles d'observation. Le terme ρ représente le rayon de l'ouverture limitante de l'objectif projetée dans le plan focal arrière tel que $0 < \rho < 1$. La RIO est alors obtenue en calculant le carré de cette intégrale :

$$PSF_{det}(x_d, y_d, z_d) = \left| \int_0^1 \left(k \rho \frac{\sqrt{x_d^2 + y_d^2}}{z_d} \right) \exp(jW(\rho)) \rho d\rho \right|^2 \quad (2.2)$$

Le terme $W(\rho)$ représente les aberrations de phase introduites par l'utilisation de l'objectif du microscope dans des conditions autres que celles préconisées par le constructeur (dites conditions standard), et qui garantissent un minimum d'aberration. On a :

$$W(\rho) = k \cdot OPD \quad (2.3)$$

où k est le vecteur d'onde et OPD représente la différence de chemin optique entre un rayon dans les conditions standard et un autre dans les conditions non standard.

Deux rayons parallèles (l'un dans les conditions standard et l'autre non) entrant dans un système de lentilles sphériques ont la même longueur de chemin optique dans ce système. Ainsi OPD se résume à la différence des chemins optiques de la source ponctuelle aux points d'entrée du rayon dans les conditions standard et du rayon dans les conditions non-standard.

La Figure 2.5 donne la représentation des chemins optiques dans un système de lentilles sphériques minces, de deux rayons partant d'une source ponctuelle et entrant dans la lentille frontale dans les conditions standard et non standard, et ayant respectivement les trajets optiques ABCD et PQRS. On a donc :

$$OPD = [ABCD] - [PQRS] \quad (2.4)$$

OPD est donc fonction des différents indices optiques et épaisseurs des milieux traversés :

$$OPD = n_s AB + n_g BC + n_i CD - (n_{g^*} PQ + n_{i^*} QR + n RS) \quad (2.5)$$

Après transformation, on a :

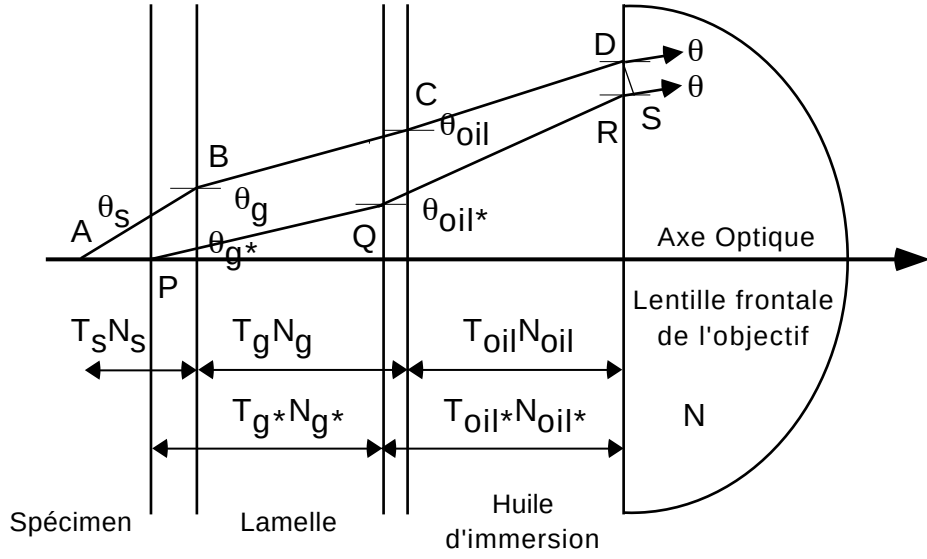


FIGURE 2.5. Schéma illustrant les chemins optiques empruntés par deux rayons : ABCD est le chemin d'un rayon entrant dans la lentille frontale dans des conditions non standard et PQRS est le chemin d'un rayon partant d'une source ponctuelle et entrant dans la lentille frontale dans les conditions standard.

$$OPD = \frac{n_s t_s}{\cos \theta_s} + \frac{n_g t_g}{\cos \theta_g} + \frac{n_i t_i}{\cos \theta_i} - \left(\frac{n_{g^*} t_{g^*}}{\cos \theta_{g^*}} + \frac{n_{i^*} t_{i^*}}{\cos \theta_{i^*}} + n \gamma \right) \quad (2.6)$$

avec :

θ : angle de propagation aux interfaces.

t_s : profondeur de l'objet sous la lamelle.

n_s : indice de réfraction du milieu dans lequel se trouve l'objet.

t_g : épaisseur de la lamelle.

n_g : indice de réfraction de la lamelle.

t_i : épaisseur du milieu d'immersion.

n_i : indice de réfraction du milieu d'immersion.

n : indice de réfraction de la lentille frontale de l'objectif.

*: épaisseurs et indices de réfractons dans les conditions standard.

$$\gamma = \sin \theta (t_s \tan \theta_s + t_g \tan \theta_g + t_{imm} \tan \theta_{imm} - (t_{g^*} \tan \theta_{g^*} + t_{imm^*} \tan \theta_{imm^*})) \quad (2.7)$$

D'après les lois de la réfraction, on a :

$$NA = n \sin \theta = n_s \sin \theta_s \Rightarrow \cos \theta_s = \sqrt{1 - \left(\frac{NA}{n_s} \right)^2} \quad (2.8)$$

L'expression de l'OPD devient alors :

$$OPD = n_s t_s \sqrt{1 - \left(\frac{n}{n_s} \sin \theta \right)^2} + n_g t_g \sqrt{1 - \left(\frac{n}{n_g} \sin \theta \right)^2} + n_{imm} t_{imm} \sqrt{1 - \left(\frac{n}{n_{imm}} \sin \theta \right)^2} - \left(n_{g^*} t_{g^*} \sqrt{1 - \left(\frac{n}{n_{g^*}} \sin \theta \right)^2} + n_{imm^*} t_{imm^*} \sqrt{1 - \left(\frac{n}{n_{imm^*}} \sin \theta \right)^2} \right) \quad (2.9)$$

Le microscope optique de fluorescence satisfaisant à la condition des sinus d'Abbé, OPD peut donc s'exprimer en fonction de coordonnées dans l'espace image. Cette condition exprime une relation entre θ et ϕ , angles entre l'axe optique et un rayon entrant et sortant du système dans les conditions standard.

$$n_{obj} \sin \theta = M n_{img} \sin \phi \quad (2.10)$$

où M est le grandissement latéral de l'objectif du microscope.

Ainsi un rayon émis par un objet se propagera dans la lentille frontale de l'objectif avec un angle θ et arrivera à l'intersection de l'axe optique et du plan image avec un angle ϕ . L'équation (2.10) peut se réécrire sous la forme :

$$n \sin \theta = M \sin \phi = \frac{MR}{\sqrt{R^2 + z_d^2}} \quad (2.11)$$

avec R la distance entre l'axe optique et le point d'intersection du rayon lumineux avec le plan focal arrière. On introduit alors la distance radiale normalisée ρ tel que :

$$\rho = R/a \quad (2.12)$$

a étant le rayon de l'ouverture limitante de l'objectif projeté dans le plan focal arrière, avec $0 \leq \rho \leq 1$. Il en résulte que :

$$n^2 \sin^2 \theta = M^2 \sin^2 \phi = \frac{M^2 a^2 \rho^2}{a^2 \rho^2 + z_d^2} = \frac{NA^2 \rho^2}{1 - \left(\frac{NA}{M}\right)^2 (1 - \rho^2)} \quad (2.13)$$

Comme $(NA/M)^2$ est très faible en pratique ($NA \approx 1$, $M > 10$), cette équation se réduit à :

$$n \sin \theta \approx NA \rho \quad (2.14)$$

La combinaison des équations (2.13) et (2.14) donne alors :

$$OPD = n_s t_s \sqrt{1 - \left(\frac{NA \rho}{n_s}\right)^2} + n_g t_g \sqrt{1 - \left(\frac{NA \rho}{n_g}\right)^2} + n_i t_i \sqrt{1 - \left(\frac{NA \rho}{n_i}\right)^2} - \left(n_{g^*} t_{g^*} \sqrt{1 - \left(\frac{NA \rho}{n_{g^*}}\right)^2} + n_{i^*} t_{i^*} \sqrt{1 - \left(\frac{NA \rho}{n_{i^*}}\right)^2} \right) \quad (2.15)$$

Lorsque les valeurs réelles diffèrent des valeurs standard recommandées par le constructeur, des aberrations de phase apparaissent. La présence d'aberrations de phase va entraîner une dégradation de la qualité de l'image et une diminution du contraste dans le plan focal. Par conséquent, il est indispensable que le microscope soit utilisé dans des conditions aussi proches que possible des conditions standard.

Un problème particulier existe quand l'objet observé possède un indice de réfraction différent de celui du milieu d'immersion : l'image de chaque plan de cet objet subira des aberrations différentes ce qui complique encore le processus de formation des images : en effet dans ce cas, la RIO varie alors avec la profondeur du spécimen.

Pour palier à ce problème, les fabricants de microscopes ont développé des objectifs à immersion à eau. L'examen de l'équation (2.15) montre en effet que si l'indice du milieu d'immersion (n_i) est égal à l'indice du spécimen (n_s) et si les autres paramètres correspondent aux conditions préconisées, alors l'influence de la profondeur du spécimen devient nulle. Le deuxième terme est identiquement nul quel que soit t_s : la RIO est donc invariante avec la profondeur.

Lors de l'acquisition d'une RIO ou de l'image d'un specimen, la coupe optique est généralement réalisée par déplacement du porte-échantillon devant l'objectif. Dans le système CellScan, un élément piezo électrique est inséré entre l'objectif et le porte objectif. Cependant dans les deux cas l'épaisseur du milieu d'immersion varie du fait du déplacement relatif de l'objectif par rapport à l'échantillon.

Gibson et Lanni exprime cette défocalisation et remplacent alors le terme t_i dans l'équation (2.15). Cette étape sera détaillée dans la troisième partie de ce chapitre. C'est ce modèle de RIO qui est utilisé dans le logiciel XCOSM [11]. Ce programme du Biomedical Computer Laboratory (Washington University, St Louis, Missouri, USA) propose aussi l'implémentation de plusieurs algorithmes de déconvolution. Il tourne sur stations Unix et PC. Ce logiciel était utilisé à l'origine des premiers travaux du MIPS dans le domaine de la déconvolution.

Un avantage de cette approche est qu'elle fait explicitement apparaître les paramètres d'utilisation recommandés par le fabricant, et les paramètres d'acquisition réels. Il souffre cependant de certaines limitations.

Tout d'abord la fonction d'apodization $a(\theta) = (\cos \theta)^{1/2}$ pour un système aplanétique obéissant à la condition des sinus d'Abbe n'est pas introduite.

D'autre part, les rayons lumineux sont considérés comme traversant les diverses interfaces sans réflexion, c'est à dire à intensité constante. Cette hypothèse est discutable en particulier pour les objectifs à grande ouverture numérique pour lesquels les rayons extrémaux arrivent à grande incidence sur les diverses interfaces et aussi lorsqu'il existe de grandes différences d'indices entre les différents milieux. Même si l'on considère la théorie scalaire comme limite de la théorie vectorielle lorsqu'on moyenne les effets de polarisation, il faudrait introduire un coefficient moyen de transmission.

Enfin, cette approche ne peut, par sa nature même, tenir compte ni des possibles effets de polarisation induits par la traversée des diverses interfaces, ni de la possible polarisation de la lumière émise par le spécimen lui-même (émission dipolaire, spécimen polarisant en cristallographie par exemple).

Ces limitations ont poussé divers auteurs à perfectionner les modèles de formation d'images dans un microscope pour tenir compte de la nature vectorielle de la lumière. Parmi les différentes approches proposées, celle de Török et Varga, généralisant le formalisme de Wolf, est sans doute la plus élégante. Cette théorie est exposée dans le paragraphe suivant.

2.3 Réponse Impulsionnelle Optique : Modèle de Török et Varga

Le modèle de Gibson et Lanni est basé sur la théorie scalaire de la diffraction de la lumière. Il est donc limité en précision, spécialement pour les objectifs à grande ouverture numérique, pour lesquels les rayons marginaux pénètrent à grande incidence les diverses interfaces. Pour ces rayons, la différence entre les coefficients de transmission pour les deux cas de polarisation est loin d'être négligeable. Pour cette raison, plusieurs auteurs se sont efforcés de développer des modèles vectoriels de formation d'image.

Parmi ces différentes approches, la plus élégante est probablement celle proposée par Peter Török, à base d'équations intégrales [14]-[16]. Elle est dérivée du modèle de diffraction vectoriel proposé par Richards et Wolf [12][13] adapté au cas d'une focalisation à travers plusieurs milieux. Par souci de simplicité, le modèle général [17][18] a été adapté au cas de la focalisation d'une onde à travers trois milieux, qui correspondent au milieu d'immersion, à la lamelle et au spécimen dans le cas du microscope qui nous intéresse ici.

La Figure 2.6 décrit la géométrie utilisée. Le système forme l'image d'une source ponctuelle située dans l'espace objet à $z=-\infty$ et émettant une onde plane monochromatique et polarisée linéairement suivant l'axe x . Cette onde est focalisée par un objectif sans aberration. L'origine O du repère (x,y,z) correspond au point focal théorique du système imageant dans un milieu homogène. La présence des divers milieux provoque un décalage du point focal. Le point d'observation $P(x,y,z)$ est repéré par le vecteur $\mathbf{r}_p$. Le vecteur $\mathbf{s}_N=(s_{Nx},s_{Ny},s_{Nz})$ est le vecteur unité le long du rayon optique considéré dans le milieu n . Dans l'espace d'indice n_1 , on peut écrire le champ électrique comme une superposition d'ondes planes selon l'expression donnée par Richards et Wolf [12][13] :

$$\mathbf{E}(P) = -\frac{ik_1}{2\pi} \iint_{\Omega} \frac{\mathbf{a}(s_{1x}, s_{1y})}{s_{1z}} \exp[ik_1(\mathbf{s}_1 \cdot \mathbf{r}_p)] ds_{1x} ds_{1y} \quad (2.16)$$

En particulier sur la première interface, on obtient :

$$\mathbf{E}_1(x, y, -h_1) = -\frac{ik_1}{2\pi} \iint_{\Omega_1} \frac{\mathbf{a}(s_{1x}, s_{1y})}{s_{1z}} \exp[ik_1(s_{1x}x + s_{1y}y - s_{1z}h_1)] ds_{1x} ds_{1y} \quad (2.17)$$

Pour décrire le champ se propageant à travers les milieux, on suppose que chaque composante de ce champ subit à la traversée de chaque interface une réfraction obéissant aux lois de Fresnel. L'amplitude de l'onde incidente dans le premier milieu valant $\mathbf{W}(s)=\mathbf{a}/s_{1z}$, l'amplitude de l'onde transmise dans le 3ème milieu est une fonction linéaire de $\mathbf{W}(s)$, qui vaut $\Lambda \mathbf{W}(s)$, le tenseur Λ étant une fonction de l'angle d'incidence, de l'épaisseur et de l'indice des milieux traversés. Le champ dans le spécimen, à la dernière interface (lamelle) vaut donc :

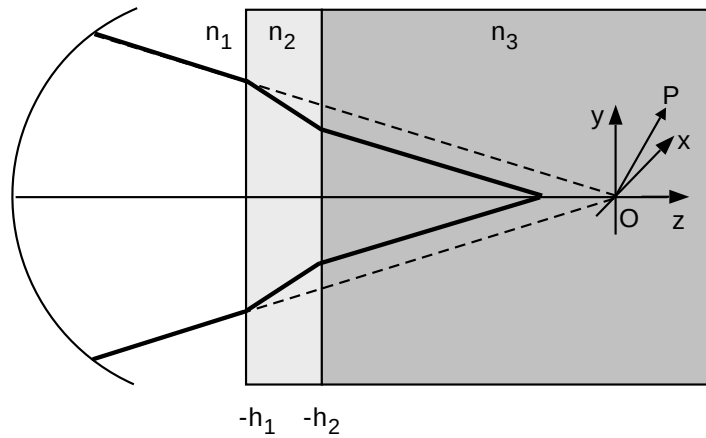


FIGURE 2.6. Focalisation d'une onde plane dans un milieu stratifié.

$$\mathbf{E}_3(x, y, -h_2) = -\frac{ik_1}{2\pi} \iint_{\Omega_1} \Lambda \mathbf{W}(\mathbf{s}_1) \exp[ik_1(s_{1x}x + s_{1y}y - s_{1z}h_2)] ds_{1x} ds_{1y} \quad (2.18)$$

Le champ dans le spécimen est aussi représenté par une superposition d'ondes planes qui peut s'écrire :

$$\mathbf{E}_3(x, y, z) = -\frac{ik_3}{2\pi} \iint_{\Omega_3} \mathbf{F} \exp[ik_3(s_{3x}x + s_{3y}y + s_{3z}z)] ds_{3x} ds_{3y} \quad (2.19)$$

Il faut déterminer la fonction $\mathbf{F}$ à l'aide de l'équation (2.18) qui est la condition aux limites pour l'équation (2.19). Pour cela on écrit la loi de la réfraction pour le passage des milieux n à $n-1$:

$$k_n \mathbf{s}_n - k_{n-1} \mathbf{s}_{n-1} = (k_n \cos \theta_n - k_{n-1} \cos \theta_{n-1}) \mathbf{u} \quad (2.20)$$

avec $\mathbf{u}$ le vecteur normal aux interfaces. On a donc par récursivité :

$$k_3 s_{3x} = k_2 s_{2x} = k_1 s_{1x} \quad \text{et} \quad k_3 s_{3y} = k_2 s_{2y} = k_1 s_{1y} \quad (2.21)$$

Ceci permet d'écrire le champ dans le specimen :

$$\begin{aligned} \mathbf{E}_3(x, y, z) = & -\frac{ik_1}{2\pi} \iint_{\Omega_1} \Lambda \mathbf{W}(\mathbf{s}_1) \exp[ik_0(n_3 h_2 s_{3z} - n_1 h_1 s_{1z})] \\ & \times \exp[ik_3 s_{3z} z] \exp[ik_1(s_{1x}x + s_{1y}y)] ds_{1x} ds_{1y} \end{aligned} \quad (2.22)$$

$$s_{nz} = \left[1 - \frac{k_1^2}{k_n^2} (s_{1x}^2 + s_{1y}^2) \right]^{1/2} \quad (2.23)$$

Pour calculer le champ électrique, on passe en coordonnées sphériques pour écrire les vecteurs $\mathbf{r}_p$ et $\mathbf{s}_n$:

$$\begin{aligned} \mathbf{s}_n &= \sin \theta_n \cos \phi_n \mathbf{i} + \sin \theta_n \sin \phi_n \mathbf{j} + \cos \theta_n \mathbf{k} \\ \mathbf{r}_p &= r_p (\sin \theta_p \cos \phi_p \mathbf{i} + \sin \theta_p \sin \phi_p \mathbf{j} + \cos \theta_p \mathbf{k}) \end{aligned} \quad (2.24)$$

Si $\mathbf{e}_0 = (e_0, 0, 0)$ est le champ électrique avant la lentille, on peut écrire le champ après l'objectif comme :

$$\mathbf{e}(p, s, \xi) = A(\theta_1) \mathbf{P}^{(n)} \mathbf{L} \mathbf{R} \mathbf{e}_0 \quad (2.25)$$

dans un nouveau repère suivant les composantes e_s et e_p polarisée s et p et tel que $e_z=0$. La fonction $A(\theta)$ représente la fonction d'apodization de l'objectif qui pour un système aplanétique obéissant à la condition des sinus d'Abbe vaut $A(\theta) = \cos^{1/2} \theta$.

$$\mathbf{R} = \begin{bmatrix} \cos \phi_n & \sin \phi_n \\ -\sin \phi_n & \cos \phi_n \\ & & 1 \end{bmatrix} \quad \mathbf{L} = \begin{bmatrix} \cos \theta_1 & \sin \theta_1 \\ & 1 \\ -\sin \theta_1 & \cos \theta_1 \end{bmatrix} \quad \mathbf{P}^{(n)} = \begin{bmatrix} \cos \theta_n & -\sin \theta_n \\ & 1 \\ \sin \theta_n & \cos \theta_n \end{bmatrix} \quad (2.26)$$

La matrice $\mathbf{R}$ décrit la transformation des coordonnées pour une rotation autour de l'axe z et la matrice $\mathbf{L}$ décrit le changement du vecteur électrique à la traversée de la lentille. La matrice $\mathbf{P}^{(n)}$ décrit elle le changement de coordonnées pour générer les composantes e_s et e_p polarisée s et p telles que $e_z=0$ dans le milieu n :

On peut alors écrire pour le champ électrique dans le milieu n :

$$\mathbf{e}_n = [\mathbf{R}]^{-1}[\mathbf{P}^{(n)}]^{-1}\mathbf{I}^{(n-1)}\mathbf{e}(p, s, \zeta) \quad (2.27)$$

la matrice $\mathbf{I}$ décrivant la transmission de l'onde à travers le milieu stratifié :

$$\mathbf{I}^{(n-1)} = \begin{bmatrix} T_p^{(n-1)} & & \\ & T_s^{(n-1)} & \\ & & T_p^{(n-1)} \end{bmatrix} \quad (2.28)$$

Les facteurs $T_{s,p}^{(n-1)}$ sont les coefficients de transmission à travers le milieu n pour les ondes polarisées s et p ayant traversé les n-1 milieux précédents. Dans le spécimen (milieu 3) après la traversée du milieu 1 d'immersion et de la lamelle (milieu 2), on a donc :

$$T_{s,p}^{(2)} = \frac{t_{s,p}^{(2)}t_{s,p}^{(1)}\exp(i\beta_2)}{1 + r_{s,p}^{(1)}r_{s,p}^{(2)}\exp(2i\beta_2)} \quad (2.29)$$

avec $\beta_2 = k_2(h_1 - h_2)\cos\theta_2$, et $t_{s,p}^{(n)}, r_{s,p}^{(n)}$ les coefficients de Fresnel en transmission et réflexion :

$$\begin{aligned} t_s^{(n)} &= \frac{2n_n \cos\theta_n}{n_n \cos\theta_n + n_{n+1} \cos\theta_{n+1}} & t_p^{(n)} &= \frac{2n_n \cos\theta_n}{n_{n+1} \cos\theta_n + n_n \cos\theta_{n+1}} \\ r_s^{(n)} &= \frac{n_n \cos\theta_n - n_{n+1} \cos\theta_{n+1}}{n_n \cos\theta_n + n_{n+1} \cos\theta_{n+1}} & r_p^{(n)} &= \frac{n_{n+1} \cos\theta_n - n_n \cos\theta_{n+1}}{n_{n+1} \cos\theta_n + n_n \cos\theta_{n+1}} \end{aligned} \quad (2.30)$$

On peut maintenant reformuler l'équation (2.22) pour calculer le champ. Pour cela, on la réécrit en coordonnées sphériques et on introduit :

$$\begin{aligned} \kappa &= k_1 \sin\theta_1 \sin\theta_p \cos(\phi_n - \phi_p) \\ \Psi_i &= h_{n-1}n_n s_{nz} - h_1 n_1 s_{1z} \end{aligned} \quad (2.31)$$

La quantité Ψ_i est appelée fonction d'aberration initiale. On peut alors écrire :

$$\mathbf{E}_3(\mathbf{r}_p) = -\frac{ik_1}{2\pi} \int_{\Omega_1} \mathbf{e}_3 \exp(ir_p \kappa) \exp(ik_0 \Psi_i) (\exp[ik_3 r_p \cos\theta_p \cos\theta_3] \sin\theta_1 d\theta_1 d\phi) \quad (2.32)$$

L'utilisation des équations (2.25) à (2.31) permet par une intervention des bornes d'intégration, et une intégration selon Φ , d'obtenir les expressions du champs électrique dans le spécimen :

$$\begin{aligned} E_{3x}(x, y, z) &= -i(I_{0ill}^{(3)} + I_{2ill}^{(3)} \cos 2\phi_p) \\ E_{3y}(x, y, z) &= -iI_{2ill}^{(3)} \sin 2\phi_p \\ E_{3z}(x, y, z) &= -2I_{1ill}^{(3)} \cos \phi_p \end{aligned} \quad (2.33)$$

$$\begin{aligned}
I_{0ill} &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos\theta_1} \sin\theta_1 \exp(ik_0\Psi_i) \\
&\quad \times (T_s^{(2)} + T_p^{(2)} \cos\theta_3) J_0(k_1 \sin\theta_1 r_p \sin\theta_p) \exp(ik_3 r_p \cos\theta_p \cos\theta_3) d\theta_1 \\
I_{1ill} &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos\theta_1} \sin\theta_1 \exp(ik_0\Psi_i) \\
&\quad \times T_p^{(2)} \sin\theta_3 J_1(k_1 \sin\theta_1 r_p \sin\theta_p) \exp(ik_3 r_p \cos\theta_p \cos\theta_3) d\theta_1 \\
I_{2ill} &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos\theta_1} \sin\theta_1 \exp(ik_0\Psi_i) \\
&\quad \times (T_s^{(2)} - T_p^{(2)} \cos\theta_3) J_2(k_1 \sin\theta_1 r_p \sin\theta_p) \exp(ik_3 r_p \cos\theta_p \cos\theta_3) d\theta_1
\end{aligned} \tag{2.34}$$

La théorie de Török et Varga permet donc de modéliser rigoureusement une réponse impulsionnelle optique en illumination. On peut ainsi calculer la RIO d'illumination d'un microscope confocal. Le modèle s'applique au cas d'une onde polarisée linéairement, mais s'étend de manière directe au cas d'une onde non-polarisée, ou d'une onde polarisée elliptiquement, en moyennant le champ E_3 par rapport à l'angle Φ_p .

Ce modèle est cependant relativement difficile à utiliser dans la pratique. En effet, si l'on considère un objectif de microscope donné, celui-ci est conçu pour travailler dans des conditions précises (indice du milieu d'immersion, indice et épaisseur de la lamelle), ce qui signifie que sa conception intègre ces données pour minimiser les aberrations. Il faut donc les introduire manuellement dans le calcul pour tenir compte.

De plus, on considère dans cette théorie un rayonnement se propageant de l'objectif vers le spécimen. Stricto sensu, elle n'est donc pas appropriée pour modéliser l'observation d'un spécimen (RIO de détection). Une approximation couramment utilisée, est de considérer que les RIO en illumination et en détection sont identiques. Dans ce cas, on peut alors modéliser un microscope conventionnel ou un microscope confocal à l'aide du modèle de Török et Varga. Cette approximation est souvent vraie, mais peut poser problème dans certaines configurations. Ainsi, un dipôle émettant un rayonnement électromagnétique dans des conditions particulières ne peut être traité par cette théorie, car le champ au foyer ne correspond pas forcément à un champ dipolaire.

Enfin, pour un milieu stratifié, les coefficients de transmission de Fresnel ne sont pas les mêmes lorsque l'on passe du verre à l'eau ou de l'eau au verre. Les RIO ne peuvent donc pas être strictement identiques.

Notons cependant que cette approche est complète et rigoureuse pour un microscope biphoton non confocalisé. En effet, pour un tel microscope, la résolution est entièrement déterminée par le dispositif d'illumination du spécimen.

Le prochain paragraphe est consacré à une modélisation rigoureuse de la RIO en détection.

2.4 Réponse Impulsionnelle Optique : Modèle de Haeblerlé *et al.*

Plusieurs modèles rigoureux de calcul de la RIO de détection d'un microscope existent [19]-[21]. Ces modèles sont cependant limités par le fait qu'ils se limitent à un milieu d'observation homogène. Or en biologie, le spécimen est souvent observé à travers un milieu d'immersion et protégé par une lamelle.

Si l'on considère que la RIO de détection est identique à la RIO d'illumination, on a donc un moyen efficace de calculer la RIO d'un microscope classique, confocal ou multiphoton. Cette approche a été utilisée par de nombreux auteurs (voir par exemple [22]-[26]). Notons cependant qu'en toute rigueur, il ne s'agit que d'une approximation. En effet, les coefficients de Fresnel en réflexion et en transmission diffèrent lorsque l'on passe de la lamelle au spécimen, ou du spécimen à la lamelle. Les RIO de détection et d'illumination doivent donc être différentes.

La Figure 2.7 décrit la géométrie considérée. Le molécule fluorescente est placée à l'origine du système de coordonnées (i,j,k). Le dipôle qu'elle constitue [27]-[29] a pour moment $p=p_x, p_y, p_z$. Török a montré que le champ électromagnétique pouvait s'écrire dans le milieu 1, juste avant l'objectif, sous la forme [30] :

$$E_{1x} = \frac{1}{2} [p_x^* (T_s' + T_p' \cos \theta'_3 \cos \theta'_1) - 2p_z^* T_p' \sin \theta'_3 \cos \theta'_1 \cos \phi'_1 - (T_s' - T_p' \cos \theta'_3 \cos \theta'_1) (p_x^* \cos 2\phi'_1 + p_y^* \sin 2\phi'_1)] \quad (2.35)$$

$$E_{1y} = \frac{1}{2} [p_y^* (T_s' + T_p' \cos \theta'_3 \cos \theta'_1) - 2p_z^* T_p' \sin \theta'_3 \cos \theta'_1 \sin \phi'_1 - (T_s' - T_p' \cos \theta'_3 \cos \theta'_1) (p_x^* \sin 2\phi'_1 - p_y^* \cos 2\phi'_1)] \quad (2.36)$$

$$E_{1z} = -p_z^* T_p' \sin \theta'_3 \sin \theta'_1 - T_p' \cos \theta'_3 \sin \theta'_1 (p_x^* \cos \phi'_1 + p_y^* \sin \phi'_1) \quad (2.37)$$

avec :

$$T_{s,p}' = \frac{t_{s,p}^{(3)} t_{s,p}^{(2)} \exp(-i\beta_2)}{1 + r_{s,p}^{(3)} r_{s,p}^{(2)} \exp(-2i\beta_2)} \quad (2.38)$$

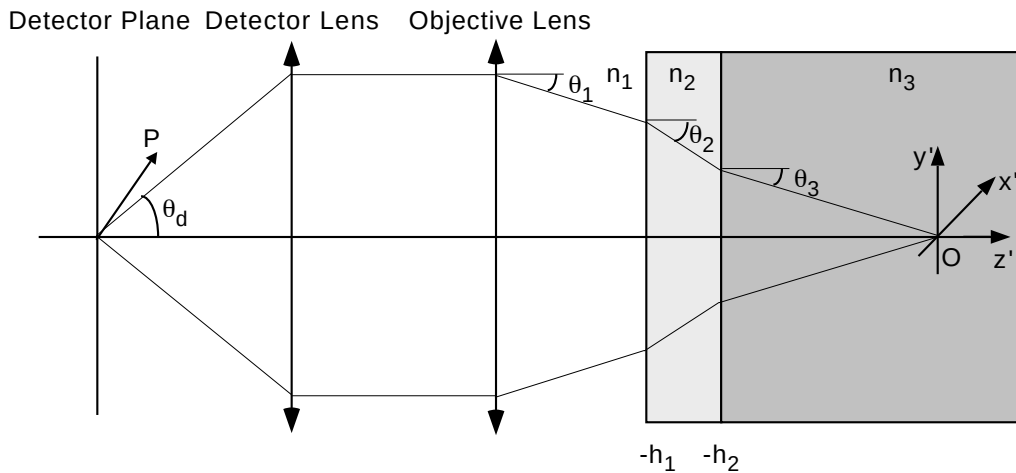


FIGURE 2.7. Schéma de principe pour l'observation d'un dipôle inclus dans un milieu stratifié.

avec $\beta_2 = k_2(h_1 - h_2)\cos\theta_2$, et $t_{s,p}^{(n)}, r_{s,p}^{(n)}$ les coefficients de Fresnel en transmission et réflexion, calculés maintenant dans le sens de propagation du milieu 3 vers le milieu 1 :

$$\begin{aligned} t_s^{(n)} &= \frac{2n_n \cos\theta'_n}{n_n \cos\theta'_n + n_{n-1} \cos\theta'_{n-1}} & t_p^{(n)} &= \frac{2n_n \cos\theta'_n}{n_{n-1} \cos\theta'_n + n_n \cos\theta'_{n-1}} \\ r_s^{(n)} &= \frac{n_n \cos\theta'_n - n_{n-1} \cos\theta'_{n-1}}{n_n \cos\theta'_n + n_{n-1} \cos\theta'_{n-1}} & r_p^{(n)} &= \frac{n_{n-1} \cos\theta'_n - n_n \cos\theta'_{n-1}}{n_{n-1} \cos\theta'_n + n_n \cos\theta'_{n-1}} \end{aligned} \quad (2.39)$$

Après la lentille de collimation, le champ électrique peut s'écrire sous la forme [19] :

$$\mathbf{E} = \cos^{-1/2}\theta'_1 \mathbf{R}^{-1} \mathbf{L}^{-1} \mathbf{R} \mathbf{E}_1 \quad (2.40)$$

Les matrices $\mathbf{R}$ et $\mathbf{L}$ sont calculées comme précédemment, mais notons maintenant la présence d'une fonction inverse d'apodisation $\cos^{-1/2}\theta$. Le calcul de l'équation (2.40) se fait sans difficulté particulière, et on obtient le champ électromagnétique focalisé par l'objectif [31]:

$$\begin{aligned} E_x &= \cos^{-1/2}\theta'_1 \{ p_x^* [(T_s' + T_p' \cos\theta'_3) - (T_s' - T_p' \cos\theta'_3) \cos 2\phi'_1 \\ &\quad - p_y^* (T_s' - T_p' \cos\theta'_3) \sin 2\phi'_1 \\ &\quad - 2p_z^* T_p' \sin\theta'_3 \cos\phi'_1] \} \end{aligned} \quad (2.41)$$

$$\begin{aligned} E_y &= \cos^{-1/2}\theta'_1 \{ -p_x^* (T_s' - T_p' \cos\theta'_3) \sin 2\phi'_1 \\ &\quad + p_y^* [(T_s' + T_p' \cos\theta'_3) + (T_s' - T_p' \cos\theta'_3) \cos 2\phi'_1 \\ &\quad - 2p_z^* T_p' \sin\theta'_3 \sin\phi'_1] \} \end{aligned} \quad (2.42)$$

$$E_z = 0 \quad (2.43)$$

Ce champ est refocalisé sur le détecteur par la lentille de détection. On considère par la suite une lentille de détection de faible ouverture numérique. On peut alors simplifier le traitement en disant que cette lentille effectue une transformée de Fourier partielle des composantes individuelles du champ incident [31].

$$E_x = FT(E_x) = p_x^* (I_{0det} + I_{2det} \cos 2\phi_d) + p_y^* I_{2det} \sin 2\phi_d - 2ip_z^* I_{1det} \cos \phi_d \quad (2.44)$$

$$E_y = FT(E_y) = p_x^* I_{2det} \sin 2\phi_d + p_y^* (I_{0det} - I_{2det} \cos 2\phi_d) - 2ip_z^* I_{1det} \sin \phi_d \quad (2.45)$$

avec les intégrales de diffraction pour la détection :

$$\begin{aligned} I_{0det} &= \int_0^{\alpha_d} \cos^{-1/2}\theta'_1 \sin 2\theta_d \exp(-ik_0 \Psi_{det}) \\ &\quad \times (T_s' + T_p' \cos\theta'_3) J_0(k_d \rho \sin\theta_d) \exp(-ik_1 z \cos\theta'_1) d\theta_d \\ I_{1det} &= \int_0^{\alpha_d} \cos^{-1/2}\theta'_1 \sin 2\theta_d \exp(-ik_0 \Psi_{det}) \\ &\quad \times T_p' \sin\theta'_3 J_1(k_d \rho \sin\theta_d) \exp(-ik_1 z \cos\theta'_1) d\theta_d \end{aligned} \quad (2.46)$$

$$I_{2det} = \int_0^{\alpha_d} \cos^{-1/2} \theta'_1 \sin 2\theta_d \exp(-ik_0 \Psi_{det}) \times (T'_s - T'_p \cos \theta'_3) J_2(k_d \rho \sin \theta_d) \exp(-ik_1 z \cos \theta'_1) d\theta_d$$

La fonction d'aberration initiale en détection est donnée par :

$$\Psi_{det} = h_1 n_1 \cos \theta'_1 - h_2 n_3 \cos \theta'_3 \quad (2.47)$$

La relation reliant les angles d'incidence à l'entrée de l'objectif et sur le détecteur étant :

$$\frac{n_1 \sin \alpha_1}{n_d \sin \alpha_d} = \frac{n_1 \sin \theta'_1}{n_d \sin \theta_d} = \beta \quad (2.48)$$

où β est le grandissement nominal de l'objectif, et n_d étant l'indice du milieu du détecteur.

La Figure 2.8 montre les RIO d'illumination et de détection calculées pour une lamelle d'épaisseur (a) : 120 μm , (b) : 170 μm pour un objectif à air (N.A.=0.9), à 50 μm de profondeur dans l'eau ($n=1.33$). Ces résultats montrent que considérer les RIO de détection et d'illumination comme identiques peut être dans certains cas une mauvaise approximation, en particulier en présence de forte aberration sphérique comme pour la Figure 2.8(b).

Nous disposons donc maintenant d'un modèle rigoureux de formation d'image pour la détection dans un microscope. Ce modèle s'applique au microscope conventionnel. En le combinant au modèle rigoureux de Török et Varga pour l'illumination, nous avons maintenant un modèle complet et rigoureux du microscope confocal.

Cependant, ce modèle, tout comme le modèle de Török et Varga, et pour les mêmes raisons, est relativement difficile à utiliser dans la pratique, car il faut introduire manuellement dans le calcul les possibles corrections d'aberrations.

Dans le prochain paragraphe, une simplification de ces deux modèles vectoriels est proposée.

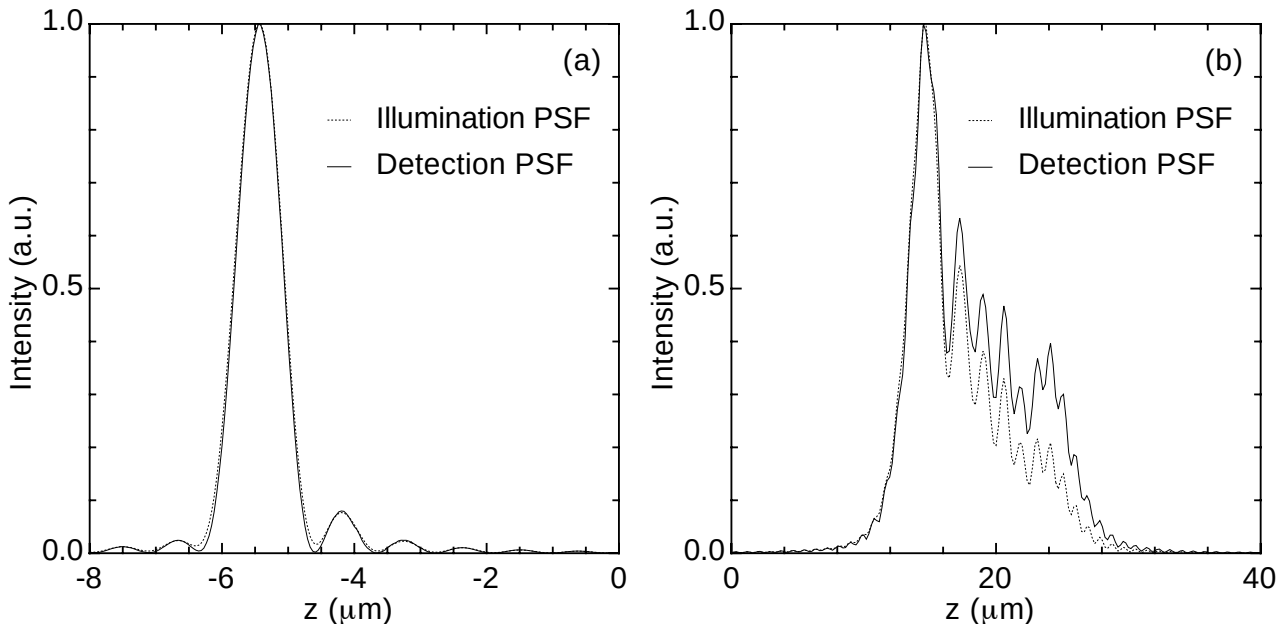


FIGURE 2.8. Comparaison RIO d'illumination et de détection. Mêmes conditions que pour la Figure 2.9 et pour une lamelle de (a) : 120 μm et (b) : 170 μm .

2.5 Simplification des modèles vectoriels

Le modèle scalaire de Gibson et Lanni a pour avantage d'introduire explicitement les paramètres du système optique considéré (spécimen + lamelle + milieu d'immersion + objectif), tels que recommandés par le fabricant et tels qu'ils sont en réalité (si connus). De ce fait, ce modèle a remporté un certain succès de part sa facilité d'utilisation. Il souffre cependant de plusieurs limitations. Tout d'abord la fonction d'apodisation $\cos^{1/2}\theta$ pour un objectif aplanétique obéissant à la condition des sinus d'Abbe n'est pas introduite. D'autre part, ce modèle considère que les rayons lumineux traversant le milieu stratifié sont transmis sans réflexion aux interfaces, c'est à dire à intensité constante. Même si l'on considère une émission de lumière non-polarisée, ce qui a pour effet de moyenner les différentes composantes, on peut légitimement douter de la précision des résultats obtenus avec ce modèle, en particulier pour les objectifs à grande ouverture numérique, pour lesquels les rayons marginaux arrivent à grande incidence.

En biologie, trois cas courant sont à considérer : les objectifs à immersion à air, à immersion à huile, et à immersion à eau. Comme l'ont fait remarquer Török et Varga, pour de tels milieux les coefficients de Fresnel r_s et r_p (équation (2.30)) sont très faibles et le dénominateur de l'expression (2.29) peut donc être considéré égal à un. En conséquence, la fonction d'aberration pour le milieu stratifié à trois composants peut s'écrire [17] :

$$\Psi = \sum h_i(n_{i+1} \cos \theta_{i+1} - n_i \cos \theta_i) \quad (2.49)$$

On se limitera au cas où l'ouverture numérique de l'objectif est limitée de telle sorte qu'il n'y a pas de rayons subissant une réflexion totale. On peut alors réécrire l'équation (2.49) avec les notation de Gibson et Lanni ($\rho = n_1 \sin \theta_1 / NA$, $n_1 \sin \alpha = NA$, $n_3 = n_s$, $n_2 = n_g$, $h_2 = t_s$ and $h_1 = t_s + t_g$) sous la forme [32]:

$$\Psi = -(t_s + t_g)n_i \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i}\right)^2} + n_s t_s \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_s}\right)^2} + n_g t_g \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_g}\right)^2} \quad (2.50)$$

La comparaison de l'équation (2.50) avec l'équation (2.15) met en évidence le parallèle entre les deux approches. Le second terme représente l'aberration introduite par la focalisation de l'onde à une profondeur ($h_2 = t_s$) sous la lamelle. Il est identique dans les deux cas. Le troisième terme représente l'aberration introduite par la lamelle. On le retrouve dans l'équation (2.15), accompagné d'un terme de compensation qui exprime le fait que l'objectif pré-introduit une aberration qui est exactement compensée quand une lamelle ayant les caractéristiques recommandées par le constructeur est utilisée. Le premier terme de l'équation (2.50) est à séparer en deux :

$$\Psi = \Psi_1 + \Psi_2 = -t_g n_i \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i}\right)^2} - t_s n_i \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i}\right)^2} \quad (2.51)$$

L'équation (2.51) représente la fonction d'aberration initiale. Le premier terme ne dépend que de ρ , et ne dépend pas de la profondeur du spécimen. Il est alors aisé de corriger cette aberration sphérique initiale en introduisant un terme de compensation, en disant que l'objectif introduit une aberration définie par :

$$\Psi_{obj} = +t_g n_i \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i}\right)^2} \quad (2.52)$$

de telle sorte que lorsqu'une lamelle d'épaisseur optimale est utilisée en combinaison avec un milieu d'immersion d'indice optimal, ces deux facteurs se compensent. Török et Varga considèrent le cas d'une onde plane focalisée dans un milieu à travers la lamelle, ce qui explique la présence d'un deuxième terme dans l'équation (2.51), qui n'est présent dans la formulation de Gibson et Lanni. Dans ce modèle, on considère au contraire un balayage d'une source ponctuelle pour acquérir la RIO en 3D. L'épaisseur du milieu d'immersion varie donc au cours de l'acquisition. En écrivant la variation d'épaisseur en fonction de la défocalisation, on obtient alors :

$$t_i = n_i \left[\frac{z}{n_i} + \left(\frac{t_{g^*}}{n_{g^*}} - \frac{t_g}{n_g} \right) + \left(\frac{t_{i^*}}{n_{i^*}} - \frac{t_s}{n_s} \right) \right] \quad (2.53)$$

En réécrivant la différence de chemin optique à l'aide de cette équation, on obtient alors l'expression finale de l'OPD qui fait apparaître les termes correspondants aux contributions des différentes composantes (spécimen, lamelle et milieu d'immersion) du système optique :

$$\begin{aligned} OPD \approx n_i \Delta_z \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i} \right)^2} + n_s t_s \left(\sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_s} \right)^2} - \left(\frac{n_s}{n_{i^{***}}} \right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i} \right)^2} \right) \\ + n_g t_g \left(\sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_g} \right)^2} - \left(\frac{n_i}{n_g} \right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i} \right)^2} \right) \\ - n_{g^*} t_{g^*} \left(\sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_{g^*}} \right)^2} - \left(\frac{n_i}{n_{g^*}} \right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i} \right)^2} \right) \\ - n_{i^*} t_{i^*} \left(\sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_{i^*}} \right)^2} - \left(\frac{n_{i^{***}}}{n_{i^*}} \right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i} \right)^2} \right) \end{aligned} \quad (2.54)$$

avec Δ_z la défocalisation du au scanning à travers le spécimen et NA l'ouverture numérique de l'objectif.

On reconnaît maintenant dans le premier terme de l'équation (2.54) le terme présent dans l'expression de Török et Varga. Nous avons ainsi établi l'équivalence entre les deux méthodes pour calculer les termes d'aberration. Ainsi, on peut maintenant proposer de combiner les deux méthodes, en calculant la RIO avec les intégrales de diffraction rigoureuses de Török et Varga pour lesquelles on calcule la différence de chemin optique par la méthode de Gibson et Lanni [32] :

$$\begin{aligned} I_{0ill}^{(3)} &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos\theta_1} \sin\theta_1 J_0(k_1 \sin\theta_1 r_p \sin\theta_p) (t_{12s} t_{23s} + t_{12p} t_{23p} \cos\theta_3) \exp(ik_0 OPD) d\theta_1 \\ I_{1ill}^{(3)} &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos\theta_1} \sin\theta_1 J_1(k_1 \sin\theta_1 r_p \sin\theta_p) t_{12p} t_{23p} \sin\theta_3 \exp(ik_0 OPD) d\theta_1 \\ I_{2ill}^{(3)} &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos\theta_1} \sin\theta_1 J_2(k_1 \sin\theta_1 r_p \sin\theta_p) (t_{12s} t_{23s} - t_{12p} t_{23p} \cos\theta_3) \exp(ik_0 OPD) d\theta_1 \end{aligned} \quad (2.55)$$

Pour vérifier numériquement le bien fondé de cette approche, nous avons calculé les RIO pour un objectif d'ouverture numérique 0,9, à immersion à air ($n_i=1$) à utiliser avec un lamelle d'indice $n_g=1,54$ et d'épaisseur 0,170 mm, en focalisant une onde à $\lambda=488$ nm à 50 μ m sous la lamelle.

La Figure 2.9 illustre les résultats pour une lamelle d'épaisseur effective (a) : 120 μ m, (b) : 170 μ m et (c) : 220 μ m. Ces courbes sont en fait identiques à celles calculées par Török et Varga [17]. La seule différence est qu'avec cette méthode, les RIO sont calculées dans un repère centré sur le point focal, alors que les courbes publiées en [17] sont présentées avec la distance de la dernière interface au point focal comme abscisse. Nous avons aussi calculé ces courbes sans approximation sur les coefficients de Fresnel. La différence est bien en dessous de 1%, ce qui justifie les approximations faites par Török et Varga, et donc valide aussi le parallèle qui été établi entre les deux méthodes. Notons enfin que la grande similitude entre les équations (2.55) et (2.2) indique qu'il doit être facile de modifier le code XCOSM pour combiner la facilité d'utilisation de ce logiciel avec la rigueur de l'approche de Török et Varga.

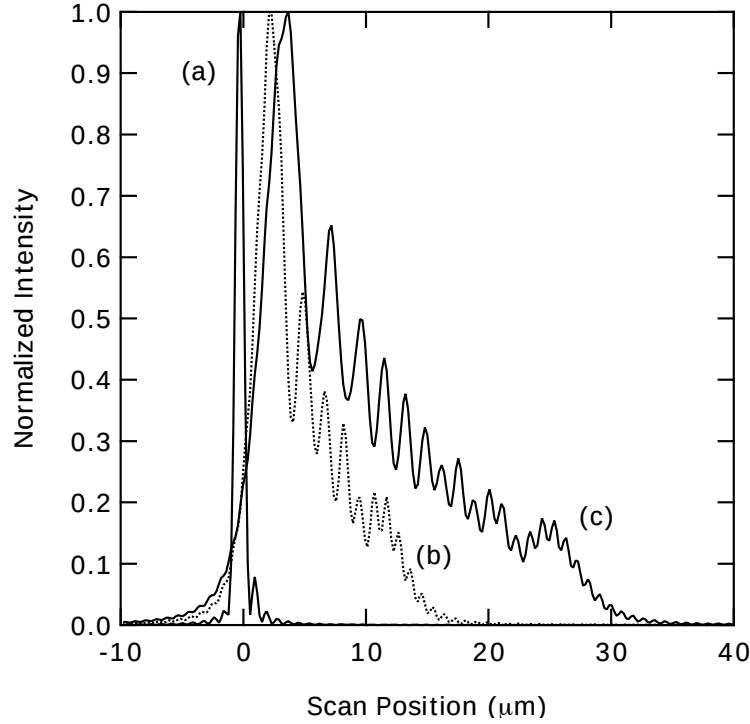


FIGURE 2.9. RIO en illumination calculées avec le modèle vectoriel de Török et Varga combinant l'approche de Gibson et Lanni pour le calcul de la fonction d'aberration.

Une analyse de la fonction d'aberration et des coefficients de Fresnel *en détection* montre que ceux-ci ont la même forme que la fonction d'aberration et les coefficients de Fresnel *en illumination*. Le raisonnement précédent s'applique donc aussi aux intégrales de diffraction en détection. On montre alors qu'on a [33] :

$$\begin{aligned}
 I_{0det}^{(3)} &= \int_0^{\alpha_d} \cos^{-1/2} \theta'_1 \sin 2\theta_d (t_{32s} t_{21s} + t_{32p} t_{21p} \cos \theta_3) J_0(k_d \rho \sin \theta_d) \exp(-ik_0 OPD) d\theta_d \\
 I_{1det}^{(3)} &= \int_0^{\alpha_d} \cos^{-1/2} \theta'_1 \sin 2\theta_d t_{32p} t_{21p} \sin \theta_3 J_1(k_d \rho \sin \theta_d) \exp(-ik_0 OPD) d\theta_d \\
 I_{2det}^{(3)} &= \int_0^{\alpha_d} \cos^{-1/2} \theta'_1 \sin 2\theta_d (t_{32s} t_{21s} - t_{32p} t_{21p} \cos \theta_3) J_2(k_d \rho \sin \theta_d) \exp(-ik_0 OPD) d\theta_d
 \end{aligned} \tag{2.56}$$

La Figure 2.10 montre les résultats obtenus pour les RIO de détection dans les mêmes conditions que pour la Figure 2.9. Sans aberration (courbe (a)), les RIO de détection et d'illumination sont quasi-identiques. Pour les courbes (b) et (c), des différences notables apparaissent. La validité de l'approximation utilisée a été vérifiée. La Figure 2.11 montre la courbe (c) (lamelle de 220 μm) calculée avec approximation (trait pointillé) et sans approximation (trait plein) (cette courbe a été multipliée par 10 pour plus de clarté). Les deux courbes sont quasi identiques, avec de très faibles différences visibles seulement dans les anneaux de diffraction d'ordre élevé, de très faible intensité, et d'intérêt pratique nul, en raison du bruit dans les images de fluorescence.

Pour conclure, nous disposons donc maintenant de modèles vectoriels rigoureux aussi bien pour le calcul des RIO d'illumination que pour le calcul des RIO de détection. De plus, ces modèles sont faciles à utiliser, de par leur modification à l'aide de la méthode de Gibson et Lanni pour calculer la fonction d'aberration. Introduire de manière explicite les conditions d'utilisation optimales telles que recommandées par le fabricant de l'objectif et les conditions réelles devrait faciliter leur adoption par les non-spécialistes de l'optique.

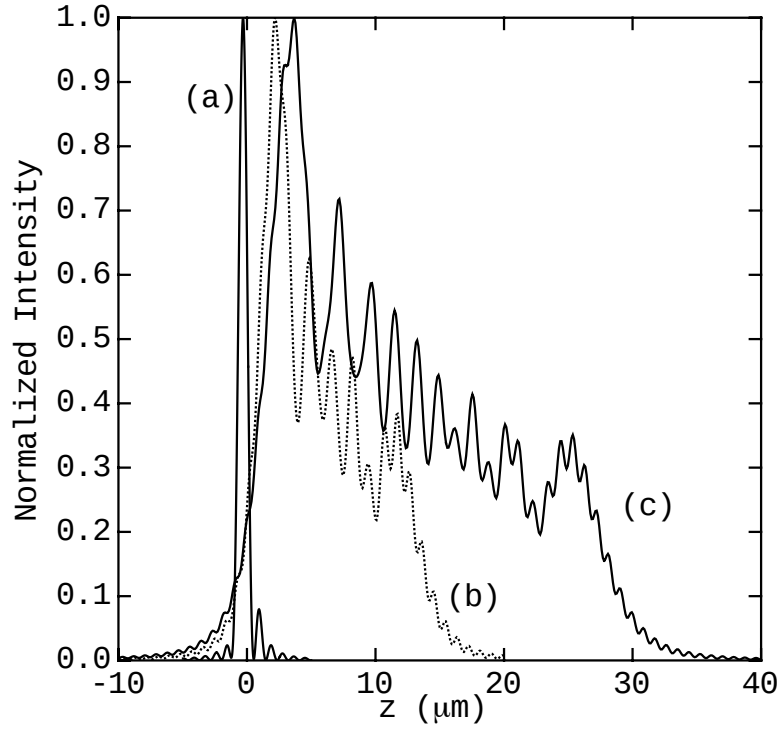


FIGURE 2.10. RIO en détection calculées avec le modèle vectoriel de Török et Varga combinant l'approche de Gibson et Lanni pour le calcul de la fonction d'aberration.

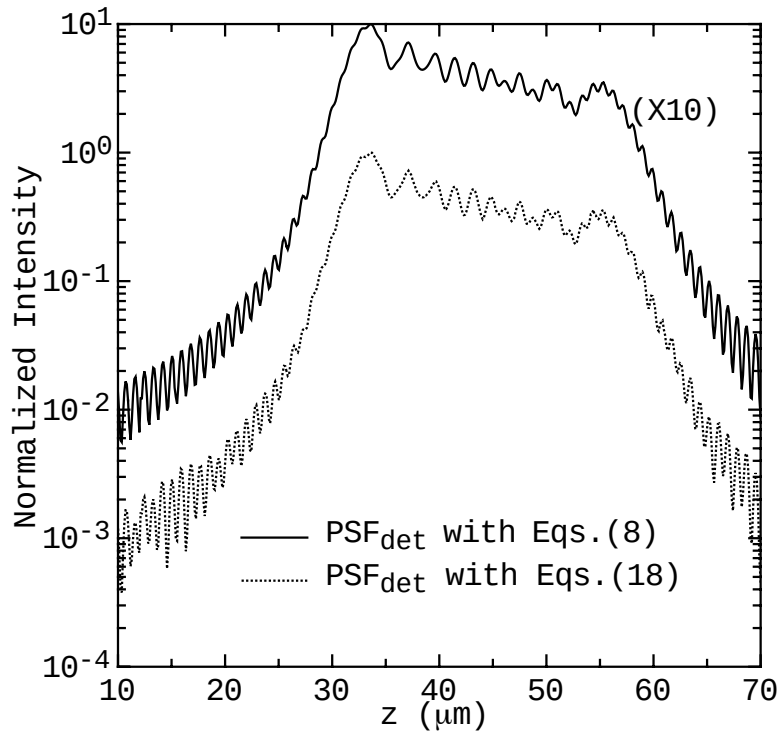


FIGURE 2.11. Comparaison des RIO de détection calculées avec (Eqs. (2.56)) et sans approximation (Eqs. (2.46)) pour la courbe (c) de la Figure 2.10. Les courbes sont quasi-identiques, ce qui prouve la validité de l'approche proposée.

2.6 Modélisation du microscope confocal de fluorescence

Nous disposons maintenant de tous les éléments nécessaires à une modélisation rigoureuse du microscope confocal, à savoir un modèle précis de calcul de l'illumination, ainsi qu'un modèle rigoureux de détection. Le point fondamental restant est la modélisation de l'interaction entre le champ incident et le spécimen, qui donnera naissance au champ électromagnétique détecté.

Dans le cas de la fluorescence, quatre cas extrêmes sont à considérer suivant la nature de l'excitation du dipôle et le mécanisme de réémission photonique [27][28][19] :

- Dipôle permanent à l'excitation et fixe à l'émission
- Dipôle permanent à l'excitation et libre à l'émission
- Dipôle induit à l'excitation et fixe à l'émission
- Dipôle induit à l'excitation et libre à l'émission

Lorsque le dipôle est fixe à l'excitation, on obtient le moment d'excitation simplement par le produit scalaire du moment dipolaire par le champ électrique d'excitation, calculé à partir de la RIO en illumination. Lorsque le dipôle est induit, on considère que le moment dipolaire est proportionnel au champ électrique d'excitation, et colinéaire à celui-ci (on négligera les phénomènes de saturation).

En microscopie de fluorescence, les temps de pose nécessaires à l'acquisition d'une image sont longs devant les phénomènes d'excitation et de désexcitation. Le signal enregistré correspond donc toujours à une moyenne. Lorsque le dipôle est libre de tourner sur lui même entre l'excitation et la désexcitation, cela revient donc à moyenner la RIO de détection sur toutes les orientations spatiales possibles du dipôle.

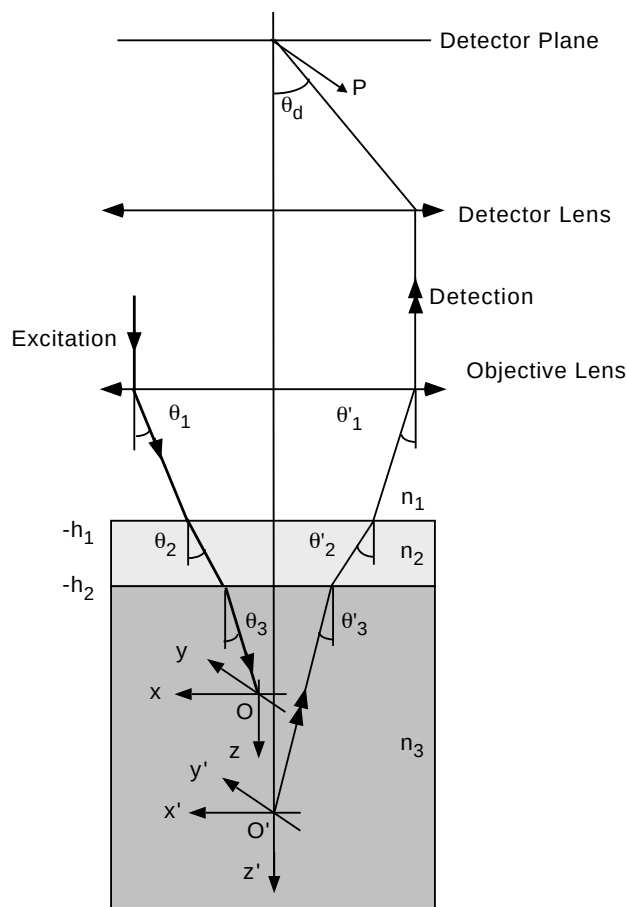


FIGURE 2.12. Combinaison des modèles de Török et Varga en illumination et de Haeblerlé *et al.* en détection pour modéliser un microscope confocal.

Dans ce cas, on montre que la RIO du microscope confocal non polarisé est obtenue en multipliant la RIO d'illumination par la RIO de détection [20]. Dans les travaux précédemment publiés, on considère que ces deux RIO sont identiques, ce dont nous allons discuter maintenant.

Nous avons donc la possibilité de calculer simplement la RIO d'un microscope confocal en combinant les modèles développés auparavant pour l'excitation et la détection. La Figure 2.12 décrit le principe. La RIO d'illumination est calculée dans le repère (x,y,z) centré en O. Une molécule fluorescente au voisinage de O est excitée par le champ incident. Cette molécule réémet un champ électromagnétique calculé dans le référentiel (x',y',z') centré en O'. Pour la lisibilité du schéma, la distance entre O et O' a été grandement exagérée.

2.6.1 Applications biologiques

Pour les applications biologiques, on se limitera aux trois cas précédemment cités, à savoir l'objectif à sec (air), à immersion à huile, et à immersion à eau [31]-[33]. Les RIOs en illumination et détection pour l'objectif à sec ont été présentées dans le Paragraphe 2.4. Pour le cas le plus simple, on considérera que la RIO du microscope confocal est simplement obtenue par multiplication des RIOs d'illumination et de détection.

La Figure 2.13 illustre les résultats obtenus pour deux cas considérés précédemment.

Lorsque une forte aberration due au désaccord des indices et à la profondeur du specimen est compensée par l'utilisation d'une lamelle de moindre épaisseur, la RIO confocale calculée de manière habituelle (courbe en pointillés), en considérant les RIO d'illumination et de détection identiques, est confondue avec la RIO calculée rigoureusement (courbe pleine).

On constate que l'effet de confocalisation réduit aussi grandement la différence dans le cas défavorable de l'utilisation d'un lamelle standard (170 μm) à grande profondeur.

Le cas de l'objectif à air est intéressant car il représente sans doute le pire scénario en microscopie de fluorescence (forts sauts d'indices).

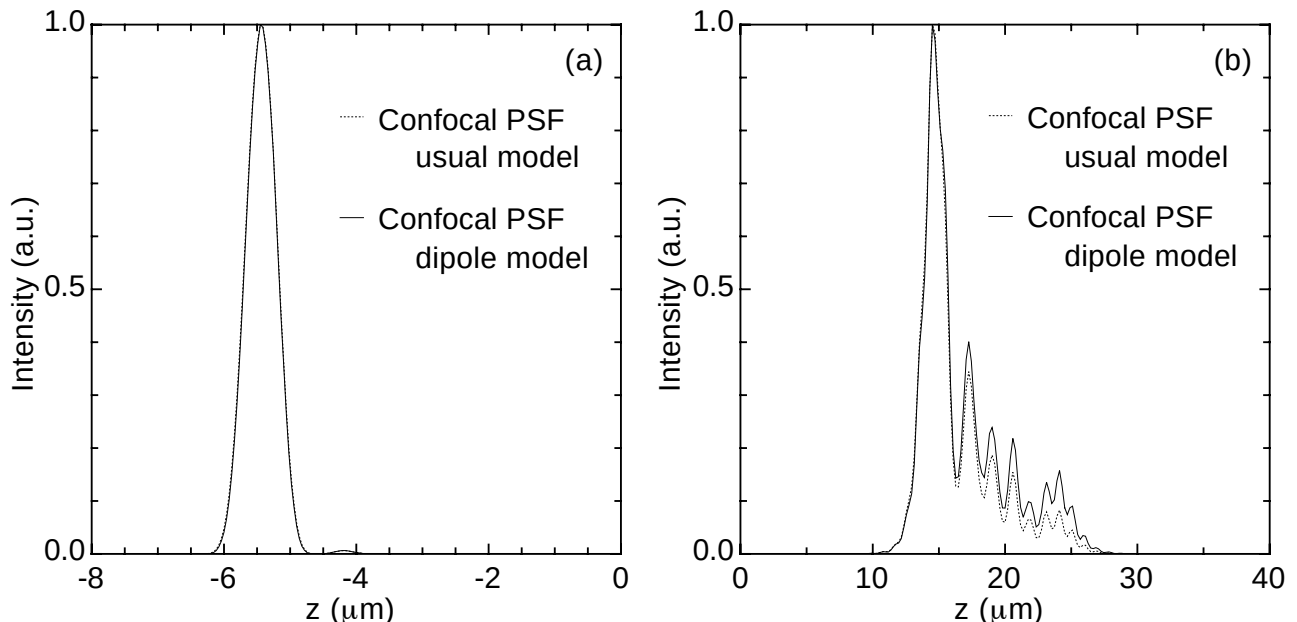


FIGURE 2.13. RIO d'un microscope confocal selon l'approximation usuelle (RIOs d'illumination et de détection identiques) et le modèle rigoureux. Mêmes conditions que pour la Figure 2.9 et pour une lamelle de (a) : 120 μm et (b) : 170 μm . Une légère différence persiste.

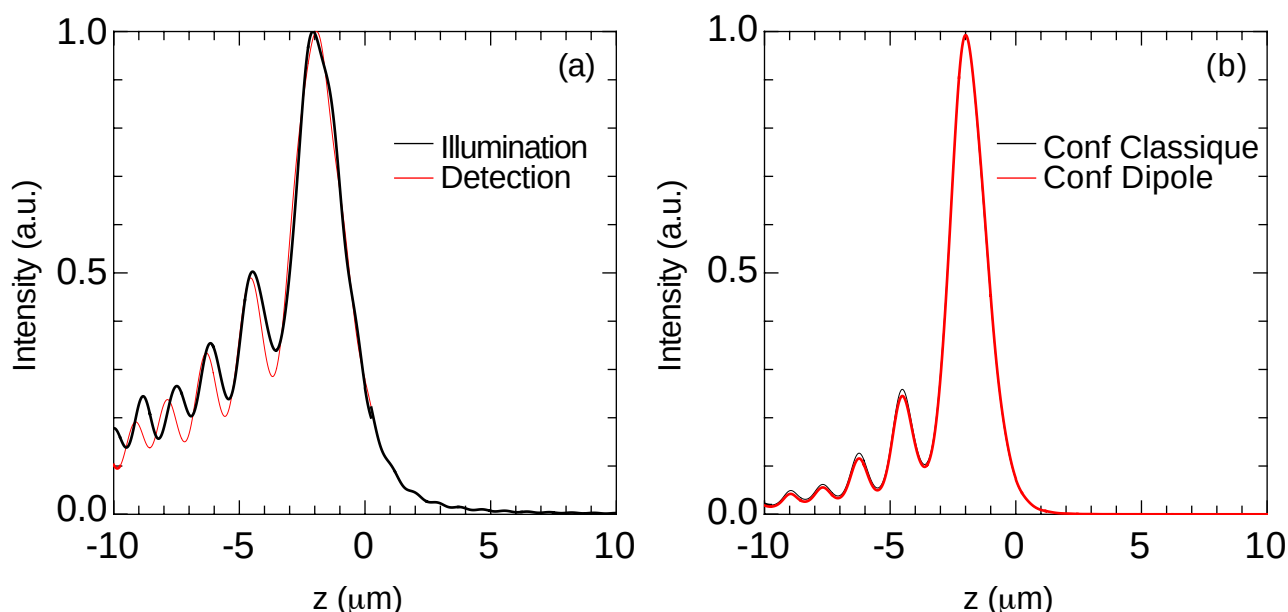


FIGURE 2.14. (a) : RIO d'illumination et de détection pour un objectif à immersion à huile d'ouverture numérique 1.4. Le spécimen est à 50 μm de profondeur. Les courbes sont très semblables. Les RIO confocales approximées et rigoureuses de la Figure (b) sont donc très similaires

Dans le cas d'un objectif à immersion à huile, les résultats sont toujours bien meilleurs.

Ceci est illustré par la Figure 2.14, qui présente pour le même spécimen considéré (à 50 μm de profondeur) les RIO d'illumination et de détection, et les RIO confocales, approximées et rigoureuses, pour un objectif d'ouverture numérique 1.4. Les différences entre illumination et détection sont maintenant minimales.

Enfin, pour un objectif à immersion à eau, qui ne serait pas affecté d'aberration sphérique, les RIO d'illumination et de détection sont toujours quasi-identiques, et bien entendu invariantes en profondeur. Numériquement, une infime différence persiste, à cause de la fonction d'apodisation différente dans les intégrales de diffraction en illumination et détection.

La configuration du microscope biphoton a aussi été étudiée. Dans ce cas, on considère que la probabilité d'excitation est proportionnelle au carré de l'intensité d'illumination (effet non linéaire (quadratique) dû à l'absorption simultanée de deux photons). L'excitation biphotonique permet l'observation dans des spécimens épais pour deux raisons. Tout d'abord, elle permet de réaliser des coupes optiques sans avoir recours à un montage confocal, permettant ainsi de collecter de manière plus efficace les photons de fluorescence, souvent peu nombreux. Enfin, l'utilisation de rayonnement infrarouge permet une beaucoup plus grande profondeur de pénétration, grâce à la diffusion réduite des photons incidents (dans la peau par exemple).

Il existe une autre raison. La Figure 2.15(a) montre les RIO d'illumination calculées pour un objectif à immersion à huile d'ouverture numérique $\text{N.A.} = 1.4$, pour une longueur d'onde d'excitation de 900 nm (illumination biphoton), et pour une profondeur d'observation de 0 μm et 100 μm sous une lamelle de verre de 170 μm , dans un spécimen aqueux. La RIO d'un processus à n-photon est calculée comme la puissance n de la RIO du processus monophoton à la même longueur d'onde. Les RIO d'illumination calculées à 450 nm sont aussi indiquées.

Tout d'abord, il faut remarquer que contrairement à la microscopie classique, ou à la microscopie confocale, la résolution d'un microscope multiphoton est déterminée non pas par la RIO de détection, mais par la RIO d'illumination. En effet, le processus de coupe optique est entièrement déterminé par l'excitation, la détection pouvant se faire sans pinhole.

Sous la lamelle, la résolution d'un microscope biphoton (non-confocal ou confocal) est en fait moins bonne que celle du microscope monophoton à la longueur d'onde équivalente. Ceci est dû au fait qu'élever au

carré la RIO ne compense pas la perte de résolution d'un facteur 2 due à l'utilisation d'une longueur d'onde double (900 nm au lieu de 450 nm).

A une profondeur de 100 μm sous la lamelle, la RIO de l'excitation à 1 photon est beaucoup plus dégradée que son homologue à 2 photons. Ceci s'explique par le fait qu'un faisceau de longueur d'onde plus élevée est moins affecté par l'aberration sphérique, et donc, la RIO d'illumination est plus concentrée. Ceci a pour effet de réduire le phénomène de photobleaching par rapport à une excitation à 1 photon. De plus, l'aberration sphérique réduite, combinée à la diffusion moindre aux grandes longueurs d'onde, contribue aussi à concentrer les photons disponibles dans un petit volume, ce qui augmente l'efficacité du processus d'excitation biphotonique.

On lit souvent que le microscope biphoton ne requiert pas de confocalisation, de part ses qualités intrinsèques de coupe optique dues à l'effet quadratique d'excitation. Cependant, on peut évidemment lui associer une détection confocale pour améliorer encore la résolution. On considère maintenant une détection à 600 nm. La Figure 2.15(b) montre la RIO de détection à 600 nm (ligne grise), la RIO confocale d'un microscope à excitation monophotonique à 450 nm (ligne pleine épaisse), et la RIO confocale d'un microscope à excitation biphotonique à 900 nm (ligne pointillée épaisse), ainsi que la RIO non-confocale d'un microscope à excitation biphotonique à 900 nm (ligne pointillée fine).

La résolution (en z) pour le microscope confocal monophotonique est de 2.3 μm , comparée à 2.2 μm pour le confocal biphoton. On a donc maintenant une résolution meilleure pour le microscope biphoton, contrairement au cas précédent sous la lamelle. Le microscope biphoton non-confocal a une résolution de 3.2 μm seulement, soit 50% moins bonne. Ceci constitue un argument fort en faveur de la confocalisation systématique des microscopes biphoton utilisés dans des conditions fortement aberrantes (observation sous la peau par exemple). On pourra aussi noter le léger décalage (1 μm à une profondeur de 100 μm) du point focal entre les microscopes monophoton et biphoton.

On peut donc conclure que pour toutes les applications biologiques courantes, les modèles de RIO en illumination et en détection donnent des résultats très proches, et que même en cas de fortes aberrations, le modèle de RIO confocale approximatif couramment utilisé donne d'excellents résultats.

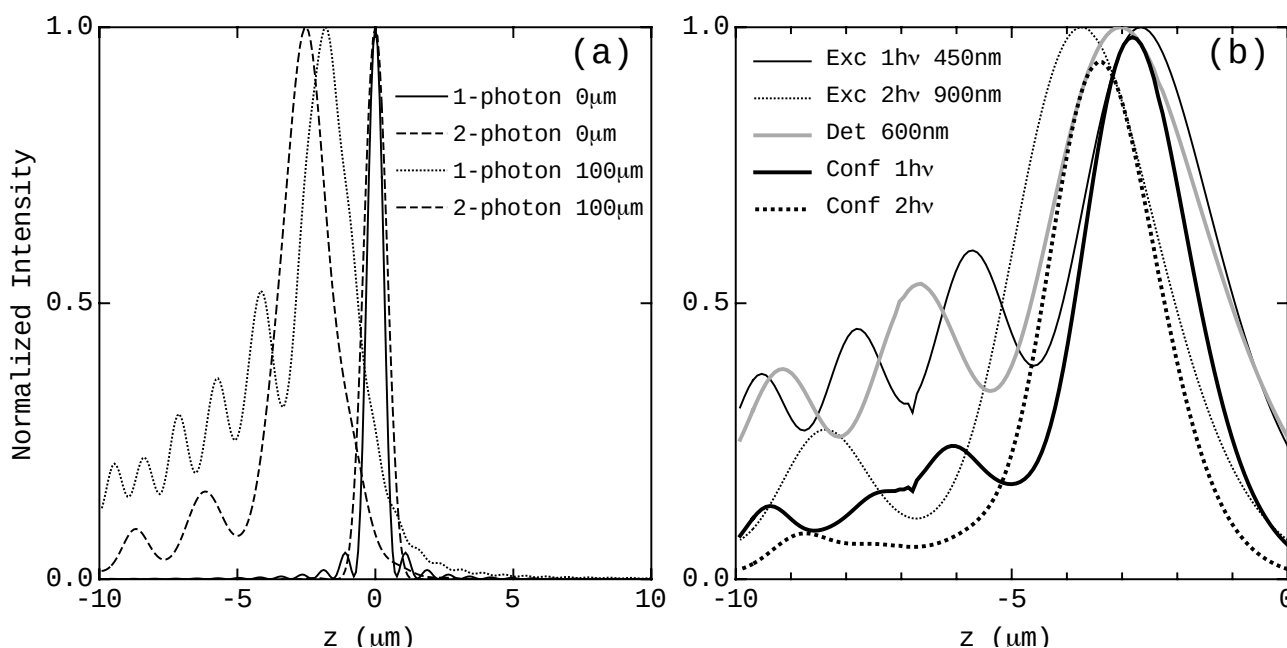


FIGURE 2.15. (a) RIO d'illumination à 900 nm (processus biphoton) et 450 nm (excitation monophoton) pour un objectif à immersion à huile d'ouverture numérique 1.4, observant dans un milieu aqueux, à 0 μm et 100 μm sous une lamelle de verre de 170 μm d'épaisseur. (b) RIOs d'excitation, de détection et totale d'un microscope confocal à excitation biphotonique à 900 nm et monophotonique à 450 nm avec une détection confocale à 600 nm, observation à 100 μm de profondeur.

2.6.2 Cristallographie

Le microscope est aussi un instrument de choix en cristallographie, pour l'étude des défauts, des inclusions, centres colorés etc... dans les cristaux, naturel (gemnologie) ou artificiels (diamant polycristallin en micro-électronique par exemple). Pour les cristaux, les indices de réfraction dans le visible sont extrêmement élevés. Par exemple, le diamant à un indice $n=2.418$ dans le visible ($\lambda=633$ nm). Dans le cas d'objectifs à air souvent utilisés, on peut donc s'attendre à de grandes différences entre les RIO d'illumination et de détection.

On s'intéressera en particulier à un critère important dans la pratique, à savoir la résolution longitudinale, dont on attend une forte dégradation à mesure que la profondeur augmente, l'aberration sphérique étant très importante. La Figure 2.16 présente la résolution (définie par le critère de largeur à mi-hauteur de la RIO) des RIO en illumination et en détection en fonction de la profondeur d'observation, pour un objectif à air d'ouverture numérique $N.A.=0.9$ et à une longueur d'onde $\lambda=633$ nm.

On observe deux phénomènes [31]-[33] :

- les courbes sont très différentes, ce qui confirme l'affirmation que dans le cas de forts sauts d'indices, les RIO de détection et d'illumination sont très différentes.
- parfois, la résolution varie très fortement pour de petites variations de profondeur.

La Figure 2.17 présente quelques cas de RIO qui permettent d'expliquer ces deux observations. Pour une profondeur de $46,5 \mu\text{m}$, on observe sur la Figure 2.17(a) que le premier minimum de la RIO de détection est légèrement inférieur à 0.5, ce qui n'est pas le cas pour la RIO d'illumination. Ceci explique que les résolutions paraissent très différentes, alors que l'allure générale de la courbe est la même.

La Figure 2.17(b) montre la RIO de détection à une profondeur de $70 \mu\text{m}$ et $73.5 \mu\text{m}$. On observe là que le premier minimum des courbes à 0.5 définissant la résolution est décalé de près de $2 \mu\text{m}$. Ceci explique la très forte variation de résolution pour une variation de profondeur de $3.5 \mu\text{m}$ seulement, alors que là encore, l'allure générale des courbes est très semblable.

On peut donc s'interroger à la vue de ces deux exemples sur la pertinence du critère de résolution défini comme la largeur à mi-hauteur dans le cas de RIO présentant de fortes aberrations.

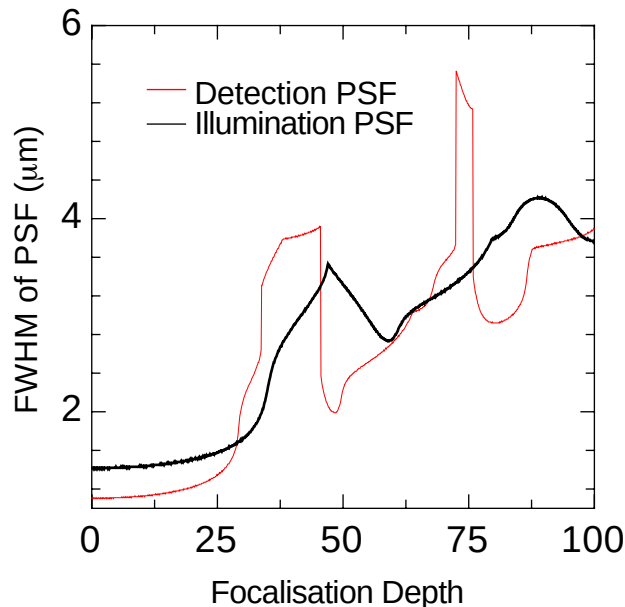


FIGURE 2.16. Variation en fonction de la profondeur d'observation de la résolution longitudinale des RIO d'illumination et de détection dans le diamant. $N.A.=0.9$, $\lambda=633$ nm.

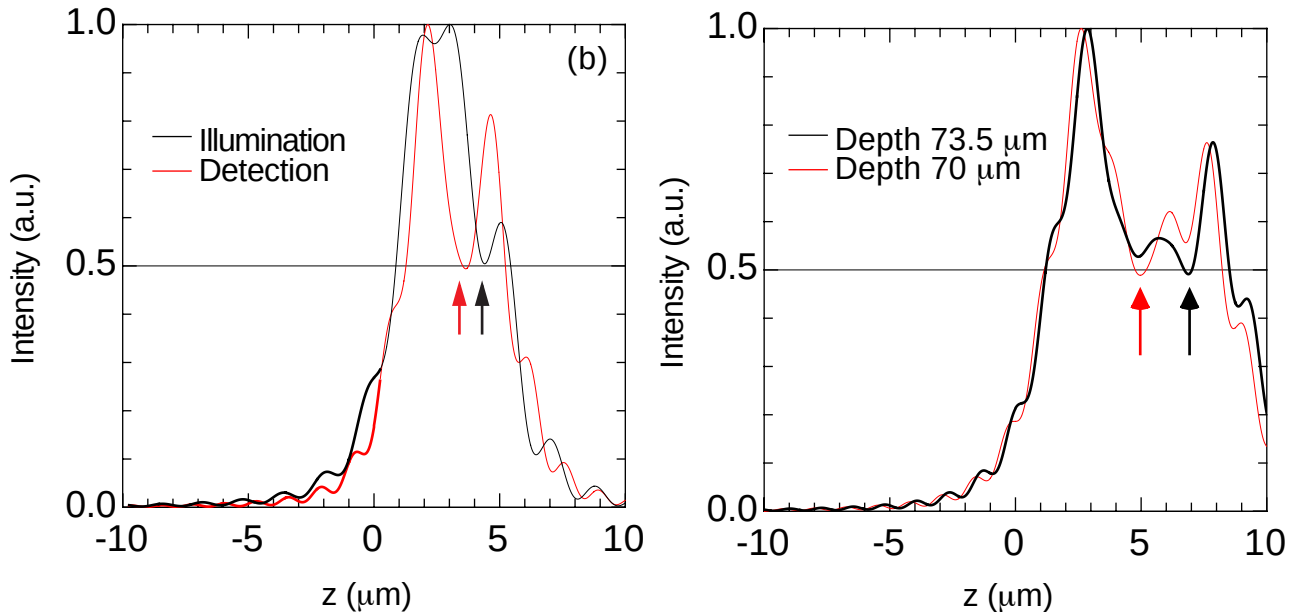


FIGURE 2.17. (a): RIO d'illumination et de détection à une profondeur de 46,5 μm . La forme très différente des RIO explique la différence de résolution. (b) RIO de détection à une profondeur de 70 μm et 73,5 μm : la variation très rapide de la RIO explique la grande différence de résolution sur une aussi petite différence de profondeur.

Nous nous intéressons maintenant à un cas plus particulier, celui d'une couche de diamant déposé sur un support de silicium, observé dans l'infrarouge proche ($\lambda=1.3 \mu\text{m}$), domaine où le silicium est transparent. Cette configuration est potentiellement intéressante pour la microélectronique, le diamant ayant des propriétés d'isolant, de semi-conducteur ou de conducteur selon le dopage, le silicium étant le matériaux de base de toute l'industrie microélectronique, et ce pour encore de nombreuses années.

Pour cette configuration, les sauts d'indice sont très importants de 1 à 2,44 (air-diamant), et 2,44 à 3,5 (diamant-silicium). Dans ces cas, les coefficients de Fresnel en réflexion à chaque interface ne peuvent être plus être négligés, et l'approximation qui avait permis d'établir l'équivalence entre les modèle de Gibson et Lanni et le modèle de Török et Varga pour le calcul de la RIO d'illumination n'est sans doute plus valable. Il en est évidemment de même pour le calcul de la RIO de détection.

La Figure 2.18 montre les RIO d'illumination et de détection calculées pour un tel milieu air/diamant/silicium à une profondeur de 100 μm dans le silicium, et pour une épaisseur de diamant de 1 μm et 20 μm . Les courbes sont calculées avec et sans approximation.

On constate tout d'abord que les courbes d'illumination et de détection sont différentes, contrairement à l'approximation couramment admise.

D'autre part, les courbes calculées avec et sans approximation sont aussi légèrement différentes. Le calcul de la fonction d'aberration par la méthode de Gibson et Lanni devient incorrect dans ce cas.

La Figure 2.18(c) montre la RIO confocale calculée avec et sans approximation. Par un heureux hasard, les erreurs sur les RIO d'illumination et de détection calculées avec la fonction d'aberration de Gibson et Lanni se compensent, et la RIO finale est très proche de la RIO calculée par la méthode rigoureuse. On peut donc toujours utiliser l'approximation proposée au Paragraphe 2.5, même dans ce cas extrême, mais il convient d'être prudent.

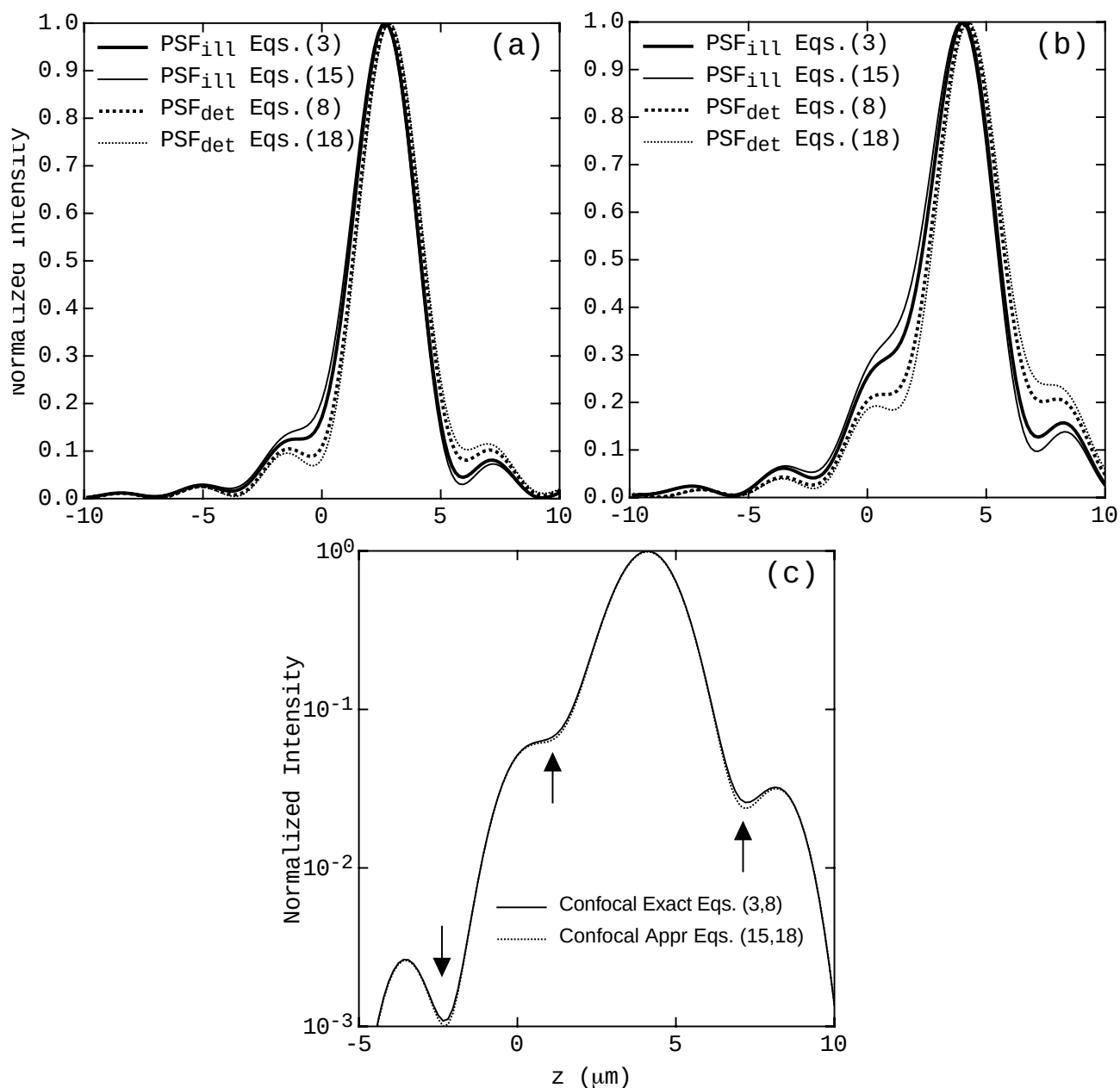


FIGURE 2.18. RIO en illumination et détection pour un milieu air/diamant/silicium observé dans l'infrarouge. Les courbes sont calculées avec et sans approximation sur les coefficients de Fresnel pour un milieu stratifié. Epaisseur de la couche de diamant (a) : 1 μm et (b) : 20 μm . (c) RIO confocale correspondant à la Figure (b).

2.7 Application au Microscope thème polarisé

En microscopie classique et même confocale, un compromis entre distance de travail et résolution doit être accepté. Les objectifs à grande distance de travail ont généralement une faible ouverture numérique, et donc une mauvaise résolution, en particulier le long de l'axe optique. Les objectifs à grande ouverture numérique permettent une bien meilleure résolution, mais au prix d'une distance de travail très courte. Nikon a récemment introduit un nouveau standard d'objectifs permettant d'allonger la distance de travail. Cette solution a cependant l'inconvénient de rendre obsolète les matériels existants, de plus ce "standard" n'est pour l'heure suivi que par Nikon.

Le microscope thème a été proposé pour combiner haute résolution et grande distance de travail voici quelques années déjà [34]-[38]. Il présente l'avantage unique de permettre l'étude de grands spécimens biologiques avec une bonne résolution. L'idée est de diminuer la taille de la tache de focalisation en utilisant deux objectifs de microscopes croisés. Ainsi, la résolution longitudinale plus faible de l'objectif de détection est compensée par le fait que son axe optique correspond à un axe latéral de l'objectif d'illumination.

La Figure 2.19 décrit la configuration considérée. L'objectif 1 est utilisé pour l'excitation de fluorescence, et l'objectif 2 sert à la détection confocale. La configuration optique considérée impose d'utiliser des objectifs sans lamelle. Dans ce cas, le modèle de Richards et Wolf décrit bien la RIO d'illumination [13]. On considère une onde plane, polarisée linéairement selon l'axe x , et focalisée par l'objectif 1 à l'origine du repère (x,y,z) . Le champ électrique au point P de coordonnées $x=x', y=-z', z=y'$ (le repère (x,y,z) s'applique au bras de détection, le repère (x',y',z') s'appliquant au bras d'illumination) s'écrit alors :

$$\begin{aligned} E_x(x, y, z) &= -i(I_0 + I_2 \cos 2\Phi) \\ E_y(x, y, z) &= 2I_1 \cos \Phi \\ E_z(x, y, z) &= -iI_2 \sin 2\Phi \end{aligned} \quad (2.57)$$

Pour un système obéissant à la condition des sinus d'Abbe et illuminé par une onde plane polarisée, on a :

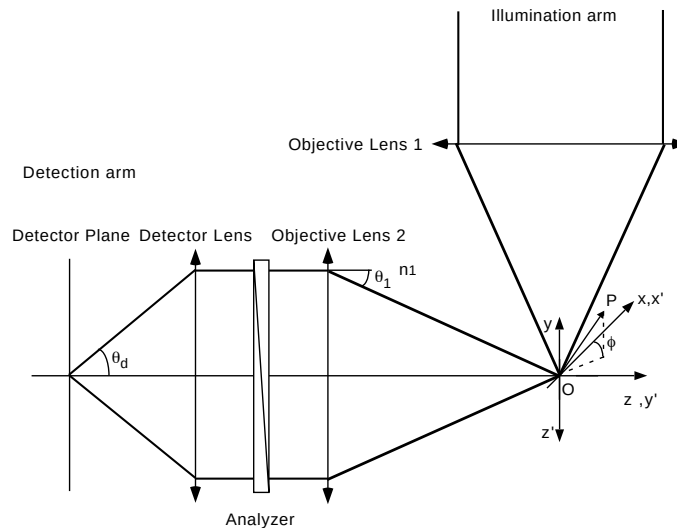


FIGURE 2.19. Schéma d'un microscope confocal thème. L'objectif 1 sert à l'excitation du spécimen et l'objectif 2 à la détection confocale du signal de fluorescence. Un analyseur peut être inséré dans le bras de détection pour l'étude de la polarisation du signal de fluorescence.

$$\begin{aligned}
I_0 &= \int_0^\alpha a(\theta) \sin \theta (1 + \cos \theta) J_0(k\sqrt{x^2 + z^2} \sin \theta) \exp(-iky \cos \theta) d\theta \\
I_1 &= \int_0^\alpha a(\theta) \sin^2 \theta J_1(k\sqrt{x^2 + z^2} \sin \theta) \exp(-iky \cos \theta) d\theta \\
I_2 &= \int_0^\alpha a(\theta) \sin \theta (1 - \cos \theta) J_2(k\sqrt{x^2 + z^2} \sin \theta) \exp(-iky \cos \theta) d\theta
\end{aligned} \tag{2.58}$$

Dans les équations (2.57) et (2.58), $a(\theta)$ représente la fonction d'apodisation qui vaut pour un système obéissant à la condition des sinus d'Abbe et sans aberration $a(\theta) = \cos^{1/2}\theta$, r représente la distance radiale et ϕ est l'angle entre la direction d'observation au point P et l'axe de polarisation de l'onde incidente (en coordonnées cylindriques), $k=k_0.n$ avec n l'indice du milieu d'immersion et α est l'angle d'ouverture de la lentille.

Le traitement classique du microscope θ (et du microscope confocal) consiste à considérer que la molécule fluorescente excitée se comporte comme un émetteur isotropique, émettant une onde non-polarisée. La RIO finale est alors simplement calculée en multipliant la RIO d'illumination avec la RIO de détection. Pour un montage θ , on obtient alors :

$$PSF^{\theta}(x, y, z) = PSF_{ill}(x, y, z)PSF_{det}(-z, y, x) \tag{2.59}$$

De plus on néglige souvent la différence de longueur d'onde entre l'émission et l'excitation, pour ne retenir que :

$$PSF^{\theta}(x, y, z) = PSF_{ill}(x, y, z)PSF_{ill}(-z, y, x) \tag{2.60}$$

Dans cette approche, la RIO de détection et la RIO d'illumination sont calculées en utilisant le modèle de Richard et Wolf. Ce modèle s'applique cependant à une onde focalisée vers le milieu, et est donc valide pour calculer la RIO d'illumination, mais calculer la RIO de détection comme une RIO d'illumination constitue une autre approximation.

La Figure 2.21 présente les RIO d'excitation, de détection et globale pour un microscope θ calculée en considérant une excitation à 400 nm et une détection à 450 nm. Ces longueurs d'onde correspondent à l'utilisation du colorant Cascade Blue de Molecular Probes (Figure 2.20). On considère des objectifs à immersion à eau d'ouverture numérique N.A.=0.8 avec une distance de travail de 3.3 mm qui permettent un montage θ .

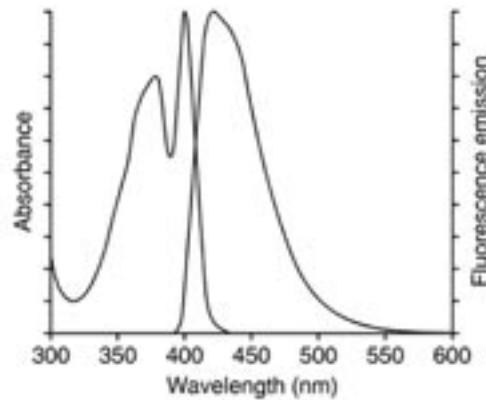


FIGURE 2.20. Spectres d'excitation et d'émission pour le colorant Cascade Blue de Molecular Probes fixé sur albumine bufferisée à pH 7.0 (Document Molecular Probes).

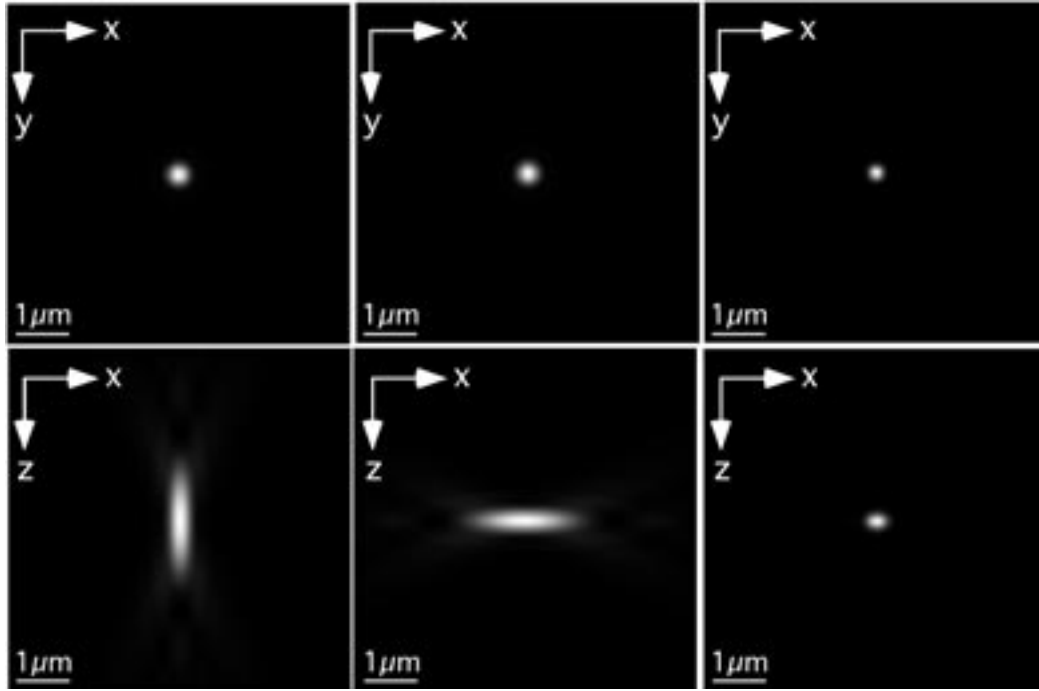


FIGURE 2.21. Gauche : RIO d'excitation à 400 nm, milieu : RIO de détection à 450 nm et droite : RIO globale d'un microscope θ utilisant des objectifs à eau d'ouverture numérique 0.8.

La RIO finale promet une bien meilleure résolution selon l'axe optique de l'objectif de détection car l'émission selon cet axe est bien limitée par la RIO d'excitation. Le microscope θ est donc caractérisée par une RIO quasi-isotrope. La résolution est cependant plus faible que pour d'autres types de microscope à plusieurs objectifs (voir paragraphe suivant), à cause de l'emploi d'objectifs à faible ouverture numérique.

Le modèle utilisé pour calculer ces RIO est cependant une approximation supposant l'émission de fluorescence isotrope et non-polarisée. En appliquant les développements du microscope confocal exposés dans le paragraphe précédent à la configuration particulière du microscope θ , j'ai proposé un modèle rigoureux tenant compte de la nature polarisée de la lumière de fluorescence (modèle dipolaire) et de la théorie électromagnétique de la diffraction appliquée aux objectifs à grande ouverture numérique [39].

Dans ce modèle, la molécule fluorescente agit donc comme un diffuseur ponctuel dont le champ lointain est celui d'un dipôle, dont le moment $\mathbf{p}$ est proportionnel au champ d'illumination. En coordonnées cartésiennes, on obtient donc (voir Figure 2.19) :

$$p_x = -i(I_0 + I_2 \cos 2\Phi) \quad p_y = 2I_1 \cos \Phi \quad p_z = -iI_2 \sin 2\Phi \quad (2.61)$$

Le champ lointain est toujours donné par la relation :

$$\mathbf{E}_{dp} = -\mathbf{r} \times (\mathbf{r} \times \mathbf{p}) \quad (2.62)$$

Le champ électrique dipolaire est collimaté par l'objectif de détection, passé à travers un analyseur, et refocalisé sur le détecteur. En considérant une lentille de refocalisation de faible ouverture numérique, un détecteur quadratique enregistre donc l'intensité $I = |\mathbf{E}_d|^2$, $\mathbf{E}_d$ étant la transformée de Fourier du champ scalaire :

$$\begin{aligned} E_{dx} &= p_x(I_0^d + I_2^d \cos 2\Phi_p) + p_y I_2^d \sin 2\Phi_p - 2ip_z I_1^d \cos \Phi_p \\ E_{dy} &= p_x I_2^d \sin 2\Phi_p + p_y(I_0^d - I_2^d \cos 2\Phi_p) - 2ip_z I_1^d \sin \Phi_p \end{aligned} \quad (2.63)$$

On obtient donc l'expression de la RIO après l'analyseur :

$$PSF(x, y, z) = \left| \cos^2 \gamma E_{dx} + \sin \gamma \cos \gamma E_{dy} \right|^2 + \left| \sin \gamma \cos \gamma E_{dx} + \sin^2 \gamma E_{dy} \right|^2 \quad (2.64)$$

avec :

$$\begin{aligned} I_0^d &= \int_0^{\alpha_d} \sqrt{\cos \theta_1} \sin 2\theta_d J_0(k\rho \sin \theta_d) (1 + \cos \theta_1) \exp(-ik_1 z_s \cos \theta_1) d\theta_d \\ I_1^d &= \int_0^{\alpha_d} \sqrt{\cos \theta_1} \sin 2\theta_d J_1(k\rho \sin \theta_d) \sin \theta_1 \exp(-ik_1 z_s \cos \theta_1) d\theta_d \\ I_2^d &= \int_0^{\alpha_d} \sqrt{\cos \theta_1} \sin 2\theta_d J_2(k\rho \sin \theta_d) (1 - \cos \theta_1) \exp(-ik_1 z_s \cos \theta_1) d\theta_d \end{aligned} \quad (2.65)$$

avec γ l'angle entre l'axe x et l'analyseur. L'ouverture angulaire de la lentille de refocalisation sur le détecteur et la coordonnée θ_d sont liés à l'ouverture angulaire de l'objectif de détection et à la coordonnée θ_1 par la relation :

$$\frac{n_1 \sin \alpha_1}{n_d \sin \alpha_d} = \frac{n_1 \sin \theta_1}{n_d \sin \theta_d} = \beta \quad (2.66)$$

avec β le grandissement nominal de l'objectif, et n_1 et n_d étant respectivement les indices de réfraction du milieu d'immersion et de l'espace image ($n_d=1$ généralement) .

La Figure 2.22 présente les RIO pour un microscope thêta calculées en considérant une excitation à 400 nm et une détection à 450 nm pour le colorant Cascade Blue de Molecular Probes. On considère des objectifs à immersion à eau Olympus Universal Plan Fluorite d'ouverture numérique N.A.=0.8 avec une distance de travail de 3.3 mm qui permettent un montage thêta après une légère modification de leur enveloppe. Le spécimen est scanné par rapport au point focal. On considère un détecteur ponctuel incohérent.

La Figure 2.22(a) présente la RIO calculée à l'aide du modèle classique isotropique, pour une excitation et une détection non-polarisée, à l'aide de l'équation (2.59). La Figure 2.22(b) présente la RIO calculée à l'aide du modèle d'émission dipolaire pour une excitation polarisée x et une détection polarisée x . On remarquera que le modèle classique a tendance à légèrement surestimer la résolution en x , tout en sous-estimant la résolution en y et en z . Le modèle dipolaire prévoit une RIO plus isotrope, avec une meilleure séparation des lobes latéraux (des différences encore plus notables sont attendues si l'on utilise des objectifs de plus grande ouverture numérique). La résolution en x est de 220 nm et la résolution en y et en z est de 270 nm (contre 210 nm et 290 nm pour le modèle isotropique)

Un problème du microscope confocal en lumière polarisée vient du fait que la détection des molécules excités par de la lumière polarisée en z est fortement limité par le fait que l'excitation (et donc le signal détectable) est beaucoup plus faible selon cet axe que pour la polarisation x ou y . Pour un objectif à grande ouverture numérique (N.A.=1.4), le signal est typiquement 100x plus faible. Cela est dû au phénomène de dépolarisation de la lumière focalisée par un objectif qui reste malgré tout limité, et qui est d'autant moins important que l'ouverture numérique est faible. Une solution possible est d'utiliser des masques de phase de manière à rehausser la composante polarisée en z pour l'excitation et la détection .

Le microscope thêta offre une alternative : comme les axes d'illumination et de détection sont croisés, l'axe optique pour le bras de détection correspond à un axe latéral pour l'objectif d'illumination, axe pour lequel la composante est supposée être d'intensité beaucoup plus élevée. Comme le montre la Figure 2.19, choisir une excitation polarisée en x' ou y' correspond à rehausser la détection pour l'axe x ou z . Les équations donnant le

champ d'excitation, et donc le moment dipolaire sont obtenues à partir des équations (2.57) et (2.58) par une rotation de 90° autour de l'axe ($z'=-y$), et donc en permutant le rôle des variables x et $-z$. La Figure 2.22(c) montre la RIO obtenue pour une excitation polarisée en z et une détection polarisée en x . La RIO est de même intensité pour l'excitation polarisée en x et en z . Le microscope confocal thêta peut donc constituer une alternative intéressante au microscope confocal polarisé en z pour les spécimens de grande taille.

La Figure 2.23 montre les RIO obtenues pour des polariseurs croisés, avec une détection polarisée en y . La forme est différente, mais surtout les intensités relatives des RIO sont beaucoup plus faibles, typiquement $400\times$ moins intenses.

La Figure 2.23(a) montre la RIO calculée pour une excitation polarisée x avec une détection polarisée y (dans les plans $z=0\text{ }\mu\text{m}$ et $y=0\text{ }\mu\text{m}$). On reconnaît la forme caractéristique en trèfle à quatre feuilles déjà prévue (et observée) en microscopie confocale, mais maintenant visible dans les deux plans. La RIO est cependant maintenant asymétrique, comme le prouve la Figure 2.23(b), qui montre des coupes en $(x-z)$ pour les plans $y=-0.18\text{ }\mu\text{m}$ et $y=+0.18\text{ }\mu\text{m}$, respectivement. On conserve cependant une symétrie centrale.

La Figure 2.23(c) montre la RIO calculée pour une excitation polarisée z avec une détection polarisée y dans les plans $z=0\text{ }\mu\text{m}$ et $y=0\text{ }\mu\text{m}$. La forme de la RIO est maintenant totalement différente, comme on peut le voir sur la Figure 2.23(d) et la Figure 2.23(e), qui montrent des coupes de la RIO à divers plans en y et en z . Là encore, on conserve une symétrie centrale.

Notons enfin que pour favoriser la composante polarisée en y , on pourrait soit symétriser les bras de détection et d'excitation, soit utiliser un deuxième objectif d'illumination, placé perpendiculairement aux deux autres, le long de l'axe x , dans une configuration inspirée de la Multiple Objective Microscopy [49][50] ou de la Multiple Imaging Axis Microscopy développé à Heidelberg dans le groupe de Ernst Stelzer.

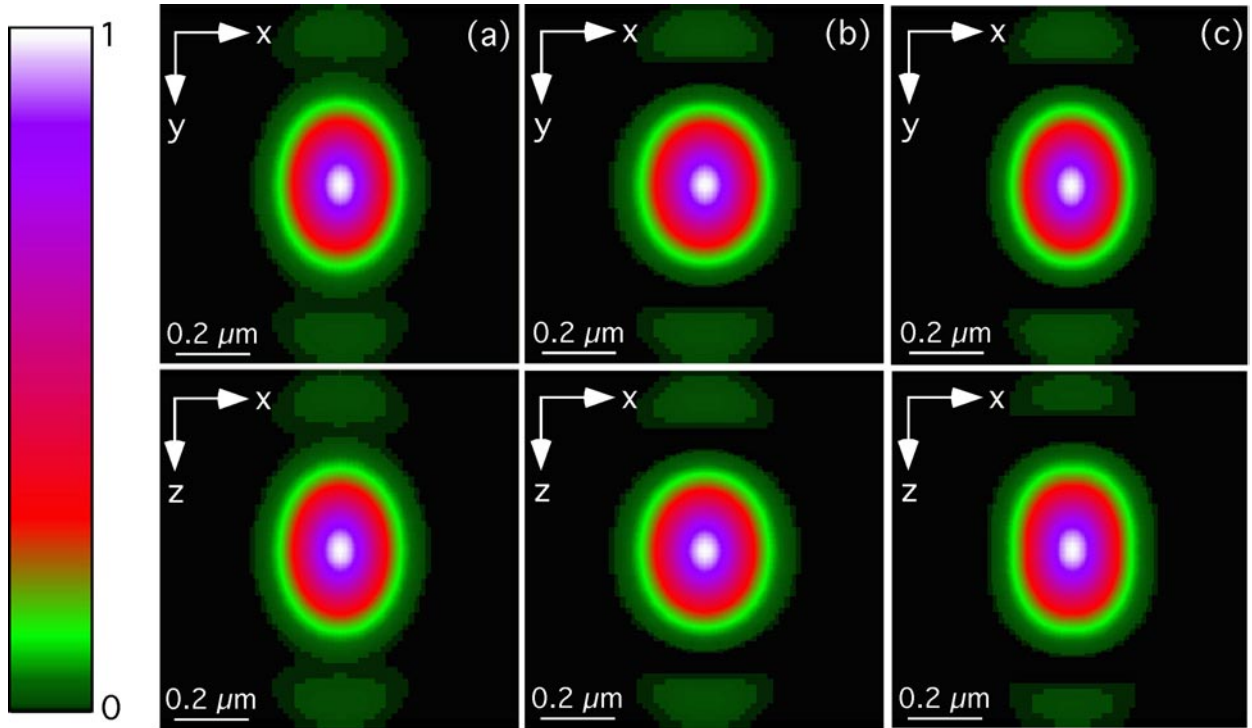


FIGURE 2.22. RIO d'un microscope thêta calculées pour des objectifs à immersion à eau avec $N.A.=0.8$ (excitation à 400 nm et détection à 450 nm). (a) : modèle classique isotrope. (b) modèle dipolaire, excitation polarisée x et détection polarisée x . (c) : modèle dipolaire, excitation polarisée en z et détection polarisée en x .

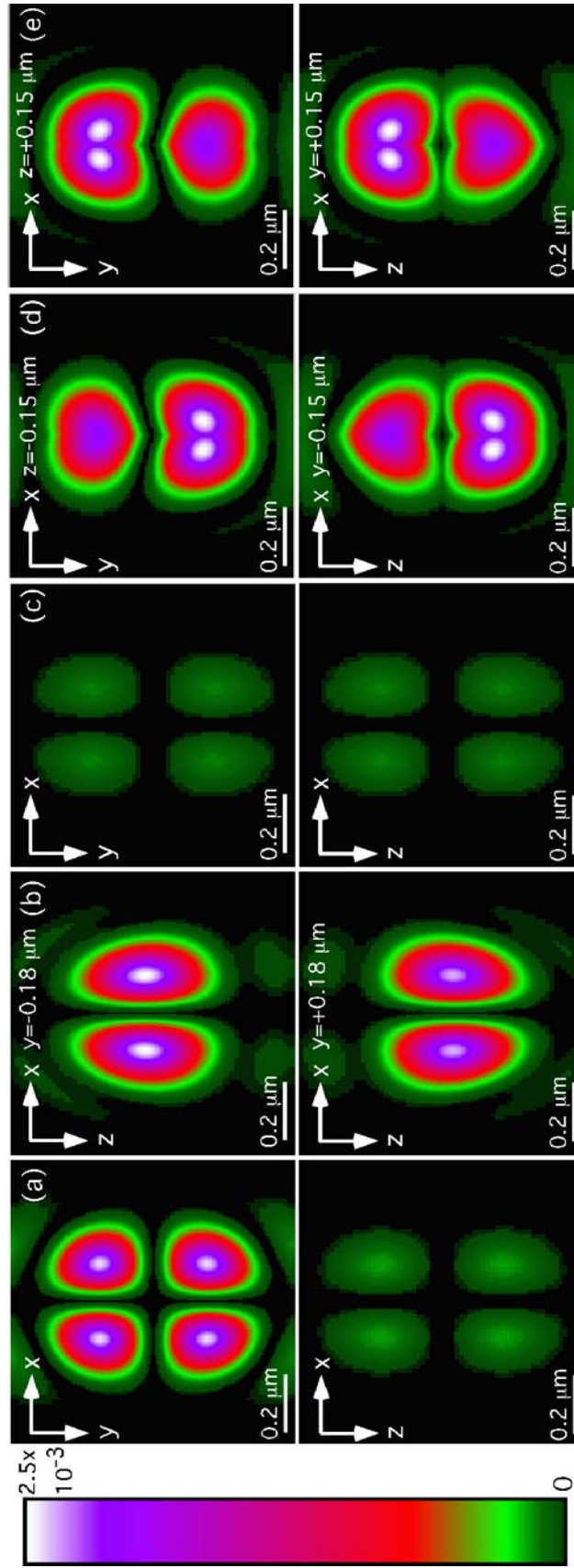


FIGURE 2.23. RIO d'un microscope θ calculées pour des objectifs à immersion à eau avec $N.A.=0.8$ (excitation à 400 nm et détection à 450 nm) pour des polariseurs croisés. (a) RIO pour une excitation polarisée x avec une détection polarisée y (dans les plans $z=0$ μm et $y=0$ μm). (b) : coupes en $(x-z)$ pour les plans $y=-0.18$ μm et $y=+0.18$ μm de la RIO présentée en (a). (c) : RIO calculée pour une excitation polarisée z avec une détection polarisée y dans les plans $z=0$ μm et $y=0$ μm . (d) et (e) : diverses coupes à différents plans de la RIO présentée en (c). Dans tous les cas, une symétrie centrale est conservée.

2.8 Microscopie à Objectifs Multiples

2.8.1 Introduction

Dans la quête d'une résolution toujours meilleure, les microscopes confocaux, 4Pi et Thêta (étudié en détail dans le chapitre précédent) ont été proposés voici déjà plusieurs années. Le principe de la microscopie 4Pi est d'utiliser deux objectifs se faisant face pour illuminer le spécimen ou/et détecter le rayonnement de fluorescence. On utilise alors principalement le phénomène d'interférences entre plusieurs faisceaux cohérents. En microscopie Thêta, on utilise le découplage entre la RIO d'illumination et la RIO de détection de façon à éliminer l'élongation en z par croisement des RIOs à 90° . Il a été proposé de combiner microscopie Thêta et 4Pi, mais les performances ainsi obtenues sont moins bonnes que celles de la microscopie 4Pi avec des objectifs à grande ouverture numérique. Par contre, une plus grande distance de travail est alors possible.

J'ai alors proposé de combiner et d'étendre ces deux principes pour obtenir une résolution encore meilleure tout en conservant une grande distance de travail, ce qui doit permettre d'étudier des spécimens de grande taille avec une très bonne résolution.

Comme pour la microscopie Thêta, on considérera des objectifs à immersion à eau à utiliser sans lamelle. Dans ce cas, le modèle diffractif vectoriel de Richards et Wolf décrit bien le processus de formation de la RIO.

Pour un objectif considéré comme parfait (pas d'aberration), on peut calculer le champ électrique au point (x,y,z) (voir Figure 2.24) :

$$\begin{aligned} E_x(x, y, z) &= -i(I_0 + I_2 \cos 2\Phi) \\ E_y(x, y, z) &= -iI_2 \sin 2\Phi \\ E_z(x, y, z) &= -2I_1 \cos \Phi \end{aligned} \tag{2.67}$$

De plus, pour un système obéissant à la condition des sinus d'Abbe et illuminé par une onde plane polarisée, on a :

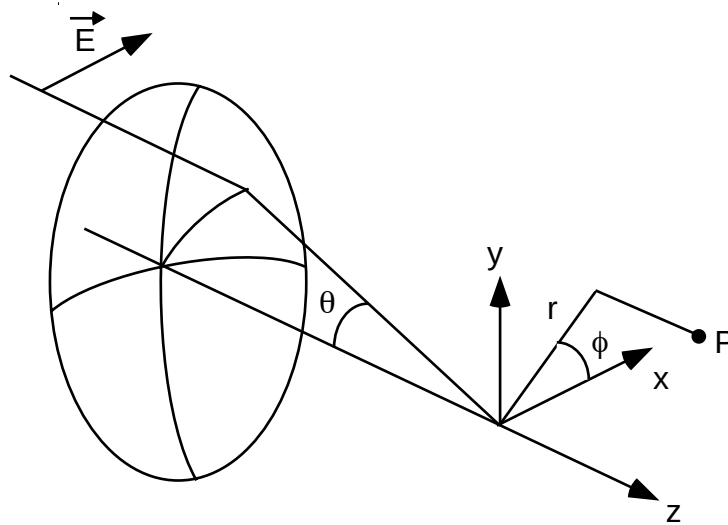


FIGURE 2.24. Focalisation d'une onde plane polarisée par un objectif.

$$\begin{aligned}
I_0 &= \int_0^\alpha a(\theta) \sin \theta (1 + \cos \theta) J_0(kr \sin \theta) \exp(ikz \cos \theta) d\theta \\
I_1 &= \int_0^\alpha a(\theta) \sin^2 \theta J_1(kr \sin \theta) \exp(ikz \cos \theta) d\theta \\
I_2 &= \int_0^\alpha a(\theta) \sin \theta (1 - \cos \theta) J_2(kr \sin \theta) \exp(ikz \cos \theta) d\theta
\end{aligned} \tag{2.68}$$

Dans les équations (2.67) et (2.68), $a(\theta)$ représente la fonction d'apodisation qui vaut pour un système obéissant à la condition des sinus d'Abbe et sans aberration $a(\theta) = \cos^{1/2}\theta$, r représente la distance radiale et ϕ est l'angle entre la direction d'observation au point P et l'axe de polarisation de l'onde incidente (on travaille en coordonnées cylindriques). On considère par la suite une onde polarisée linéairement selon l'axe x (voir Figure 2.24). La RIO d'illumination d'un tel objectif peut alors être calculée :

$$PSF_{ill}(x, y, z) = |E(x, y, z)|^2 = |I_0|^2 + 4|I_1|^2 \cos^2 \phi + |I_2|^2 + 2Re(I_0 I_2^*) \cos 2\phi \tag{2.69}$$

Cette équation correspond aussi au calcul de la RIO de détection d'un microscope classique avec une illumination en champ large. Alors que l'illumination peut être polarisée linéairement, circulairement ou aléatoire, le phénomène de fluorescence peut souvent être considéré comme induisant une émission aléatoire. Dans ce cas, la RIO de détection vaut :

$$PSF_{det}(x, y, z) = |I_0|^2 + 2|I_1|^2 + |I_2|^2 \tag{2.70}$$

Pour un microscope confocal, en négligeant la différence de longueur d'onde entre l'excitation et la détection, on obtient en première approximation :

$$PSF^{conf}(x, y, z) = PSF_{ill}(x, y, z) PSF_{det}(x, y, z) = [PSF^{clas}(x, y, z)]^2 \tag{2.71}$$

Pour un objectif à immersion à huile d'ouverture numérique 1.4 et à une longueur d'onde de détection de 450 nm, on obtient une résolution latérale de 200 nm et longitudinale de 450 nm pour un microscope classique. Pour un microscope confocal, en considérant une excitation à 400 nm et une détection à 450 nm, on obtient une résolution latérale de 130 nm et longitudinale de 320 nm. Ces longueurs d'onde correspondent à l'utilisation du colorant Cascade Blue de Molecular Probes (voir Figure 2.20).

Un microscope 4Pi [40]-[47] utilise deux objectifs colinéaires pour illuminer de manière cohérente le spécimen et détecter de manière cohérente l'émission de fluorescence (microscope 4Pi type C). La Figure 2.25 en décrit brièvement le principe. En additionnant les champs, on obtient pour les RIO d'illumination et de détection :

$$PSF_{ill}(x, y, z) = PSF_{det}(x, y, z) = |E_z(x, y, z) + E_z'(x, y, z)|^2 \tag{2.72}$$

Les champs étant calculés à l'aide des équations (2.67) sachant que la symétrie du problème impose que :

$$I_n = I_n(x, y, z) \quad \text{et} \quad I_n' = I_n(x, y, -z) \tag{2.73}$$

On obtient pour un microscope 4Pi type C :

$$PSF^{4PiC}(x, y, z) = [Re\{I_0\}^2 + 2Re\{I_1\}^2 + Re\{I_2\}^2]^2 \tag{2.74}$$

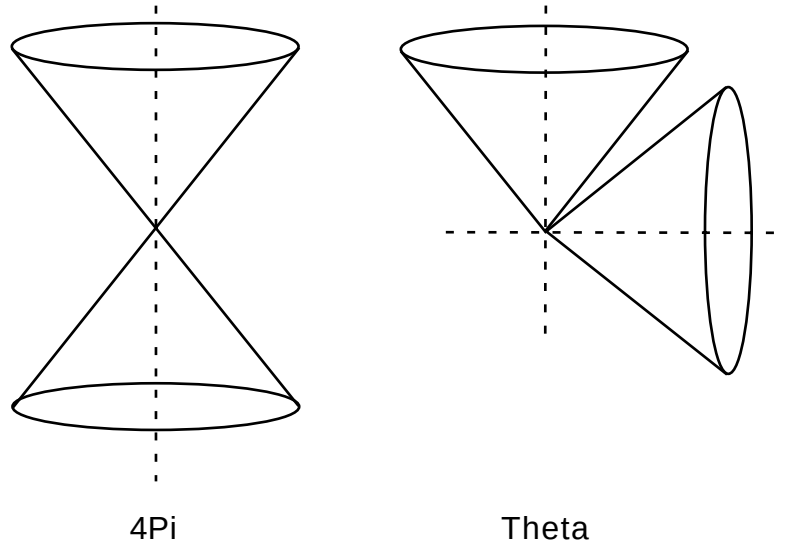


FIGURE 2.25. Principe des microscopes 4Pi et Thêta.

Avec les mêmes paramètres, le gain en résolution longitudinale à 70 nm est spectaculaire, mais le gain en résolution latérale est plus modeste avec une largeur à mi-hauteur (FWHM) de 120 nm.

Le principe de la microscopie thêta est d'utiliser deux objectifs orthogonaux de façon à "croiser" les RIO (voir paragraphe précédent). De ce fait une bien meilleure résolution longitudinale est obtenue que pour un microscope confocal utilisant le même type d'objectifs. Cependant, la nécessité de placer les objectifs à 90° oblige à utiliser des objectifs à grande distance de travail, et donc d'ouverture numérique relativement modeste. La perte en résolution latérale est telle que la taille globale de la RIO est plus grande que pour un confocal utilisant un objectif de grande ouverture numérique. L'avantage est de pouvoir examiner des spécimens de relativement grande taille, grâce à la grande distance de travail. La RIO d'un microscope thêta est donnée par la relation :

$$PSF^{theta}(x, y, z) = PSF_{ill}(x, y, z)PSF_{det}(-z, y, x) \quad (2.75)$$

Afin de mieux illustrer les performances attendues de ces configurations, on a calculé les RIO correspondants à un microscope classique ou confocal utilisant un tel objectif à grande distance de travail.

La Figure 2.26(a) présente les résultats obtenus pour un microscope conventionnel. Notons la très forte élongation en z due à la faible ouverture numérique et les anneaux de diffraction très marqués pour le microscope classique. La résolution à mi-hauteur est de 300 nm en latéral, et de 1.5 µm longitudinalement.

Pour le microscope confocal utilisant le même objectif, on obtient une résolution latérale de 210 nm et une résolution longitudinale de 1.05 µm (Figure 2.26(b)).

On obtient une bien meilleure résolution longitudinale avec un montage 4Pi type C (excitation et détection cohérentes). La Figure 2.27(a) montre la RIO calculée pour des objectifs de même caractéristique. La résolution longitudinale atteint 70 nm, mais la présence de nombreuses franges d'interférence aura pour résultat de brouiller l'image obtenue, ce qui limitera en particulier les possibilités de restauration.

La Figure 2.27(b) montre la RIO calculée pour un microscope thêta avec les mêmes objectifs. La résolution axiale est de 290 nm, ce qui est bien meilleur que le montage confocal avec le même objectif (1.05 µm).

La résolution latérale (210 nm en x et 290 nm en y) est cependant relativement faible, et on obtient une résolution 3D plus faible que pour un microscope 4Pi utilisant des objectifs à grande ouverture numérique. Notons cependant que la RIO est quasi isotrope.

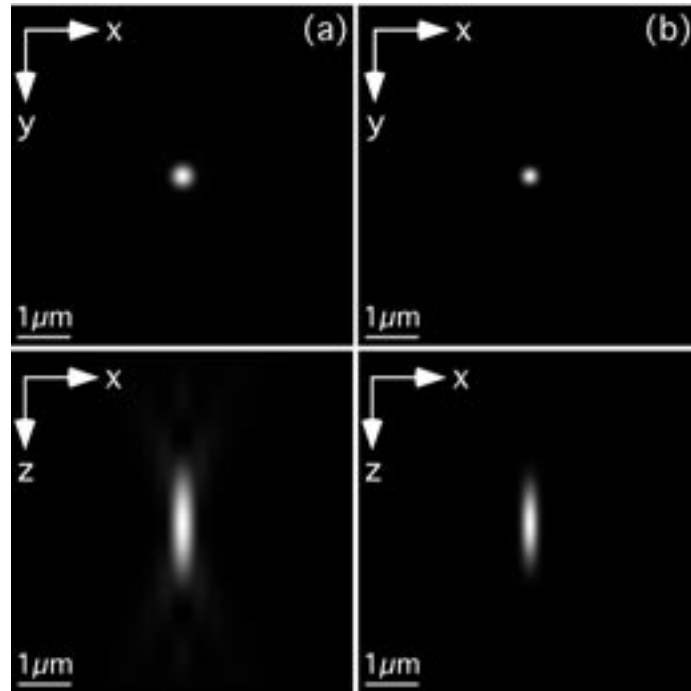


FIGURE 2.26. RIO calculées pour un objectif d'ouverture numérique $N.A.=0.8$ à immersion à eau. (a) microscope classique. (b) microscope confocal.

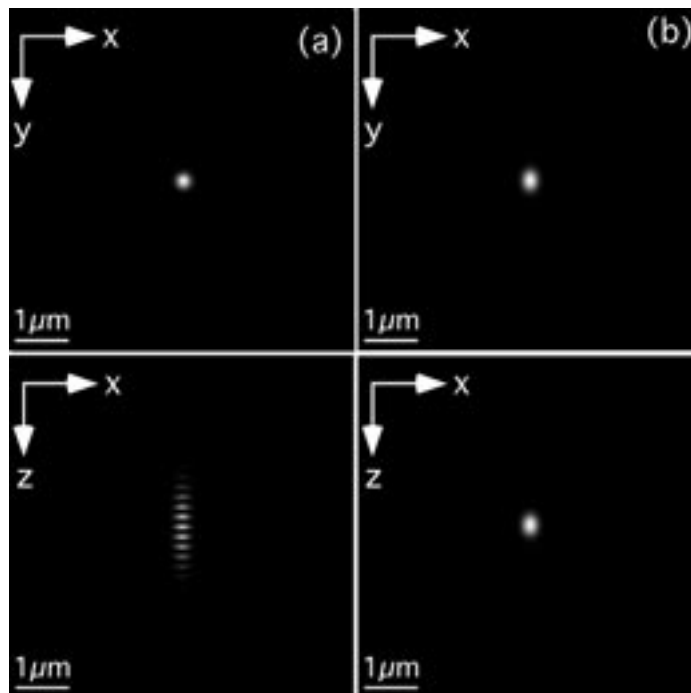


FIGURE 2.27. RIO calculées pour des objectifs d'ouverture numérique $N.A.=0.8$ à immersion à eau. (a) microscope 4Pi type C. (b) microscope θ .

2.8.2 Microscopes 4Pi croisés

Lindek, Pick and Stelzer ont eu l'idée de combiner microscopie 4Pi de type A pour l'illumination du spécimen avec une détection θ pour diminuer encore la taille de la RIO et surtout réduire le nombre de franges d'interférence dues à l'utilisation d'objectifs à faible ouverture numérique [36]. Le montage expérimental réalisé ne permettait cependant pas de placer les objectifs rigoureusement à 90° .

Les objectifs à utiliser doivent en effet avoir une grande distance de travail et un faible encombrement pour pouvoir être placé à 90° sans entrer en contact. Nous avons trouvé, après discussion avec les ingénieurs d'Olympus Europe que l'objectif Olympus Universal Plan Fluorite 40x, N.A.=0.8 à immersion à eau conviendrait bien à ce type de montage après une légère modification de son enveloppe externe (Figure 2.28) [48]. L'objectif Zeiss Water Achroplan 40x, N.A.=0.8 à immersion à eau pourrait sans doute aussi convenir.

Le montage à 90° étant possible, un vrai microscope 4Pi- θ est donc maintenant envisageable. Le calcul montre alors une résolution de 75 nm en longitudinal et une résolution de 240 par 250 nm latéralement. Une extension naturelle de ce montage est alors de considérer un montage 4Pi de type A pour l'illumination du spécimen avec un montage 4Pi de type B pour la détection du signal, dans une configuration de microscopes 4Pi croisés.

La Figure 2.29 montre les RIO d'illumination (à 400 nm), de détection (à 450 nm) et globale d'un tel montage. On atteint 80 nm de résolution longitudinale et latérale selon l'axe x, et 250 nm selon l'axe y. On peut alors "gagner" la résolution sur cet axe en prenant deux images du spécimen (après rotation de 90° de celui-ci), et en fusionnant les données.

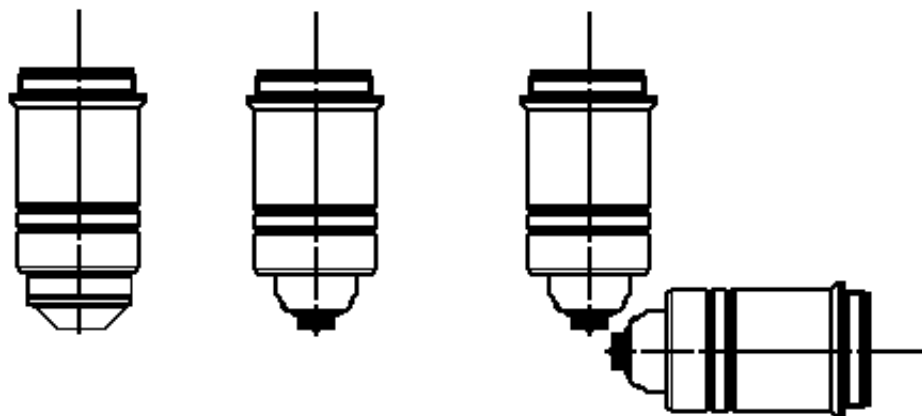


FIGURE 2.28. Proposition d'arrangement pour un MOM utilisant des objectifs Olympus Universal Plan Fluorite 40x, N.A.=0.8 à immersion à eau modifiés (document Olympus France) (a) objectif original. (b) objectif modifié. (c) arrangement à 90° de deux objectifs modifiés pour un microscope θ ou un MOM.

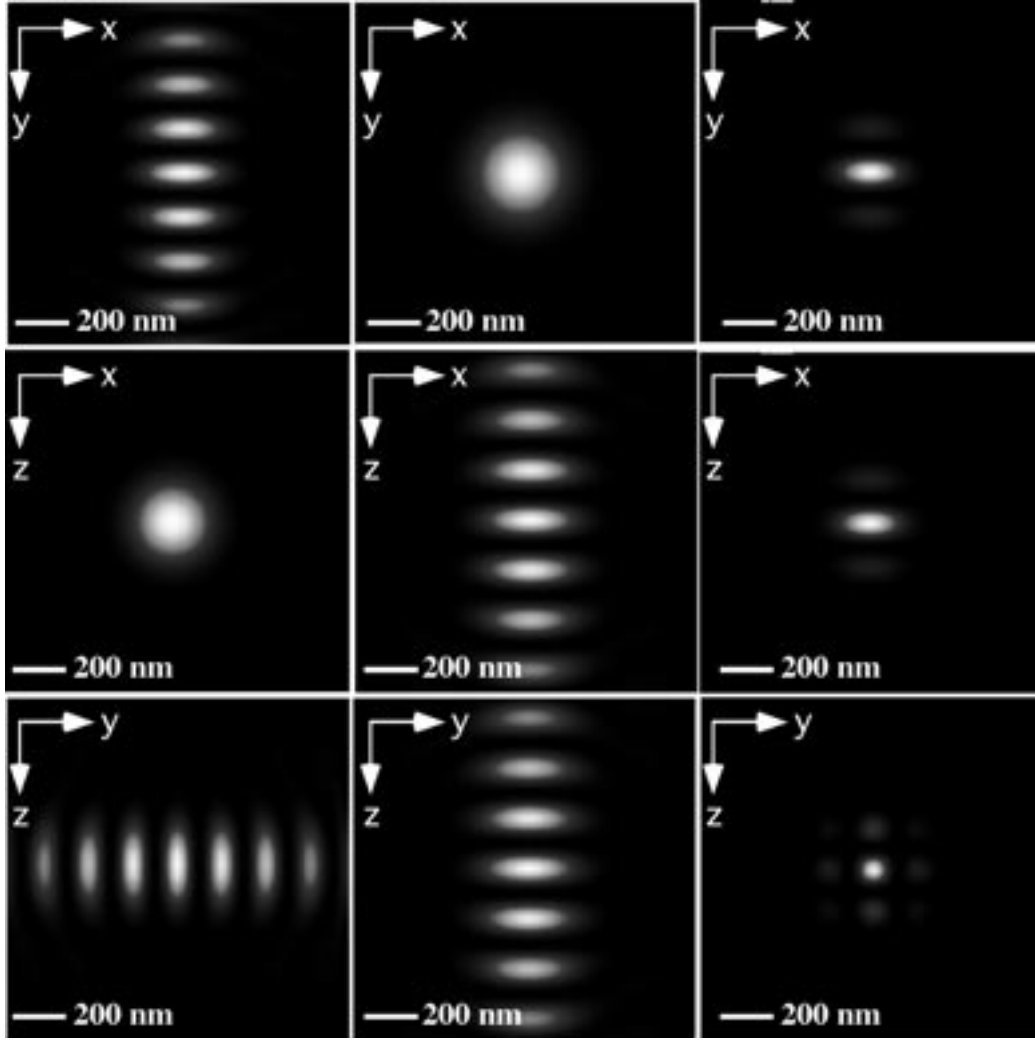


FIGURE 2.29. RIO de microscopes 4Pi à axes croisés. (a) RIO 4Pi type A d'illumination à 400 nm (axe y). (b) RIO 4Pi type B de détection à 400 nm (axe z). (c) RIO globale

2.8.3 Microscope 4Pi modifié

Afin de combiner les avantages des microscopies 4Pi (haute résolution) et θ (grande distance de travail, j'ai proposé une combinaison à 6 objectifs appelée Microscope à Objectifs Multiples (MOM) [49][50]. La Figure 2.30 en montre le principe : la géométrie des objectifs permet d'envisager une configuration où le spécimen est observé par les six cotés à la fois. De nombreuses combinaisons d'illumination/détection sont envisageables. La combinaison donnant les meilleurs résultats est la suivante : quatre objectifs selon les axes x et y sont utilisés pour exciter de manière cohérente le spécimen. Les objectifs 1 et 2 sont utilisés pour une détection cohérente du signal de fluorescence (microscope 4Pi de type B).

On considérera des objectifs à immersion à eau d'ouverture numérique N.A.=0.8 à utiliser sans lamelle : comme pour la microscopie θ , la configuration considérée ne permet pas l'utilisation de lame et lamelle, le spécimen devant être illuminé simultanément sur plusieurs faces.

Le calcul de la RIO d'excitation se fait en additionnant de manière cohérente les 4 champs incidents :

$$PSF_{ill}^{Obj}(x, y, z) = |E_z(x, y, z) + E_z'(x, y, z) + E_y(x, y, z) + E_y'(x, y, z)|^2 \quad (2.76)$$

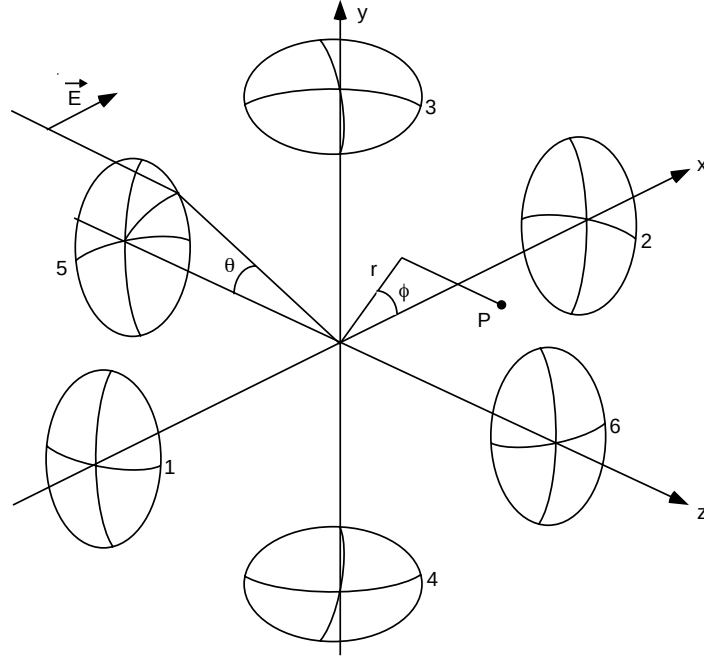


FIGURE 2.30. Principe du Microscope à Objectifs Multiples. L'excitation se fait à l'aide des objectifs 1 à 4. Les objectifs 1 et 2 sont utilisés en mode 4Pi type B.

On calcule les champs électriques incidents à l'aide des équations (2.67) et (2.68) en appliquant une rotation autour des axes de symétrie du système. Pour une excitation polarisée aléatoirement, les dépendances angulaires disparaissent comme pour l'équation (2.69), et on obtient :

$$PSF_{ill}^{4obj}(x, y, z) = Re\{I_0'\}^2 + 2Re\{I_1'\}^2 + Re\{I_2'\}^2 + Re\{I_0''\}^2 + 2Re\{I_1''\}^2 + Re\{I_2''\}^2 + 2Re\{I_0'\}Re\{I_0''\} \quad (2.77)$$

La détection se fait en mode 4Pi type B :

$$PSF_{det}^{4PiB}(x, y, z) = Re\{I_0\}^2 + 2Re\{I_1\}^2 + Re\{I_2\}^2 \quad (2.78)$$

Les intégrales de diffraction (2.68) donnant les champs électriques sont calculées à l'aide des relations :

$$I_n = I_n(x, y, z), \quad I_n' = I_n(y, z, -x) \text{ et } I_n'' = I_n(y, z, x) \quad n=1,2,3 \quad (2.79)$$

La Figure 2.31(a) montre la RIO d'illumination PSF_{ill}^{4obj} calculée à une longueur d'onde de 400 nm. Notons la présence de nombreuses franges d'interférence dues à la faible ouverture numérique des objectifs utilisés.

Cependant, le spot central est déjà beaucoup plus compact que pour un microscope confocal : la résolution est 100 nm en x-y et 200 nm en z. Cette très bonne résolution pourrait avoir des applications en stéréophotolithographie par exemple.

La RIO de détection PSF_{det}^{4PiB} calculée à 450 nm est présentée Figure 2.31(b). De nombreuses franges d'interférences sont visibles au long de l'axe z ce qui limite l'intérêt de la microscopie 4Pi type B avec des objectifs de faible ouverture numérique. Cependant ces franges sont alignées perpendiculairement aux franges dues à l'excitation.

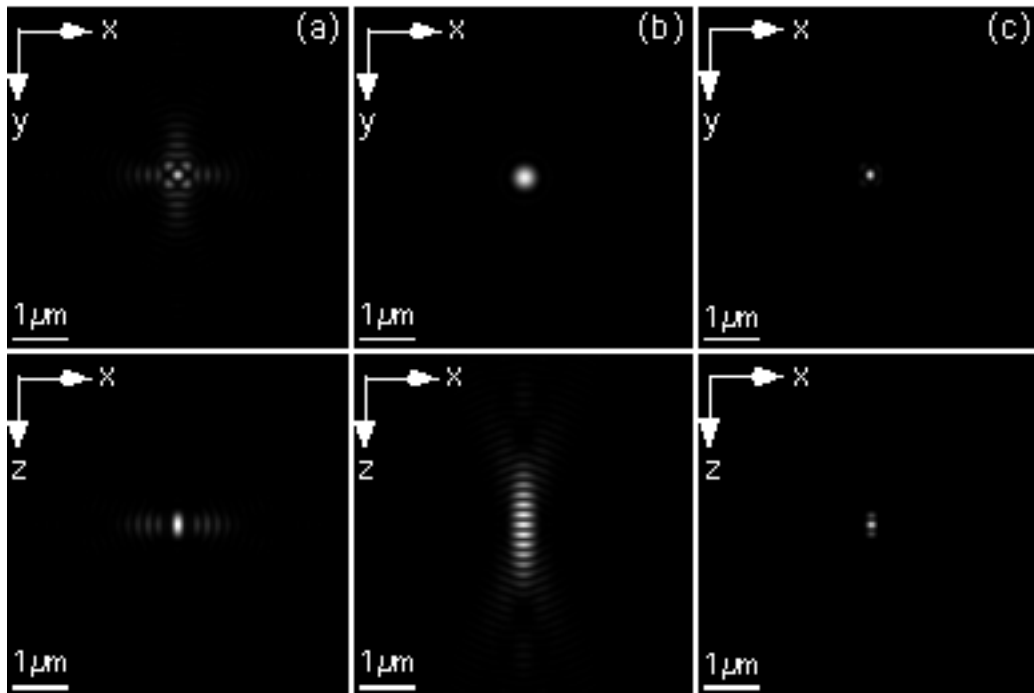


FIGURE 2.31. RIO calculée d'un microscope à objectifs multiples. Excitation à 400 nm, détection à 450 nm et objectifs d'ouverture numérique N.A.=0.8. (a) illumination à 4 objectifs. (b) détection en mode 4Pi type B. (c) RIO totale. Rangées du haut : coupes latérales (x-y). Rangées du bas : coupes longitudinales (x-z).

La RIO finale du microscope à objectifs multiples PSF^{6obj} qui est le produit des deux précédentes est présentée Figure 2.31(c). La disposition relative des franges d'interférences de la RIO d'excitation et de la RIO de détection fait que la RIO finale en est quasi-exempte. D'autre part, le spot central est de dimension très réduite.

Dans les trois cas, on a considéré un aspect aléatoire pour la polarisation de l'onde focalisée (RIO d'excitation) et pour l'émission de fluorescence, ce qui fait que les RIOs sont symétriques par rotation autour de l'axe optique z.

La Figure 2.32 présente un zoom sur la partie centrale des RIO d'excitation, de détection et sur la RIO finale. Les Figures 2.32(g) et (h) présentent le profil latéral et longitudinal de la RIO finale. La résolution latérale est de 109 nm et la résolution longitudinale de 98 nm. Les lobes visibles le long de l'axe z peuvent être éliminés par simple filtrage, comme pour la microscopie 4Pi type C à objectif de grande ouverture numérique.

Ces résultats représentent la plus petite RIO jamais obtenue pour un microscope à grande distance de travail : les objectifs d'ouverture numérique N.A.=0.8 ont une distance de travail de quelques millimètres, le MOM offre donc la possibilité de travailler à très haute résolution sur des échantillons de grande taille. D'un point de vue fondamental, ces résultats montrent aussi que la très haute résolution n'est pas limitée aux objectifs à grande ouverture numérique.

Notons cependant que la mise en œuvre d'un tel microscope est probablement très complexe. Cette complexité est sensiblement réduite par le fait que les chemins optiques de l'excitation et de la détection sont complètement séparés, contrairement à la microscopie 4Pi type C. De plus, pour l'excitation, la grande longueur de cohérence des lasers autorise d'avoir des chemins optiques de longueurs différentes. Pour la détection, les chemins optiques doivent être identiques à la longueur de cohérence de la fluorescence près, à savoir environ 20 μm. La difficulté est donc du même ordre que pour les microscopies 4Pi et Thêta qui ont déjà été utilisées avec succès. En fait, on peut considérer le MOM comme un microscope 4Pi modifié, qui utilise 4 objectifs séparés pour l'excitation, au lieu d'utiliser un objectif de détection (microscopie 4Pi type B) ou les deux (microscopie 4Pi type C) pour l'excitation.

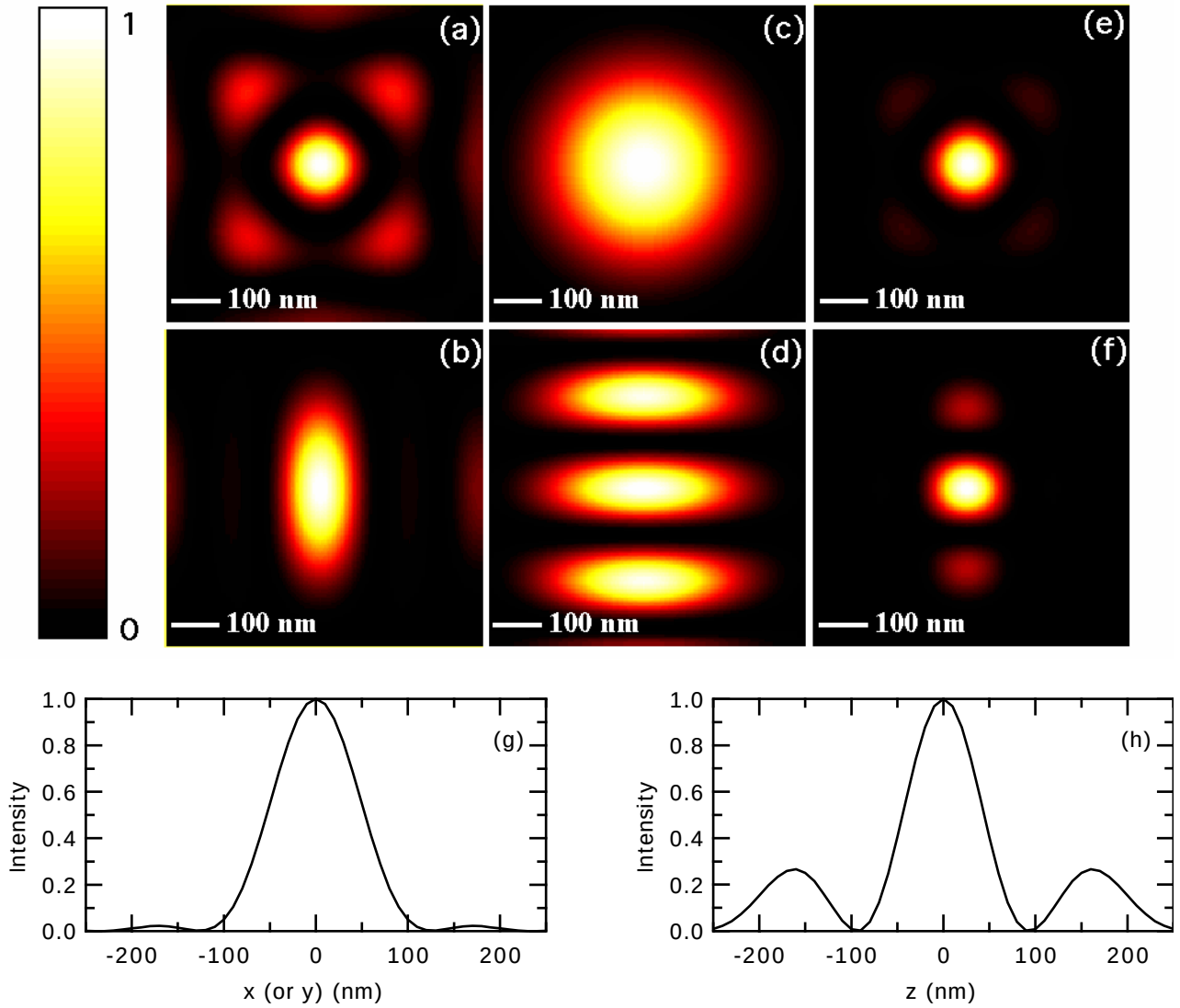


FIGURE 2.32. Agrandissement (10x) de la Figure 2.31. (a-b) : RIO d'illumination à 4 objectifs. (c-d) : RIO de détection en microscopie 4Pi type B. (e-f) : partie centrale de la RIO finale. (g-h) : Coupes transversale et longitudinale de la RIO du MOM. La résolution latérale est de 109 nm pour une résolution longitudinale de 98 nm.

Pour maintenir le spécimen immergé sans que l'eau ne fuit, l'utilisation d'une cavité cubique avec les six objectifs passant à travers les six faces est nécessaire. La manipulation du spécimen devrait alors se faire à l'aide de micromanipulateurs telles les micropincettes développées à l'AIST (Tsukuba-Japon), ou en les fixant sur une micropipette montée sur un translateur piézoélectrique de précision [51][52].

Notons enfin que ce microscope pourrait aussi utiliser avec profit les effets multiphotoniques pour encore améliorer l'efficacité de la coupe optique et diminuer les effets de photobleaching, ainsi que la méthode Stimulation Emission Depletion (STED) pour diminuer encore la taille de la RIO [53]-[55]. Cette dernière méthode est discutée brièvement dans le Chapitre IV.

2.9 Identification des paramètres d'acquisition

2.9.1 Problématique

On a vu la complexité des modèles de formation d'image. Ainsi, le modèle de Gibson et Lanni fait intervenir 14 paramètres optiques. L'obtention d'images de la meilleure qualité possible requiert d'utiliser le microscope dans les conditions standard recommandées par le constructeur. Ceci n'est pas toujours possible dans la pratique. Ainsi l'acquisition de l'image d'un spécimen en 3D requiert l'observation à une certaine profondeur sous la lamelle, or les objectifs à immersion d'huile sont corrigés pour observer à une profondeur nulle sous la lamelle. L'indice de l'huile peut varier avec la température, or c'est un des paramètres les plus sensible. Il est donc important sinon de maîtriser l'ensemble de ces paramètres, du moins d'en connaître leurs valeurs, ce qui permet de préciser le protocole expérimental d'acquisition [56].

D'autre part, lorsque la meilleure résolution est obtenue de l'instrument, on peut encore améliorer la qualité des images par déconvolution (voir chapitre suivant). Les algorithmes de déconvolution sont très sensibles aux conditions initiales. De ce fait, il est important de bien connaître ces conditions si l'on veut faire la déconvolution avec une RIO simulée. Cependant l'utilisation d'un modèle repose sur la connaissance a priori des paramètres de ce modèle et leurs valeurs réelles peuvent sensiblement différer des valeurs théoriques idéales telles que préconisées par le fabricant de l'objectif (Figure 2.33(a)), ce qui induit une RIO tout à fait différente (Figure 2.33(b)) car affectée d'aberrations.

Le bruit est un autre problème : l'utilisation d'une RIO mesurée assure que l'on est bien dans les conditions réelles, mais la RIO est bruitée (Figure 2.34) ce qui peut nuire à la déconvolution (amplification catastrophique du bruit).

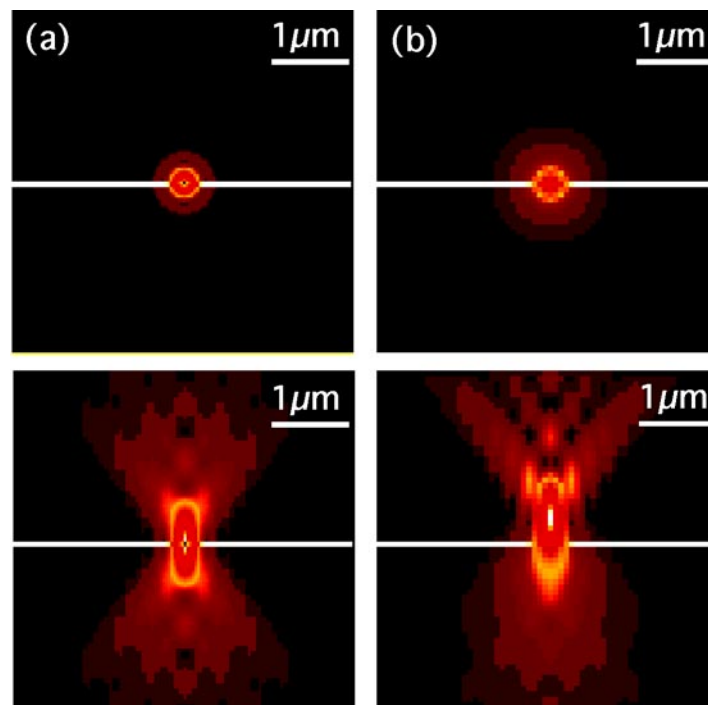


FIGURE 2.33. Exemple de calcul de RIO (a) dans les conditions idéales préconisées par le constructeur. (b) cas d'un milieu d'immersion d'indice différent de celui recommandé : la RIO est affectée d'aberrations.

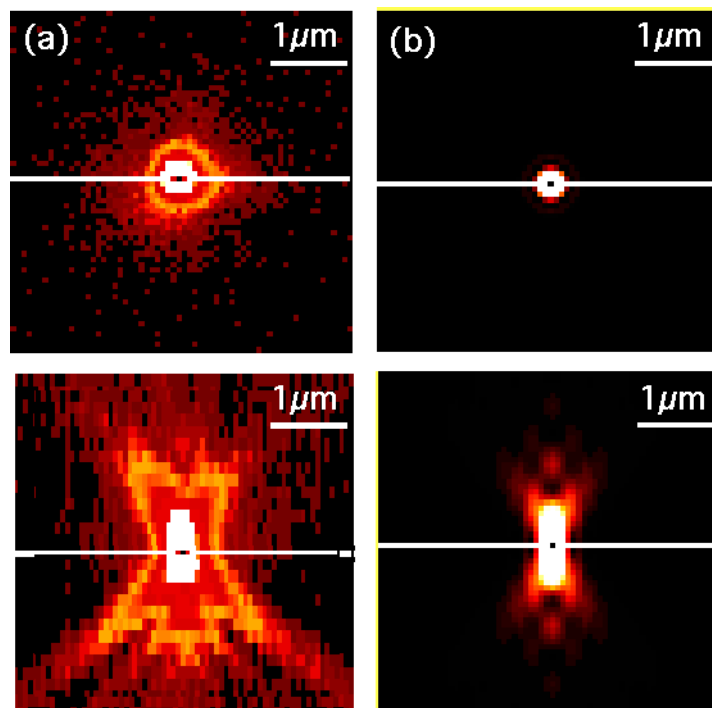


FIGURE 2.34. (a) RIO expérimentale. (b) RIO calculée. Dans le premier cas, le bruit peut nuire à la déconvolution. Dans le second, l'utilisation d'une RIO différant de l'acquisition conduit à des résultats faux.

2.9.2 Méthode

Pour améliorer la déconvolution et mieux maîtriser les conditions expérimentales, j'ai étudié la possibilité de retrouver certains paramètres expérimentaux difficiles à connaître (comme la profondeur du spécimen sous la lamelle) à partir de RIOs mesurées. Ainsi, on pourra utiliser des RIOs calculées qui sont les plus ressemblantes possibles aux RIOs expérimentales tout en ne présentant pas de bruit.

La méthode utilisée est classique : on choisit un intervalle de variation des paramètres considérés pour lesquels les RIOs calculées sont comparées à la RIO expérimentale. On utilisera les critères de corrélation et des moindres carrés. On cherche les paramètres pour lesquels la meilleure ressemblance est obtenue.

Notons tout de suite une limitation de la méthode : lors de l'enregistrement de la RIO du microscope par la technique des coupes sériées, seule l'information en intensité est enregistrée et la phase est perdue. Or cette phase est indispensable pour caractériser le système optique et ses aberrations. En conséquence, cette méthode ne permet pas une étude de la qualité optique du système.

Une autre limite est due à l'absence d'un référentiel absolu. En effet, pour enregistrer une RIO, on cherche tout d'abord le plan d'intensité maximale, pris comme référence, et l'on enregistre un ensemble de coupes au dessus et en dessous de ce plan.

De ce fait, la RIO expérimentale est automatiquement centrée dans son domaine d'acquisition. Il est à noter de plus que le centrage en latéral est plus facile que le centrage axial (pas d'échantillonnage). Lorsqu'on calcule une RIO à l'aide d'un modèle théorique, on voit qu'en présence d'aberrations, il y a décalage du maximum de la RIO par rapport à la position théorique du point focal qui est l'origine du référentiel de calcul (voir Figure 2.33). La distance entre cette position théorique et le maximum est en pratique inconnue, ce qui représente une perte d'information et il est nécessaire de calculer cette distance et de recentrer les RIOs théoriques pour pouvoir les comparer avec les RIOs expérimentales.

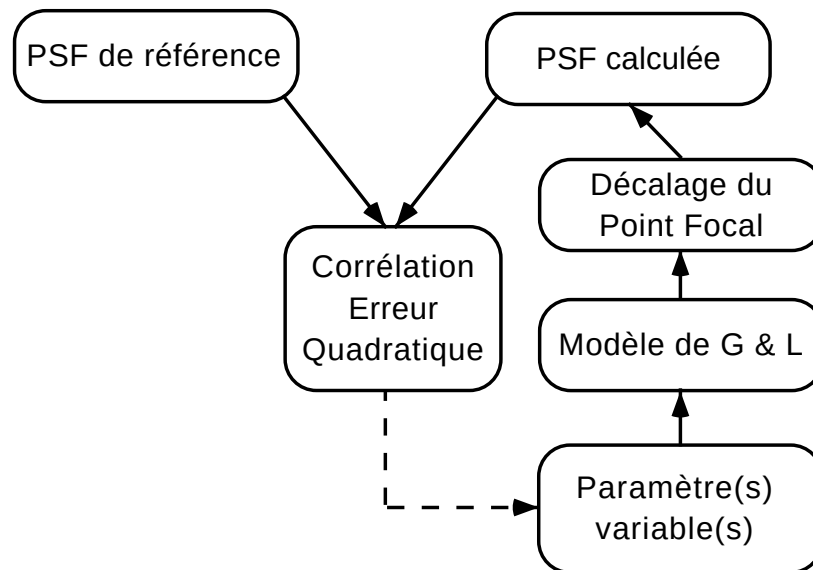


FIGURE 2.35. Méthode de recherche des paramètres de calcul d'une RIO de référence avec le modèle de Gibson et Lanni.

2.9.3 Simulations

Pour tester la méthode on travaille donc tout d'abord avec des RIOs de référence calculées, re-centrées et bruitées par ajout de bruit poissonien pour imiter le phénomène de fluorescence et de bruit gaussien pour tenir compte de l'électronique d'acquisition [57].

Pour cette étude, nous avons utilisé le modèle scalaire de Gibson et Lanni, malgré certaines de ces limitations. En effet, l'usage d'objectifs à grande ouverture numérique laisse à penser que les théories vectorielles sont indispensables, car certains rayons arrivent à grande incidence sur les différentes interfaces du milieu. Dans la pratique, la différence est souvent négligeable, ce qui fait dire à Peter Török : "Gibson and Lanni demonstrated good agreements between their numerical results and experimental measurements of the aberrated point spread function. This and some other theories confirm that, while it is essential to construct mathematically rigorous theories, it is sometimes possible to obtain accurate predictions using approximate physical models based on wave optics" (voir Török *et al.*, J. Microsc. **188**, 158 (1997)).

Nous avons utilisé ce modèle tel qu'il est implémenté dans le logiciel XCOSM du Biomedical Computer Laboratory (Washington University, St Louis, Missouri, USA) . J'ai aussi réécrit un module de calcul, ce qui m'a permis de vérifier les calculs indépendamment. (ce module a d'ailleurs permis de pointer certaines limitations du logiciel XCOSM). Comme expliqué précédemment, le modèle de Gibson et Lanni introduit 8 paramètres optiques qui peuvent varier de leurs valeurs optimales telles que recommandées par le constructeur de l'objectif du microscope. Ces huit paramètres sont :

- l'indice de réfraction du spécimen et la profondeur d'observation
- l'épaisseur et l'indice du milieu d'immersion
- l'ouverture numérique de l'objectif
- l'épaisseur et l'indice de la lamelle
- la longueur du tube optique¹

De ces huit paramètres, nous en avons retenu trois qui sont dans la pratique très difficiles voire impossibles à mesurer :

- la profondeur du spécimen observé.

1. pour les microscopes modernes corrigés à l'infini, ce paramètre est caduque.

- l'indice du milieu d'immersion (huile) qui peut varier avec la température. Ainsi, la valeur donnée par le fabricant est souvent mesurée à environ 20°C alors que les biologistes aiment souvent travailler sur des spécimens vivants à 37°C. Le changement d'indice est de l'ordre de 4‰ seulement, mais c'est un des paramètres pour lequel la RIO est la plus sensible.
- l'ouverture numérique du microscope peut être limitée dans la pratique : ainsi lorsqu'on observe dans un milieu aqueux, l'ouverture est au mieux de 1.33, le phénomène de réflexion totale limitant l'angle de collection des photons.

L'identification d'un seul paramètre inconnu dans le modèle de Gibson et Lanni a d'abord été entreprise. On a donc calculé une RIO avec un objectif d'ouverture numérique de 1.26, avec une huile d'immersion d'indice 1.513 et pour un spécimen à une profondeur de 2 µm sous la lamelle, et en gardant tous les autres paramètres à leurs valeurs nominales recommandées par le constructeur. Un bruit gaussien (rapport S/N de 40 dB) a été rajouté, ainsi que du bruit poissonien pour imiter le bruit de fluorescence. Le niveau de 40 dB a été choisi après analyse d'images acquises avec un microscope de fluorescence.

La Figure 2.36 illustre les résultats obtenus pour les trois paramètres retenus. Il est à noter que les images ont été préalablement débruitées par une simple procédure de clipping en évaluant le bruit dans une région sombre ne contenant a priori pas de signal. Sans cette précaution, les résultats sont en effet souvent inexploitable. L'indice de l'huile est retrouvé correctement à 1.513, l'ouverture numérique calculée est de 1.27 (1.26 théoriquement) et la profondeur estimée de l'échantillon est de 1.8 µm (contre 2 µm en réalité soit 10% d'erreur).

Ces calculs ont été répétés pour diverses valeurs de ces trois paramètres. Il en est ressorti que l'ouverture numérique est retrouvée avec une erreur de l'ordre de 1% tant que la profondeur du spécimen ne dépasse pas 5 µm. De même l'indice de l'huile est retrouvé avec une erreur inférieure à 2‰ (ce qui est déjà appréciable). Par contre, l'estimation de la profondeur est généralement moins bonne, avec une erreur de 10 à 15%.

Cependant les résultats se dégradent très vite avec le bruit : pour un rapport signal sur bruit inférieur à 25 dB, les valeurs de calcul des RIO ne sont pas retrouvées. Les mêmes résultats sont obtenus avec comme critère le facteur de corrélation ou l'erreur quadratique.

Une recherche à plusieurs inconnues est aussi possible. Le problème des minima locaux se pose alors. Cependant, si l'on peut restreindre suffisamment les intervalles de recherche, ce problème ne se pose pas. La précision des résultats obtenus est cependant bien moins bonne, comme illustrée par la table suivante. La RIO de référence est calculée comme précédemment, et bruitée. Elle est ensuite débruitée par la même méthode de clipping. Si l'indice de réfraction de l'huile d'immersion est retrouvé correctement (4%), la profondeur du spécimen est entachée d'une erreur de 40%, et ce pour une faible profondeur déjà.

TABLE 2. Résultats d'une recherche sur deux paramètres inconnus : indice de l'huile d'immersion et profondeur du spécimen.

Variable	Valeur théorique	Valeur retrouvée
Indice de l'huile	1.33	1.325
Profondeur (µm)	1.9	1.1

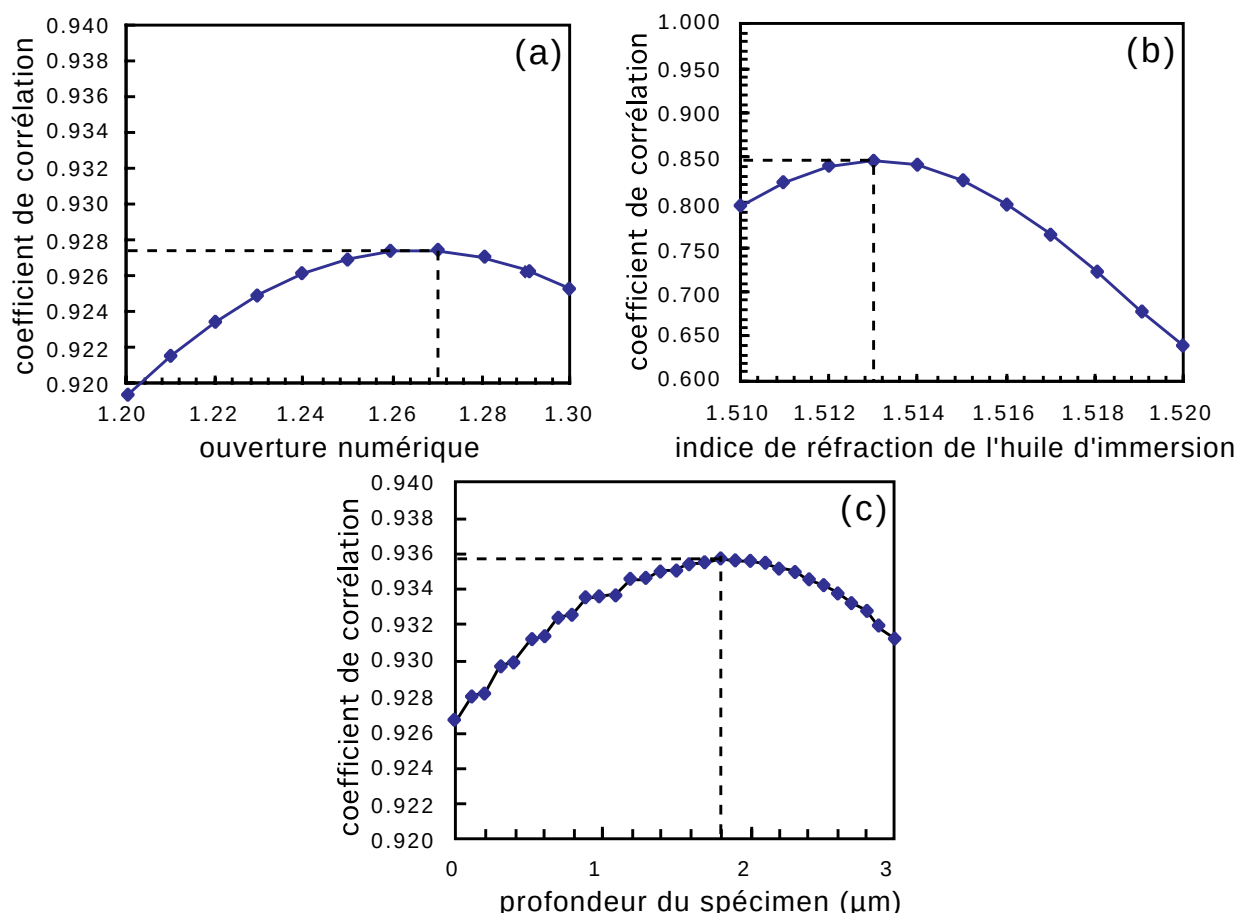


FIGURE 2.36. Recherche sur un paramètre pour des RIO simulées. (a) ouverture numérique. (b) indice de l'huile d'immersion. (c) profondeur du spécimen.

2.9.4 Résultats expérimentaux

Ces résultats encourageants ont été confirmés par l'étude de RIO expérimentales acquises sur un microscope Olympus à épifluorescence AX70 équipé du système d'acquisition 3D CellScan. Les images sont acquises sur 12 bits à l'aide d'une caméra CCD Sensys de Photometrics ayant une taille de pixel de $6.8 \times 6.8 \mu\text{m}^2$. Pour l'acquisition des RIO, des billes fluorescentes Tetraspeck de $0.2 \mu\text{m}$ de diamètres ont été utilisées (Molecular Probes). Ces billes sont séchées sur une lamelle, ce qui assure leur adhésion à celle-ci. Ensuite, la lamelle est retournée sur une lame, avec adjonction d'eau pour imiter par son indice un milieu biologique. En procédant ainsi, certaines billes n'adhèrent plus à la lamelle. Ceci n'est pas gênant dans la mesure où les billes flottant dans le milieu aqueux sont affectées par le mouvement brownien, et ne sont donc pas utilisables pour acquérir des RIO. Cette procédure assure que les RIO mesurées le sont à une profondeur nulle dans un milieu d'indice 1.33. Un objectif 100x à immersion à huile (indice 1.515) et indice d'ouverture 1.35 a été utilisé.

Les images obtenues ont été débruitées comme pour les simulations. On vérifie alors que le bon indice de réfraction et la bonne profondeur sont retrouvés (Figure 2.37) : le minimum de l'erreur quadratique se situe bien à $0 \mu\text{m}$ (qui est la valeur attendue) et pour l'indice de l'huile on trouve 1.516, la valeur donnée par le constructeur étant de 1.515 ± 0.002 [58].

Ce travail avait été effectué avant celui sur l'unification des modèles de Török et Varga et de Gibson et Lanni (section 2.5). Les résultats obtenus montrent qu'un modèle simplifié permet néanmoins d'obtenir de bons résultats. Il serait cependant intéressant de reprendre cette étude à l'aide du modèle vectoriel pour mieux préciser leurs domaines d'application respectifs.

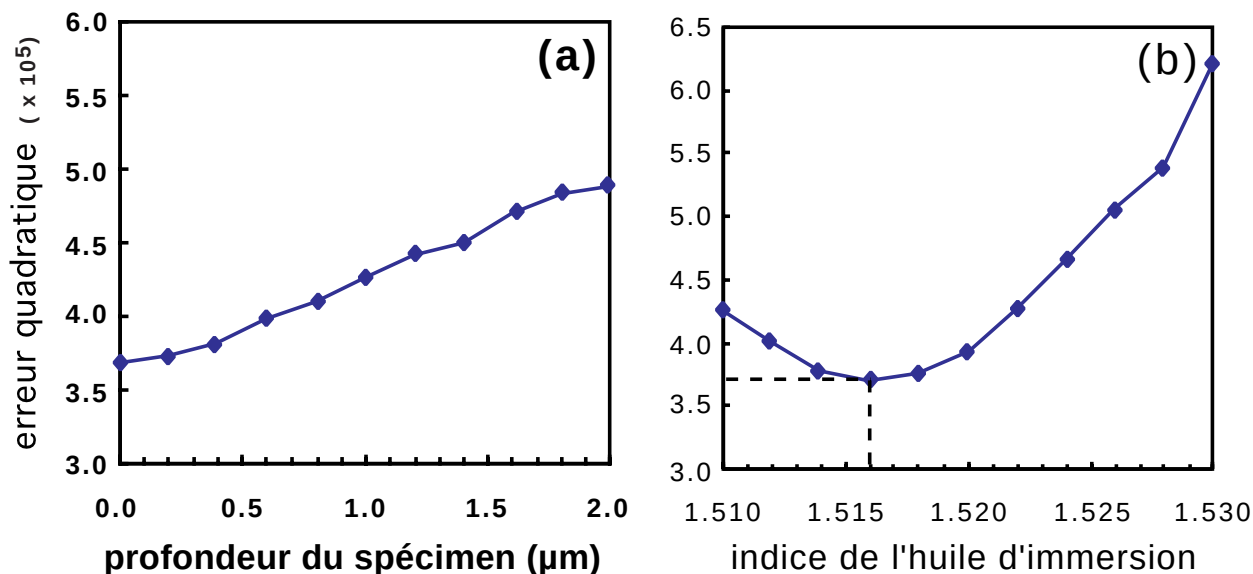


FIGURE 2.37. Analyse d'une RIO expérimentale. La profondeur trouvée correspond au protocole de préparation. L'indice de l'huile correspond à la valeur constructeur avec sa marge d'erreur.

2.9.5 Conclusion

Cette méthode permet donc de caractériser les conditions d'acquisition d'images avec un microscope, en particulier certains paramètres difficiles à mesurer dans la pratique, telle que la profondeur du spécimen. On peut ainsi vérifier que le microscope est utilisé dans les conditions standards recommandées par le constructeur, et même éventuellement corriger certains défauts par l'identification des paramètres qui ne suivent pas ces recommandations. Le biologiste peut ainsi préciser le protocole d'acquisition.

Cette technique est cependant fortement limitée par le bruit et la précision d'échantillonnage des données. On pourrait aussi l'améliorer par l'utilisation d'algorithmes de débruitage plus élaborés, un gain en rapidité et l'utilisation d'un modèle de formation d'image plus élaboré. Cependant pour les conditions expérimentales rencontrées, ces résultats confirment le fait que peu de différences existent entre le modèle scalaire de Gibson et Lanni et des modèles vectoriels plus élaborés, dans le cas le plus général d'émission non-polarisée ou polarisée aléatoirement.

Ce type d'étude autorise en particulier d'utiliser pour la déconvolution des RIO calculées donc sans bruit, tout en étant le plus proche des conditions d'acquisition. Ceci doit permettre d'améliorer la fiabilité des résultats de la déconvolution. Ce point précis sera repris dans le chapitre suivant.

Notons enfin que cette méthode est applicable à tous les types de microscopie pour lesquels la notion de RIO est bien définie, par exemple le microscope confocal ou le microscope biphoton. Par contre, en microscopie par génération de seconde ou troisième harmonique, la notion de RIO n'est pas bien définie.

2.10 Microscopie Thêta en réflexion

Le microscope thêta a été inventé et développé pour la microscopie de fluorescence en biologie. Il permet de combiner haute résolution et grande distance de travail en utilisant deux objectifs de microscope de faible ouverture numérique croisés à 90°.

La microscopie confocale est utilisée en fluorescence (essentiellement pour la biologie) mais aussi en physique des surfaces et en contrôle qualité (essentiellement dans l'industrie de la micro-électronique). On parle alors de microscopie confocale en réflexion.

On retrouve alors une limitation déjà rencontrée en microscopie de fluorescence : les objectifs à grande distance de travail ont une faible ouverture numérique, et donc une résolution relativement mauvaise. Les objectifs à haute résolution ont une distance de travail très courte.

J'ai alors proposé lors de mon séjour (Juillet-Août 2001) au groupe OptMec (Optical Measurement and Control Group) du Photonic Research Institute de l'AIST à Tsukuba (Japon) de monter un microscope thêta en réflexion. On peut en prédire les propriétés à partir de nos connaissances sur le microscope confocal et le microscope thêta en fluorescence:

- la résolution latérale est du même ordre que celle d'un microscope confocal en réflexion utilisant les mêmes objectifs.
- la résolution longitudinale sera aussi du même ordre grâce à l'utilisation du montage thêta.

On espère ainsi réaliser un microscope ayant une résolution quasi-isotrope. J'ai construit un prototype qui a permis de valider le concept [59]. La Figure 2.38 en montre le principe. Un laser (HeNe à 633 nm) sert à l'illumination du spécimen. Le faisceau est élargi et parallélisé de façon à illuminer l'ensemble du plan focal arrière de l'objectif d'illumination (utilisation d'un extenseur de faisceau : objectif de microscope de focalisation, pinhole pour "nettoyer" le faisceau des modes d'ordres supérieurs, lentille). Le faisceau parallèle ainsi généré peut alors être focalisé dans un spot de taille minimum (tache d'Airy).

Le spécimen est monté sur une table de déplacement x-y-z avec une résolution mécanique de 0.5 µm. On utilisera différents spécimens pour mesurer la taille des RIOs. L'objectif de détection est alors focalisé sur le point de focalisation de l'objectif d'illumination. Le faisceau capté est alors parallèle. Il est refocalisé à l'aide d'une lentille sur un pinhole placé devant une photodiode.

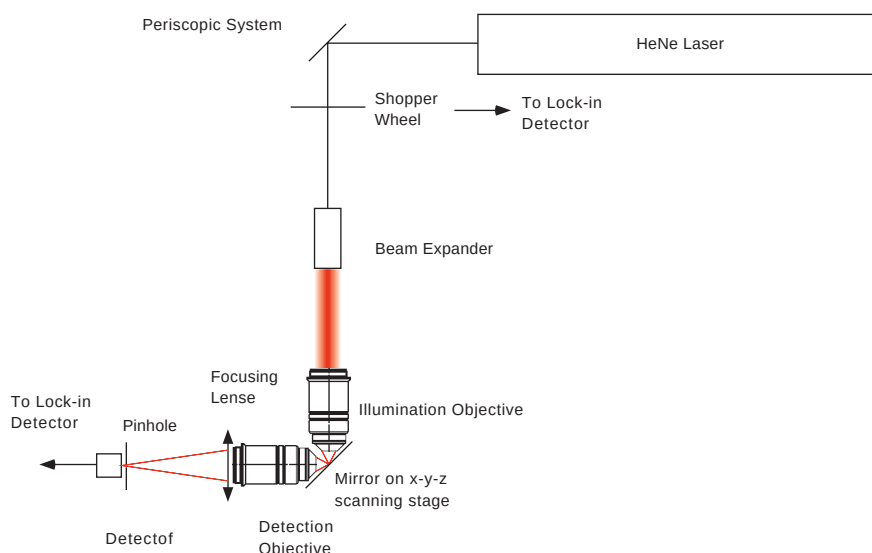


FIGURE 2.38. Schéma du microscope thêta en réflexion. Un objectif sert à illuminer le spécimen. L'objectif de détection est à 90° et utilise une détection confocale.

Pour s'affranchir des problèmes de lumière ambiante, on utilise une détection synchrone. Le faisceau du laser est haché par une roue à ouverture, et un détecteur lock-in analyse le signal provenant de la photodiode. La lecture de l'intensité se fait alors à l'oscilloscope.

Une limitation évidente de cette expérience est le fait que toutes les mesures se feront manuellement, donc lentement. Il s'agissait de construire un prototype de faisabilité, ceci ne constituera donc pas un gros handicap. Il est aussi important de laisser le laser se stabiliser thermiquement (dérive de puissance).

Les Figure 2.39 montre le prototype en vue avant et arrière.

La principale difficulté pour utiliser un microscope thêta consiste à faire coïncider les deux points focaux des deux objectifs. Pour cela, on procède en deux étapes.

Tout d'abord, le système d'illumination est installé et aligné de façon à obtenir la RIO de taille minimale. On réalise donc un montage à un seul objectif. La Figure 2.40 montre le montage. Le "spécimen" illuminé est dans ce cas constitué par un pinhole de 1 μm de diamètre placé devant le photodétecteur. La Figure 2.41 montre 3 mesures de la RIO d'illumination donnant la résolution latérale (en x ou y). L'intensité est donnée en unités arbitraires. Chaque courbe correspond à une moyenne de trois mesures réalisées sur trois jours. Le décalage observé entre les courbes est compatible avec le jeu mécanique de la table de translation micrométrique manuelle utilisée pour scanner le pinhole à travers la RIO.

La résolution latérale définie comme largeur à mi-hauteur de la RIO est donnée par :

$$R_{lat} = \lambda / (2NA) \quad (2.80)$$

ce qui pour une longueur d'onde de 633 nm et un objectif d'ouverture numérique 0.3 donne $R_{lat}=1.055 \mu\text{m}$. La résolution mesurée de 2 μm correspond donc à la résolution théorique des objectifs à air utilisés, si l'on tient compte de la convolution avec le pinhole de 1 μm de diamètre.

La mesure de la résolution longitudinale a aussi été entreprise, mais a donné des résultats moins satisfaisants. La Figure 2.41 montre une moyenne de trois mesures. Si la résolution de 13 μm est là aussi compatible avec un objectif d'ouverture numérique N.A.=0.3 (en tenant compte de la convolution avec le pinhole de 1 μm de diamètre), la courbe n'est pas parfaitement symétrique comme elle devrait l'être pour une RIO minimale, sans aberration, et la différence est plus marquée que pour la résolution latérale : la profondeur de champ théorique est donnée par $D = \lambda / (4n \sin^2(\alpha/2))$ avec $\alpha = \text{asin}(NA/n)$, soit 6.9 μm pour notre objectif. Il n'a cependant pas été possible de faire mieux. Le problème peut venir de l'alignement de l'objectif avec le faisceau (tilt), ou du faisceau laser lui-même (parallélisme).

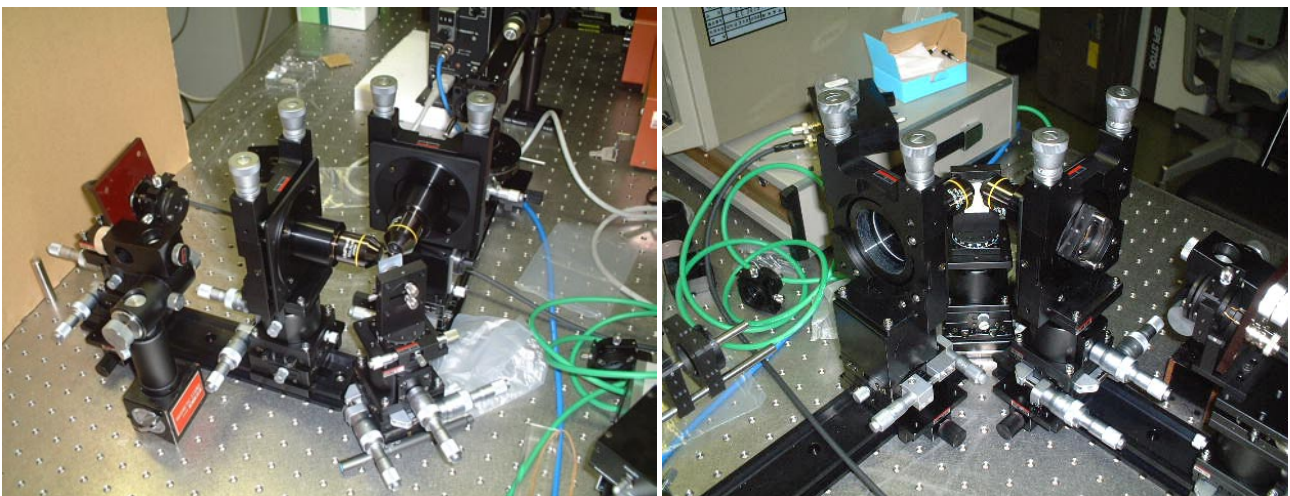


FIGURE 2.39. Vue avant et arrière du prototype de microscope thêta en réflexion construit au groupe OptMec du Photonic Research Institute de Tsukuba.

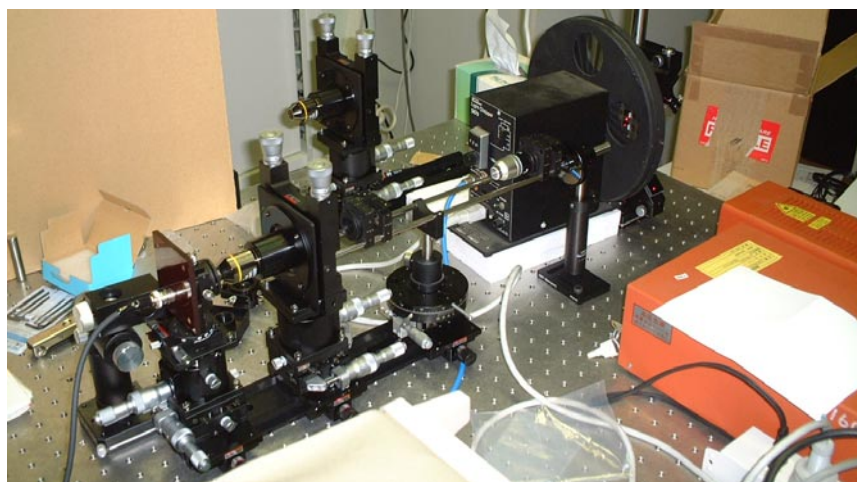


FIGURE 2.40. Dispositif d'alignement et de mesure pour l'objectif d'illumination.

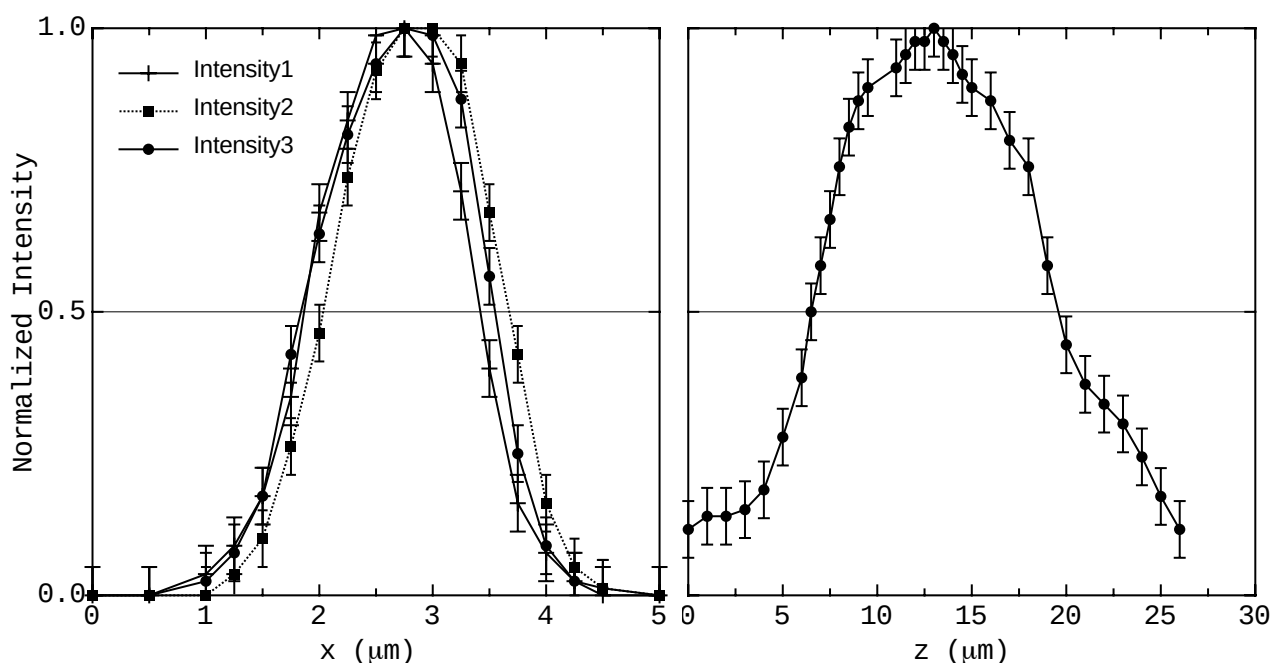


FIGURE 2.41. Mesure de la résolution latérale de l'objectif d'illumination (N.A.=0.3) à l'aide d'un pinhole de 1 μm de diamètre. Mesure de la résolution longitudinale de l'objectif d'illumination (N.A.=0.3) à l'aide d'un pinhole de 1 μm de diamètre. Notons la légère dissymétrie de la courbe, indiquant un possible problème de focalisation.

Lorsque le bras d'illumination est correctement aligné, on rajoute le bras de détection. La difficulté principale consiste à aligner les deux foyers des deux objectifs sur le même point. On a utilisé la technique suivante :

Dans un premier temps, on place comme "spécimen" un miroir incliné à 45° du faisceau d'illumination. Le faisceau est donc renvoyé à 90°. Dans cette étape, l'objectif d'illumination est enlevé, et seule la position angulaire du miroir est ajustée.

On remet ensuite l'objectif d'illumination, et le miroir est translaté de manière à intersecter la RIO d'illumination à son maximum. Ceci ne peut être fait directement. On positionne tout d'abord le miroir

grossièrement, en se servant d'une petite particule diffractante (poussière) sur le miroir. Quand le maximum de lumière diffractée est observé (à l'œil!), la particule est au maximum de la RIO.

L'alignement précis des deux points focaux se fait alors en tenant compte de la symétrie du système de détection par rapport au système d'illumination. Si les deux points focaux coïncident et que le miroir est placé à 45° au maximum de la RIO, le faisceau d'illumination (divergent après le point focal) est redirigé à travers l'objectif de détection, qui va collecter l'onde incidente divergente et la refocaliser en un faisceau parallèle.

Lorsque l'alignement est obtenue par itération successive, on place derrière l'objectif une lentille qui refocalise le faisceau sur le pinhole de détection. Le signal est alors enregistré à l'aide d'un détecteur lock-in.

La Figure 2.42 montre deux mesures obtenues pour deux expériences différentes (réalignement complet du microscope entre les deux mesures). Il est à noter que cette mesure ne correspond pas à la mesure classique de la RIO d'un point, car on a utilisé le miroir à 45° comme spécimen. On peut donc l'interpréter comme une "edge-RIO", similaire à la Line Spread Function (LSF) ou la Half-Screen Spread Function (HSFS) parfois utilisée pour caractériser un instrument d'optique.

Nous avons obtenu une largeur à mi-hauteur de $1\ \mu\text{m}$ et de $0.8\ \mu\text{m}$ pour ces deux mesures. Strictement parlant, il ne s'agit pas de la résolution de la RIO, mais cela indique que des plans verticaux distants de $0.5\ \mu\text{m}$ ou $0.4\ \mu\text{m}$ sont distinguables. Notons cependant que la résolution de $0.5\ \mu\text{m}$ du translateur en z limite la précision de la mesure.

Ces courbes montrent cependant un gain d'un facteur 8 par rapport à un système à un seul objectif avec $N.A.=0.3$. Ce prototype a donc montré l'intérêt de la microscopie θ en réflexion pour obtenir une bonne résolution longitudinale (tout en conservant la même résolution latérale en x et en y) tout en ayant une distance de travail appréciable : les objectifs utilisés ont une distance de travail de $1\ \text{cm}$.

Des domaines d'application possible pour la microscopie θ sont la mécanique (contrôle de l'état de surface d'une pièce, sans contact, à "grande" distance et avec une résolution de l'ordre du micromètre dans les trois dimensions), et la physique du solide et des surfaces, car le montage θ permet une bonne résolution tout en autorisant un espace libre autour de l'échantillon permettant à une instrumentation d'accéder à cet échantillon, contrairement au microscope confocal qui a une distance de travail très réduite.

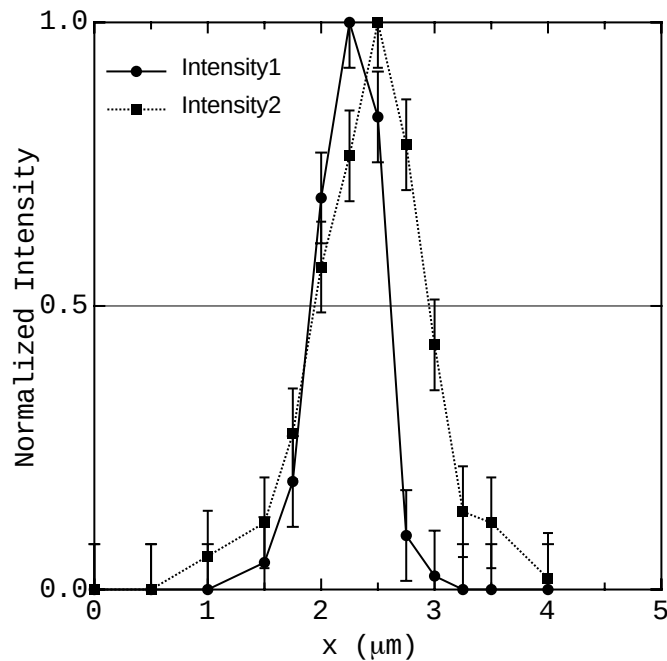


FIGURE 2.42. Mesure de la RIO longitudinale du microscope θ en réflexion.

2.11 Conclusion

Le microscope optique est un instrument utilisé à des fins scientifiques depuis plus de deux siècles, et de nombreux développements techniques ont permis d'étendre son domaine d'utilisation. Il est alors d'autant plus paradoxal de constater combien la modélisation de cet instrument s'est longtemps faite sur des bases approximatives.

La demande d'une résolution toujours meilleure, et en tout cas obtenue de manière constante et répétitive, a obligé de nombreux auteurs à se pencher sur ce problème. Il est en particulier très important de comprendre pourquoi et comment cette résolution est éventuellement dégradée dans la pratique, et d'identifier quelles sont les techniques possibles pour remédier à ce problème.

Une part importante de mon travail a donc consisté d'une part à modéliser de manière rigoureuse les mécanismes de formation des images en microscopie de fluorescence classique, confocale et multiphoton. La compréhension de ces mécanismes a aussi permis de décrire avec détail des configurations moins classiques, comme la microscopie Θ ou la microscopie 4Pi, mais aussi de proposer de nouveaux types de microscope, comme le microscope à objectifs multiples, qui combine grande distance de travail et excellente résolution, au prix cependant d'un montage optique très délicat.

Il ne fait guère de doute que la demande d'une résolution toujours plus fine continuera à motiver des recherches pour améliorer encore cet instrument, telles les recherches sur la microscopie à émission stimulée STED, qui a déjà permis une résolution inférieure à 100 nm en 3D dans des spécimens vivants, et meilleure que 30 nm sur des monomolécules de fluorophore déposées sur un support. Notons que les travaux que j'ai effectués dans ce domaine s'appliquent aussi à ces nouveaux types de microscopie.

Mes travaux dans ce domaine de la modélisation du processus de formation des images en microscopie de fluorescence ont donné lieu à 8 articles, 6 conférences avec actes, 3 workshops et 3 posters. J'ai aussi été amené à présenter mes travaux dans ce domaine dans 2 écoles scientifiques françaises et 1 école européenne. Enfin, j'ai encadré plusieurs stagiaires de maîtrise (2) ou d'école d'ingénieur (1) et de DEA (2) dans le cadre de ces travaux, et co-encadré trois étudiants en thèse.

Journaux à comité de lecture :

"Focusing of light through a stratified medium : a practical approach for computing fluorescence microscope point spread functions. Part II: confocal and multiphoton microscopy"

O. Haeberlé, *Opt. Comm.* **235**, p. 1 (2004)

"Kindling molecules: a new way to break the Abbe limit"

O. Haeberlé, *C. R. Physique* **5**, p. 143 (2004)

"The point spread function of optical microscopes imaging through stratified media"

O. Haeberlé et al., *Opt. Exp.* **11**, 2964-2969 (2003)

"Focusing of light through a stratified medium : a practical approach for computing fluorescence microscope point spread functions. Part I: conventional microscopy"

O. Haeberlé, *Opt. Comm.* **216**, p. 55 (2003)

"Confocal theta microscopy"

O. Haeberlé et al., *C. R. Physique* **3**, p. 1445 (2002)

"Fluorescence Microscopy with 3-D resolution in the 100 nm range"

O. Haeberlé et al., *Compt. Rend. Acad. Sciences IV (Paris)* **2**, p. 1509 (2001)

"Multiple objective microscopy with resolution near 100 nm and a long working distance"

O. Haeberlé et al., *Opt. Lett.* **26**, p. 1684 (2001)

"Identification of acquisition parameters from the point spread function of a fluorescence microscope"

O. Haeberlé et al., *Opt. Comm.* **196**, p. 109 (2001)

Conférences avec actes :

“The point spread function of optical microscopes imaging through a layered or an inhomogeneous medium”

O. Haeberlé and B. Simon, Photonics Europe 2004, EPE113, Strasbourg, April 26-30 (2004), in Biophotonics Micro- and Nano-Imaging, Dario Anselmetti Ed., Proceeding SPIE 5462, p. 5462 (2004)

“The point spread function of fluorescence microscopes imaging through layered and inhomogeneous media”

O. Haeberlé and B. Simon, Focus on Microscopy 2004, Philadelphia (USA), April 4-7, 2004, Technical Digest of Focus on Microscopy 2004, p. XX (2004)

“Accurate modelisation of the fluorescence microscope and sensitivity of microscope 3-D image deconvolution to initial parameters”

O. Haeberlé et al., Physics in Signal and Image Processing, PSIP2003, Grenoble (France), January 29-31, 2003, Proceedings of PSIP 2003, p. 221 (2003)

“Multiple-Objective microscopy with a resolution near 100 nm and a long working distance”

O. Haeberlé et al., Focus on Microscopy 2002, Kaohsiung (Taiwan), April 7-10, 2002. Technical Digest of Focus on Microscopy 2002, p. 47 (2002)

“Modified 4Pi microscope with a resolution near 100 nm and a long working distance”

O. Haeberlé et al., First Joint French-German Congress on Cell Biology, Strasbourg (France), November 7-9 2001. Bio. Cell **93**, p. 251 (2001)

“Analysis of point spread functions from a fluorescence microscope and identification of acquisition parameters”

O. Haeberlé et al. Focus on Microscopy 2001, Amsterdam (Netherland), April 1-4, 2001. Technical Digest of Focus on Microscopy 2001, p. 17 (2001)

Workshop :

“Microscopie à objectifs multiples combinant haute résolution et grande distance de travail”

O. Haeberlé et al., Réunion Action Spécifique - CNRS “Imagerie optique à haute résolution par synthèse d’ouverture”, Paris, 15 Janvier 2003

“Microscopie à forte ouverture numérique”

O. Haeberlé, A; Dieterlen et V. Lauer, Journée d’Etude AS 59 Imagerie optique à haute résolution par synthèse d’ouverture, 23 Mai 2003, Marseille

“Déconvolution 3D appliquée à l’imagerie microscopique de fluorescence à partir de coupes sériées optiques” A. Dieterlen, **O. Haeberlé**, C. Xu, Séminaire du GdR μ FoVi, 7 Mai 2003

Posters :

“Modelling of the optical microscope”

O. Haeberlé and P. Török, Focus on Microscopy 2003, Genoa (Italy), April 12-15, 2003

“Reflection Theta Microscopy”

O. Haeberlé et al., Focus on Microscopy 2002, Kaohsiung (Taiwan), April 7-10, 2002

“Modified 4Pi microscope with a resolution near 100 nm and a long working distance”

O. Haeberlé et al., First Joint French-German Congress on Cell Biology, Strasbourg (France), 7-9 November 2001

Séminaires invités :

“The point spread function of fluorescence microscopes: modeling, characterization, and use for deconvolution”

Light Microscopy Group, EMBL (Heidelberg), 14. May 2004

“The image formation process in 3-D fluorescence microscopy”

Photonics Group, Blackett Lab., Imperial College, London (UK), 19. January 2004

“Modelling of the classical, confocal and multiphoton fluorescence microscope”

OptMec, Photonic Research Institute, AIST, Tsukuba (Japan), 15. May 2003

“Stimulated Emission Depletion Microscopy”

OptMec, Photonic Research Institute, AIST, Tsukuba (Japan), 31. July 2002

“Some application of wave focusing : reflection theta microscopy, RIO engineering for nanoobject manipulation, random medium lasers”

OptMec, Photonic Research Institute, AIST, Tsukuba (Japan), 22. Mai 2002

“Sharpening Fluorescence Microscopy by Deconvolution and RIO Engineering”

LASIE, Osaka University, Osaka (Japan), 03. August 2001

“Improving Fluorescence Microscopy Images: Deconvolution, Instrument Characterization, and RIO Engineering”

Photonic Research Institute, AIST, Tsukuba (Japan), 10. July 2001

“Traitements d’Images Appliqués à la Microscopie de Fluorescence”

Service de microscopie confocale – IGBMC, Strasbourg, 22 Mai 2001

“Microscopie de fluorescence 3D : traitement d’image”

Institut de Biologie Physico-Chimique, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 18 Mai 2000

Enseignement dans des Ecoles d’Eté

“IMAGERIE OPTIQUE MICROSCOPIQUE EN 3D : Techniques de microscopie optique, Principes de formation d’images, Amélioration de la résolution”

Ecole d’Eté « Imagerie et Information », Centre de Physique des Houches (France), 30 Mai – 4 Juin 2004

“Improving the resolution in fluorescence microscopy”

EPS-QEOD Europhoton conference “Imaging at the limits”, Institut d’Etudes Scientifiques de Cargese (France), 6-11 September 2004

“Amélioration de la résolution spatiale en microscopie optique : Microscopie 4Pi et Microscopie STED”

Ecole Thématique Interdisciplinaire “Microscopie Fonctionnelle en Biologie”, Ile d’Oléron (France), 12-17 Septembre 2004



Billet de 1000\$ taïwanais....

REFERENCES

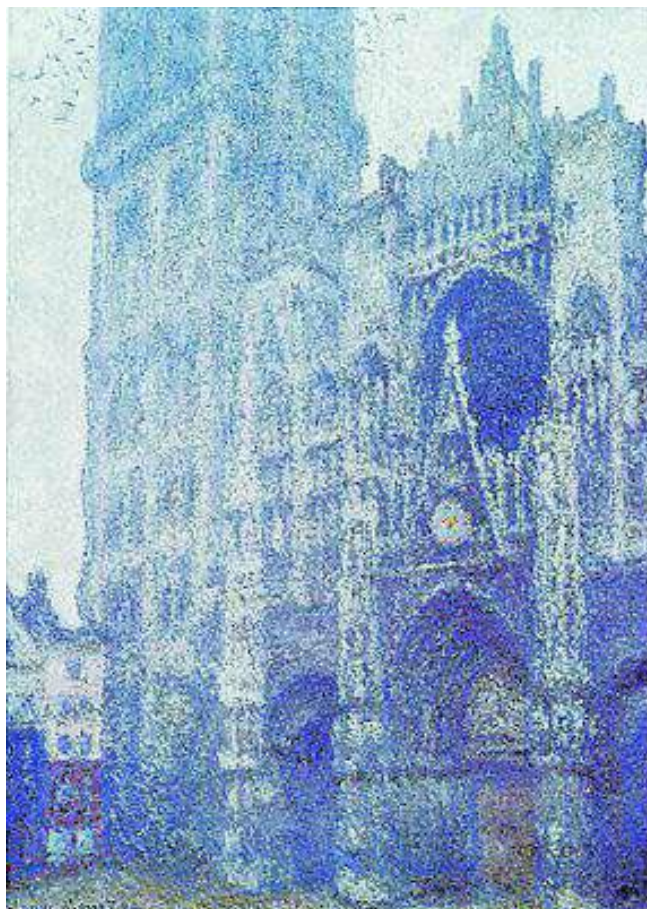
- [1] M. Minsky, *Scanning* **10**, 128 (1988)
- [2] T. Wilson and C.J.R. Sheppard "Theory and practice of Scanning Optical Microscopy" Academic Press, London (1984)
- [3] M. Göpper-Meyer, *Ann. Phys.* **9**, 273 (1931)
- [4] W. Kaiser and C. Garret, *Phys. Rev. Lett.* **7**, 229 (1961)
- [5] W. Denk, J.H. Strickler and W.W. Webb, *Science* **248**, 73 (1990)
- [6] K. König, *J. Microsc.* **200**, 83 (2000)
- [7] D.A. Agard, Y. Hiraoka, P. Shaw and J.W. Sedat in "Methods in Cell Biology, Fluorescence Microscopy in Three-Dimensions Vol. 30" p. 353, D.L. Taylor and Y. Wang eds., Academic, San Diego, Calif. (1989)
- [8] S.F. Gibson and F. Lanni, *J. Opt. Soc. Am. A* **6**, 1357 (1989)
- [9] S.F. Gibson and F. Lanni, *J. Opt. Soc. Am. A* **8**, 1601 (1991)
- [10] M. Born and E. Wolf, "Principles of Optics", Sixth Edition, Pergamon Press, p. 484 (1991)
- [11] www.ibc.wustl.edu/bcl/xcosm/xcosm.html
- [12] E. Wolf, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **253**, 349 (1959)
- [13] B. Richards and E. Wolf, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **253**, 349 (1959)
- [14] P. Török, P. Varga, Z. Laczik and G.R. Booker, *J. Opt. Soc. Am. A* **12**, 325 (1995)
- [15] P. Török, P. Varga and G.R. Booker, *J. Opt. Soc. Am. A* **12**, 2136 (1995)
- [16] P. Török, P. Varga, A. Konkol and G.R. Booker *J. Opt. Soc. Am. A* **13**, 2232 (1996)
- [17] P. Török and P. Varga, *Appl. Opt.* **36**, 2305 (1997)
- [18] P. Török, *Opt. Mem. Neural Net.* **8**, 9 (1999)
- [19] P. Török, P.D. Higdon and T. Wilson, *Opt. Comm.* **148**, 12 (1998)
- [20] P. Török, P.D. Higdon and T. Wilson, *J. Mod. Opt.* **45**, 1681 (1998)
- [21] C.J.R. Sheppard and P. Török, *Bioimaging* **5**, 205 (1997)
- [22] C.J.R. Sheppard and C.J. Cogswell, *Optik* **87**, 34 (1991)
- [23] C.J.R. Sheppard, M. Gu and K. Brain, *Appl. Opt.* **33**, 616 (1994)
- [24] C.J.R. Sheppard and P. Török, *J. Microsc.* **185**, 366 (1997)
- [25] S.H. Wiersma and T.D. Visser, *J. Opt. Soc. Am. A* **13**, 320 (1996)
- [26] S. Hell, G. Reiner, C. Cremer and E.H.K. Stelzer, *J. Microsc.* **169**, 391 (1993)
- [27] F. Perrin, *Ann. Phys. (Paris)* **12**, 169 (1929)
- [28] P. Soleillet, *Ann. Phys. (Paris)* **12**, 23 (1929)

-
- [29] D. Axelrod, Biophys. J. **26**, p. 557 (1979)
 - [30] P. Török, Opt. Lett. **25**, 1463 (2000)
 - [31] O. Haeberlé, M. Ammar, H. Furukawa, K. Tenjimbayashi and P. Török, Opt. Exp. **11**, 2964 (2003)
 - [32] O. Haeberlé, Opt. Comm. **216**, 55 (2003)
 - [33] O. Haeberlé, Opt. Comm. **235**, 1 (2004)
 - [34] E. H. K. Stelzer and S. Lindek, Opt. Commun. **111**, 536 (1994)
 - [35] S. Lindek, N. Salmon, C. Cremer und E. H. K. Stelzer, Optik **98**, 15 (1994)
 - [36] S. Lindek, R. Pick and E.H.K. Stelzer, Rev. of Sci. Instr. **65**, 3365 (1994)
 - [37] E. H. K. Stelzer, S. Lindek, S. Albrecht, R. Pick, G. Ritter, N. J. Salmon und R. Stricker, J. Microsc. **179**, 1 (1995)
 - [38] S. Lindek und E. H. K. Stelzer, J. Opt. Soc. Am. A **13**, 479 (1996):
 - [39] O. Haeberlé, H. Furukawa and K. Tenjimbayashi, C. R. Physique **3**, 1445 (2002)
 - [40] S.W. Hell and E.H.K Stelzer., Opt. Comm. **93**, 277 (1992)
 - [41] S. Lindek, E. H. K. Stelzer und S. W. Hell: Two new high-resolution confocal fluorescence microscopies (4Pi, Theta) with one- and two-photon excitation, in: J. B. Pawley (ed.): Handbook of Biological Confocal Microscopy, 2. Ausg., Plenum Press, New York, 417-430 (1995)
 - [42] S. W. Hell, "Topics in Fluorescence Microscopy Vol. 5" p. 361, J. Lakowicz ed. Penum Press, New York, (1997)
 - [43] M. Schrader, M. Kozubek, S. W. Hell, and T. Wilson, Opt. Lett. **22**, 436 (1997)
 - [44] S.W. Hell and M. Nagorni, Opt. Lett. **23**, 1567 (1998)
 - [45] M. Nagorni and S.W. Hell, J. Opt. Soc. Am. A **18**, 49 (2001)
 - [46] K. Bahlmann, S. Jakobs, S. W. Hell, Ultramicrosc. **87**, 155 (2001)
 - [47] A. Egner, S. Jakobs, and S. W. Hell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**, 3370 (2002)
 - [48] R. Clappier, Olympus France SA, 75 Rue d'Areuil 94533 Rungis, France (personal communication, 2001).
 - [49] O. Haeberlé *et al.*, Opt. Lett. **26**, 1684 (2001)
 - [50] O. Haeberlé *et al.*, Compt. Rend. Acad. Sc. IV (Paris) **2**, 1509 (2001)
 - [51] T. Tanikawa and T. Arai, IEEE Trans. Robot. Autom. **15**, 152 (1999).
 - [52] J. Swoger, S. Lindek, T. Stefany, F.-M. Haar, and E. H. K. Stelzer, Rev. Sci. Instrum. **69**, 2956 (1998).
 - [53] S.W. Hell and J. Wichmann, Opt. Lett. **19**, 780 (1994)
 - [54] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, and S. W. Hell., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**, 8206 (2000)
 - [55] S.W. Hell, Phys. Lett. A **326**, 140 (2004)
 - [56] O. Haeberlé *et al.*, Opt. Comm. **196**, 109 (2001)
 - [57] F. Bicha, "Identification des paramètres d'acquisition de la réponse impulsionnelle d'un microscope de fluorescence" Rapport de DEA, Université de Haute-Alsace (2000)
 - [58] L'indice de réfraction de l'huile utilisée est donné par le constructeur (Cargille) à $n=1.515\pm0.002$ à $T=23^{\circ}\text{C}$ avec une correction en température de $-0.00031/^{\circ}\text{C}$
 - [59] "Reflection Theta Microscopy" O. Haeberlé, *et al.* Poster présenté à Focus on Microscopy 2002, Kaohsiung (Taiwan), April 7-10, 2002
-

CHAPITRE III CONVOLUER.... DECONVOLUER... C'EST TOUJOURS TRAVAILLER.

“Il y avait, c'était sous le règne de Louis XVIII, à l'Académie des Sciences, un Fourier célèbre que la postérité a oublié”

Victor Hugo, *Les Misérables*



Claude Monet “La Cathédrale de Rouen”

3.1 Introduction

Du point de vue du physicien qui étudie le microscope en optique diffractive, le processus de formation d'image se comprend comme suit à l'aide de la RIO : chaque point lumineux de la source va être transformé par le microscope en une tache d'Airy en 3D. L'image obtenue est donc une collection de RIO, parfaitement déterministe.

D'un point de vue de physicien en mécanique quantique, qui considère les photons individuellement se propageant à travers le système optique, la RIO s'interprète comme la probabilité pour un photon émis par un point lumineux de la source d'être collecté à un endroit précis dans l'espace image. L'image se forme photon par photon, et seule une très grande accumulation de photon (moyennage) permet de réobtenir la RIO telle que prévue par l'optique diffractive. Dans ce cas, l'image est considérée comme une collection de photon, et s'interprète d'un point de vue statistique.

Lorsque l'on envisage de traiter les images en provenance d'un microscope de manière numérique, il convient de donner une description mathématique du processus de formation d'image. On retrouve alors ces deux approches physiques différentes dans les deux types de description mathématique du phénomène de formation d'image : les modèles déterministes et les modèles statistiques ou Bayésiens.

Pour montrer l'intérêt et les difficultés de la déconvolution en microscopie de fluorescence, il est cependant plus simple de se baser sur le modèle déterministe de convolution de l'objet par la réponse impulsionnelle optique du microscope. En négligeant l'influence du bruit et en supposant le système linéaire et invariant, on peut donc décrire le processus de formation d'image par l'équation de convolution :

$$g(x) = \int h(x - x_1)f(x_1)dx_1 \quad (3.1)$$

où $f(x)$ est l'objet de départ, $h(x)$ la RIO du système et $g(x)$ l'image obtenue. Si l'on réécrit cette équation dans l'espace de Fourier, on obtient alors :

$$G(\mu) = H(\mu)F(\mu) \quad (3.2)$$

où $H(\mu)$ est la réponse fréquentielle du système (Optical Transfer Function: OTF) qui est donc la transformée de Fourier 3D de la réponse impulsionnelle optique.

Si on considère le système du point de vue de l'automaticien ou de l'électronicien, c'est à dire comme un filtre, l'OTF permet donc de caractériser ce filtre : le système de mesure H échantillonne une quantité F du monde réel en un ensemble de données numériques G entachées d'erreurs expérimentales (et de bruit B). Le dispositif de mesure ne fournit pas la quantité exacte F mais une version dégradée de celle-ci. Après avoir identifié la transformation subie par les données originales, on peut envisager la transformation inverse qui permet sinon de retrouver F , du moins de restaurer les données G pour obtenir une image plus fidèle de F . La transformation H peut être déterminée à partir de considérations physiques sur le dispositif de mesure à l'aide d'un modèle, ou mesurée expérimentalement, comme il a été montré dans le Chapitre II.

L'idée de la déconvolution est donc de reconstruire le plus fidèlement possible les données de départ. En effet, comme pour tout système, le microscope en donne une version dégradée. Cette dégradation est d'autant plus notable que l'on cherche à voir de petits détails, c'est à dire qu'on se rapproche de la limite de résolution du système. Pour parvenir à un résultat le plus satisfaisant possible, le système de déconvolution devrait idéalement combiner comme le résume la Figure 3.1 :

- un modèle de formation d'image correct
- une bonne connaissance des paramètres d'acquisition
- un algorithme de déconvolution adapté
- des connaissances a priori sur le spécimen

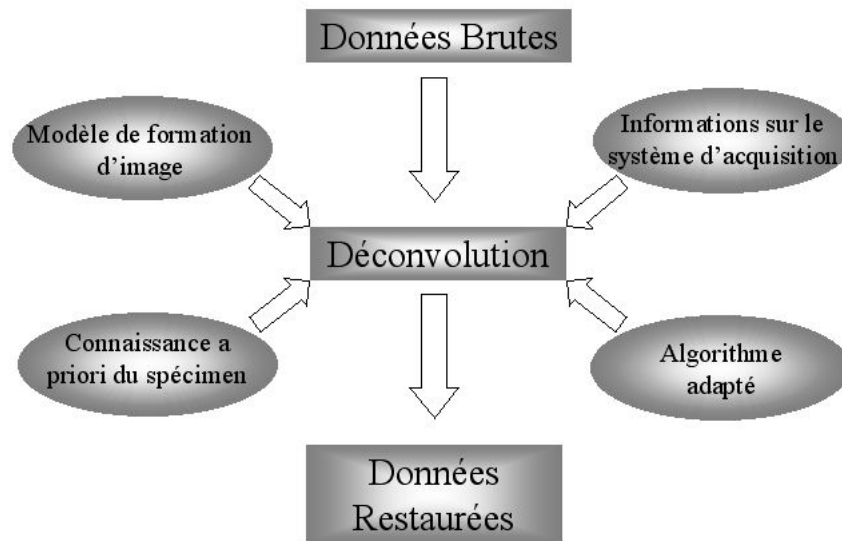


FIGURE 3.1. Structure type d'un système de déconvolution.

A titre d'exemple, on peut donner certaines caractéristiques particulières du microscope optique [1]. La Figure 3.2 montre en trois dimensions son OTF 3D. L'axe η représente les fréquences longitudinales (le long de l'axe optique z). Les fréquences latérales μ sont groupées sous la forme $\mu = (\mu_x^2 + \mu_y^2)^{1/2}$ avec μ_x et μ_y les fréquences selon l'axe x et l'axe y respectivement. Cette figure illustre bien les spécificités d'un tel instrument.

- Les fréquences latérales et longitudinales sont liées : à la fréquence latérale zéro, aucune fréquence longitudinale, c'est à dire aucune information, n'est transmise. De même à une fréquence longitudinale donnée, seules certaines fréquences latérales sont transmises.
- L'OTF présente un cône de fréquences non-transmises, appelé "missing cone" en anglais. L'ouverture de ce cône est directement liée à l'ouverture numérique de l'objectif utilisé.
- Enfin, on note la présence d'un pic de Dirac à l'origine. Il traduit le fait que chaque plan de l'image, qui est normalement l'image d'un seul plan de l'objet, contient en fait des informations de tous les plans de l'objet.

La conséquence en est qu'un objet vu à travers un microscope optique est [2] :

- flou, à cause de l'effet de filtrage de l'OTF (atténuation des hautes fréquences)
- déformé, à cause du filtrage différent en x - y et en z (allongement selon l'axe z)
- déformé, à cause du mélange d'information des plans (présence du pic de Dirac)

A cause de ces déformations, l'image brute d'un microscope optique est inutilisable pour toute mesure quantitative. Un algorithme de déconvolution adapté à la microscopie optique devrait donc tenir compte de ces spécificités pour restaurer correctement l'image. En particulier pour redonner sa forme correcte à l'objet, il faudra "remplir" le missing cone.

Enfin, on a vu au Chapitre II que la RIO d'un microscope confocal idéal peut être calculée en première approximation à partir de la RIO d'un microscope classique par élévation au carré. En conséquence, l'OTF d'un microscope confocal est obtenue par convolution de l'OTF d'un microscope classique avec elle-même. Cette opération de convolution va remplir le missing cone, ce qui explique les propriétés intrinsèques de sectionnement optique du microscope confocal par rapport au microscope classique. D'autre part, une opération de convolution ayant pour effet d'élargir le support de l'OTF, plus de fréquences sont donc transmises, et la RIO du microscope confocal est donc plus compacte que la RIO du microscope classique. Cette approche "filtrage" est en fait complémentaire de l'approche physique pour bien comprendre les propriétés imageantes de ces systèmes.

Dans la suite de ce chapitre sont présentés les travaux relatifs aux différents aspects importants d'un système de déconvolution tels qu'illustrés par la Figure 3.1, puis sont exposés certaines améliorations apportées aux algorithmes de déconvolution eux mêmes.

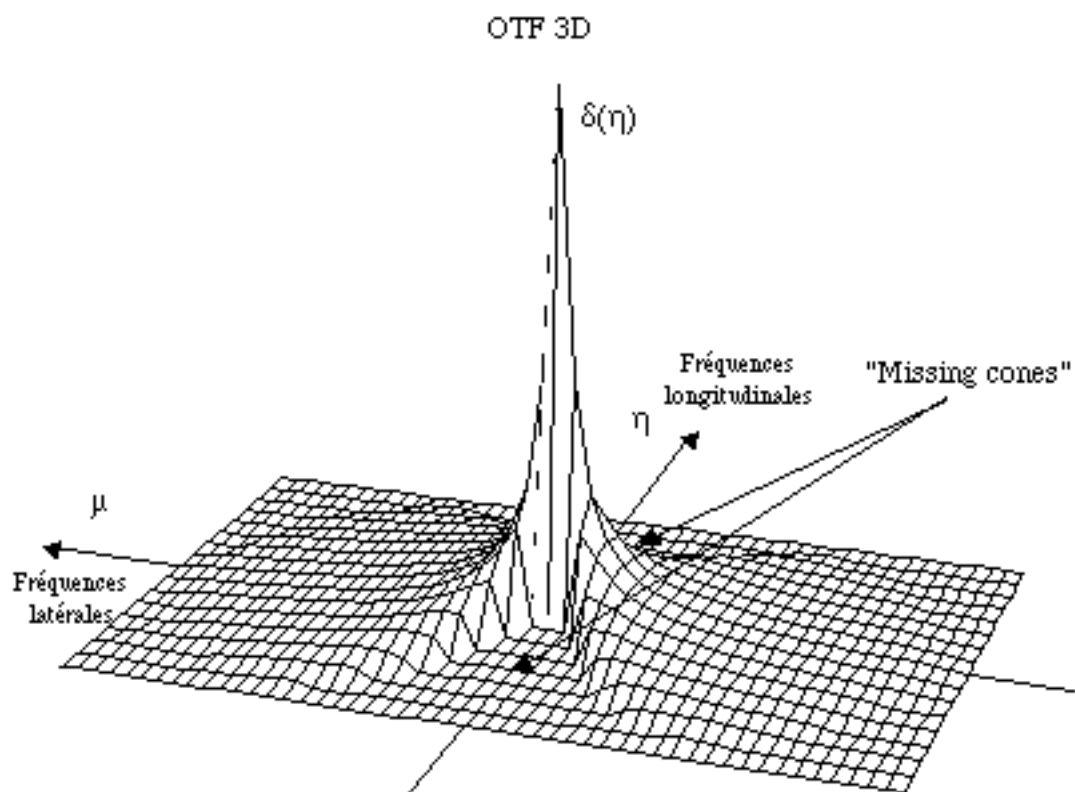


FIGURE 3.2. OTF d'un microscope classique

3.2 Déconvolution : équation intégrale en 2D ou 3D

Le domaine des équations intégrales est relativement ancien dans l'histoire des mathématiques et des sciences en général, remontant à environ 300 ans. Cependant, l'essentiel de la théorie des équations intégrales date du 20^{ème} siècle, et l'apparition de l'ordinateur dans les années 60 a considérablement élargi les domaines d'utilisation des équations intégrales. En mathématiques, une équation intégrale est une équation dans laquelle une inconnue apparaît sous un signe intégral. Les théories des équations intégrales et des équations différentielles sont très proches, et beaucoup de problèmes peuvent s'écrire avec les deux formalismes.

On peut, très grossièrement, classer les équations intégrales en deux grandes familles [3]. Celles pour lesquelles le domaine d'intégration varie avec la variable libre sont appelées *équations intégrales de Volterra*. Lorsque le domaine d'intégration est fixe, on parle d'*équations intégrales de Fredholm*. Les situations physiques exposées dans le reste de ce manuscrit nous conduisent à nous intéresser aux équations intégrales de Fredholm. C'était par exemple déjà le cas avec le problème du réseau, déjà rencontré au Chapitre I [4].

Les équations de Fredholm se divisent en deux genres. Lorsque l'équation s'écrit sous la forme :

$$\int_D K(t, s)x(s)ds = y(t) \quad t \in D \quad (3.3)$$

on parle d'équation intégrale de Fredholm du premier type. D est un ensemble fermé de $\mathbb{R}^n$. Le noyau $K(t, s)$ est supposé absolument intégrable. Ces équations sont habituellement considérées comme mal posées, car la solution x est très sensible à de petites variations dans les données y et des techniques spéciales de régularisation sont nécessaires.

Les équations du second type ont la forme :

$$\lambda x(t) + \int_D K(t, s)x(s)ds = y(t) \quad t \in D, \lambda \neq 0 \quad (3.4)$$

Si $y=0$, on a alors un problème de valeurs propres, et l'on cherche simultanément la valeur propre λ et une fonction propre x . Si $y \neq 0$, étant donné y et λ , on cherche une solution x . C'est un problème non-homogène.

Il n'existe pas de méthode générale efficace pour résoudre les équations intégrales. Il convient en particulier d'adapter la méthode aux spécificités du noyau $K(s, t)$. Le lecteur intéressé trouvera dans les références [3][4] un excellent point de départ sur les méthodes numériques de résolution des équations intégrales. Dans ce Chapitre seront décrites uniquement les méthodes utilisées dans notre groupe pour traiter du problème de la déconvolution 3D des images de fluorescence.

D'un point de vue pédagogique, on peut s'étonner que dans la formation de nos étudiants, les équations intégrales et leurs méthodes de résolution sont largement ignorées, alors que les équations différentielles sont traitées avec beaucoup plus d'attention.

3.2.1 Modèles déterministes

Les modèles déterministes traduisent directement l'approche d'optique diffractive qui décrit l'image comme une collection de RIO. Le phénomène s'écrit sous forme d'une équation de convolution :

$$g(x) = \int h(x, x_1)f(x, x_1)dx_1 \quad (3.5)$$

où $f(x)$ est l'objet de départ, $h(x)$ la RIO du système et $g(x)$ l'image obtenue. On retrouve là une équation de Fredholm (de la première catégorie) comme dans le cas des équations intégrales servant à résoudre le problème du réseau (Chapitres I). On peut donc s'attendre à des difficultés similaires de résolution de cette équation

(conditionnement, stabilité de la solution). Par rapport au problème du réseau, ces difficultés sont ici encore augmentées ici par le fait que l'on travaille sur des images 3D, et que les images réelles sont contaminées par du bruit.

On considère en général le système imageur comme étant linéaire et invariant par translation. L'équation (3.5) se réécrit alors sous la forme d'un produit de convolution linéaire et invariant :

$$g(x) = \int h(x - x_1) f(x_1) dx_1 \quad (3.6)$$

Les systèmes d'acquisition donnant une image discrétisée de l'objet, on peut réécrire l'équation (3.6) :

$$g(k) = \sum_j h(k - j) f(j) \quad (3.7)$$

De manière plus générale, et pour tenir compte de certaines limitations du système dans les conditions réelles (saturation de l'image, bruit etc.), l'expression (3.7) se généralise sous la forme :

$$g(k) = P \left[\sum_j h(k - j) f(j) \right] \oplus b(k) \quad (3.8)$$

où P est une projection non linéaire, b représente les sources de bruit dans le système physique et $\oplus$ un opérateur point à point dont la fonction dépend de la nature du bruit (bruit de photons dans les images de faible intensité, bruit gaussien dû aux électroniques d'acquisition).

Pour le traitement numérique des données, il est plus commode de réécrire ses équations sous forme matricielle et dans l'espace de Fourier, ce qui transforme les équations de convolution en simple produit. Le problème de la déconvolution "se réduit" donc à l'inversion d'un système matriciel. La taille (image 3D) et la complexité (mauvais conditionnement des matrices) de ce système constituent alors les principales difficultés pour retrouver l'objet de départ, vu déformé à travers le microscope. Une "simple" inversion n'est alors plus adaptée, à cause du mauvais conditionnement du système matriciel qui conduit à une sensibilité extrême par rapport aux conditions initiales, et aussi à une amplification parfois catastrophique du bruit. Il convient alors d'introduire des procédures de régularisation permettant de stabiliser la solution.

3.2.2 Modèles Bayésien

Pour ces modèles, l'image acquise $g(x)$ et l'objet observé $f(x)$ sont toujours supposés liés par l'équation de convolution (3.5), mais la formation d'image est un processus aléatoire et $g(x)$ n'est qu'un échantillon de ce processus à un instant donné.

Il est bien connu que les photons collectés par un détecteur CCD ou un photomultiplicateur obéissent à la statistique de Poisson [5]. Le modèle Bayésien est basé sur la probabilité conditionnelle :

$$P(f/g) = \frac{P(f, g)}{P(g)} = \frac{P(g/f)P(f)}{P(g)} \quad (3.9)$$

La densité de probabilité (Probability Density Function : PDF) $P(x)$ est celle de Poisson. Pour un pixel x de l'image, la PDF s'écrit :

$$P(x) = \frac{\lambda^x \exp(-\lambda)}{x!} \quad (3.10)$$

où λ est un paramètre qui caractérise l'arrivée des photons par unité de temps. On considère que la collecte des photons de chaque cellule CCD est indépendante, alors la PDF de l'ensemble des pixels qui forment l'image est le produit de la PDF de chaque pixel :

$$P(f/g) = \prod_k \frac{(h(k) \otimes f(k))^{g(k)} \exp(-h(k) \otimes f(k))}{g(k)!} \quad (3.11)$$

où $h(k) \otimes f(k)$ est le paramètre qui représente λ .

3.2.3 Présentation de quelques algorithmes

De nombreux algorithmes de déconvolution ont été développés pour la microscopie de fluorescence 3D [6]-[32]. Certains sont très généralistes, d'autres très spécialisés. Nous utilisons couramment au LabEl quatre méthodes qui sont bien adaptées à la microscopie de fluorescence. Elles supposent toutes la connaissance du processus de formation d'images, à savoir la Réponse Impulsionnelle Optique du système (voir Chapitre II), par opposition aux méthodes dites aveugles ou myopes, qui ne nécessitent qu'une connaissance partielle de la RIO.

Ces méthodes sont : LLS ("Linear Least Square" développée pour la microscopie de fluorescence par C. Preza, MAP ("Maximum a Posteriori"), ML-EM ("Maximum Likelihood-Expectation Maximization" principalement développée par T. Holmes, et l'algorithme de W.A. Carrington, basé sur la méthode POCS ("Projection onto Convex Sets").

Elles tiennent toute quatre compte des particularités de la RIO, à savoir que :

- le système est singulier (présence d'un pic de Dirac à l'origine),
- la solution peut être instable à cause du bruit.

3.2.3.1 Linear Least square Solution (LLS)

Cette méthode de déconvolution développée par Preza [6]-[8] est une méthode linéaire basée sur le modèle déterministe, qui réalise une inversion directe régularisée. Deux hypothèses sont faites avec cette méthode :

- le processus de formation d'image est linéaire,
- le bruit est supposé blanc gaussien additif et non corrélé au signal.

A partir de ces deux hypothèses, on peut conclure que les petites valeurs propres sont principalement responsables de l'amplification du bruit lors de l'inversion du système. Donc, la régularisation proposée consiste à éliminer les petites valeurs propres de l'OTF inférieures à un seuil λ_m prédéfini. La difficulté est donc le choix de λ_m . La formule de l'inversion matricielle s'écrit alors :

$$\hat{f} = \Phi_{LLS} g = [H'^* H']^{-1} H'^* g \quad (3.12)$$

avec $\hat{f}$ l'estimée de l'objet originel, g l'image observée, H représente l'OTF, et H' l'OTF régularisée. Les valeurs propres inférieures au seuil λ_m sont éliminées de la matrice H pour former la matrice régularisée H' .

Le problème principal consiste donc à déterminer le seuil optimal de régularisation λ_m . Trop petit, on ne règle pas le problème de l'instabilité. Trop grand, on supprime de l'information dans l'image, et non plus seulement du bruit. On peut en effet assimiler cette méthode à un filtrage sur les hautes-fréquences de l'image.

Preza a appliqué la jauge de Joyce et Root [9][10]. Elle consiste à minimiser la somme des erreurs de biais et des erreurs dues au bruit :

$$\min \left(\sum (f - \hat{f})^2 + \sigma^2 \sum_{i=1}^m \frac{1}{\lambda_i} \right) \quad (3.13)$$

avec f l'objet original, $\hat{f}$ l'estimée de cet objet, σ la variance du bruit, λ_m les valeurs propres conservées.

On recherche le minimum de (2.15) qui offre le meilleur compromis précision-stabilité.

Si λ_m est faible, le bruit dans l'image restaurée est plus amplifié mais l'erreur de biais est réduite ; Si λ_m est élevé, le bruit dans l'image restaurée est faible, mais l'erreur de biais devient importante.

La détermination de λ_m optimal est d'autant plus difficile que l'erreur de biais est supposée être mesurée dans l'espace des objets qui est évidemment inconnu (on n'a en réalité accès à l'espace image uniquement). Dans la pratique, ce paramètre est introduit manuellement par l'utilisateur [11]. L'utilisateur ne possède aucun critère de choix précis, il sait juste que la valeur de λ_m est comprise entre 1 valeur propre la plus grande et 10^{-6} , la précision courante du calcul numérique. Le choix pour cette valeur est donc très étendu. Cette méthode semble donc très adaptée à des tests sur des images de synthèse, pour lesquelles on connaît l'objet de départ. Pour des images réelles, le choix du paramètre de régularisation nécessite une certaine expérience de la part de l'utilisateur.

D'autre part l'hypothèse de bruit blanc gaussien est sujette à discussion, les phénomènes de fluorescence donnant lieu à un bruit poissonien. Lorsque les images sont faiblement bruitées, il a cependant été montré que les résultats obtenus avec cette méthode sont tout à fait satisfaisants.

L'intérêt premier de cette méthode est sa rapidité : en effet on obtient le résultat par une inversion directe.

3.2.3.2 Algorithme de Carrington

Il a été montré que les méthodes de déconvolution utilisant comme critère de stabilité les moindres carrés ne pouvaient donner de solution stable [12]. On a vu que la méthode LLS résolvait ce problème en supprimant tout simplement les petites valeurs propres responsables de l'instabilité. Walter Carrington [13]-[17] a proposé une autre approche, basée sur la minimisation d'une fonctionnelle avec une contrainte au sens des moindres carrés.

Cette méthode cherche une estimée $\hat{f}$ de f par minimisation de la fonction de coût suivante :

$$\min_{\{\hat{f} \geq 0\}} \sum \left| g - \iiint h(x) \hat{f}(x) dx \right|^2 + \alpha \iiint |\hat{f}(x)|^2 dx \quad (3.14)$$

$h(x)\hat{f}(x)$ l'image estimée, g l'image observée, h la RIO du système, α le paramètre de régularisation.

Le premier terme de cette fonctionnelle représente la différence entre l'image originale et l'image recalculée de l'objet restauré. Le second terme représente le lissage de la solution, qui impose qu'il n'y ait pas de transitions brusques.

Cet algorithme est itératif, deux contraintes sont appliquées à chaque itération :

- la contrainte de positivité,
- $\hat{f}$ ne comporte pas de transition brutale (en forme et en intensité).

ce qui conduit la solution à se trouver dans un espace convexe fermé. La méthode de Carrington est donc essentiellement basée sur la méthode POCS (Projection onto Convex Sets). Dans ce cas, l'estimée qui permet la minimisation de l'équation (3.14) est unique. La méthode numérique de minimisation est celle du gradient conjugué.

L'intérêt de cette méthode est l'unicité de la solution, par contre, c'est une méthode itérative, donc relativement lente. Le paramètre de régularisation α décrit le compromis entre la précision et la stabilité de la solution. La détermination de ce paramètre fait appel à l'expérience de l'opérateur. Si α est faible, les données sont lissées et peu sensibles au bruit. La précision des données restaurées est cependant faible. Si α est grand, la précision est meilleure, mais le résultat moins stable. On considère généralement que les spécimens fluorescents ne présentent pas de transitions brusques. Des expériences numériques ont conduit Walter Carrington à proposer la valeur de $\alpha = 10^{-5}$ comme un bon compromis pour les images de fluorescence.

Carrington a montré durant sa thèse, que la solution issue de la minimisation de cette fonction de coût (3.14) est particulièrement appropriée aux spécimens fluorescents fins. Pour les spécimens épais, aucune donnée n'étaient disponible. Nous étudierons au Paragraphe 3.3 l'application de cette méthode dans le cas général.

3.2.3.3 Maximum A Posteriori (MAP)

En microscopie de fluorescence, la littérature fait ressortir deux grandes familles de solutions bien adaptées au problème des images en trois dimensions, et tenant compte du bruit :

- la première utilise deux informations a priori, la statistique du bruit et le modèle de distribution d'entropie de l'image d'origine [18],
- la deuxième utilise une maximisation de l'espérance mathématique [19][20].

Ces solutions sont très complexes et leur implémentation pratique est souvent largement simplifiée. Le logiciel XCOSM qui historiquement est à la base des travaux en déconvolution de notre groupe intègre une solution approchée de MAP sous la forme suivante :

$$\hat{f} = \frac{H^*}{|H|^2 + 2\alpha(\omega_x^2 + \omega_y^2 + \omega_z^2)} \quad (3.15)$$

où $\hat{f}$ est l'estimée de l'objet originel, g est image observée, H est l'OTF (transformée de Fourier de la RIO) α est un coefficient de régularisation et ω_x , ω_y , ω_z représentent les fréquences spatiales.

Dans la pratique, l'utilisateur saisit la valeur de α . Il connaît uniquement la valeur minimale et maximale que peut prendre ce paramètre (de 0 à 1). Il fera ensuite appel à son expérience personnelle pour faire le meilleur choix, et ce paramètre doit bien évidemment rester constant pour des images acquises dans des conditions expérimentales sinon identiques, du moins similaires.

La méthode MAP telle qu'elle est implémentée dans XCOSM est donc une méthode «plus douce» que la méthode LLS, car elle se contente de modifier les petites valeurs propres responsables de l'instabilité de la déconvolution, là où LLS les supprime purement et simplement.

Cependant, le choix optimal de ce paramètre est lui aussi difficile et fait appel à des connaissances a priori sur le spécimen et à l'expérience de l'utilisateur. Les mêmes images brutes déconvoluées avec le même algorithme par des opérateurs différents peuvent donc donner des images finales très différentes. Au Paragraphe 3.5 sera présentée une méthode d'automatisation de MAP (et de LLS) qui vise à supprimer cette dépendance.

3.2.3.4 Maximum Likelihood-Expectation Maximization (ML-EM)

La solution du Maximum Likelihood-Expectation Maximization est aussi dérivée des modèles statistiques de formation des images. On trouve dans la littérature de nombreuses évaluations et applications de cette méthode, qui est généralement considérée comme étant celle donnant les résultats les plus précis et les plus fiables, car cette méthode est peu sensible au bruit dans les images.

La solution la plus couramment employée est celle de Lucy et Richardson qui ont proposé une implémentation itérative de la solution sous la forme [21][22]

$$\hat{f}^{n+1} = \hat{f}^n \cdot h \otimes \left(\frac{g}{h \otimes \hat{f}^n} \right) \quad (3.16)$$

Cette solution a été reprise dans le domaine de la microscopie de fluorescence par Holmes [23]. Verveer a introduit une pénalité de rugosité de Good [24] à chaque itération afin d'améliorer la convergence.

Pour obtenir une restauration correcte, un nombre important d'itérations est nécessaire, ce qui constitue la limitation la plus importante de cette méthode, qui peut se révéler lente sur des images de taille importante ou très bruitées. De plus, le choix du nombre d'itération est fait par l'utilisateur, et est donné a priori au lancement de l'algorithme. Cette méthode fait donc elle aussi appel à l'expérience personnelle du «déconvolveur».

3.3 Adéquations des algorithmes existants

Dans un premier temps, un travail d'étude des algorithmes existant et couramment utilisés en microscopie de fluorescence a été entrepris. Je me suis en particulier attaché à caractériser la qualité de la reconstruction et à étudier l'adéquation du modèle de formation d'image (invariance en profondeur) utilisé en déconvolution et la sensibilité des algorithmes aux conditions initiales d'acquisition de l'image. Les résultats obtenus sont présentés dans les trois paragraphes suivants.

3.3.1 Efficacité de reconstruction des algorithmes de déconvolution

Un travail d'évaluation de l'efficacité de reconstruction des algorithmes de déconvolution existants a été entrepris par Alain Chomik durant sa thèse [33], à laquelle j'ai contribué durant mon séjour comme ATER au LabEl en 1996-1997. Ce travail a consisté à comparer différents algorithmes en terme de rapidité, précision de reconstruction, sensibilité au bruit à l'aide d'objets de synthèse aux caractéristiques bien connues. Les mesures géométriques effectuées sur les reconstructions peuvent donc être directement comparées aux mesures faites sur les objets de départ, contrairement à ce qui peut se faire par l'expérience. On peut raisonnablement penser que les algorithmes les plus efficaces sur ces objets de synthèse seront aussi les plus efficaces dans le cas de la déconvolution de specimens biologiques. Cette première partie est donc consacrée à l'adaptation des algorithmes de déconvolution au cas de la microscopie de fluorescence (Figure 3.3).

On a mesuré la RIO d'un microscope de fluorescence équipé du système CellScan pour la prise de vue en 3D, et d'une caméra refroidie CCD-1317K de Princeton Corp. avec une taille de pixel de $6.8 \times 6.8 \mu\text{m}^2$ en mode binning x2, et d'un objectif x100 à immersion à huile (N.A.=1.25, noil=1.515). Les RIO ont été mesurées à $\lambda=530 \text{ nm}$ à l'aide de bille de latex fluorescente de $0.20 \mu\text{m}$ de diamètre (Interfacial Dynamics Corporation). L'image 3D de la RIO est constituée de 128 plans de 128×128 pixels, avec une résolution latérale de $0.12 \mu\text{m}$ et une résolution axiale de $0.25 \mu\text{m}$ [34].

Les algorithmes de déconvolution utilisés dans ce travail (LLS, ML-EM et algorithme de Carrington) ont été présentés au Paragraphe 3.2. Pour comparer les résultats des différentes méthodes, on a réalisé un objet de synthèse correspondant à une bille pleine fluorescente de diamètre 92 voxels, centrée dans le bloc image de $128 \times 128 \times 128$ voxels. La sphère occupe donc approximativement la moitié du volume considéré. L'intensité de la sphère est uniforme, fixée à 4000 (codage sur 12 bits) avec un fond fixé à 1 correspondant aux meilleures conditions expérimentales rencontrées.

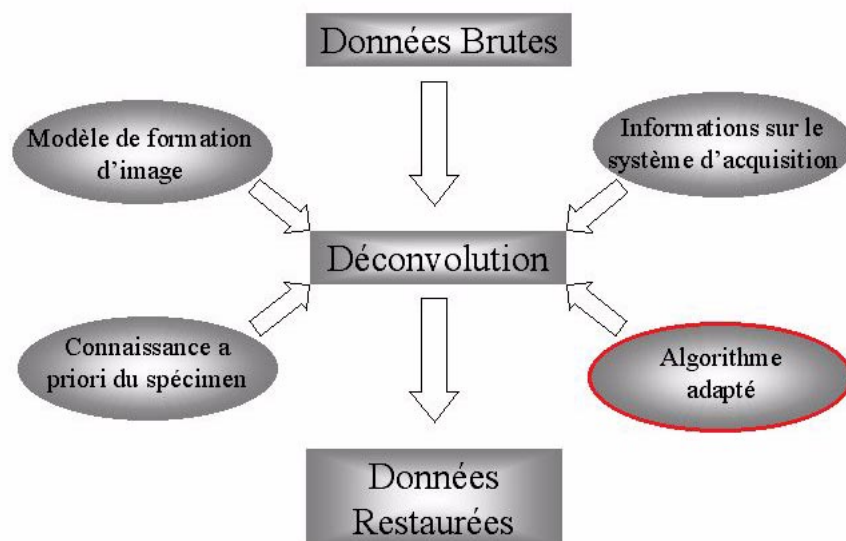


FIGURE 3.3. L'algorithme utilisé est-il adapté au problème ?

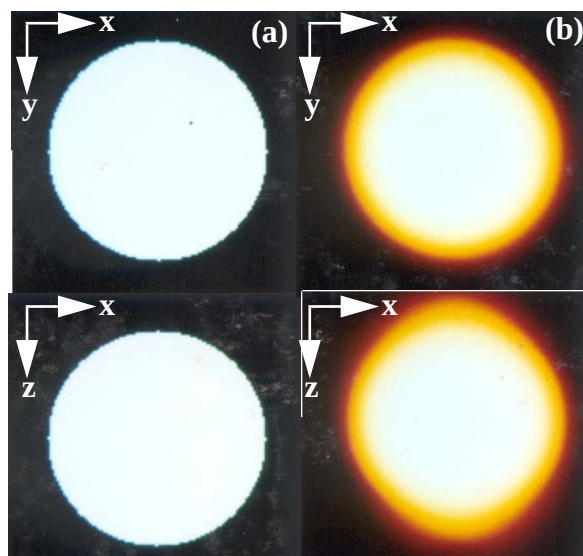


FIGURE 3.4. Effet de la convolution sur une bille. Coupes x-y (haut) et x-z (bas) (a) : bille originale. (a') : bille convoluée par la RIO expérimentale.

Cet objet a été convolué avec la RIO expérimentale, et non pas une RIO calculée, pour refléter au mieux les conditions réelles d'acquisition rencontrées avec le microscope considéré. Après convolution, on obtient donc une image floue similaire à ce qu'on observerait dans notre microscope. La Figure 3.4 présente la bille originale et l'image simulée de celle-ci obtenue par convolution avec la RIO expérimentale. La comparaison sur les coupes x-z montre l'élongation selon l'axe optique. Sur une bille de cette taille, l'effet de déformation dû à la fonction de transfert du microscope est moins spectaculaire que pour de très petites billes, mais il apparaît cependant déjà clairement que toute mesure (taille ou intensité) effectuée sur la Figure 3.4(b) sera entachée de larges erreurs.

Pour illustrer ce fait, la Figure 3.5 montre l'histogramme des intensités dans l'image 3D de la bille après convolution par la RIO mesurée, présenté sur une échelle de 256 niveaux de gris. La convolution mélange les distributions d'intensité du bruit avec celle de l'objet. Si on segmente l'image à un niveau donné, obtenir une détermination précise de la taille de l'objet de départ est difficile. Le seuil optimal est à 128, donnant une erreur de 2% seulement sur la mesure de volume, mais tolérer une erreur de 10% sur ce volume définit une plage de segmentation étroite de 35 niveaux de gris seulement. De plus, l'objet obtenu sera déformé et les mesures d'intensité incorrectes. Ceci montre qu'une déconvolution est nécessaire avant toute mesure géométrique ou d'intensité.

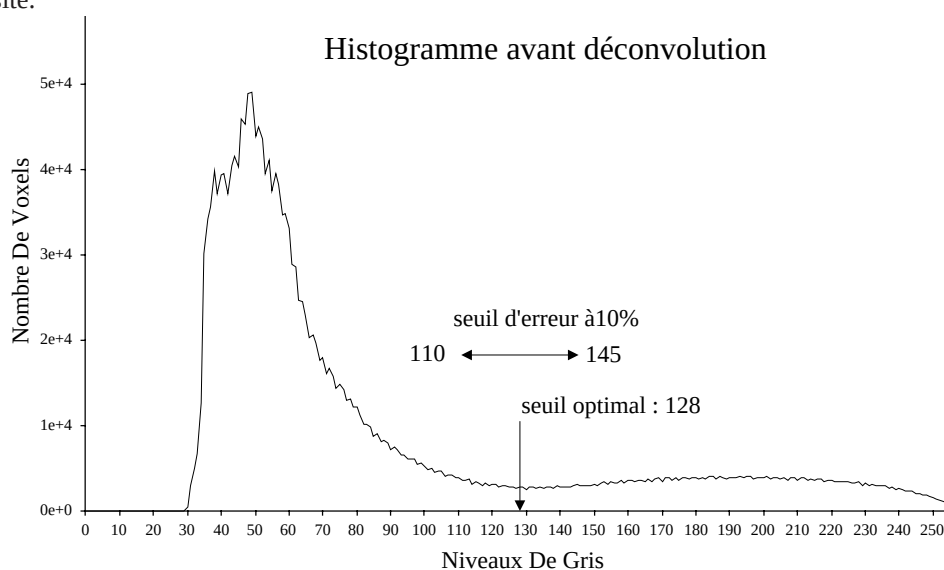


FIGURE 3.5. Histogramme en niveau de gris de l'image d'origine.

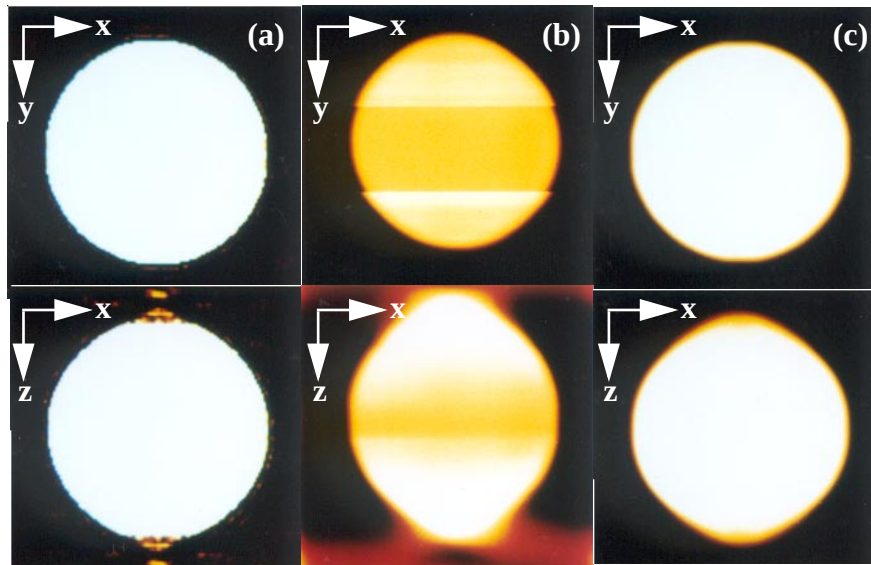


FIGURE 3.6. Résultats de la déconvolution de l'image simulée (Figure 3.4(b)). Coupes x-y (haut) et x-z (bas) (a) : méthode LLS. (b) : méthode de Carrington. (c) : méthode ML-EM.

L'image simulée a alors été déconvoluée à l'aide des algorithmes LLS, ML-EM et de la méthode de Carrington (POCS). La Figure 3.6 montre les résultats obtenus. Les billes ont été recentrées et sont présentées en coupes horizontales (x-y) et verticales au milieu de la bille (64^{ème} plan en x-y et en x-z).

On peut voir que la méthode LLS (Figure 3.6(a)) conduit à une bonne reconstruction de la forme de l'objet. Ceci est particulièrement vrai grâce au bas niveau de bruit, la méthode étant en effet très sensible au bruit. Il subsiste une légère déformation, et on note l'apparition d'artéfacts de reconstruction, comme de légères oscillations le long du contour de l'objet.

Avec la méthode POCS (Carrington), les résultats sont mitigés. La zone centrale de l'image est bien restaurée, aussi bien en volume qu'en intensité. La robustesse est bonne (peu de sensibilité au bruit), mais la correction de l'élongation en z est marginale, et on peut voir des artéfacts de restauration sur le haut et le bas de la bille ((Figure 3.6(b)). En fait cette méthode est connue pour donner d'excellents résultats sur des spécimens fins, mais n'apparaît pas être vraiment adaptée à des études en 3D sur de gros objets.

La méthode ML-EM (Figure 3.6(c)) semble donner les meilleurs résultats. Elle est très robuste au bruit, et reconstruit correctement l'objet par correction de l'élongation en z. Il subsiste cependant une légère déformation. Le calcul a porté sur 500 itérations. Un plus grand nombre d'itération améliore encore le résultat, mais cette méthode est très gourmande en tant de calcul.

Les Figures 5.6 à 5.8 montre les histogrammes en 256 niveaux de gris des images déconvoluées.

On peut voir sur la Figure 3.7 qu'avec la méthode LLS, l'image est très bien séparée du fond après restauration : le segmentation de l'image est donc très facile, comme le montre la plage de variation du seuil de segmentation qui peut varier de 193 niveaux tout en conservant une erreur sur le volume inférieure à 10%.

Pour la méthode de Carrington, il n'est pas possible de clairement séparer l'objet du fond, ce qui conduit à une grande erreur sur le volume dans une plage très étroite de segmentation (Figure 3.8).

Enfin, pour la méthode ML-EM, l'image est aussi très bien séparée du fond après restauration, ce qui laisse une large plage de segmentation possible (Figure 3.9).

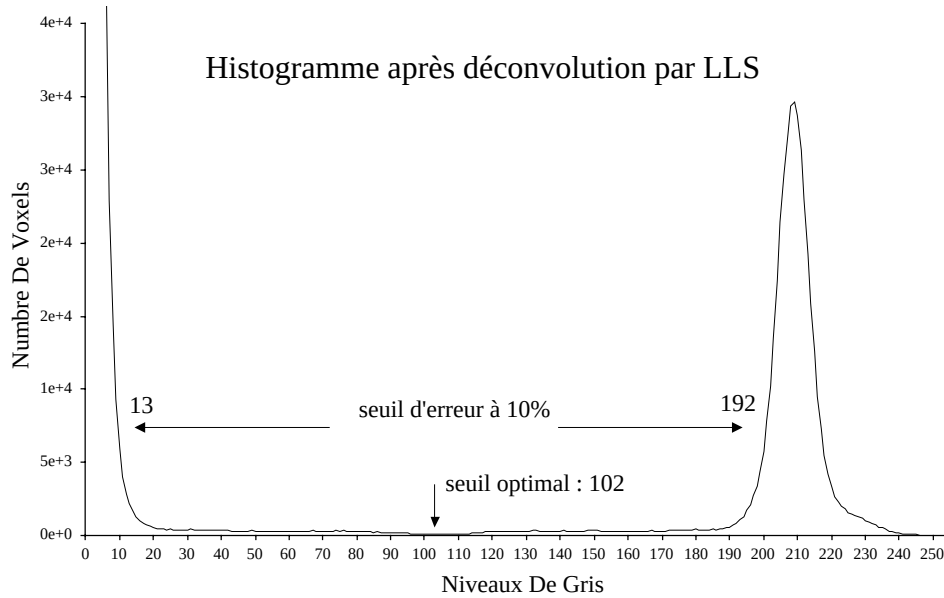


FIGURE 3.7. Histogramme en niveau de gris après déconvolution par la méthode LLS.

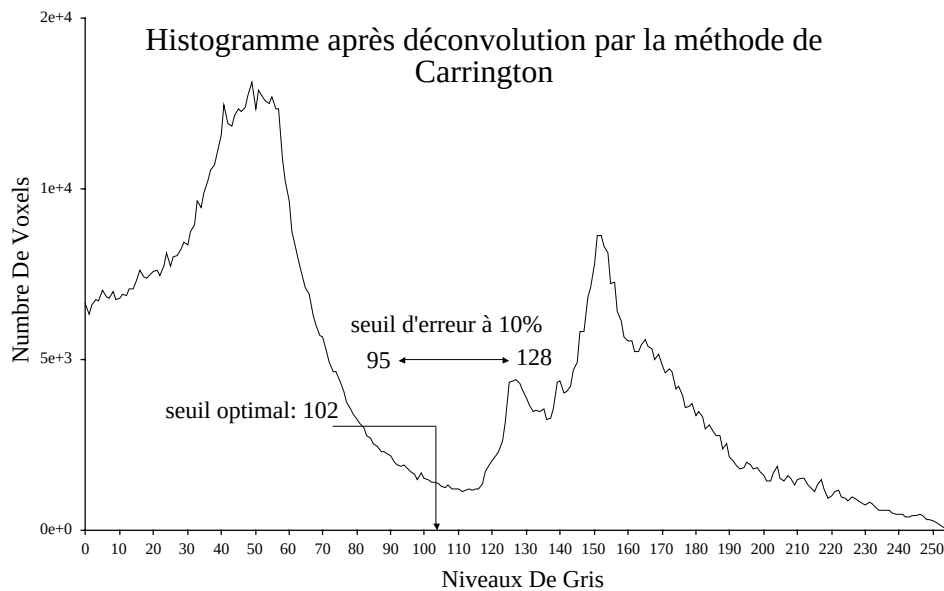


FIGURE 3.8. Histogramme en niveau de gris après déconvolution par la méthode de Carrington.

En conclusion de cette étude, on peut dire que tester l'adaptation de la méthode de déconvolution aux images à traiter est très important. La méthode ML-EM donne les meilleurs résultats en terme de qualité de restauration. De plus, cette méthode est peu sensible au bruit dans les images. Par contre, elle est très gourmande en temps de calcul (6000x plus lente que LLS), et donc peu adaptée pour du travail routinier, par exemple pour trier un grand nombre de cellules. La méthode LLS est une très bonne alternative, car elle permet une bonne reconstruction de l'objet de départ. Par contre cette méthode est sensible au bruit, et il faut donc être vigilant sur la qualité des images à déconvoluer. Enfin, la méthode de Carrington ne donne pas de résultats satisfaisant pour des objets épais et présentant des transitions brusques.

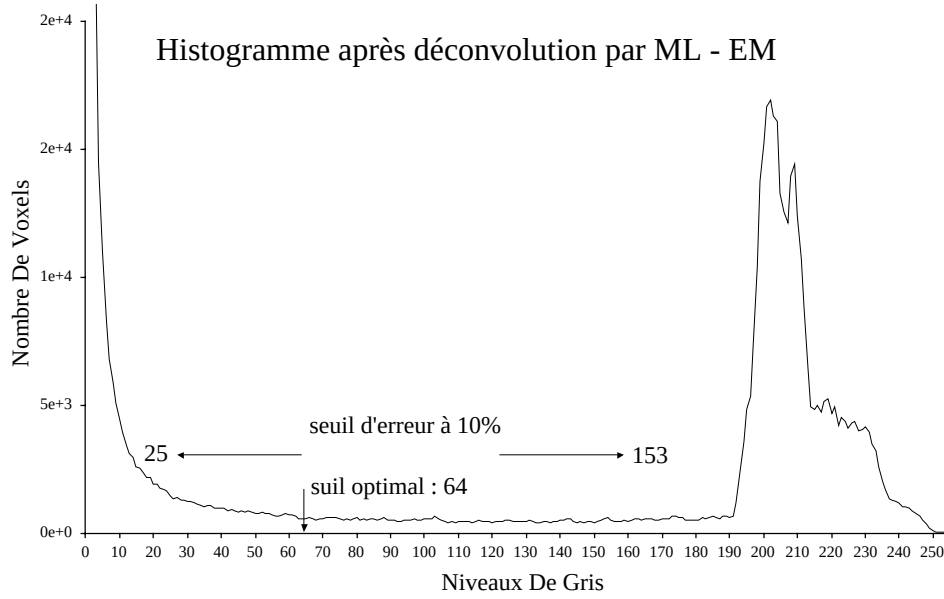


FIGURE 3.9. Histogramme en niveau de gris après déconvolution par la méthode ML-EM.

3.3.2 Convolution non invariante

Dans le paragraphe précédent, on a testé différents algorithmes de déconvolution, et analysé leur capacité à reconstruire l'objet de départ. Ces algorithmes supposent tous que la RIO utilisée pour la déconvolution (calculée ou mesurée) est invariante par translation.

Pour les objectifs modernes, on peut en effet considérer que la RIO est latéralement invariante dans l'ensemble du champ d'observation, car ces objectifs sont bien corrigés. Cependant, l'invariance de la RIO avec la profondeur n'est pas toujours garantie. En particulier, lorsque l'on utilise des objectifs de grande ouverture numérique, à immersion à huile, il y a un désaccord entre l'indice de réfraction de l'huile (souvent 1.515) et l'indice de réfraction du spécimen, qui est généralement proche de celui de l'eau (1.33).

A cause de ce désaccord, la RIO est entachée d'aberrations : la RIO n'est pas invariante en profondeur (voir Chapitre II) et ces aberrations dégradent la résolution du système avec la profondeur d'observation. Le modèle de formation d'image habituellement utilisé pour la déconvolution, et qui suppose une RIO invariante, n'est donc plus valable.

$$g(x, y, z) = \int h((x, y, z) - (x_1, y_1, z_1)) f(x_1, y_1, z_1) dx_1 dy_1 dz_1 \quad (3.17)$$

Il convient d'utiliser une convolution à noyau variable :

$$g(x, y, z) = \int h_{z_1}((x, y, z) - (x_1, y_1, z_1)) f(x_1, y_1, z_1) dx_1 dy_1 dz_1 \quad (3.18)$$

Afin d'estimer les erreurs entraînées par l'utilisation de ce modèle de formation d'image lors d'une déconvolution, nous avons simulé l'image de différents objets en tenant compte de la variation de la RIO. Nous avons aussi calculé les images que l'on obtiendrait avec une RIO invariante en z .

Ces images ont été traitées à l'aide de nos algorithmes de déconvolution et on a étudié l'influence de cette variation en profondeur de la RIO [35].

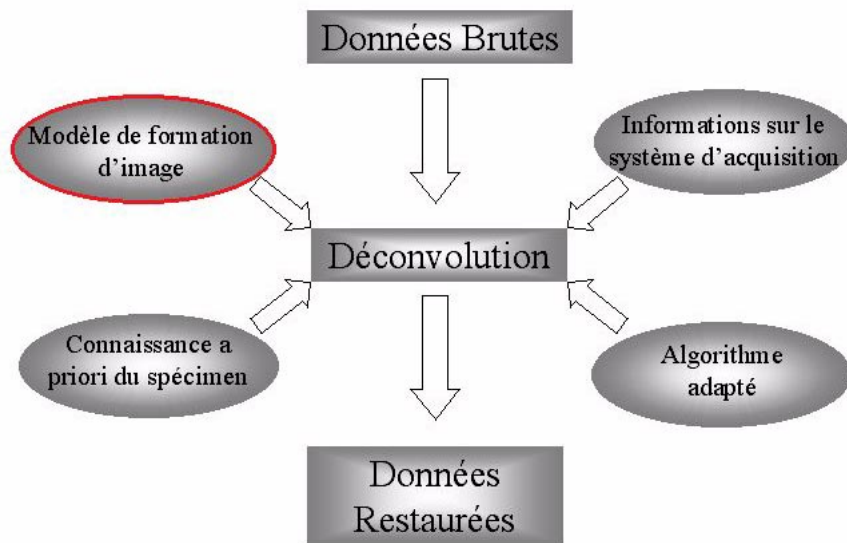


FIGURE 3.10. Le modèle de formation d'image correspond-il au modèle supposé par les algorithmes de déconvolution ?

La Figure 3.11 présente les images simulées d'une bille fluorescente de $3.2\ \mu\text{m}$ de diamètre, d'intensité uniforme, observée avec un microscope confocal parfait (pinhole infiniment petit) utilisant un objectif d'ouverture numérique 1.4 à immersion à huile et à une longueur d'onde de $\lambda=530\ \text{nm}$ (tous les autres paramètres correspondant aux recommandations du fabricant de l'objectif). La bille est supposée être immergée dans un milieu aqueux d'indice 1.33, et se trouve placée juste sous la lamelle (le haut de la bille est en contact avec la lamelle, à profondeur zéro).

La Figure 3.11(a) présente la bille convoluée avec une RIO calculée à une profondeur nulle et supposée invariante en profondeur. On note un léger flou, et une légère elongation de la bille, mais la forme générale est respectée, et de cette image, on déduirait effectivement une bille d'intensité constante.

La Figure 3.11(b) présente la bille convoluée avec une RIO calculée en fonction de la profondeur. Le flou est nettement plus important sur la partie inférieure de la bille. Ce phénomène est dû au fait que la taille de la RIO augmente rapidement avec la profondeur, à cause de l'aberration induite par le désaccord entre les indices de réfraction de l'huile d'immersion et l'eau.

De plus, on conclurait de cette image que la bille n'est pas d'intensité constante. Certains auteurs ont attribué ce phénomène au photobleaching lors de l'acquisition. Ce calcul montre une autre explication possible à ce phénomène de la bille d'intensité constante qui ne l'est pas.

Ces images sont ensuite déconvoluées à l'aide des algorithmes MAP, LLS, POCS ou MEL-EM (voir Paragraphe 3.2), avec une RIO supposée invariante, mais on utilisera plusieurs RIO calculées à plusieurs profondeurs différentes. La Figure 3.12 illustre la méthode (avec MAP).

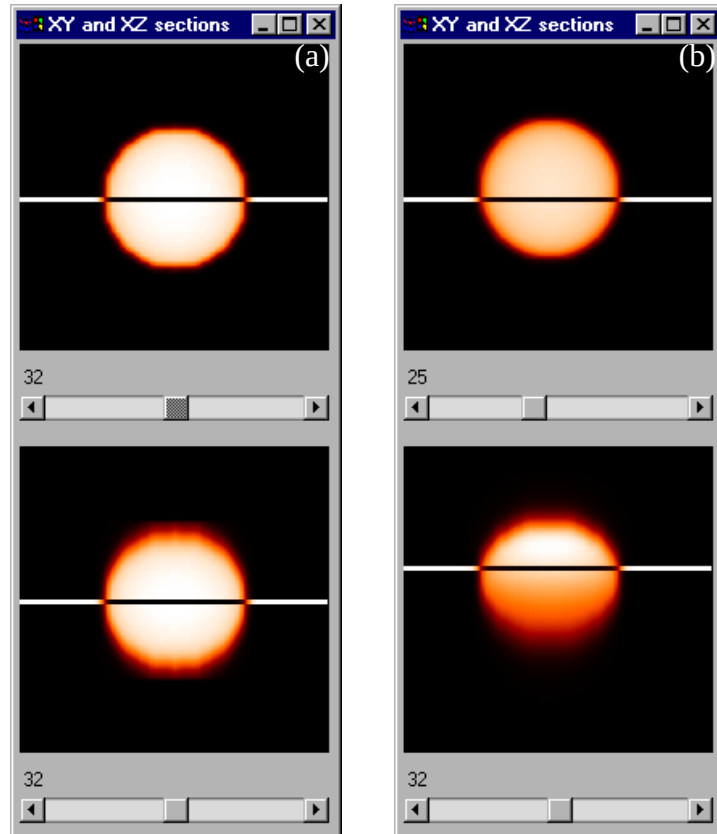


FIGURE 3.11. Image simulée d'une bille de $3.2\ \mu\text{m}$ de diamètre (a) sous l'hypothèse RIO invariante en z et (b) en tenant compte de la variation de profondeur.

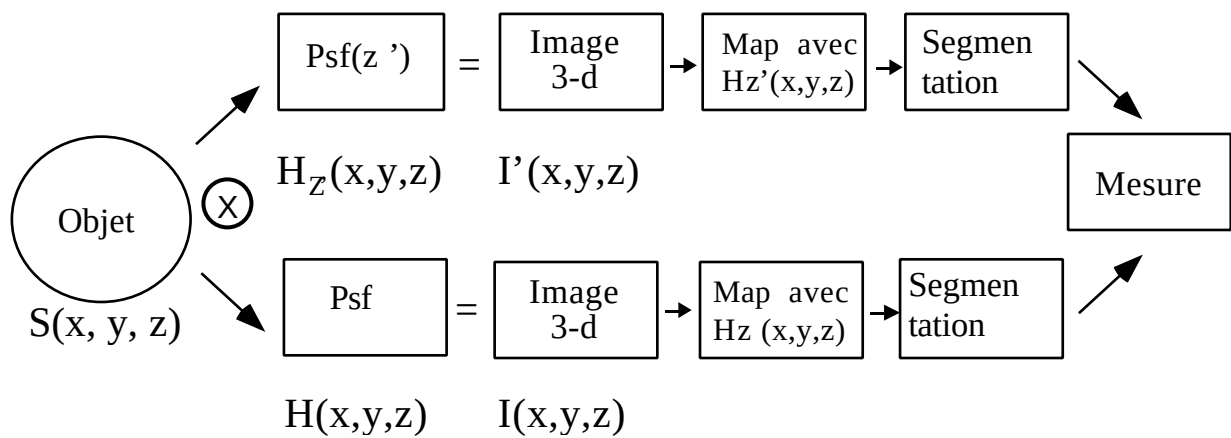


FIGURE 3.12. Méthode de comparaison des résultats de déconvolution pour une convolution linéaire avec RIO invariante en z , et une convolution traduisant la non-invariance en profondeur de la RIO.

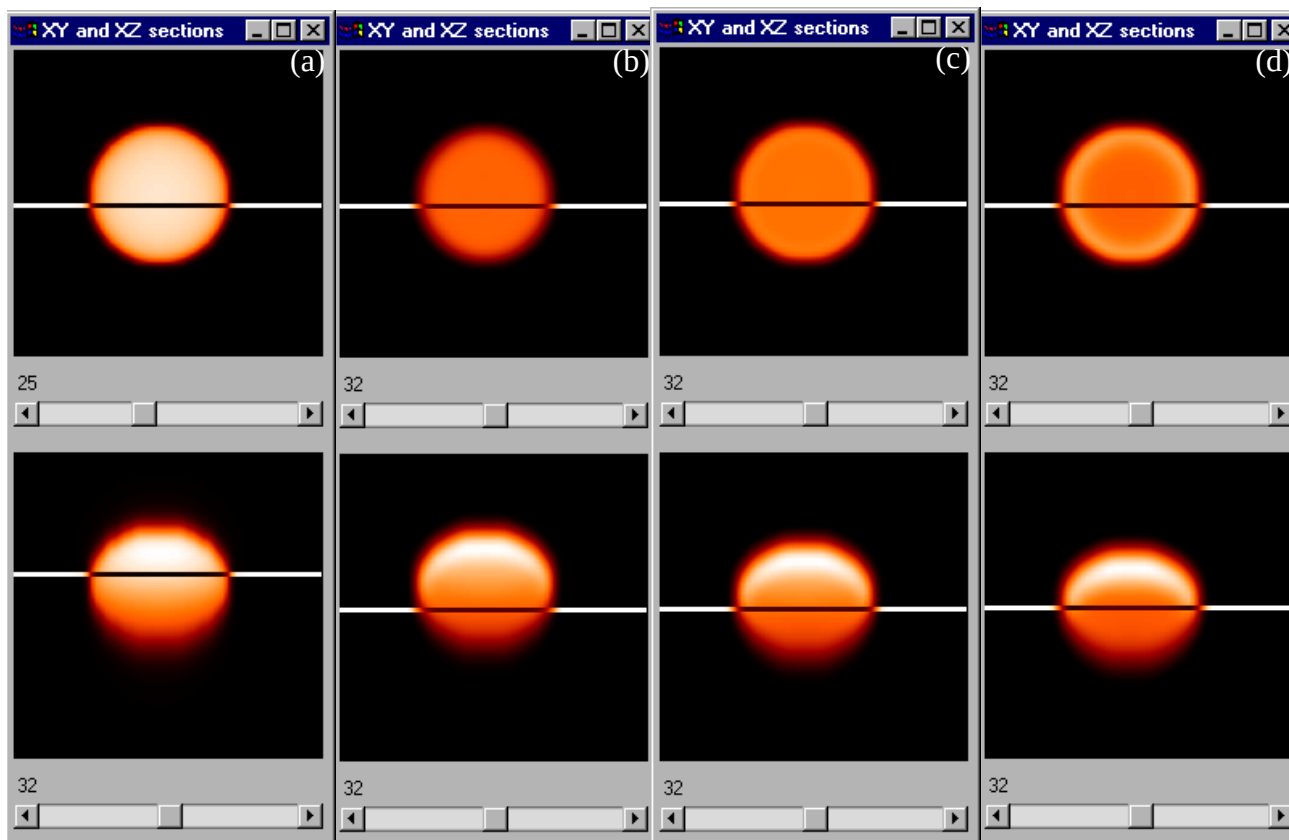


FIGURE 3.13. (a) Bille calculée avec une RIO variante en profondeur. Résultats de déconvolution avec la méthode MAP pour : (b) une RIO à profondeur nulle. (c) une RIO à profondeur 1.6 μm . (d) une RIO à profondeur 3.2 μm . Les coupes à profondeur constante montrent des profils différents.

Pour quantifier les résultats, l'image déconvoluée est segmentée pour séparer l'objet du fond, et une mesure (de volume, de forme, d'intensité) peut être effectuée.

Ce travail consistant à tester l'erreur commise sur l'hypothèse de non-invariance de la RIO, et non sur la qualité des algorithmes eux-mêmes ou leur sensibilité au bruit, le calcul des images se fait sans ajout de bruit (gaussien ou poissonien).

La Figure 3.13 illustre les résultats obtenus pour la bille de diamètre 3.2 μm , déconvoluée avec une RIO calculée à profondeur nulle (Figure 3.13(b)), à profondeur 1.6 μm (moitié de la profondeur considérée, Figure 3.13(c)) et 3.2 μm , correspondant au fond de l'objet (Figure 3.13(d)). La Figure 3.13(a) montre l'image de départ.

On remarque quatre phénomènes :

Tout d'abord, on notera que la reconstitution est seulement partielle, et de bien moins bonne qualité qu'une déconvolution à RIO réellement invariante. En particulier, la surintensité observée sur le haut de la bille n'est jamais corrigée.

La forme de la bille reconstituée diffère légèrement selon la RIO considérée. Ce phénomène est prévisible car on utilise des RIO différentes.

La position de la bille dans l'image déconvoluée change d'une image à l'autre. Ceci est dû au fait que les RIO à 0 μm , 1.6 μm et 3.2 μm sont non seulement différentes en forme (à cause de l'aberration sphérique), mais leur maximum est décalé. Or l'algorithme MAP passe par une transformée de Fourier de la RIO

(OTF), et de ce fait cette information est perdue. En conséquence, la reconstruction peut être décalée en profondeur.

Enfin, le diamètre (selon la verticale) de la bille diffère d'une image à l'autre. Ceci est dû au fait qu'une RIO sans aberration est plus compacte. Pour un objet étendu flou, la reconstitution sera de ce fait plus étendue que si l'on utilise une RIO moins compacte. Dans notre exemple, la reconstitution avec une RIO calculée à profondeur nulle (et donc de taille minimale car sans aberration) est légèrement plus grande que celle calculée avec la RIO calculée à profondeur 3.2 μm .

Le phénomène qui apparaît le plus gênant est le fait que la bille parait de taille verticale différente suivant la RIO choisie pour la reconstruction. En effet, on sait que les reconstructions sont seulement partielles, et donc que la forme et les intensités seront seulement partiellement restaurées et la position absolue de la bille dans l'espace d'observation n'est pas indispensable aux mesures.

Pour estimer l'erreur commise sur les mesures à cause de ce phénomène de tassement, nous avons calculé l'image d'un ensemble de 4 billes identiques de 1.6 μm de diamètre, espacées de 3.2 μm , la première bille étant située juste sous la lamelle. La Figure 3.14(a) montre l'image de départ, calculée avec une RIO variante en profondeur. Celle-ci est déconvoluée avec une RIO à profondeur nulle (Figure 3.14(b)), une RIO à profondeur 3.2 μm (Figure 3.14(c)), et une RIO calculée à la profondeur de 6.4 μm (Figure 3.14(d)). L'observation est supposée se faire avec le même objectif à immersion à huile d'ouverture numérique 1.4 que précédemment.

Sur l'image de départ, on note que les 4 billes sont quasiment fusionnées à cause de la résolution limitée du microscope. Une restauration est indispensable avant toute mesure quantitative. A l'échelle d'une bille, on remarquera que la reconstruction est de bien meilleure qualité. En effet, la RIO ne varie que peu sur un intervalle de 1.5 μm . Chaque bille est relativement uniforme en intensité.

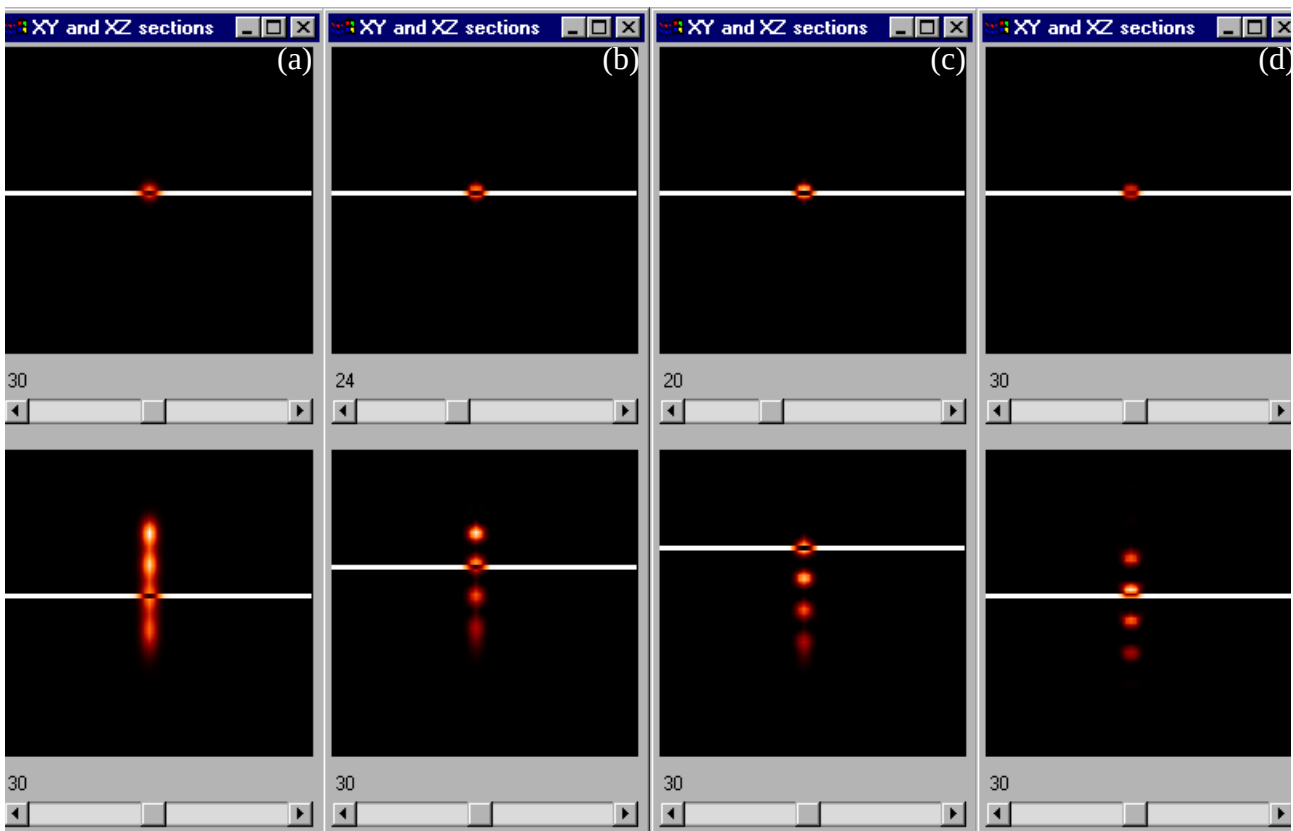


FIGURE 3.14. Pile de billes de 1.6 μm de diamètres (a) convoluée en tenant compte de la variation en z de la RIO, (b) déconvoluée avec une RIO calculée à profondeur nulle, (c) à profondeur 3.2 μm et (d) à profondeur 6.4 μm .

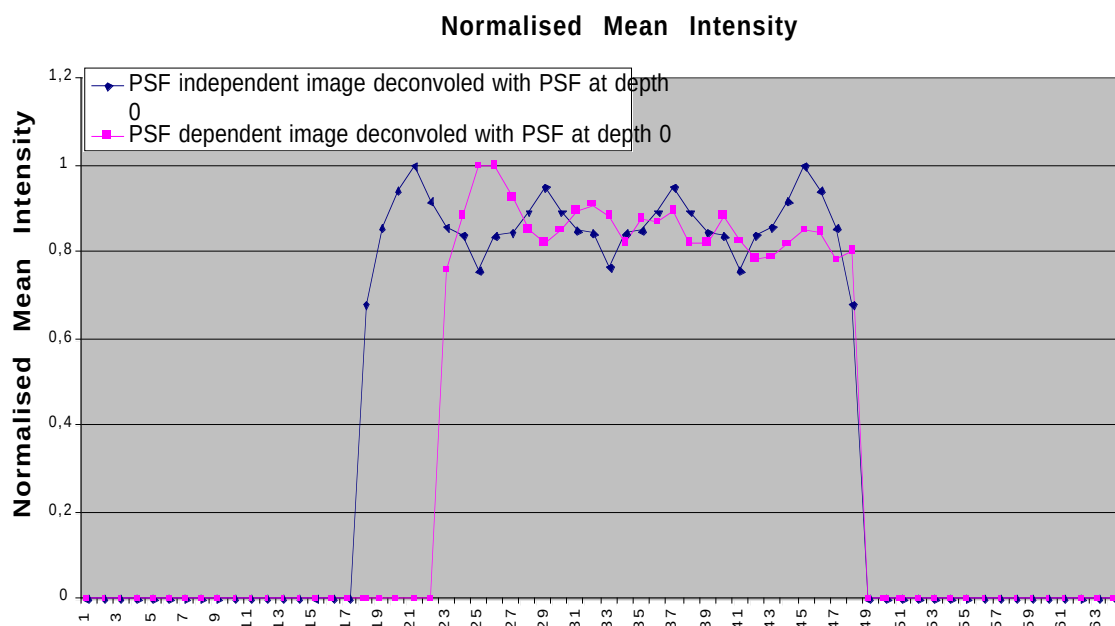


FIGURE 3.15. Profil des billes après déconvolution avec RIO invariante et RIO variante en profondeur.

On remarque cependant certaines limites :

- La bille la plus profonde est mal reconstruite avec les RIO à 0 μm et 3.2 μm . La meilleure déconvolution (en terme de forme) est obtenue avec la RIO à 6.4 μm .
- Comme précédemment, la position absolue de la pile de billes change d'une image à l'autre.
- L'intensité des billes change d'une reconstruction à l'autre : par exemple, la première bille est plus lumineuse avec la RIO à profondeur nulle (la mieux adaptée pour cette bille) qu'avec la RIO à profondeur 6.4 μm , mieux adaptée pour la quatrième bille. Celle-ci est cependant quand même moins bien restaurée.
- Le phénomène d'écrasement noté avec la bille de 3.2 μm est toujours visible, et d'autant plus accentué que l'image globale à une profondeur plus importante.

La Figure 3.15 montre le profil en intensité le long de l'axe optique mesuré sur l'image déconvoluée avec la RIO à profondeur nulle, par rapport au profil théorique. Les deux courbes ont été normalisées à l'unité pour la première bille, située juste sous la lamelle. On remarquera en particulier que :

- L'intensité est de moins en moins bien reconstruite avec la profondeur. La bille la plus profonde est vue avec une intensité 17% moins grande que la première bille, alors qu'elles sont censées être identiques. On en déduit qu'une mesure de concentration de fluorophores serait affectée de la même erreur.
- Un seuillage à 50% donne quatre billes de diamètre quasi-identique. La mesure des tailles de chaque objet n'est donc presque pas affectée par les limitations de l'algorithme de déconvolution. Par exemple, sur une cellule, on déduirait que la taille des différents sites de fluorescence est similaire, même si leur intensité apparaît différente.
- Par contre, la distance inter-bille est grandement faussée par l'hypothèse de non-invariance de la RIO. Ceci conduirait à sous-estimer la taille totale de la cellule.

Pour conclure, on peut dire que l'utilisation d'objectif à immersion à huile pour observer des spécimens aqueux d'épaisseur même faible (environ 5 μm et au delà) est à éviter si l'on envisage de faire des mesures quantitatives autres que la taille relative des sites de fluorescence, et ce même si l'on effectue une déconvolution. Il faudrait alors soit utiliser des objectifs à immersion à eau, utiliser un système d'optique adaptative pour maintenir la RIO constante, ou utiliser des algorithmes de déconvolution tenant compte de la variation de la RIO avec la profondeur. Nous avons proposé d'utiliser un algorithme de déconvolution Monte-Carlo pour traiter cette difficulté [36].

3.3.3 Sensibilité aux conditions initiales

On a vu dans le Chapitre II l'intérêt d'analyser les RIO du microscope pour identifier les paramètres du modèle de Gibson et Lanni. Ceci permet de vérifier que le microscope est utilisé dans les meilleures conditions et éventuellement corriger certains défauts par l'identification des paramètres qui ne suivent pas les recommandations du constructeur. Ceci doit permettre à l'expérimentateur de garantir la meilleure qualité d'image possible. Le biologiste peut aussi préciser le protocole d'acquisition de ses mesures, ce qui doit permettre d'en améliorer la répétabilité et la fiabilité.

Cependant les images brutes prises par un microscope optique ne permettent pas des mesures quantitatives directes, en raison des déformations et du flou des images. Pour améliorer celles-ci, on les déconvolue pour obtenir une meilleure estimation de l'objet initial. Si les algorithmes existants permettent une reconstruction souvent très fidèle, ils sont cependant tributaires d'une bonne connaissance de la RIO d'acquisition. Or, si celle-ci est mesurée, elle sera bruitée ce qui est néfaste pour les algorithmes de déconvolution. Si elle est calculée, la connaissance exacte des paramètres d'acquisition est nécessaire pour permettre un calcul précis, la forme de la RIO étant très sensible par exemple à l'indice du milieu d'immersion.

La question posée est en fait de savoir si la RIO utilisée pour la déconvolution est bien celle qui correspond aux conditions d'acquisition. J'ai focalisé mon attention sur trois grandeurs importantes : l'indice de l'huile d'immersion dans le cas d'étude de spécimens fins avec un objectif à immersion à huile, la limitation d'ouverture numérique due à l'observation dans un milieu aqueux avec un même objectif, et l'épaisseur de la lamelle utilisée, car dans une même boîte de lamelles, on observe des variations d'épaisseur non négligeable (uniformité d'épaisseur, variation d'une lamelle à l'autre).

3.3.3.1 Variation de l'indice de l'huile d'immersion.

Pour mieux quantifier la sensibilité à ce paramètre, on a simulé l'acquisition de l'image d'une bille de 680 nm de diamètre située sous la lamelle, dans le cas où le microscope est utilisé dans une enceinte thermostatée à 37°C, ce qui est souvent le cas pour l'étude de milieux vivants qui peuvent être très sensibles à la température. Cependant, les conditions d'utilisation du microscope telle que spécifiée par le constructeur peuvent différer. Ainsi dans le Chapitre II, les mesures de RIO ont été effectuées sur des billes fluorescentes (et donc non sensibles à la température) sans enceinte thermostatée à une température de 21°C.

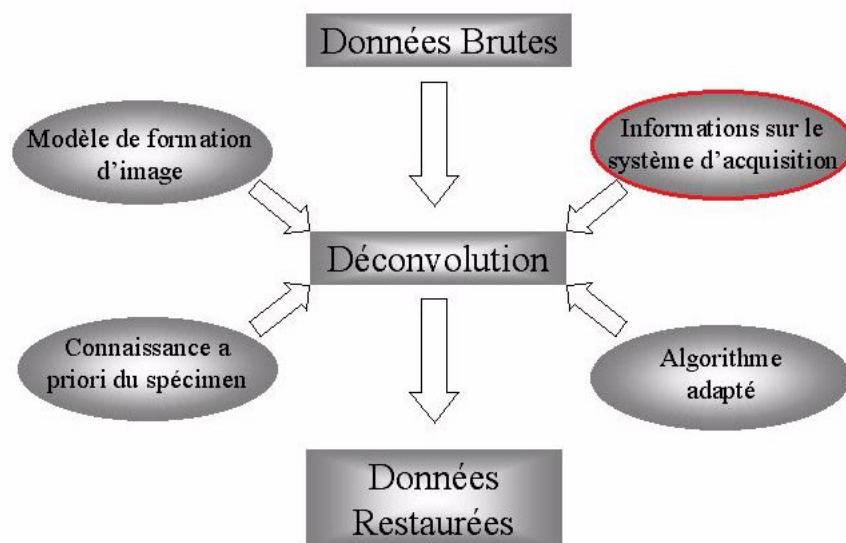


FIGURE 3.16. Les paramètres utilisés pour la déconvolution correspondent-ils vraiment aux conditions d'acquisition ?

Pour une température de 37°C, en tenant compte de la valeur de $N_{oil}=1.516$ trouvée en analysant les RIO expérimentales [37][38], et en appliquant la correction en température donnée par le fabricant, on trouve que l'indice de l'huile vaut dans ces conditions $N_{oil}=1.512$ [39]. On a donc calculée une $RIO_{1.512}$ avec cette valeur et convolué la bille avec $RIO_{1.512}$. L'image obtenue a été bruitée avec du bruit Gaussien et Poissonien pour imiter le type d'image obtenue avec le microscope. Notons que pour une bille de cette taille, on peut supposer la RIO invariante en profondeur, malgré l'utilisation d'un objectif à immersion à huile (voir paragraphe 3.3.2).

On a ensuite déconvolué cette image d'une part avec $RIO_{1.512}$ qui correspond aux conditions d'acquisition simulées à 37°C, et d'autre part avec $RIO_{1.515}$ qui suppose que le microscope a été utilisé dans les conditions standard avec $N_{oil}=1.515$. Pour cette étude, l'algorithme LLS qui est couramment employé par les biologistes pour déconvoluer leurs images a été utilisé. La Figure 3.17 illustre les résultats obtenus.

La Figure 3.17(a) montre la bille de départ. La Figure 3.17(b) représente $RIO_{1.512}$: l'asymétrie visible est due à la valeur de l'indice de l'huile d'immersion de 1.512 qui diffère de la valeur nominale 1.515. La Figure 3.17(c) présente l'image simulée obtenue par convolution de la bille avec $RIO_{1.512}$. Il convient de noter l'asymétrie de l'image obtenue, alors que l'objet de départ est symétrique.

La Figure 3.17(d) présente le résultat de la déconvolution avec $RIO_{1.512}$, et la Figure 3.17(e) présente le résultat de la déconvolution avec $RIO_{1.515}$ (présentée Figure 3.17(f)) par la méthode LLS. Il apparaît clairement que l'objet original est mieux reconstruit lorsqu'on utilise $RIO_{1.512}$ comme le prouve la quasi-absence d'asymétrie résiduelle.

Pour quantifier la qualité de la reconstruction, une mesure du volume de l'objet ainsi "observé" est faite. Un seuillage à 15% sur l'image brute (non déconvoluée) entraîne une erreur de mesure de 692%, en majeure partie due à la forte elongation axiale. Ce résultat prouve bien que les mesures effectuées directement sur les images d'un microscope optique conventionnel sont sans signification lorsqu'on est proche de la limite de résolution du microscope, qui dans ce cas vaut environ 0.25 μm à comparer aux 0.68 μm de la bille de départ.

Lorsqu'on utilise la RIO correcte $RIO_{1.512}$ l'erreur est encore de 56%, car l'algorithme LLS ne permet pas une reconstruction complète de l'objet de départ. Lorsqu'on utilise la RIO incorrecte $RIO_{1.515}$ en supposant que le microscope a été utilisé dans les conditions optimales, l'erreur est plus importante et vaut 91%. On fait donc une erreur supplémentaire de l'ordre de 25% dans les mesures dimensionnelles, ce qui n'est pas négligeable.

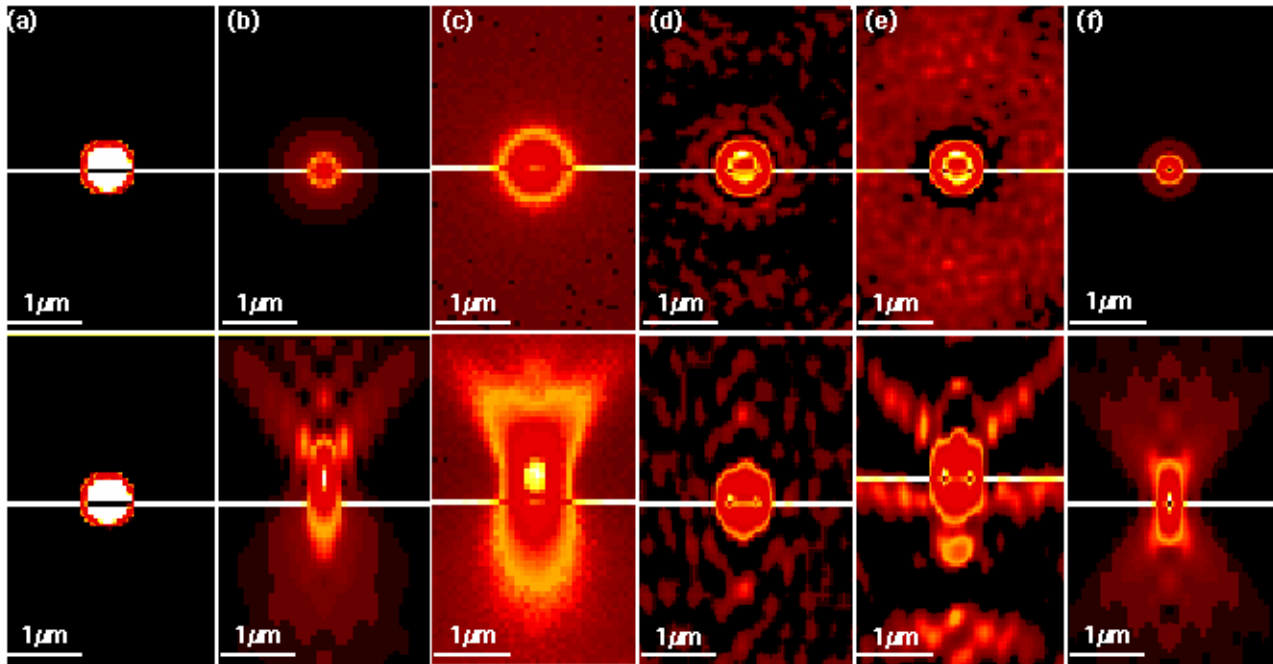


FIGURE 3.17. Effets de la déconvolution avec des RIO avec et sans aberration due à un changement de l'indice de l'huile d'immersion induit par une variation de température. Coupes x-y (haut) et x-z (bas).

3.3.3.2 Limitation de l'ouverture numérique

Lorsque l'on utilise un objectif à immersion à huile pour observer un spécimen dont l'indice de réfraction est proche de l'eau, deux phénomènes apparaissent. On a déjà vu que le désaccord entre les indices de réfraction entraîne une aberration sphérique lorsque l'on pénètre dans le spécimen. De ce fait, la RIO est non-invariante avec la profondeur, ce qui peut poser des problèmes quand on utilise des algorithmes de déconvolution supposant une RIO invariante (voir paragraphe 3.3.2), et la résolution se dégrade avec la profondeur.

Pour des spécimens relativement fins (de l'ordre du micromètre), on peut considérer que la RIO est invariante en profondeur. Les algorithmes de déconvolution classiques peuvent alors être utilisés sans problème.

Cependant, l'ouverture numérique effective de l'objectif est limitée. En effet, un objectif d'ouverture numérique 1.4 (utilisé avec une huile d'immersion d'indice supérieur) ne collecte la lumière émise sous l'angle d'incidence extrême correspondant ($\sin\alpha = NA/n_{\text{imm}}$ où n_{imm} est l'indice du milieu d'immersion) que pour des points situés immédiatement sous la lamelle, à une profondeur nulle dans le spécimen. Pour un point situé à une certaine profondeur dans le spécimen, l'ouverture numérique effective est au mieux de 1.33. Cette limitation est souvent omise par les utilisateurs, qui déconvoluent leurs images 3D avec une RIO calculée pour l'ouverture numérique nominale de leur objectif.

Pour estimer l'erreur induite par cette simplification, nous avons calculé l'image d'une bille de 680 nm de diamètre imagée dans un milieu aqueux, et observée avec un objectif d'ouverture numérique 1.4. L'image simulée est donc obtenue par une convolution linéaire invariante (on admet la RIO invariante sur une telle épaisseur) de la bille avec la RIO de l'objectif, calculée pour une ouverture numérique effective de 1.33.

Cette image est ensuite déconvoluée à l'aide de l'algorithme ML-EM, en utilisant la $RIO_{1.33}$ correspondant à la convolution, et la $RIO_{1.4}$ calculée à l'ouverture numérique nominale de l'objectif, mais négligeant la limitation d'ouverture dans l'eau. La Figure 3.18 présente (a) la bille convoluée avec la PSF calculée à $N.A.=1.33$, (b) la bille déconvoluée avec cette même PSF, (c) la bille déconvoluée avec la PSF calculée à $N.A.=1.4$ et (d) la bille originale.

Nous avons focalisé notre attention sur la capacité de l'algorithme à retrouver la taille (volume) de la bille initiale après déconvolution, d'où le choix de ML-EM qui est réputé être le plus efficace.

Dans les trois cas, le centre de gravité de la bille est correctement retrouvé, au centre du volume d'observation (voir discussion au Paragraphe Figure 3.3.2). Ceci s'explique par le fait que les deux RIO considérées ne présentent pas d'aberration. Seul leur volume est légèrement différent, la RIO à $N.A.=1.4$ étant plus compacte que la RIO à $N.A.=1.33$.

La bille originale a un volume de 4599 voxels. Lorsqu'on utilise la RIO calculée à $N.A.=1.33$, le volume mesuré après déconvolution est de 5101 voxels. Ce résultat s'explique par le fait que la déconvolution restaure l'image d'origine, mais imparfaitement seulement. Il subsiste une erreur résiduelle de 11.5% en volume.

Lorsqu'on utilise la RIO calculée à $N.A.=1.4$, le volume mesuré après déconvolution est de 5070 voxels, soit une erreur résiduelle plus faible de 10%. Ce résultat est paradoxal, car la RIO étant légèrement plus compacte, on s'attend à un résultat de déconvolution plus dilué, un raisonnement «naïf» basé sur l'hypothèse que la déconvolution est parfaite. Ce résultat s'explique probablement par le fait que la RIO à $N.A.=1.4$ étant plus compacte, elle contient plus de hautes fréquences nécessaires à la reconstruction de la bille pleine qui présente des transitions brusques nécessitant justement ces hautes fréquences pour être correctement reconstruite (voir discussion Paragraphe 3.5.2.).

Ce résultat suggère aussi qu'une meilleure déconvolution est sans doute possible en surestimant l'ouverture numérique effective de la RIO utilisée, une approche à manier avec précaution, car basée uniquement sur des résultats numériques, et non justifiée physiquement.

Notons de plus que l'hypothèse d'une ouverture numérique de 1.33 est probablement optimiste, puisqu'elle suppose la collecte des photons qui arrivent sur la première interface sous une incidence de 90°. L'ouverture numérique réelle est donc probablement encore plus faible, et les conclusions présentées ici, provisoires, l'erreur finale étant probablement encore plus grande.

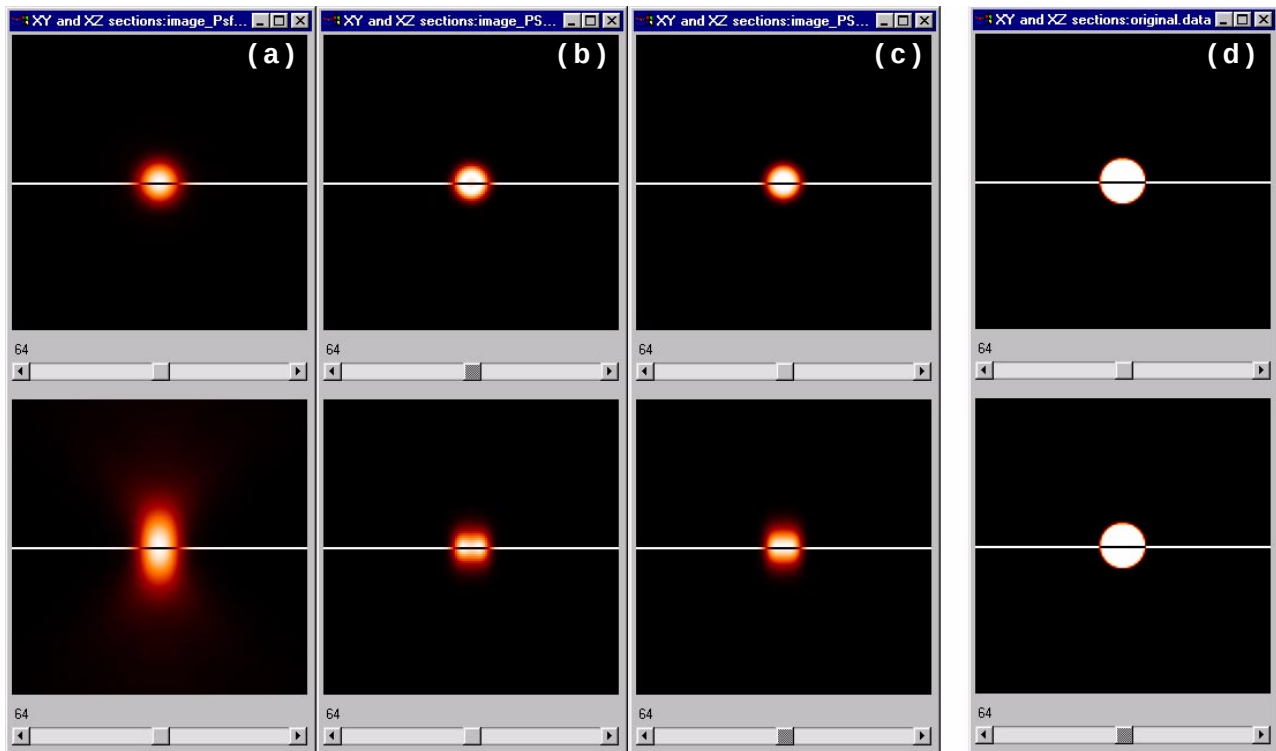


FIGURE 3.18. Déconvolution avec erreur sur l'ouverture numérique. (a) bille convoluée avec une RIO calculée pour $NA=1.33$. (b) bille déconvoluée avec la même RIO. (c) bille déconvoluée avec une RIO calculée pour $NA=1.4$. (d) bille originale.

3.3.3.3 Epaisseur de la lamelle.

Nous avons mené une étude similaire sur un autre paramètre important, et facile à vérifier dans la pratique : l'épaisseur de la lamelle. En effet, les objectifs de microscopes sont étudiés pour travailler avec des lamelles d'épaisseur standard $170\text{ }\mu\text{m}$. Certains objectifs intègrent aussi un anneau de correction, qui permet de compenser l'aberration sphérique et d'utiliser des lamelles d'épaisseur variable. On peut aussi utiliser cette correction en fonction de l'indice de réfraction du milieu d'immersion ou du spécimen. Notons cependant que l'ajustement se fait manuellement et est donc relativement peu précis.

Mais dans un lot de lamelles de microscope, toutes n'ont pas une épaisseur parfaitement définie à $170\text{ }\mu\text{m}$ [40]. On peut alors se demander l'influence de petites variations d'épaisseur sur les images (présence d'aberration sphérique) et sur les résultats de déconvolution. Nous avons considéré le cas de lamelles de 165 , 170 et $175\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur. On simule maintenant l'observation d'une bille de 680 nm de diamètre dans un milieu aqueux avec un objectif à immersion à eau d'ouverture numérique $N.A.=1.2$, à $\lambda=530\text{ nm}$. La seule source d'aberration sphérique est donc la lamelle d'épaisseur non standard.

La Figure 3.19(a)-(c) présente la bille convoluée avec les RIO calculées pour une lamelle d'épaisseur 165 , 170 et $175\text{ }\mu\text{m}$ respectivement. On note maintenant une dissymétrie due à l'aberration sphérique présente pour les images Figure 3.19(a) et Figure 3.19(c). La Figure 3.19(d)-(f) présente les résultats de déconvolution pour les trois cas considérés, en supposant que la lamelle correcte d'épaisseur $170\text{ }\mu\text{m}$ a été utilisée. Comme dans le cas de l'huile d'immersion, une dissymétrie persiste pour les images Figure 3.19(d) et Figure 3.19(f), car la RIO utilisée n'est pas correcte.

La bille originale a toujours un volume de 4599 voxels. Lorsqu'on utilise la RIO calculée pour une lamelle de $170\text{ }\mu\text{m}$, le volume mesuré après déconvolution est de 4980 voxels, soit une erreur résiduelle de 8% en volume seulement. Lorsqu'on utilise la RIO calculée pour une lamelle de $165\text{ }\mu\text{m}$ ou $175\text{ }\mu\text{m}$, le volume mesuré après déconvolution est de 5357 voxels ou 5286 voxels, soit une erreur résiduelle de 16% ou 15% en volume.

On voit donc qu'une faible erreur sur l'épaisseur de la lamelle ($5\mu\text{m}$ par rapport à $170\mu\text{m}$) conduit à doubler l'erreur résiduelle sur les mesures de volume. L'épaisseur de la lamelle est donc un paramètre important à vérifier dans la pratique, d'autant plus que contrairement à l'indice du milieu d'immersion ou l'ouverture numérique effective de l'objectif, c'est un paramètre facilement mesurable en pratique.

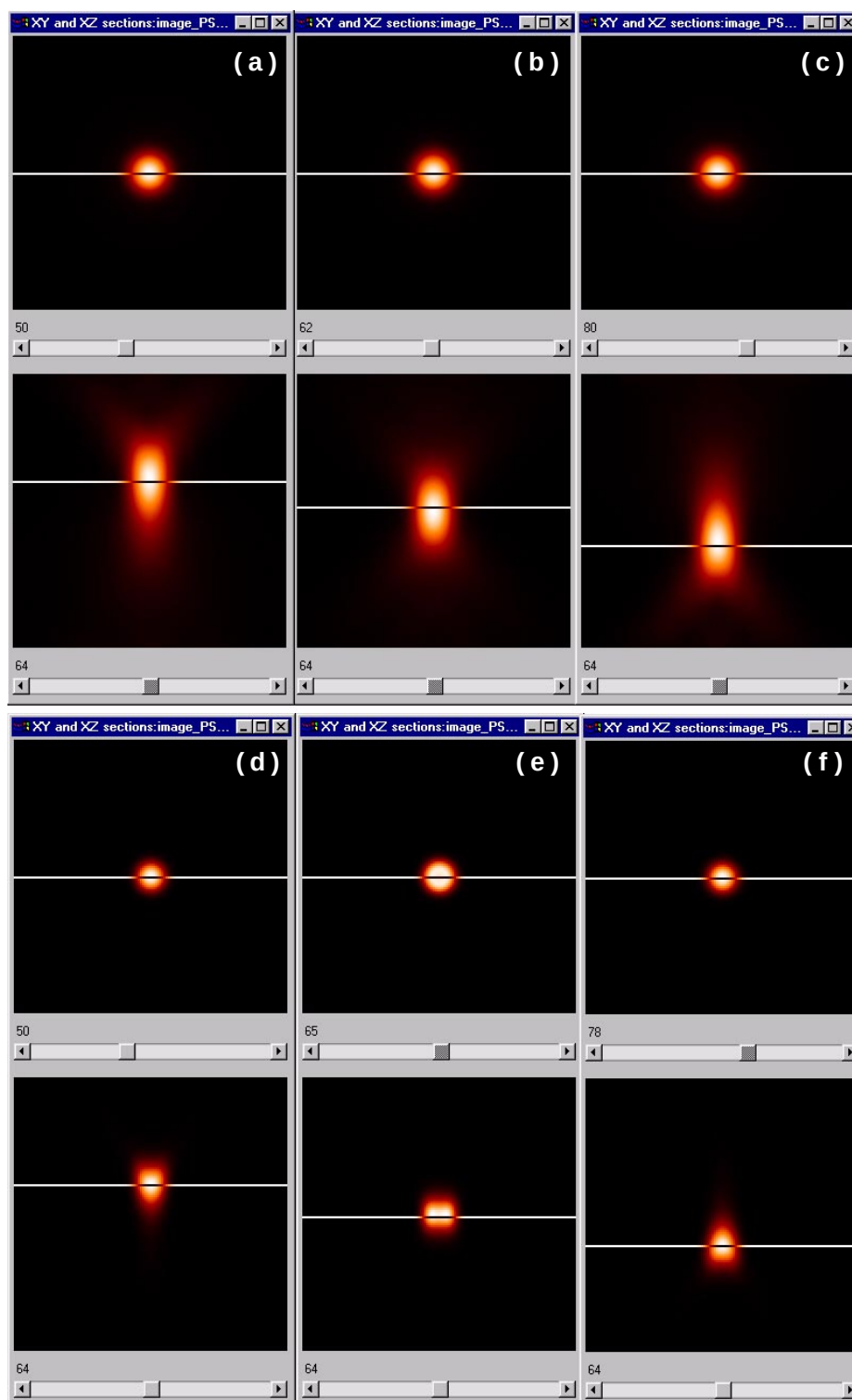


FIGURE 3.19. Effet de l'épaisseur de la lamelle. (a),(b),(c) bille convoluée avec des RIO calculées pour une lamelle d'épaisseur 165, 170 et 175 μm respectivement. (d),(e),(f) : images (a)(b)(c) déconvoluée avec la RIO idéale calculée pour une lamelle d'épaisseur 170 μm .

3.4 Discussion

On peut dire que la qualité de reconstruction des images par déconvolution dépend essentiellement de quatre facteurs :

- l'efficacité de reconstruction de l'algorithme utilisé. En règle générale, les algorithmes itératifs donnent de meilleurs résultats, mais au prix de calculs parfois très longs. On leur préfère alors souvent pour des raisons pratiques (masse des données à traiter) des algorithmes basés sur une inversion directe avec régulation, mais qui donnent de moins bons résultats.
- son adéquation avec le processus de formation d'image : invariance ou non de la RIO par exemple, qui est une des plus sévère restriction à l'utilisation des objectifs à immersion à huile.
- la précision de la connaissance de la RIO, qui est soit calculée soit mesurée, mais qui doit correspondre au mieux aux conditions réelles d'acquisition des images. Une petite erreur sur un paramètre tel que l'indice du milieu d'immersion entraîne une forte erreur sur le résultat final.
- le niveau de bruit dans l'image. Là encore les algorithmes itératifs sont souvent meilleurs que ceux basés sur une inversion directe, mais avec les mêmes restrictions d'utilisation pratique (temps de calcul).

L'étude menée au paragraphe 3.3.1 permet de répondre en partie au premier point. Elle a cependant aussi mis en évidence certaines limites de la déconvolution. En particulier les algorithmes les plus précis sont aussi les plus gourmands en temps de calcul, ce qui peut être incompatible avec le travail de routine du microscopiste visant à traiter un grand nombre de données pour obtenir des statistiques fiables sur les analyses biologiques. On verra au paragraphe 3.5.1 une méthode pour améliorer la précision et la répétabilité des mesures avec des méthodes de déconvolution rapides telles que LLS.

Il est clair que dès que le spécimen a une certaine épaisseur (environ 5 μm), la variation de la RIO avec la profondeur interdit l'utilisation d'objectif à immersion à huile si l'on veut faire des mesures quantitatives après une déconvolution. Pour répondre à ce problème, une méthode de déconvolution basée sur l'algorithme Monte-Carlo a été étudiée au laboratoire. Cette méthode est brièvement présentée au Chapitre IV.

La méthode proposée au Chapitre II pour identifier les paramètres d'acquisition permet de répondre au second point et d'utiliser une RIO calculée, donc non-bruitée, mais qui correspond au mieux aux conditions d'acquisition. Elle n'est cependant pas toujours facile à mettre en œuvre dans la pratique : résultats peu fiables sur RIO bruitées, difficulté de répétabilité des mesures. Elle est aussi inadaptée pour des cas "graves" tels qu'un désalignement d'un élément du microscope : on reste limité par l'utilisation d'un modèle.

Le bruit est un problème supplémentaire. On verra au paragraphe 3.5.2 une technique permettant de s'affranchir en partie de cette contrainte, et qui fiabilise grandement les méthodes de déconvolution rapides basées sur des inversions directes telles que LLS.

3.5 Améliorations apportées

Dans les parties précédentes, les algorithmes de déconvolution les plus courants ont tout d'abord été présentés, et leur capacité à correctement reconstruire des objets de synthèse a été étudiée. On peut en effet penser que si un algorithme reconstruit correctement un objet numérique maîtrisé, il en est de même pour un objet biologique inconnu. Nous avons vu dans le Chapitre II que le processus de formation des images dans un microscope est grandement dépendant des conditions d'acquisition. Nous avons donc ensuite étudié la sensibilité des résultats obtenus en déconvolution par rapport à la connaissance précise des paramètres expérimentaux.

Dans cette partie sont présentés deux améliorations notables des algorithmes de déconvolution, à savoir l'automatisation du choix des paramètres de régularisation, ce qui diminue la sensibilité des résultats par rapport à l'expérience et aux connaissances a priori de l'utilisateur, et le préfiltrage des données, qui augmente le champ d'utilisation de la déconvolution à des images normalement «inutilisables».

3.5.1 Automatisation des algorithmes

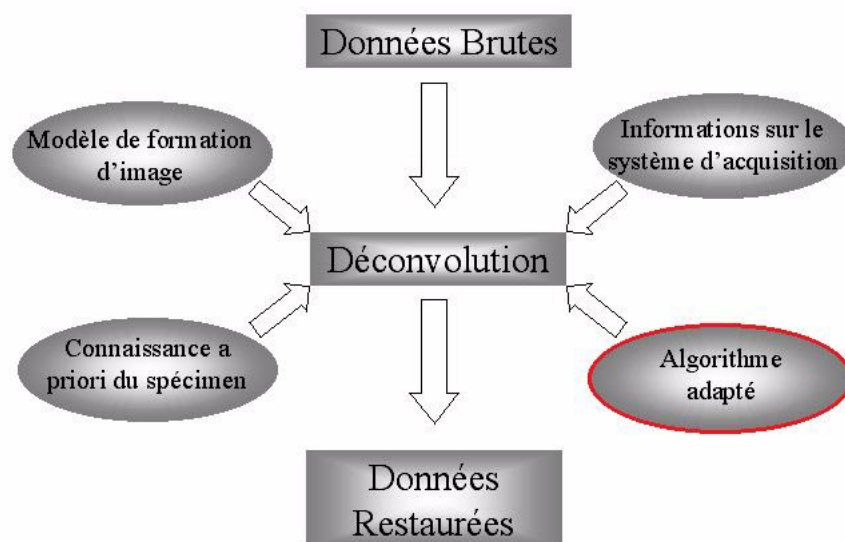


FIGURE 3.20. Est-il possible d'automatiser le choix des paramètres de régulation d'un algorithme de déconvolution ?

Les algorithmes de déconvolution couramment utilisés en microscopie de fluorescence, et qui ont été présentés au début de ce chapitre, nécessitent généralement une intervention de l'opérateur, qui doit fixer les paramètres de régularisation, ou prédéterminer le nombre d'itérations pour les algorithmes récursifs. Cette étape nécessite une certaine expérience de la part de l'utilisateur, qui n'est cependant souvent pas un spécialiste de la déconvolution. D'autre part, les résultats pour de mêmes données brutes peuvent grandement varier d'un opérateur à un autre, en fonction des connaissances à priori sur le spécimen, du bruit dans l'image, ou de l'expérience et du savoir-faire.

Cette intervention manuelle est donc grandement subjective, et la qualité du résultat final est souvent jugée de manière seulement qualitative. Pour faciliter l'adoption de la déconvolution par des utilisateurs non-spécialistes comme le sont souvent les biologistes, il conviendrait donc d'éliminer l'incertitude liée à cette intervention manuelle, et se baser sur des critères quantitatifs pour juger de la qualité finale de la restauration.

Au Laboratoire d'Hématologie de l'Hopital Emile Muller de Mulhouse, le Dr Georges Jung a entrepris une étude sur les cellules CD34 du cordon ombilical. Deux populations différentes semblent apparaître durant la maturation de ces cellules, et nous voulons améliorer la méthode de classification de ces populations. Ceci

nécessite de traiter des échantillons relativement importants (quelques centaines de cellules) de manière à obtenir des résultats statistiquement significatifs. Pour ce faire, il convient donc d'utiliser des algorithmes de déconvolution rapide, tels que MAP ou LLS. Cependant, la qualité des images obtenues variant grandement, un choix automatique des meilleurs critères de régularisation augmenterait de manière significative la qualité et surtout la reproductibilité des résultats obtenus, en éliminant l'intervention humaine.

Lorsque l'on met au point une méthode de déconvolution, on travaille tout d'abord sur des images de synthèse, obtenues par convolution d'un objet numérique avec une Réponse Impulsionnelle Optique calculée, censée modéliser le processus de formation d'image dans le microscope (voir Chapitre II). On peut enfin rajouter un bruit numérique, Gaussien et/ou Poissonien. L'image ainsi obtenue est déconvoluée, et l'objet reconstruit peut être comparé à l'objet de départ pour estimer la qualité de la reconstruction.

Lorsque l'on travaille sur des images biologiques «vraies», une telle méthode ne peut pas être utilisée car l'objet de départ est par définition justement inconnu, et c'est lui que l'on cherche à reconstruire. Nous utilisons donc les algorithmes de déconvolution LLS et MAP de la manière suivante, décrite par la Figure 3.21.

Un objet de synthèse connu O est convolué numériquement avec une RIO H , pour former une image I . Cette image est déconvoluée avec la RIO régularisée H' . On obtient alors une estimée de l'objet O' . Habituellement, la comparaison de O et O' sert à juger de la qualité de la reconstruction, et perfectionner le choix du paramètre de régularisation optimal. Nous avons proposé de reconvoluer l'estimée O' avec la RIO H , pour obtenir une estimée de l'image I' . En faisant cela, nous supprimons la référence à l'objet de départ, ce qui est plus reproductif de la manière dont on utilise la déconvolution dans la pratique. On peut aussi rajouter du bruit pour tester la robustesse de la méthode.

On utilise alors LLS ou MAP, qui sont normalement des algorithmes d'inversion directe, de manière itérative en faisant varier le paramètre de régularisation, en comparant I et I' . On suppose donc dans cette méthode, que lorsqu'on a une bonne image reconstituée I' très ressemblante à I , c'est qu'on a bien reconstitué un objet O' très ressemblant à O .

Nous utilisons alors la jauge de Joyce et Root pour obtenir le meilleur compromis (au sens des moindres carrés) entre la variance et la biais. La variance et l'erreur de biais sont liées aux valeurs propres des matrices de convolution H ou H' qui sont utilisées pour l'opération d'inversion du système matriciel décrivant mathématiquement le processus de formation des images.

Lorsque l'on se base sur les objets initiaux et reconstruits, on utilise la jauge de Joyce et Root [9][10] :

$$\min \left(\sum (O - O')^2 + \sigma^2 \sum_{i=1}^m \frac{1}{\lambda_i} \right) \quad (3.19)$$

avec σ la variance du bruit, et λ_m les valeurs propres conservées après régularisation. Il convient donc d'estimer le bruit, ce qui se fait généralement en considérant une zone sombre de l'image d'origine, ne contenant a priori aucune information.

Nous avons proposé d'utiliser la même jauge, mais calculée sur les images brutes et reconstituées :

$$\min \left(\sum (I - I')^2 + \sigma^2 \sum_{i=1}^m \frac{1}{\lambda_i} \right) \quad (3.20)$$

Nous avons constaté que lorsque l'on travaille sur des images synthétiques sans bruit, cette méthode marche très bien, et donne des résultats tout à fait comparables à la méthode conventionnelle basée sur le calcul de la jauge de Joyce et Root sur les objets. Par contre, l'image obtenue par déconvolution étant très sensible au bruit, l'application de cette méthode sur des images biologiques échoue souvent à donner un résultat exploitable. Nous avons donc réalisé une première étape visant à l'automatisation de la déconvolution, mais il convient encore de diminuer la sensibilité de la méthode au bruit. La prochaine section présente une méthode de préfiltrage des données qui résout en grande partie ce problème.

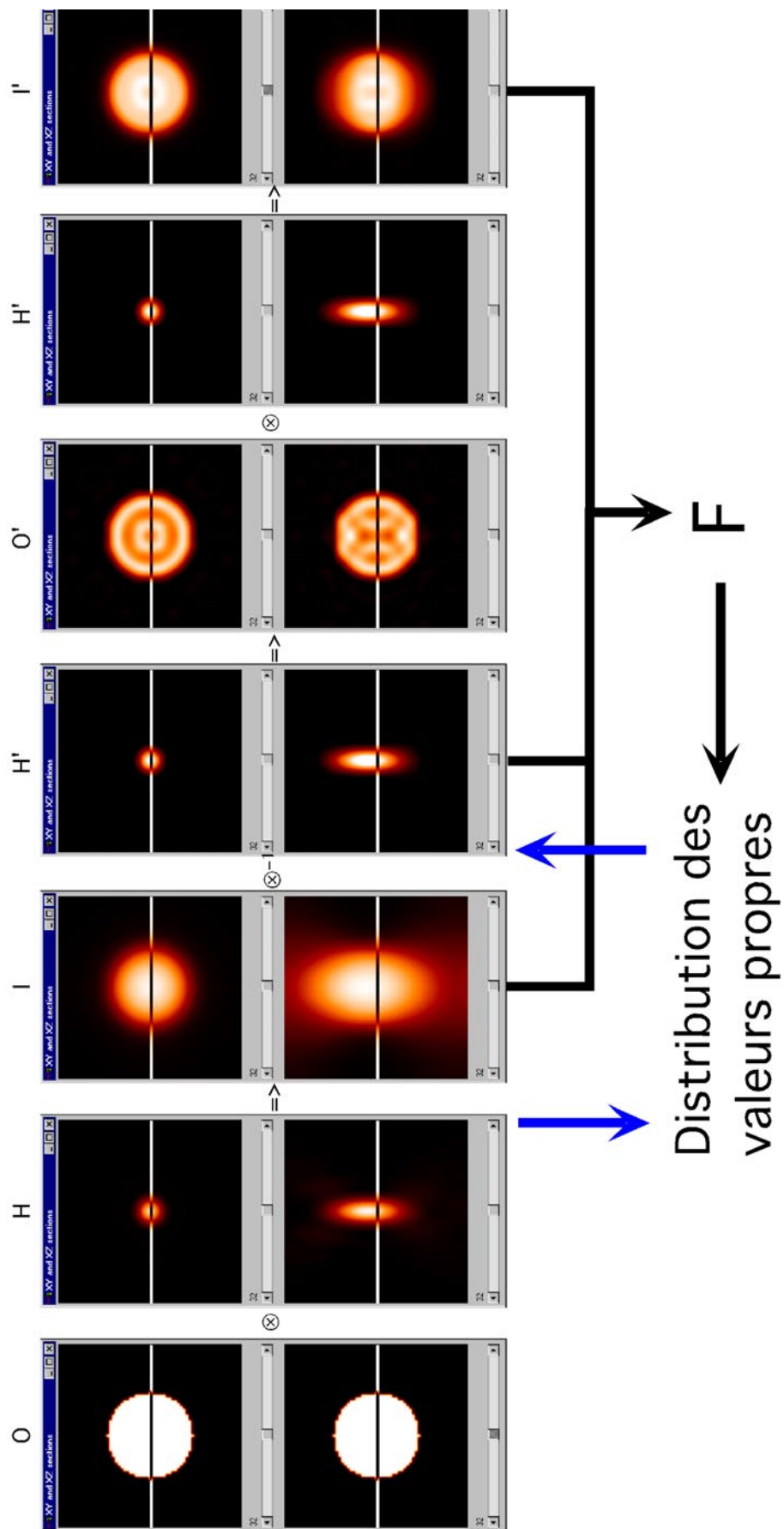


FIGURE 3.21. Principe de l'automatisation des algorithmes LLS ou MAP

3.5.2 Préfiltrage des données

Les données expérimentales acquises sur un microscope de fluorescence sont toujours bruitées. On distingue dans la pratique deux types de bruit.

Le bruit additif, de type Gaussien additif, est dû au système d'acquisition et de numérisation électronique. L'électronique moderne a fait des progrès considérable de ce point de vue, aussi bien au niveau des capteurs CCD, qui ont des niveaux de noir (bruit enregistré alors que le capteur n'est pas éclairé) très faible, que des amplificateurs et des cartes d'acquisition. Nous avons vu lors de la présentation des algorithmes de déconvolution comment le bruit additif était pris en compte.

En microscopie de fluorescence, les niveaux de lumière en jeux sont souvent faibles. On voit alors clairement apparaître la nature aléatoire des phénomènes d'émission lumineuse, qui se traduit mathématiquement par un bruit de type Poissonien, proportionnel au signal lumineux, et non plus simplement additif. Là encore, nous avons vu comment certains algorithmes de déconvolution tiennent compte de cette nature particulière du bruit.

Lorsque les images sont acquises dans de bonnes conditions, on peut souvent négliger l'influence du bruit. On parle alors d'images acquises avec un bon rapport signal/bruit. La déconvolution est alors relativement facile, et donne de bons résultats.

Lorsque le niveau de bruit augmente, la déconvolution devient impossible. Le bruit est alors responsable de l'instabilité du processus d'inversion. On doit alors accepter un compromis entre la précision du résultat de déconvolution, et la stabilité du processus, car l'inversion mathématique peut résulter en une amplification catastrophique du bruit qui rend les résultats inutilisables.

On peut alors se demander s'il faut vraiment travailler sur les données brutes d'acquisition, ou si un prétraitement de ces données pourrait améliorer les résultats. Le préfiltrage des données est une technique qui permet justement de séparer le processus de réduction du bruit et le processus d'inversion du problème [41]. Un avantage de cette technique est qu'on peut envisager un système de déconvolution adaptatif, dans lequel le préfiltrage des données est ajusté au bruit présent dans les images, et la méthode d'inversion est elle adaptée aux caractéristiques des images considérées et au type de mesures désirées. Il a en effet été vu que certains algorithmes donnaient de meilleurs résultats pour les mesures de forme ou de taille, alors que d'autres respectent mieux la distribution d'intensité.

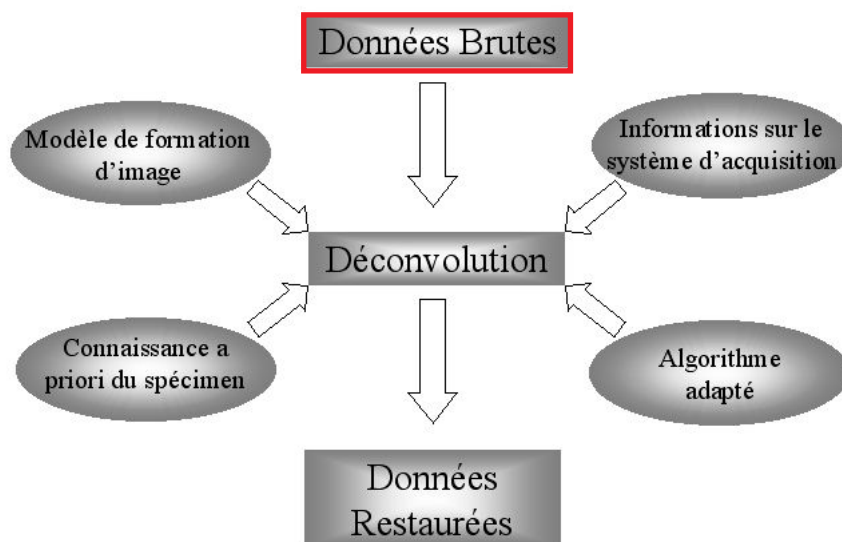


FIGURE 3.22. Faut-il vraiment travailler avec les données brutes d'acquisition ?

Dans cette étude sur le préfiltrage, nous avons focalisé notre attention sur trois méthodes les plus courantes en déconvolution : LLS, MAP et ML-EM, qui sont connues pour donner de bons résultats en microscopie de fluorescence.

Nous utilisons un objet de synthèse, composé de 9 billes de même diamètre et d'intensités différentes, disposées en configuration cubique centrée dans le volume d'observation. Dans cette étude, le modèle simplifié scalaire de Gibson et Lanni est utilisé. Ce modèle est une approximation (comme nous l'avons vu dans le Chapitre II), mais donne d'assez bons résultats. De plus, nous nous concentrons ici sur la qualité des résultats de déconvolution, et non sur la qualité de la simulation du processus de formation des images. L'utilisation de ce modèle simplifié ne limite donc en rien les conclusions que nous tirerons sur les algorithmes de déconvolution.

La réponse impulsionnelle optique est calculée dans des conditions correspondant aux conditions expérimentales, et l'objet est convolué avec cette RIO. La liste suivante donne les paramètres utilisés dans le modèle de Gibson et Lanni correspondants aux conditions d'acquisition des images de cellules de cordon ombilical CD34 qui sont étudiées au Laboratoire d'Hématologie de l'Hopital Emile Muller de Mulhouse par le Dr Georges Jung :

Nxy :	128	size of the image in x and y
deltaxy :	0.068	pixel size in image space in μm
Nz :	64	size of the image in z (optical axis)
deltaz :	0.068	pixel size in z in μm
mag :	100	lateral magnification
NA :	1.4	numerical aperture of the objective
workdist :	0.16	working distance of the objective in mm
lamda :	0.000530	fluorescence wavelength in mm
slipdesri :	1.525	coverslip design refractive index
slipactri :	1.525	coverslip actual refractive index
slipdesth :	0.170	coverslip design thickness in mm
slipactth :	0.170	coverslip actual thickness in mm
medesri :	1.515	immersion oil design refractive index
medactri :	1.515	immersion oil actual refractive index
specri :	1.33	specimen refractive index
specthick :	0.0	specimen depth in mm
desot :	160	design tube length in mm
actot :	160	actual tube length in mm

Un bruit Gaussien est ensuite ajouté, pour imiter les conditions expérimentales. En toute rigueur, il faudrait aussi ajouter un bruit Poissonien, mais LLS et MAP sont connus pour donner de bons résultats même pour un bruit Poissonien pour lequel ces algorithmes ne sont pas optimisés. Nous négligerons donc dans la suite l'influence du bruit Poissonien. Le niveau de bruit de 40%, relativement élevé, a été choisi par rapport à des images expérimentales pour lesquelles LLS et MAP sans prétraitement échouent à donner des résultats de déconvolution exploitables.

La Figure 3.23 décrit le processus de formation des images simulées bruitées. Elle présente des coupes x-y et x-z des objets, RIO, image sans bruit, bruit, et image bruitée considérés [42].

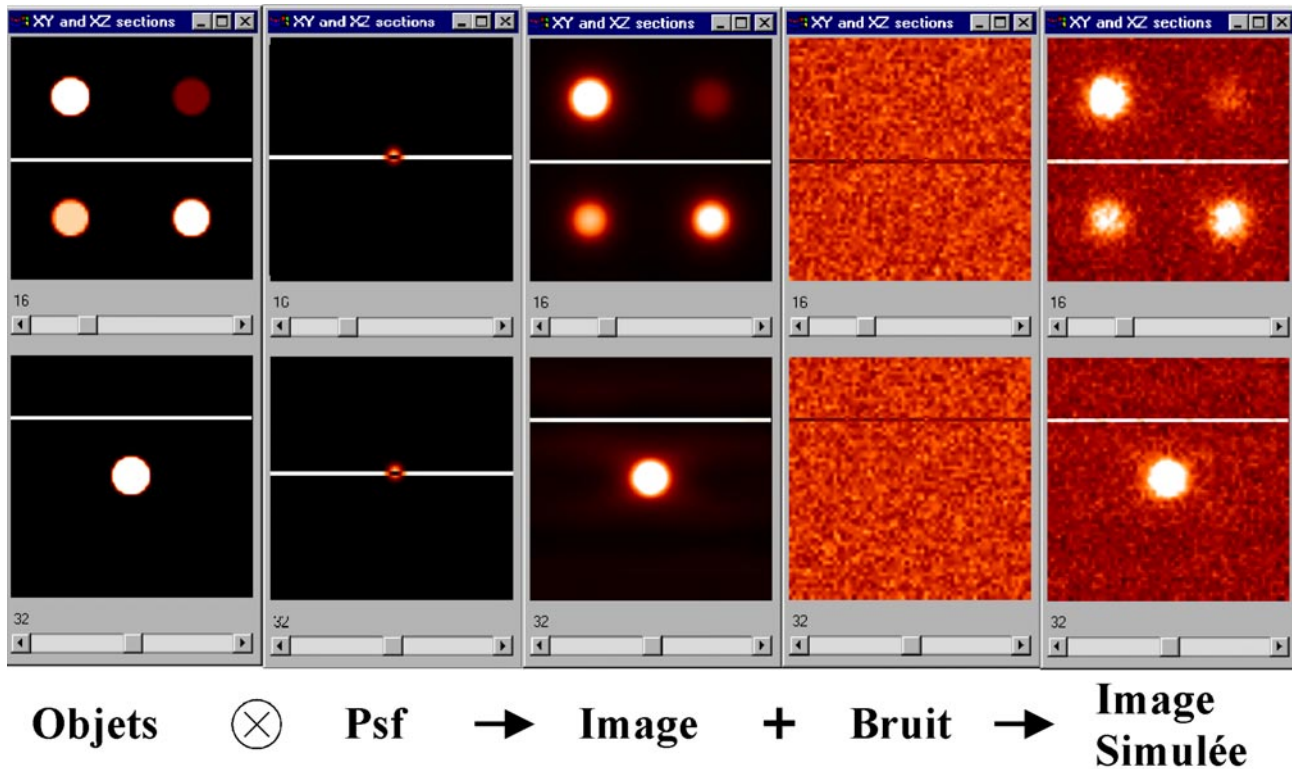


FIGURE 3.23. Construction de l'image test par convolution d'un objet avec une RIO calculée et rajout de bruit.

Cette image simulée a été déconvoluée à l'aide de l'algorithme LLS (sans préfiltrage), et le résultat est comparé à l'objet original. On calcule l'erreur quadratique entre l'objet original et l'objet estimé, en fonction du paramètre de régularisation β qui définit le seuil à partir duquel on supprime les plus petites valeurs propres pour stabiliser l'inversion numérique.

La Figure 3.24 montre (en échelle logarithmique) l'erreur quadratique en fonction de β . On constate que cette erreur varie très grandement en fonction du paramètre de régularisation. On en déduit qu'une petite erreur sur le paramètre de régularisation, introduite par l'opérateur, entraîne une grande erreur sur la qualité du résultat final. C'est justement ce que nous voulions éviter par l'introduction de notre méthode itérative de détermination du paramètre optimal de déconvolution.

Cependant, même en prenant la valeur de β correspondant à la plus petite erreur quadratique ($\beta=10^{-2.7}$), le résultat de déconvolution est loin d'être satisfaisant, comme on le voit sur la Figure 3.25, qui montre l'objet reconstruit pour cette valeur du paramètre de déconvolution.

On constate en fait que l'information a été diluée dans toute l'image, sans doute à cause de la valeur de seuillage élevée, et que, par rapport à l'image de départ convoluée et bruitée, la segmentation des objets n'est pas facilitée, ce qui est justement un des buts de la déconvolution. Les profils des billes mesurés sur l'image déconvoluée, en trait plein, sont très différents des profils des billes théoriques (traits pointillés rouges). Toute mesure de taille et/ou d'intensité serait entachée d'erreurs inacceptables. Ce résultat est clairement dû au bruit présent dans les images, car les mêmes mesures sur les images non-bruitées donnent de très bons résultats.

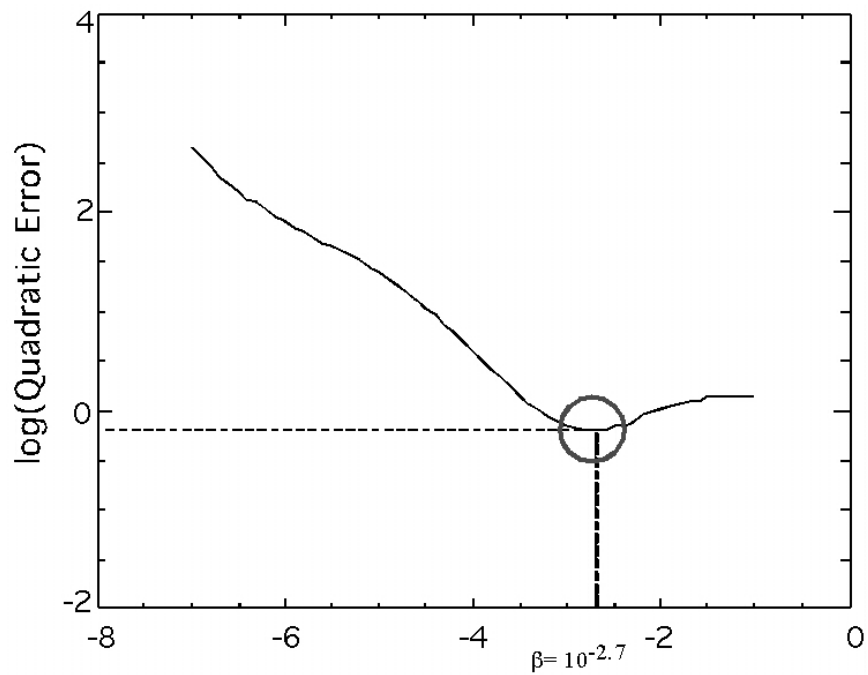


FIGURE 3.24. Courbe d'erreur de déconvolution en fonction du paramètre de régularisation.

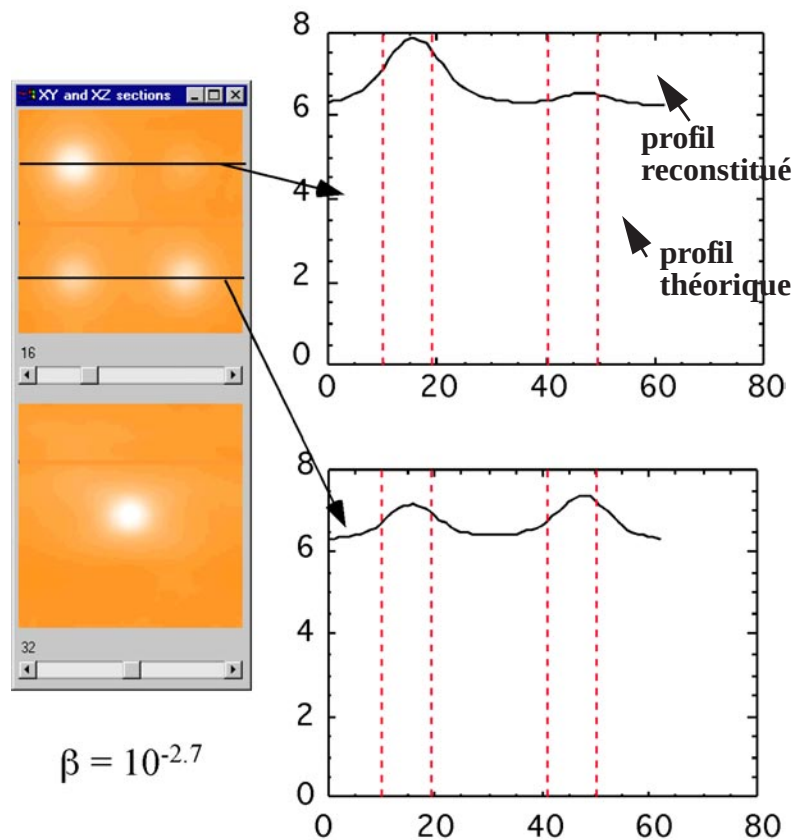


FIGURE 3.25. Profil de l'image test déconvolué sans préfiltrage. Le bruit nuit à la déconvolution, et les profils sont très mal reconstruits.

Il convient donc de réduire l'influence du bruit sur la déconvolution si l'on veut obtenir des résultats quantitatifs fiables.

Nous avons alors proposé d'étendre à nos travaux en 3D l'approche proposée par Sekko [41]. Le principe du préfiltrage que nous avons adopté est alors le suivant. Le calcul de la jauge de Joyce et Root (ou de l'erreur quadratique) pour estimer la qualité de la déconvolution est combiné avec un préfiltrage de Wiener selon la fonction de transfert :

$$W = \frac{1}{1 + \alpha \cdot \frac{P_n(u, v, w)}{P_s(u, v, w)}} \quad (3.21)$$

Dans ce filtre, $P_s(u,v,w)$ représente le spectre du signal recherché (qui est à estimer), et $P_n(u,v,w)$ représente le spectre du bruit, que l'on estime généralement sur une portion de l'image acquise ne contenant a priori pas de signal. Pour une valeur de $\alpha=0$, aucun filtrage n'est appliqué. La valeur $\alpha=1$ correspond au filtre de Wiener classique. Des valeurs de α plus grandes peuvent être utilisées, mais vont alors aussi filtrer le signal (et non plus le seul bruit), ce qui entrainera une grande perte d'information.

Nous avons alors étudié les résultats de déconvolutions à l'aide des algorithmes LLS et MAP, sans et avec préfiltrage. Nous avons dans ce cas calculé l'erreur quadratique entre le résultat final et l'objet de départ, qui est ici connu. Nous avons donc effectué une étude à deux paramètres, α pour le préfiltrage et β pour la régularisation, et tracé la surface d'erreur obtenue (par extension de la courbe d'erreur présentée à la Figure 3.24).

La Figure 3.26 présente le résultat obtenu pour notre image simulée des 9 billes, pour une déconvolution avec LLS. On constate la présence d'une vallée de stabilité pour une valeur de préfiltrage de $\alpha=10^{-0.4}$. Dans cette vallée de stabilité (indiquée par une flèche sur la figure), on voit que l'erreur de restauration est maintenant bien moins dépendante du choix du paramètre de régularisation, qui peut maintenant varier sur plusieurs décades sans grand changement du résultat de déconvolution final.

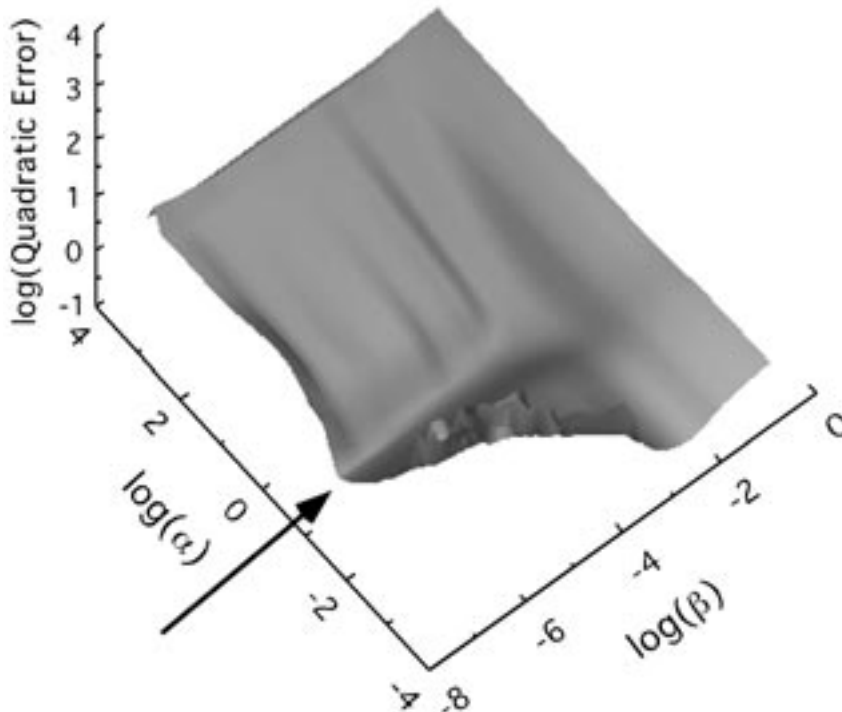


FIGURE 3.26. Surface d'erreur de la déconvolution en fonction des paramètres de préfiltrage et de régularisation. Une vallée de stabilité apparaît pour $\alpha \approx 10^{-0.4}$: une grande variation du facteur de régularisation β est alors possible.

Ce résultat est intéressant sur deux points. Tout d'abord, il confirme en 3D le résultat de Sekko que le préfiltrage permet de séparer le processus de réduction du bruit du processus de déconvolution (présence de la vallée de stabilité).

Ensuite le résultat final est de bien meilleure qualité. Le minimum d'erreur est observé pour une valeur de préfiltrage $\alpha=10^{-0.4}$ et un seuil de régularisation $\beta=10^{-4.3}$. La Figure 3.27 présente le résultat de la déconvolution LLS pour ces valeurs. Les profils reconstitués sont maintenant très proches des profils originaux, et ce pour les 9 billes. Une segmentation de l'image à 45% montre que les mesures de volumes sont entachées d'une erreur de 23% et les mesures d'intensité d'une erreur de 20% par rapport à l'image originale, ce qui montre une bonne restauration malgré le bruit, alors que la déconvolution sans préfiltrage donne des résultats inutilisables (289% d'erreur sur le volume et 93% sur l'intensité).

La méthode MAP combinée au préfiltrage donne des résultats de qualité similaire.

Cette méthode de préfiltrage est classique, et le préfiltrage supprimant les hautes fréquences responsables de l'instabilité de la déconvolution, il n'est guère étonnant que la régularisation soit stabilisée. On peut observer sur la Figure 3.27 que les profils reconstitués présentent des rebonds. Ceci est aussi dû au préfiltrage, qui supprime les hautes fréquences responsables des instabilités, ce qui est justement le but recherché, mais ces hautes fréquences sont aussi justement celles nécessaires à la reconstruction correcte d'un profil rectangulaire tel que celui adopté pour nos billes de synthèse.

Ce phénomène ne devrait pas être gênant dans la pratique, car une hypothèse couramment admise est que justement les objets de fluorescence ne présentent pas de transition brusque (et donc leurs spectres ne contiennent pas de hautes fréquences), à cause du phénomène de diffusion des fluorophores dans le spécimen.

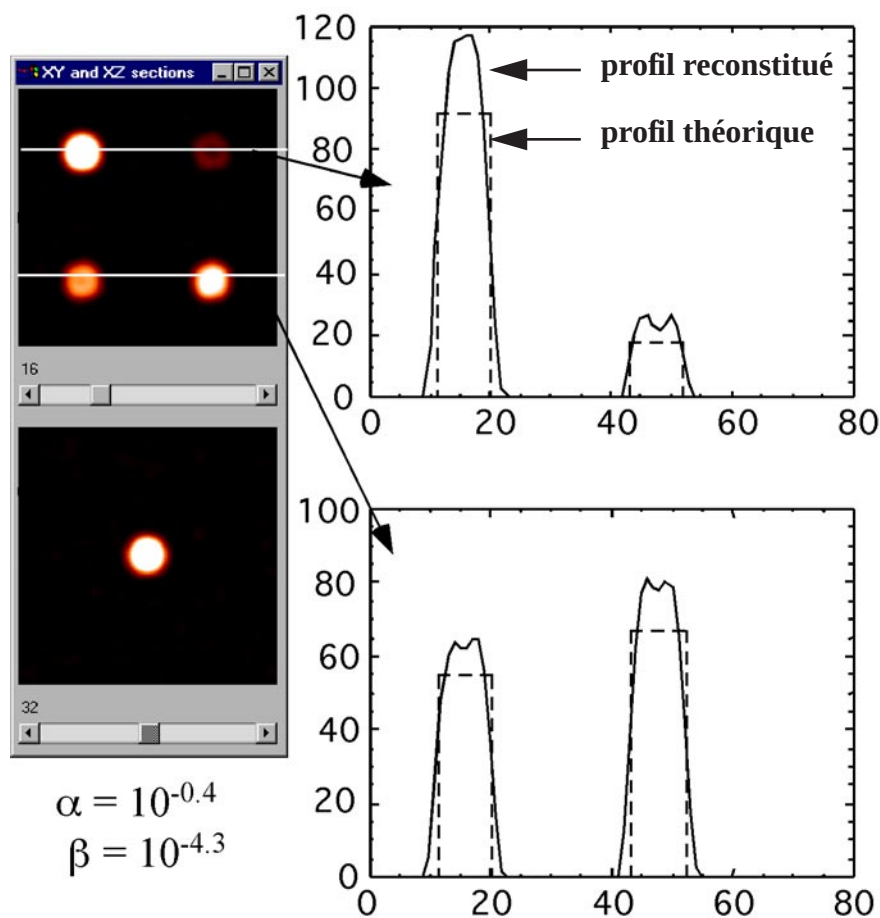


FIGURE 3.27. Profil de l'image test déconvolué par LLS avec préfiltrage. La reconstruction est de bien meilleure qualité.

Nous avons néanmoins étudié l'effet du préfiltrage sur le spectre des images. Pour ce faire, nous considérons maintenant un objet synthétique composé de 9 sphères de même intensité, mais de diamètres différents. La Figure 3.28(a) montre en perspective cet objet composé des 9 sphères dans une configuration cubique centrée. La Figure 3.28(a') montre le spectre de cet objet. Les fréquences sont représentées selon l'axe x et l'axe z. Pour mieux faire apparaître les hautes fréquences, de faibles amplitudes, les fréquences spectrales sont codées en niveaux de gris sur une échelle logarithmique, selon l'équation $S_{\log} = \log_{10}(1 + 30 \cdot \text{abs}(S))$, où S représente la FFT de l'objet.

Cet objet a été convolué avec la même RIO que précédemment, et le même niveau de bruit de 40% a été ajouté. Le flou et l'élongation selon l'axe z, caractéristique du microscope conventionnel, sont clairement visible sur la Figure 3.28(b). Cet allongement selon l'axe z est illustré sur la Figure 3.28(b'), qui représente le spectre de l'objet convolué, par l'apparition du fameux «missing cone» qui traduit le fait que le microscope classique ne transmet pas les informations selon l'axe z. La Figure 3.28(c) est la même que la Figure 3.28(b) après addition du bruit, ce qui a pour effet de brouiller encore l'image. Sur le spectre, l'effet du bruit est de diminuer encore le contraste en diminuant de manière relative l'amplitude des basses fréquences par rapport aux hautes fréquences.

Cette image de synthèse a tout d'abord été déconvoluée à l'aide des algorithmes LLS, MAP et ML-EM. Les résultats sont visibles sur les Figures 3.28 (d) à (f), les Figures 3.28 (d') à (f') montrant les spectres associés. A cause du niveau de bruit, la régularisation de LLS et MAP doit être maintenue à une valeur assez élevée, en éliminant ou minorant les hautes composantes instables, et ce dès une fréquence relativement basse. Ceci a pour conséquence une mauvaise correction de l'élongation en z. Cette limitation est clairement visible sur les spectres, où l'on voit que les fréquences présentes, mais atténuées de la Figure 3.28(b') sont partiellement restaurées seulement, et le cône de fréquences manquantes est encore bien visible. L'utilisation de ML-EM donne des résultats sensiblement meilleurs, visible sur la Figure 3.28(f), pour laquelle on note une meilleure correction de l'élongation en z. Ceci se traduit sur le spectre (Figure 3.28(f')) par un comblage partiel du missing cone.

Lorsque l'on applique notre méthode de préfiltrage, les résultats obtenus sont clairement de meilleure qualité, et ce pour les trois méthodes de déconvolution considérée ici. Les Figures 3.28 (g) à (i) sont à comparer aux Figures 3.28 (d) à (f). On voit le gain en qualité aussi sur les spectres associés, qui montrent clairement que plus de fréquences sont retrouvées, le meilleur résultat étant obtenu pour ML-EM avec préfiltrage, qui reconstruit presque correctement l'ensemble du spectre de l'objet de départ. Les gains en déconvolution du préfiltrage sont de deux ordres.

Tout d'abord, les objets (les 9 sphères) sont mieux séparés du fond diffus dû au bruit, grâce au préfiltrage. Ceci se traduit par une segmentation plus aisée de l'image finale.

Enfin, comme la majorité du bruit est supprimé, les algorithmes de déconvolution peuvent mieux restaurer les hautes fréquences, ce qui permet de mieux reconstruire la forme exacte des objets de départ. De ce fait, on peut s'attendre à des mesures de dimensions, volumes ou intensités de meilleure qualité.

Nous avons quantifié le gain obtenu pour les 9 sphères (présentées par ordre de taille croissante) composant l'objet de synthèse utilisé pour la Figure 3.28. La Table 1 présente les résultats pour les mesures de volume, intensité totale (intégrée sur le volume), et intensité maximale pour chaque sphère. Les images obtenues avec les différentes méthodes de déconvolution ont toutes été segmentées de la même manière, en appliquant un seuillage à 15% du maximum. Les trois premières lignes donnent les valeurs de référence pour les objets de départ, qui sont supposés correctement reconstruits après déconvolution. Nous avons utilisé les méthodes LLS, MAP et ML-EM sans préfiltrage d'abord, puis avec préfiltrage, que nous avons appelées respectivement LLS+, MAP+ et ML-EM+. Les résultats sont présentés en pourcentage de variation par rapport aux sphères de référence.

On notera tout d'abord que pour les deux plus petites sphères, on obtient pas de résultats significatifs, quelle que soit la méthode employée. La raison en est que ces objets ne sont pas clairement segmentés du bruit. Ceci est dû au fait que dans ce travail, nous nous sommes concentré sur l'amélioration des résultats quantitatifs, et pas sur l'obtention de la meilleure résolution possible par séparation ou identification des plus petits objets.

Pour les mesures de volume, le préfiltrage améliore la qualité des mesures pour les trois méthodes considérées. Typiquement, LLS+ présente des résultats 40% plus précis que LLS. LLS+ et MAP+ donnent des résultats similaires pour ce qui est de l'identification des sites de fluorescence et la mesure de leur taille. Les

meilleurs résultats en volume sont obtenus avec ML-EM+. Non seulement l'erreur sur les mesures de volume est la plus petite, de manière absolue, mais contrairement à LLS+ ou MAP+, l'erreur est très similaire d'une bille à une autre. Ceci montre aussi que ML-EM+ reconstruit le mieux les profils des objets, ce qui est confirmé par le fait que le spectre de l'objet reconstruit avec ML-EM+ est le plus proche de l'objet de départ.

Pour les mesures d'intensité totale, un gain similaire de qualité est obtenu pour LLS+, MAP+ et ML-EM+. Les meilleurs résultats sont dans l'ordre obtenus avec LLS+ (en négligeant la sphère de diamètre 2 pixels), MAP+ puis ML-EM+. Curieusement, ML-EM+ donne dans ce cas des mesures moins bonnes que ML-EM seul. Ceci s'explique par le fait que ML-EM+ reconstruit mieux les profils presque plats des sphères, mais avec une intensité maximale plus faible, ce qui se traduit par une erreur similaire sur l'intensité totale. Il faut cependant noter que, là encore, les variations des erreurs sur les mesures d'intensité maximale et d'intensité intégrée sont les plus faibles pour ML-EM+. Ceci montre que cette méthode, au contraire des autres, donne des résultats dont la qualité est indépendante de la taille de l'objet considéré.

Pour conclure, on peut dire qu'on peut utiliser LLS+ ou MAP+ pour une première évaluation rapide des résultats, ce qui permet de traiter un grand nombre d'échantillons dans un temps raisonnable et de retenir les meilleurs images qui seront alors traité avec ML-EM+, qui demande plus de temps de calcul, mais fournit des résultats de meilleure qualité pour ce qui est des mesures de forme et de taille ou de volume, car c'est la méthode qui reconstruit le mieux les profils, et pour les mesures d'intensité relative entre les sites, car ML-EM+ est la méthode qui fournit les résultats présentant le moins de variations pour ce type de mesure.

TABLE 3.

Original	Volume (voxels)	Bead Ø1 (0.068µm)	Bead Ø2 (0.136µm)	Bead Ø3 (0.204µm)	Bead Ø5 (0.340µm)	Bead Ø6 (0.408µm)	Bead Ø7 (0.476µm)	Bead Ø8 (0.544µm)	Bead Ø10 (0.680µm)	Bead Ø11 (0.748µm)
		1	7	27	81	115	251	341	515	739
		Σ(I)	Σ(I)	Σ(I)	Σ(I)	Σ(I)	Σ(I)	Σ(I)	Σ(I)	Σ(I)
	Max(I)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
LLS	ΔVolume	x	x	266.7	232.0	226.0	157.0	157.7	162.3	133.8
	ΔΣ(I)	x	x	-21.4	2.7	7.6	3.0	3.9	8.5	7.0
	ΔMax(I)	x	x	-63.3	-39.4	-26.7	-1.6	7.6	-0.6	-3.3
MAP	ΔVolume	x	x	207.4	258.0	247.8	211.6	186.7	168.8	148.7
	ΔΣ(I)	x	x	-39.6	-6.1	-0.5	7.2	7.2	8.0	7.4
	ΔMax(I)	x	x	-72.4	-47.2	-36.6	-15.7	-6.1	-4.0	-1.4
MLEM	ΔVolume	x	x	x	0	69.6	96.0	88.9	84.9	87.7
	ΔΣ(I)	x	x	x	-74.0	-47.7	-26.6	-23.8	-19.6	-15.1
	ΔMax(I)	x	x	x	-56.7	-23.2	-7.4	8.4	9.5	18.9
LLS+	ΔVolume	x	171.4	174.1	155.6	131.3	107.6	103.8	87.0	79.7
	ΔΣ(I)	x	-49.9	-8.7	-1.9	-5.1	-0.4	-1.4	-0.9	-0.7
	ΔMax(I)	x	-73.7	-33.3	-3.4	-6.6	-6.5	-5.5	-2	1.6
MAP+	ΔVolume	x	x	174.1	155.6	153.9	117.1	121.1	106.0	96.5
	ΔΣ(I)	x	x	-31.3	-10.4	-9.7	-5.1	-3.0	-1.9	-1.1
	ΔMax(I)	x	x	-58.0	-19.8	14.3	-5.5	-3.2	-4.6	-2.7
MLEM+	ΔVolume	x	x	-7.4	-8.6	7.8	9.6	4.1	14.0	9.1
	ΔΣ(I)	x	x	-52.3	-39.8	-29.7	-23.6	-23.8	-18.4	-19.3
	ΔMax(I)	x	x	30.1	78.2	46.6	39.8	38.1	43.8	40.8

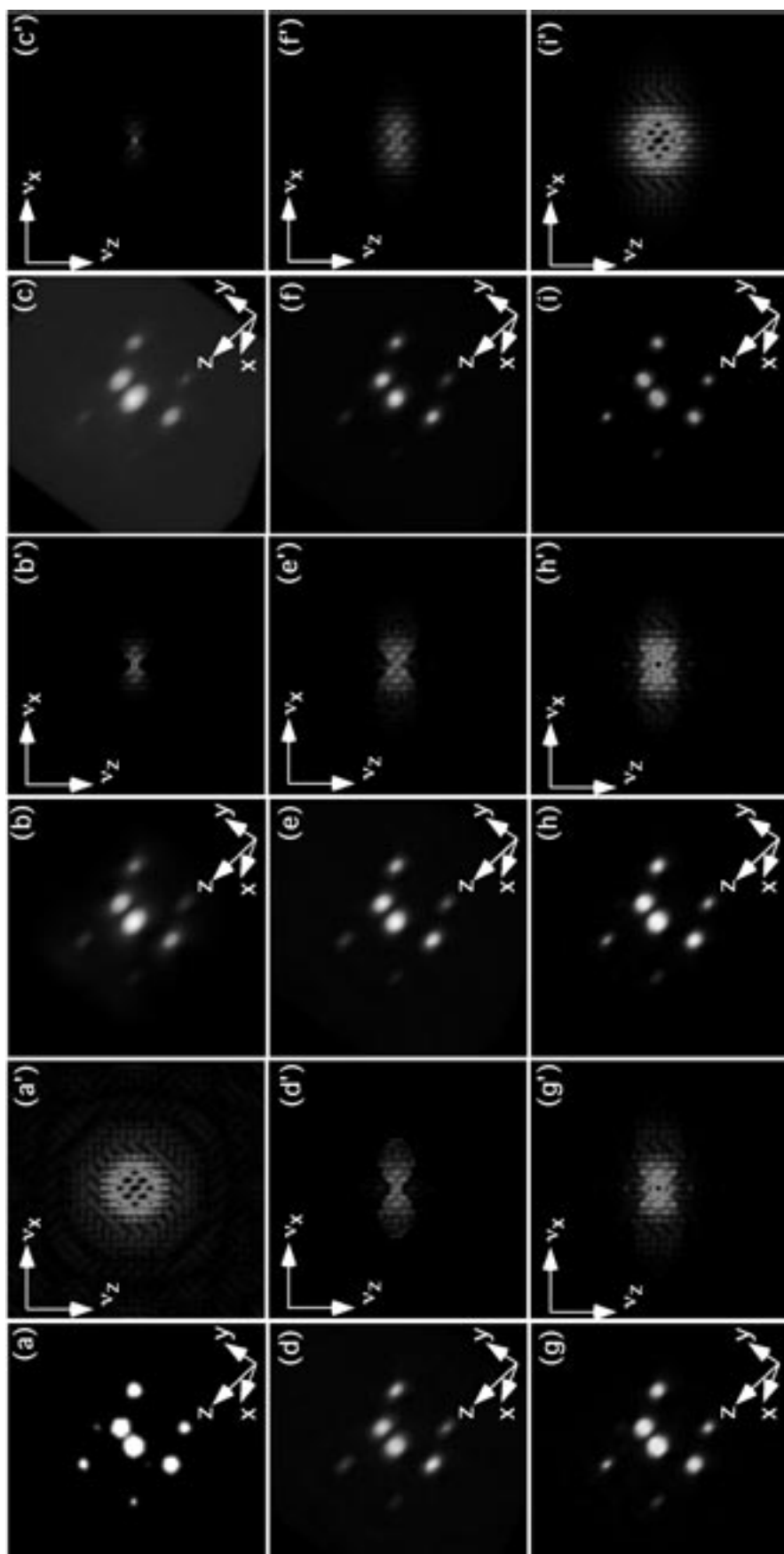


FIGURE 3.28. Etude sur un objet de synthèse constitué de 9 billes d'intensité identique et de diamètre différents. (a) objet. (a') spectre de l'objet. (b) objet convolué. (b') spectre associé. (c) et (c') idem après adjonction de bruit. (d) - (f) : déconvolutions par les méthodes LLS, MAP et ML-EM sans préfiltrage. (d') - (f') spectres associés. (g) - (i) déconvolution par les méthodes LLS, MAP et ML-EM après préfiltrage. (g') - (i') spectres associés.

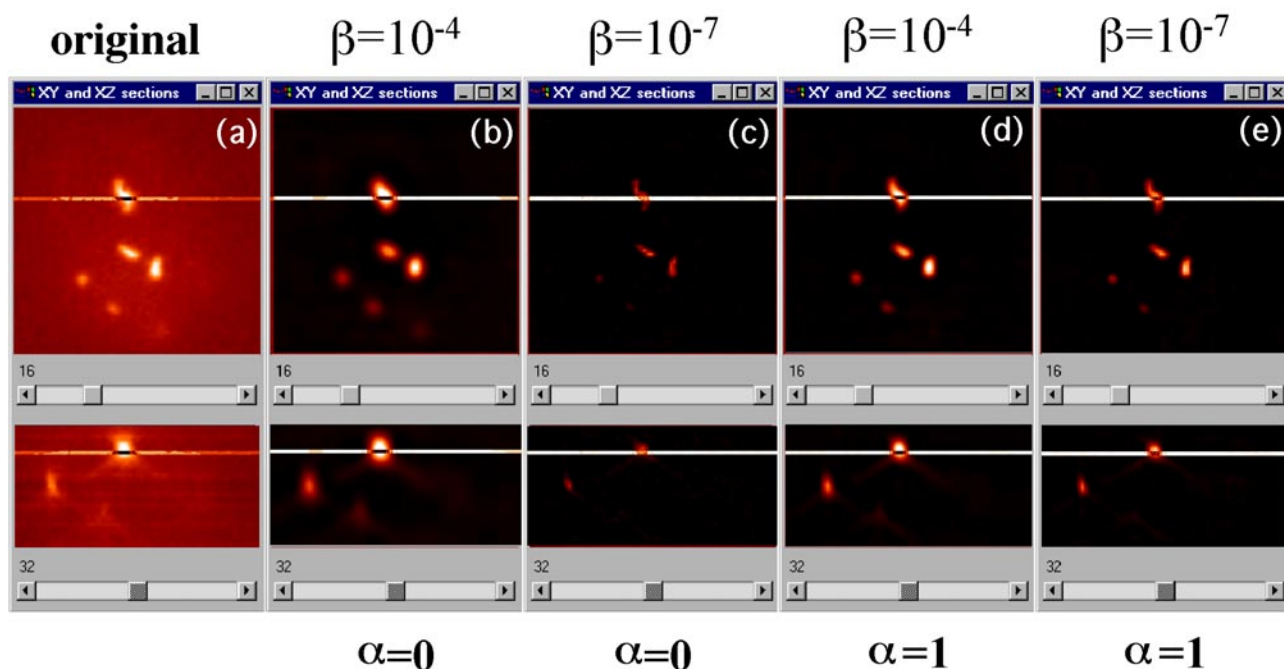


FIGURE 3.29. Effet du préfiltrage et de la déconvolution sur une image biologique. (a) : image originale. (b) : sans préfiltrage, régularisation $\beta=10^{-4}$ (c) : sans préfiltrage, régularisation $\beta=10^{-7}$ (d) : avec préfiltrage, régularisation $\beta=10^{-4}$ (e) : avec préfiltrage, régularisation $\beta=10^{-7}$. Les images (d) et (e) sont beaucoup plus ressemblantes que (b) et (c), ce qui montre que le préfiltrage stabilise la déconvolution.

Nous avons enfin appliqué notre méthode à des images biologiques acquises sur le microscope de fluorescence du LabEl, situé au Laboratoire d'Hématologie de l'Hôpital Emile Muller à Mulhouse. Les échantillons considérés sont des cellules CD34, étudiées par le Dr Georges Jung [43]. La réponse impulsionnelle optique a été mesurée à l'aide de billes de latex fluorescence selon la méthode décrite dans le Chapitre II [37].

La Figure 3.29 montre les résultats de la déconvolution avec et sans préfiltrage sur une image typique. La Figure 3.29 (a) montre l'image brute, relativement bruitée et difficilement exploitable (segmentation).

Les Figure 3.29 (b)(c) montrent le résultat d'une déconvolution par MAP sans préfiltrage, et en changeant le paramètre de régularisation à $\beta=10^{-4}$ et $\beta=10^{-7}$. On peut voir que le résultat final varie grandement. Ceci prouve donc que les mesures quantitatives peuvent grandement varier d'un opérateur à un autre, qui estimera différemment la qualité de la déconvolution. De ce fait, ces mesures sont peu répétitives, et donc peu fiables dans la pratique. Les Figure 3.29 (d)(e) montrent le résultat d'une déconvolution par MAP avec un préfiltrage de Wiener avec $\alpha=1$, pour la même variation du paramètre de régularisation à $\beta=10^{-4}$ et $\beta=10^{-7}$. On voit maintenant que le résultat de la déconvolution varie peu (on se situe dans, ou très près de la vallée de stabilité). Ces résultats ont été confirmés sur plusieurs images pour lesquelles une déconvolution sans préfiltrage donnait des résultats inexploitable, ou très variables.

En conclusion, on peut donc dire que le préfiltrage des données améliorent le processus de déconvolution de deux façons. Tout d'abord, des images qui ne pourraient être utilisées à cause de leur trop grand bruit peuvent être étudiées. Ceci aide à augmenter la statistique des résultats. Enfin, en éliminant l'ajustement manuel des paramètres de déconvolution, très dépendant de l'expérience et des connaissances a priori de l'observateur, l'automatisation de la déconvolution, combinée au préfiltrage des données, permet de grandement améliorer la reproductibilité et donc la fiabilité des résultats [42][44]. L'étude théorique sur des objets de synthèse a aussi montré que la qualité des mesures quantitatives était aussi améliorée.

Ces avancées devraient permettre de contribuer à une plus large adoption des méthodes de déconvolution pour un usage routinier par des non-spécialistes du traitement d'image.

3.6 Conclusion

Le couplage du microscope de fluorescence à l'ordinateur a permis de décupler ses possibilités et ouvert de nouveaux champs d'application pour cet instrument. Ce couplage explique en grande partie le regain d'intérêt pour les techniques de microscopie optique, qui sont les seules à pouvoir travailler sur des spécimens biologiques vivants, et en 3 dimensions.

Nous avons cependant vu au Chapitre II certaines limitations de cet instrument. Sa résolution est encore faible par rapport à d'autres techniques (microscopie électronique, microscopie optique en champ proche), les modèles de formation d'image sont souvent approximatifs (hypothèse de non invariance spatiale de la réponse impulsionnelle optique par exemple), les images obtenues sont souvent bruitées et difficiles à utiliser pour des mesures quantitatives.

Les techniques de traitement d'image, et en particulier les techniques de restauration par déconvolution des images permettent de palier en partie à ces insuffisances. On peut en particulier améliorer la résolution des images finales, augmenter le rapport signal sur bruit, et surtout restaurer les formes et intensités des objets observés. Ces étapes sont indispensables pour pouvoir réaliser des mesures quantitatives fiables.

Un changement très notable dans l'utilisation du microscope optique est en effet qu'on veut passer d'un outil d'imagerie, essentiellement qualitatif, à un outil de mesures quantitatives. Pour ce faire il convient de parfaitement maîtriser la chaîne d'acquisition et de traitement des images. Ceci passe par une compréhension fine des mécanismes de formation des images (Chapitre II) et par une parfaite technique expérimentale. La prise de conscience de ces deux points par les utilisateurs finaux semblent être faite.

A l'heure actuelle, les techniques de traitement des images sont souvent bien moins comprises et maîtrisées. De ce fait, les meilleures images obtenues ne peuvent être que partiellement exploitées. Pour une meilleure utilisation de ces techniques, et leur adoption à une plus grande échelle, il convient de réduire au minimum les interventions humaines basées sur l'expérience et les connaissances a priori de l'observateur, et d'introduire dans la chaîne de traitement des critères de qualité qui soient quantitatifs et indépendants des utilisateurs.

Nous travaillons au LabEl sur ce point précis, par l'étude des algorithmes de déconvolution les plus courants, pour mieux maîtriser et quantifier leurs performances. Ce point à fait l'objet de la deuxième partie de ce chapitre. La quantification des erreurs résiduelles est importante pour estimer la fiabilité des résultats, et mieux cerner le domaine d'application de ces techniques. Enfin, l'amélioration des algorithmes par leur automatisation et l'augmentation de leur robustesse est aussi un résultat important obtenu au laboratoire.

Ces travaux ont donné lieu à 4 articles, 10 communications avec actes, 11 communications sans actes, 5 posters et 4 séminaires invités. J'ai aussi encadré plusieurs stagiaires de maîtrise (1) et de DEA (2) dans le cadre de ces travaux, et co-encadré deux étudiants en thèse.

Journaux à comité de lecture :

"Improvement of the LLS and MAP deconvolution algorithms by automatic determination of optimal regularization parameters and pre-filtering of original data"

B. Colicchio, **O. Haeberlé** *et al.*, Opt. Comm. (accepted)

"Validation of image processing tools for 3-D fluorescence microscopy"

A. Dieterlen, C. Xu, M.-P. Gramain, **O. Haeberlé** *et al.*, C. R. Biologies **325**, p. 327 (2002)

"Acquisition, restauration et Analyse 3D en Microscopie Optique de Fluorescence"

A. Dieterlen, C. Xu, M.P. Gramain, **O. Haeberlé**, *et al.*, Récent Progrès en Génie des Procédés **15**, p. 135 (2001)

"Fluorescence quantification in 3D optical sectioning microscopy: a comparison of some deconvolution algorithms in view of 3D image segmentation"

A. Chomik, A. Dieterlen, C. Xu, **O. Haeberlé** *et al.*, J. Opt. **28**, p. 225 (1997)

Conférences avec actes :

“Identification, Restoration in 3-D Fluorescence Microscopy”

A. Dieterlen, C. Xu, **O. Haerberlé** *et al.*, 6th International Conference on Correlation Optics, Chernivtsi (Ukraine), September 16-19 (2003). Proceeding SPIE 5477, p. 105 (2004)

“Amélioration de la résolution en microscopie 3D: du processus d’émission photonique au traitement d’image”

O. Haerberlé *et al.*, Colloque Imagerie pour les Sciences du Vivant et la Médecine IMVIE 2003. Actes du colloque IMVIE 2003, p. 111 (2003)

“Accurate modelisation of the fluorescence microscope and sensitivity of microscope 3-D image deconvolution to initial parameters”

O. Haerberlé *et al.*, Third Workshop on Physics in Signal and Image Processing PSIP2003 Grenoble (France), January 29-31, 2003. Proceedings of PSIP 2003, p. 221 (2003)

“Monte-Carlo reconstruction of images from a RIO variant system”

B. Colicchio, C. Xu, **O. Haerberlé**, *et al.*, Focus on Microscopy 2002, Kaohsiung (Taiwan), April 7-10, 2002. Technical Digest of Focus on Microscopy 2002, p. 56 (2002)

“Régularisation de la déconvolution d’image par préfiltrage”

B. Colicchio, C. Xu, A. Dieterlen, S. Razgallah, M.-P. Grammain, **O. Haerberlé** *et al.*, Colloque CRN-IUT-2001, Roanne (France) 13-15 Juin 2001, CRN’IUT 2001, p. 113 Publications de l’Université de St-Etienne

“Pre-filtering applied to 3-D fluorescence microscopy deconvolution”

B. Colicchio, C. Xu, G. Jung, A. Dieterlen, **O. Haerberlé**, 7th Congress of European Society for Analytical Cellular Pathology, Caen (France), April 1-5 2001. Analytical Cellular Pathology **22**, p. 91 (2001)

“Acquisition, restauration et analyse 3D en microscopie optique de fluorescence”

A. Dieterlen, C. Xu, M.-P. Grammain, **O. Haerberlé** *et al.*, Colloque Visualisation Image Modélisation VIM 2001, Nancy (France), 15-17 mai 2001

“Regularization of fluorescence image deconvolution by adaptive prefiltering”

B. Colicchio, C. Xu, **O. Haerberlé** *et al.*, Focus on Microscopy 2001, Amsterdam (Netherland), April 1-4, 2001

“Quantification of errors made in deconvolution under the assumption of RIO depth invariance”

C. Xu, **O. Haerberlé** *et al.*, Focus on Microscopy 2000, Shirahama (Japan), April 9-13, 2000, Technical Digest of Focus on Microscopy 2000, p. 57 (2000)

“Fluorescence microscopy image deconvolution: application to anthracycline distribution in breast cancer cells”

M.-P. Grammain, C. Bour, A. Chomik, A. Dieterlen, **O. Haerberlé** *et al.*, BIOS Europe 97, San Remo (Italy), September 4-8, 1997, Proc. SPIE Vol. 3197, p. 187 (1997)

Conférences sans actes :

“Evolutions de la microscopie 3D de fluorescence”

A. Dieterlen, **O. Haerberlé** *et al.*, Cinquième Colloque National Optique pour le Diagnostic Médical, Paris, 11-13 Mai 2004

“Application des outils d’analyse 3D en microscopie de fluorescence à la cytogénétique moléculaire”

B. Colicchio, E. Jeandidier, A. Dieterlen, **O. Haerberlé**, Cinquième Colloque National Optique pour le Diagnostic Médical, Paris, 11-13 Mai 2004

“Apport de la microscopie 3D à la cytogénétique moléculaire sur noyaux”

A. Dieterlen, B. Colicchio, C. Xu, **O. Haerberlé** *et al.*, Nouvelles stratégies pour la détection de réarrangements génomiques, Strasbourg, 14 Décembre 2002

“Validation des outils d’analyse 3D en microscopie de fluorescence; application clinique aux explorations cytologiques membranaires, cytoplasmique et nucléaire”

A. Dieterlen, C. Xu, C. Cudel, **O. Haerberlé** *et al.*, Colloque technologie pour la Santé, Hôpital Européen Georges Pompidou (H.E.G.P), 10 juin 2002

“Acquisition, restauration et analyse 3D en microscopie optique de fluorescence. ”

A. Dieterlen, C. Xu, **O. Haerberlé et al.**, Quatrième Colloque National Optique pour le Diagnostic Médical, Paris, 16-17 Mai 2002

“Acquisition, restauration et analyse 3D en microscopie optique de fluorescence”

A. Dieterlen, C. Xu, **O. Haerberlé et al.**, Colloque Visualisation, Image, Modélisation VIM 2001, Nancy (France), 15-17 Mai 2001

“3-D fluorescence microscopy”

A. Dieterlen, M.P.Gramain, C.Xu, C.Bour-Dill, **O.Haerberlé et al.**, Euromech Colloquium N° 420: Mechanics of cells and tissues, Nancy (France) 24-26 April 2001

“Traitements d’Images Appliqués à la Microscopie de Fluorescence : Déconvolution - Mesures Quantitatives”

Rendez-vous des microscopies appliquées au vivant, Lille 19-20 Avril 2001

“Mesures 3D en microscopie optique : caractérisation du système et déconvolution des données”

S. Razgallah, M.-P. Gramain, C. Bour-Dill, A. Dieterlen, C. Xu, **O. Haerberlé et al.**, Troisième Colloque National Optique pour le Diagnostic Médical, Paris 18-19 Mai 2000

“View 3D: a toolbox for 3-D fluorescence image analysis”

S. Razgallah, B. Collichio, N. Mokrani, P. Berthélémy, **O. Haerberlé et al.**, Cytométrie 99, Dijon (France), October 15-19 1999

“Quantification de fluorescence en microscopie optique 3D”

A. Dieterlen, C. Xu, A. Chomik, P. Schillinger, J.J. Meyer, S. Jacquey et **O. Haerberlé** Deuxième Colloque National Optique pour le Diagnostic Médical, Paris 15-16 Mai 1997

Posters :

“Acquisition, restauration et analyse 3D en microscopie optique de fluorescence. ”

A. Dieterlen, C. Xu, **O. Haerberlé et al.**, Quatrième Colloque National Optique pour le Diagnostic Médical, Paris, 16-17 Mai 2002

“Validation of image processing tools for 3-D fluorescence microscopy”

A. Dieterlen, C. Xu, **O. Haerberlé et al.**, Colloque AcM/MdA, Grenoble (France), 23-24 Novembre 2000

“Automation of the LLS deconvolution algorithm for 3-D fluorescence microscopy image processing”

O. Haerberlé, C. Xu, S. Razgallah, A. Dieterlen, 20th congress of the International Society for Analytical Cytometry, ISAC XX, Montpellier (France), May 20-25, 2000

“View 3D: a toolbox for 3-D fluorescence image analysis”

S. Razgallah, B. Collichio, N. Mokrani, P. Barthélémy, **O. Haerberlé et al.**, Cytométrie 99, Dijon (France), October 15-19, 1999

“Statistical tools for biological images analysis”

S. Razgallah, **O. Haerberlé**, C. Xu and A. Dieterlen, Cytométrie 99, Dijon (France), October 15-19, 1999

Séminaires invités :

“Sharpening Fluorescence Microscopy by Deconvolution and RIO Engineering”

LASIE, Osaka University, Osaka (Japan), 03. August 2001

“Improving Fluorescence Microscopy Images: Deconvolution, Instrument Characterization, and RIO Engineering”

Photonic Research Institute, AIST, Tsukuba (Japan), 10. July 2001

“Microscopie de fluorescence 3D : traitement d'image”

Institut de Biologie Physico-Chimique, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 18 Mai 2000

“Deconvolution of 3-D images in fluorescence microscopy”

Optical Engineering Division, Department of Applied Physics and Information Science Mechanical Engineering Laboratory, Tsukuba (Japan), 20. April 2000

REFERENCES

- [1] B.R. Frieden, J. Opt. Soc. Am. **57**, 56 (1967)
- [2] *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Pawley J.B., Plenum, New York, 1995.
- [3] *The Numerical Solution of Integral of Equations of the Second Kind*, K.E. Atkinson (Cambridge University Press, 1997)
- [4] *Electromagnetic Theory of Gratings*, edited by R. Petit (Springer-Verlag, Berlin, 1980)
- [5] *Statiscal Optics*, J.W. Goodman (Wiley, New York, 1989)
- [6] C. Preza *et al.*, J. Opt. Soc. Am. A **9**, 219 (1992)
- [7] C. Preza *et al.*, J. Opt. Soc. Am. A **10**, 1078 (1992)
- [8] C. Preza, M.I. Miller and J.-A. Conchello, Image reconstruction for 3-D light microscopy with a regularized linear method incorporating smoothness prior, Proc. SPIE **1905**, 129 (1993)
- [9] L.S. Joyce and W.L. Root, J. Opt. Soc. Am. A **1**, 149 (1984)
- [10] W.L. Root, J. Opt. Soc. Am. A **4**, 171 (1987)
- [11] XCOSM, Progiel, Biomedical Computer Laboratory, Washinton University, St. Louis
- [12] *Solutions of ill-posed problems*, A.N. Tikhonov and V.Y. Arsenin (Winston V. H. & Sons, Washington 1977)
- [13] *Moment problems and ill-posed operator equations with convex constraints*, W.A. Carrington Mathematics. St Louis, Washington(1982)
- [14] W.A. Carrington, Image restoration in 3D microscope with limited data, Bioimaging and Two-dimentional spectroscopy, Proceedings SPIE **1205**, 72 (1990)
- [15] W.A. Carrington and K.E. Fogarty, "3-D molecular distribution in living cells by deconvolution of optical sections using light microscopy", Proceedings of the Thirteenth Annual Northeast Bioengineering Conference, Foster K. R. Edition, IEEE, 108 (1987)
- [16] F.S. Fay, K.E. Fogarty and J.M. Coggins, Opt. Meth. Cell. Physiol. **40**, 51 (1986)
- [17] F.S. Fay, W. A. Carrington, W. Forgarty, J. Microsc.(Oxford) **153**, 133 (1989)
- [18] P. Verveer, J. Opt. Soc. Am. A **14**, 1696 (1997)
- [19] J.-A. Conchello, J.J. Kim and E.W. Hansen, Appl. Optics **33**, 3740 (1994)
- [20] J.-A. Conchello, Q. Yu and J.W. Lichtman, "Three-Dimensional image reconstructions from a partially confocal scanning microscope", in Image reconstruction and restoration Proceeding SPIE **2302**, 1 (1994)
- [21] L.B. Lucy, The Astronomical Journal **79**, 745 (1974)
- [22] W.H. Richardson, J. Opt. Soc. Am. **62**, 55 (1972)
- [23] T. Holmes, Appl. Optics **28**, 4930 (1989)
- [24] P. Verveer, J. Opt. Soc. Am. A **15**, 1077 (1998)
- [25] J.G. McNally *et al.*, J. Opt. Soc. Am. A **11**, 1056 (1994)

-
- [26] B.R. Hunt, Intern. J. of Modern Phys. C **5**, 151 (1994)
- [27] E.S. Meinel, J. Opt. Soc. Am. A **3**, 787 (1986)
- [28] T.J. Holmes, J. Opt. Soc. Am. A **5**, 666 (1988)
- [29] S. Kawata, J. Opt. Soc. Am. **70**, 762 (1980)
- [30] S. Kawata, J. Opt. Soc. Am. **70**, 768 (1980)
- [31] H. Vandervoort, J. of Microscopy **178**, 165 (1995)
- [32] C. Preza *et al.*, Micros. Acta **23**, 501 (1992)
- [33] A. Chomik “Déconvolution 3D orientée vers la reconstruction d’objets biologiques observés en microscopie optique de fluorescence”, Thèse de Troisième Cycle, Université de Haute-Alsace, juin 1997.
- [34] A. Chomik *et al.*, Journal of Optics **28**, 1 (1997)
- [35] C. Xu, O. Haeberlé, B. Colicchio and S. Razgallah “Quantification of errors made in deconvolution under the assumption of PSF depth invariance” Focus on Microscopy 2000, Shirahama (Japan), April 9-13, 2000 Technical Digest of Focus on Microscopy 2000, p. 57 (2000)
- [36] B. Colicchio, C. Xu, O. Haeberlé, A. Dieterlen, “Monte-Carlo reconstruction of images from a PSF variant system” Focus on Microscopy 2002, Kaohsiung (Taiwan), April 7-10, 2002 Technical Digest of Focus on Microscopy 2002, p. 56 (2002)
- [37] O. Haeberlé *et al.*, Opt. Comm. **196**, 109 (2001)
- [38] F. Bicha, “Identification des paramètres d’acquisition de la réponse impulsionnelle d’un microscope de fluorescence” Rapport de DEA, Université de Haute-Alsace (2000)
- [39] L’indice de réfraction de l’huile utilisée est donné par le constructeur (Cargille) à $n=1.515\pm0.002$ à $T=23^{\circ}\text{C}$ avec une correction en température de $-0.00031/^{\circ}\text{C}$
- [40] S.F. Gibson, “Modeling the three-dimensional imaging properties of the fluorescence light microscope”, Ph. D. Carnegie Mellon University (1990)
- [41] E. Sekko, G. Thomas, A. Bourkrouche, Signal Proc. **72**, 23 (1999)
- [42] B. Colicchio, O. Haeberlé *et al.*, Opt. Comm. (accepted to be published 2004)
- [43] G. Jung *et al.*, Three-dimensional CD34 antigen expression in human umbilical cord cells, in: 45th American Society of Hematology Annual Meeting, 6–9 December 2003, San Diego, CA, Blood 100, (2003)
- [44] G.M.P Van Kempen *et al.*, J. Microsc. **185**, 354 (1996)
-

CHAPITRE IV PROJET DE RECHERCHES

“Celui qui se perd dans sa passion est moins perdu que celui qui a perdu sa passion.”

Saint Augustin

“Celui qui a cessé de s’émerveiller a pratiquement cessé de vivre”

Albert Einstein

“Doutez de tout, et surtout de ce que je vais vous dire...”

Bouddha



Max Ernst “Euclide”

4.1 Introduction

Nous avons vu dans les trois précédents chapitres différentes techniques donnant lieu à des améliorations de la résolution en imagerie microscopique.

Ainsi, dans le Chapitre I, consacré à de nouvelles sources de rayonnement électromagnétique, nous avons vu que le rayonnement de transition a donné lieu à une technique d'imagerie optique en champ lointain, à la résolution inégalée pour des surfaces et interfaces. On accède donc aux propriétés optiques des matériaux étudiés, mais avec une résolution se rapprochant de celle de la microscopie électronique à balayage. Les limitations de cette technique restent cependant les mêmes que celles de la microscopie électronique : limitation à l'imagerie de surface 2D, nécessité d'opérer sous vide. Cette technique n'est donc pas du tout adaptée à l'imagerie biologique de spécimens vivants.

Dans le Chapitre II, nous avons détaillé les modèles de formation d'image dans un microscope de fluorescence. Cet instrument est devenu l'outil de référence pour les études en biologie fonctionnelle. Paradoxalement, son fonctionnement était (est) encore loin d'être pleinement compris. Ce travail a permis de préciser les modèles théoriques décrivant les propriétés optiques de cet instrument, mais aussi d'étudier et de proposer des configurations nouvelles.

Dans le Chapitre III, l'accent a été mis sur les techniques numériques de restauration des images, une fois celles-ci manipulables par l'ordinateur. Le couplage du microscope avec l'informatique a en effet ouvert des horizons nouveaux, encore largement inexplorés. Les modèles de formation d'image décrits au Chapitre II peuvent alors être utilisés pour déconvoluer les données, ce qui permet une amélioration du rapport signal sur bruit et une restauration des images en forme et en intensité. En particulier, l'accent a été mis sur l'automatisation des procédures de traitement numérique, en vue de faciliter leur adoption par des non-spécialistes.

La microscopie de fluorescence telle qu'elle est utilisée actuellement souffre principalement d'un manque de résolution, surtout quand on la compare à d'autres techniques, comme la microscopie électronique, ou les techniques de microscopie en champ proche.

Ce constat a motivé et motive encore les travaux de plusieurs équipes à travers le monde, qui visent à améliorer la résolution de l'instrument, accroître sa vitesse d'acquisition, ou encore étendre son champ d'investigation à de grands spécimens (plusieurs mm³). Au vu des trois premiers chapitres, on comprend aisément que ces recherches sont nécessairement pluri-disciplinaires.

La technique du balayage pour produire une image montre que la limite de résolution n'est pas imposée par le système de détection, mais par le plus petit volume dans lequel on produit l'émission lumineuse. On s'intéressera donc en premier lieu à la physique du rayonnement, pour «déconvrir» et utiliser de nouvelles méthodes de production de la lumière dans l'échantillon.

Il est très important, comme on l'a vu au Chapitre II, d'adapter l'instrument au besoin de l'observation, ce qui passe par la définition de nouvelles techniques de microscopie, mais aussi de parfaitement maîtriser les conditions expérimentales d'acquisition des images.

Enfin, lorsque l'image est acquise, et si l'on a une connaissance suffisante du système de formation des images, les techniques de traitement du signal et de l'image et l'informatique permettent d'encore améliorer la qualité des données.

Ce constat est résumé sur la Figure 4.1, qui illustre le caractère nécessairement pluridisciplinaire des recherches dans ce domaine.

Il est à noter la faiblesse des équipes françaises dans ce domaine de l'imagerie microscopique, puisque très peu de développements instrumentaux sont effectués dans notre pays. Cette faiblesse s'explique sans doute en partie par l'absence de constructeur national, par rapport à l'Allemagne, le Japon ou les Etats-Unis, mais cette déficience s'appliquerait alors aussi au Royaume-Uni, qui possède cependant plusieurs équipes très actives dans le domaine.

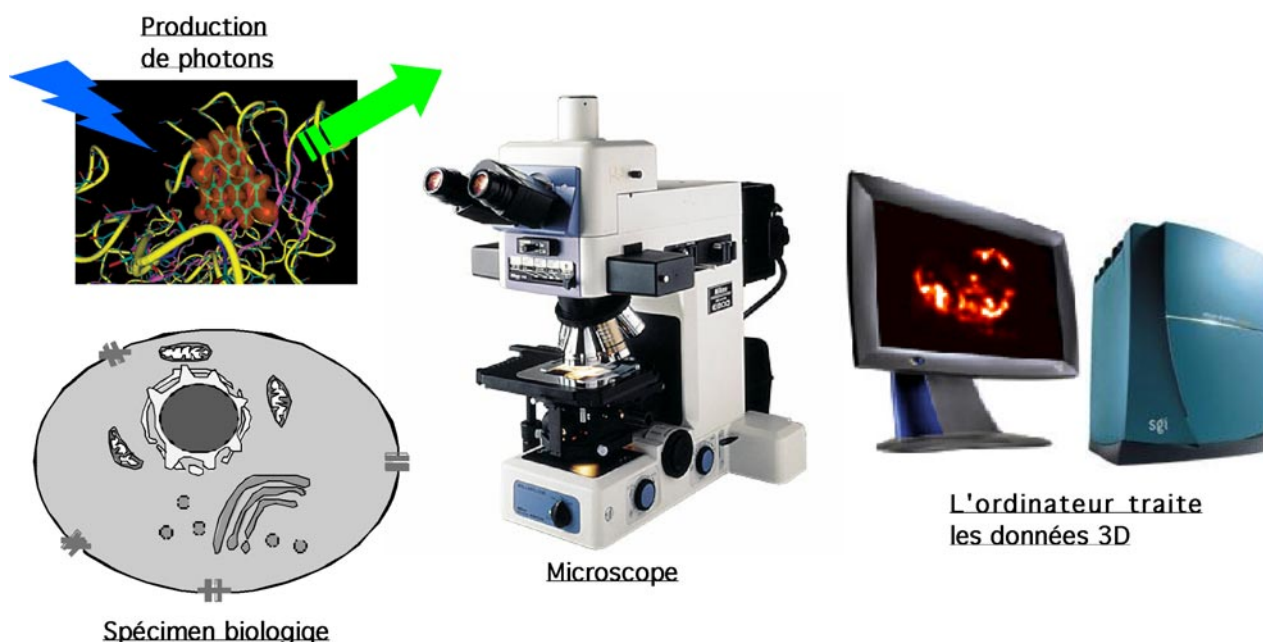


FIGURE 4.1. Améliorer les images en microscopie de fluorescence fait appel à de nombreuses disciplines : physique photonique, instrumentation optique, traitement du signal et de l'image.

4.2 Production des photons

Les développements actuels les plus prometteurs en terme d'amélioration de la résolution ont été obtenus par Stefan Hell et son équipe du Max Planck Institut de Göttingen (Allemagne), par la mise en œuvre du microscope 4Pi (décrit au Chapitre II) et du microscope à émission stimulée STED.

L'idée consiste à utiliser les propriétés du phénomène de fluorescence pour diminuer la zone de production de lumière. La description détaillée des phénomènes mis en jeu dépasse le cadre de cet exposé, mais on peut néanmoins en donner les grandes lignes (voir Figure 4.2) :

Lorsqu'un fluorophore est illuminé, et passe de son état de repos à un état excité, il passe aussi par une transition non radiative de l'état S_1 à l'état S . L'ensemble du spot d'excitation dans un microscope confocal suit ce schéma.

On dispose néanmoins d'un court laps de temps (de l'ordre de la ps) pour provoquer une émission stimulée à une longueur d'onde choisie, différente de la longueur d'onde utilisée pour l'observation de la fluorescence.

L'idée consiste alors à provoquer cette émission stimulée sur la périphérie du spot d'excitation confocal, à l'aide d'un spot STED «creux». La zone qui va donc émettre la fluorescence spontanée est alors beaucoup plus réduite, et la résolution finale grandement améliorée.

Cette technique a permis une amélioration très notable de la résolution. En 3D, une résolution de l'ordre de 100 nm dans des spécimens biologiques a ainsi déjà été démontrée. Pour des molécules déposées en surface, une résolution de l'ordre de 30 nm en x-y a été atteinte. Enfin, en combinant microscopies 4Pi et STED, une résolution de l'ordre de 30 nm le long de l'axe optique a été obtenue sur des membranes cellulaires.

Cette technique est donc extrêmement prometteuse, d'autant plus que le microscope STED n'est rien d'autre qu'un microscope confocal modifié. Même dans sa version 4Pi, il se base sur un instrument qui est désormais disponible commercialement.

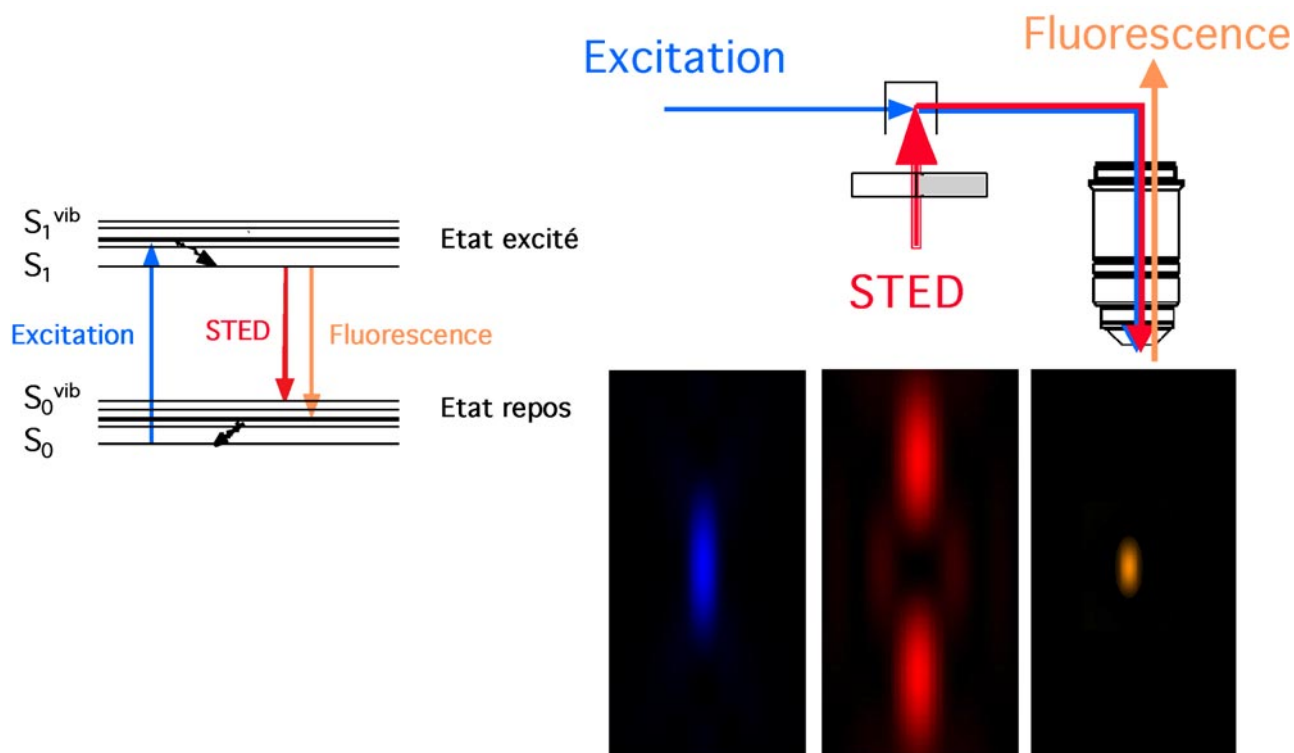


FIGURE 4.2. Schéma de principe du microscope STED.

On peut cependant émettre un certain nombre de réserves vis-à-vis d'une adoption rapide cet instrument :

- L'instrumentation nécessaire, femto/picoseconde est fragile et délicate à mettre en œuvre
- Les fluorophores adaptés permettant cette technique sont encore très limités.
- Le coût de cette technique est donc encore très élevé.
- Enfin, par définition, cette technique ne s'applique qu'à la microscopie de fluorescence, et ne peut donc rien apporter à d'autres techniques comme la microscopie en transmission ou en réflexion, très utilisées dans d'autres domaines.

J'ai déjà proposé (O. Haeberlé "Kindling molecules: a new way to break the Abbe limit" C. R. Physique 5, p. 143 (2004)) l'utilisation des nouvelles familles de molécules photoactivables pour remplacer les fluorophores utilisés en microscopie STED. Ces nouvelles molécules présentent la particularité d'avoir deux états de repos, l'un susceptible de donner lieu à une fluorescence, l'autre non. On peut alors directement transposer les schéma de la microscopie STED à ces nouvelles molécules, mais en gagnant sur deux points essentiels :

Les états à fluorescence permise et interdite sont stables, contrairement aux états excités en microscopie STED. Il n'est donc plus nécessaire d'avoir recours à une instrumentation rapide, donc chère.

Ces molécules sont dérivées de fluorophores organiques, tels que la Green Fluorescent Protein (GFP), ou la Kindling Fluorescent Protein (KFP1). Ces molécules sont biologiquement compatibles, et l'ingénierie moléculaire permettra sans aucun doute (comme cela a déjà été le cas pour la GFP) d'ajuster les propriétés de ces fluorophores aux besoins des expériences biologiques.

D'autres schémas visant à améliorer la résolution en microscopie de fluorescence ont aussi été proposés. On peut par exemple penser à la microscopie Ground State Depletion, qui est une variante de la microscopie STED.

La microscopie par saturation de fluorescence est un autre exemple de microscopie non-linéaire permettant d'améliorer la résolution de façon notable.

L'utilisation de molécules photoactivables permet d'envisager une microscopie confocale à trois étapes, activation du fluorophore, excitation, émission de la fluorescence, qui dans un montage confocal permettraient aussi d'améliorer la résolution. En effet, si la Réponse Impulsionnelle Optique d'un microscope confocal est en première approximation celle d'un microscope conventionnel élevée au carré, l'utilisation de molécules photoactivables conduit à 3 RIO successives que l'on multiplie entre elles, ce qui donnerait en première approximation une RIO élevée au cube, et donc une résolution encore meilleure.

Notons enfin que l'utilisation des molécules photoactivables reste compatible avec la technique STED, ces deux étapes étant dissociées dans les processus d'activation et d'excitation.

Les connaissances en physique «de base» que j'ai pu acquérir lors de mon travail de thèse, de mes différents post-docs et durant mon séjour au MIPS m'encouragent donc à poursuivre ces études, d'un point de vue théorique au moins, pour proposer de nouveaux schémas de microscopie de fluorescence.

4.3 Instrumentation

Comme nous l'avons vu au Chapitre II, l'instrumentation optique reste un facteur clé dans l'obtention de bons résultats.

Les modèles de formation d'image actuels sont suffisamment précis pour décrire les microscopes de fluorescence classiques, confocaux et multiphotons. On peut aussi décrire correctement le modèle de formation d'image en microscopie de fluorescence polarisée, un domaine en émergence, car jusqu'à présent, seules l'intensité et la durée de vie de la fluorescence (Fluorescence Life Time Imaging) ont été beaucoup étudiées.

L'imagerie de polarimétrie est un domaine actuellement en plein essor, et il ne fait guère de doute que d'ici peu, l'imagerie de fluorescence polarisée apparaîtra comme un moyen d'accéder à d'autres informations dans les spécimens biologiques. Les modèles développés au Chapitre II seront alors d'une grande utilité.

Ces modèles souffrent cependant encore d'une limitation fondamentale. Ils supposent (comme tous les modèles de formation d'image actuellement disponibles) que le spécimen observé est homogène optiquement.

Cette hypothèse simplificatrice ne résiste en fait pas à une analyse un peu plus poussée. Si l'on suppose le spécimen homogène optiquement, il n'est alors pas possible de l'observer dans un microscope en transmission (classique ou même à contraste de phase ou contraste de phase différentiel). Mais si l'on suppose le spécimen inhomogène, alors les modèles de formation d'image en microscopie de fluorescence sont incorrects, et l'image que l'on enregistre est donc forcément une version déformée de la réalité, un peu comme lorsqu'on observe à travers une vitre déformante.

Ces limitations ont été mises en évidence par plusieurs auteurs. Une illustration très convaincante en est donnée par la Figure 4.3 extraite de « Limitations on Optical Sectioning in Live-Cell Confocal Microscopy » de J. B. Pawley, *Scanning* 24, 241 (2002).

Cette image montre un spécimen pris en sandwich entre une lamelle et une lame et observé avec un microscope confocal. Le spécimen n'est pas marqué, et on observe la lumière rétrodiffusée. Les transitions brusques d'indice sont donc nettement visibles, comme la transition lamelle ($n=1.525$) spécimen ($n\approx 1.33$) et la transition spécimen ($n\approx 1.33$) lame ($n=1.525$).

On voit nettement sur cette image que l'image de la lamelle est conforme (on obtient bien un plan), alors que l'image de la surface de la lame est fortement déformée par les cellules placées entre lame et lamelle. C'est essentiellement un effet dû aux variations d'indices optiques dans le milieu.

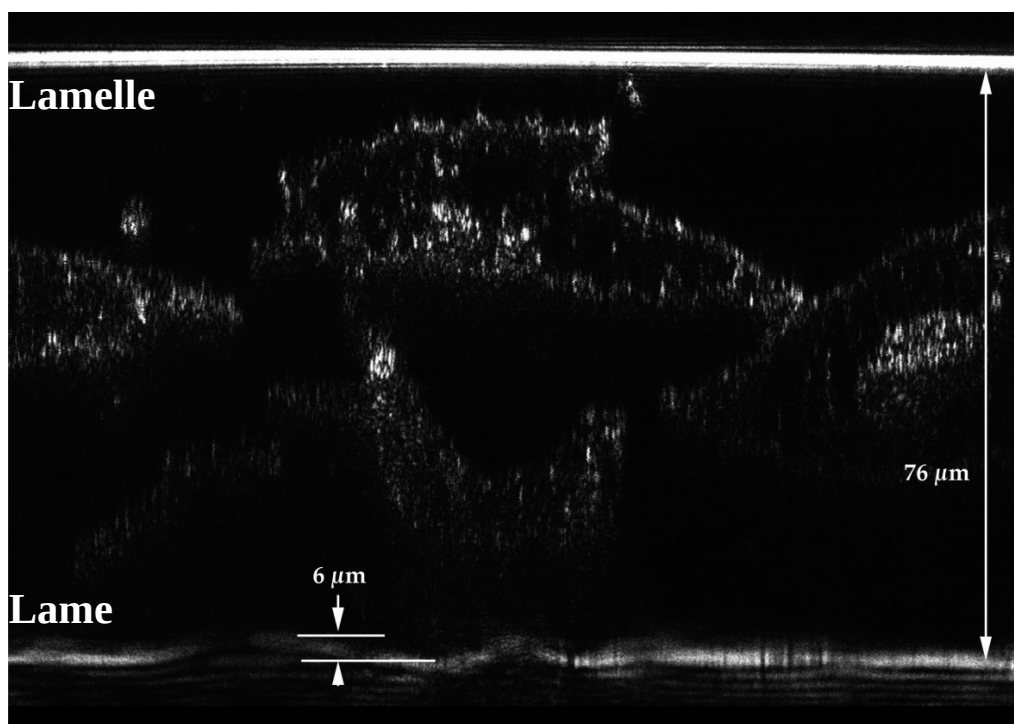


FIGURE 4.3. Illustration de l'influence du spécimen (généralement supposé uniforme) sur le process de formation des images. : la lame est vue déformée à cause des inhomogénéités optiques du spécimen. Image extraite de J. B. Pawley, *Scanning* 24, 241 (2002)

Pour corriger les images, on peut envisager deux voies.

La première est inspirée des résultats obtenus en astronomie, où le développement de l'optique adaptative a permis de s'affranchir des problèmes de turbulence qui dégradaient les images. En microscopie, le problème est différent. Il est grandement simplifié par le fait que le système considéré est statique ou quasi-statique par rapport aux temps de pose nécessaires à l'acquisition d'une image, contrairement au problème de la turbulence. Il n'est donc pas nécessaire de corriger les distorsions plusieurs dizaines de fois par seconde.

En astronomie, on se sert d'une étoile de référence pour mesurer la turbulence. A défaut, il est possible de créer dans la haute atmosphère une étoile artificielle de référence par excitation laser dans la raie de sodium généralement.

En microscopie, deux problèmes se posent. Tout d'abord, on ne dispose pas de source de référence dont on sait qu'elle est ponctuelle. Enfin, lors de la création du signal lumineux dans un microscope confocal par exemple, le faisceaux d'éclairage et le lumière de fluorescence subissent les aberrations lors de l'aller retour à travers le spécimen. Des résultats encourageant ont néanmoins déjà été obtenus.

Une autre approche possible est de faire une correction numérique des données. Pour cela, il faut disposer d'une distribution des Réponses Impulsionelles Optiques dans le spécimen. Il paraît extrêmement difficile de mesurer directement cette distribution à travers le spécimen (certaines pistes existent cependant).

Par contre, on peut envisager de calculer, en étendant les modèles développés au Chapitre II, la réponse impulsionelle optique dans un milieu inhomogène. Pour cela, il faut donc être capable de mesurer la distribution des indices optiques dans le spécimen. A l'aide de cette distribution, on peut alors espérer corriger la distribution des intensités.

La microscopie tomographique optique est une des techniques permettant de mesurer une distribution d'indices dans un spécimen transparent ou quasi-transparent. Vincent Lauer (Lauer Microscopie – Besançon) en a posé les principes et a développé un prototype d'un tel microscope :

Vincent Lauer, J. Microscopy **205**, p. 165-176 (2000)

Il apparaît ainsi possible de mesurer in-situ la distribution des indices optiques d'un milieu par la mesure de la phase et de l'amplitude d'une onde traversant ce milieu. La résolution obtenue, dans cette version du prototype (en transmission uniquement), est celle d'un microscope optique classique. Potentiellement, on peut faire bien mieux (imagerie en transmission ET réflexion).

Nous nous proposons donc de monter un microscope tomographique non plus sur un banc optique comme le prototype de Vincent Lauer, mais sur un bâti de microscope de fluorescence. Nous entendons ainsi bénéficier de la qualité optique et mécanique du support.

De plus, cette adaptation doit permettre à terme de se servir du même bâti pour faire l'acquisition d'une image de fluorescence ET d'une image tomographique du même spécimen pour effectuer les corrections optiques et la déconvolution.

Ce travail est déjà entamé, et fait l'objet d'une thèse (Bertrand Simon) que j'encadre.

4.4 Modèles de formation des images

Un travail théorique et numérique important est donc à effectuer en parallèle au travail expérimental visant à mesurer la distribution d'indice optique dans un spécimen biologique.

Il consistera à étendre les modèles vectoriels diffractifs de formation des images dans un microscope, pour lesquels on suppose actuellement le spécimen comme homogène, à une distribution quelconque d'indices.

Pour cela, il convient de modéliser la cellule et ses principales structures d'un point de vue optique. Il est déjà acquis que les différents constituants de la cellule ont des indices optiques différents, qui ont été mesurés. Ainsi, la membrane est constituée d'une bicouche lipidique, d'indice 1.48, le milieu intracellulaire a un indice proche de l'eau 1.33, alors que le noyau essentiellement constitué de protéines a un indice plus élevé, de l'ordre de 1.54.

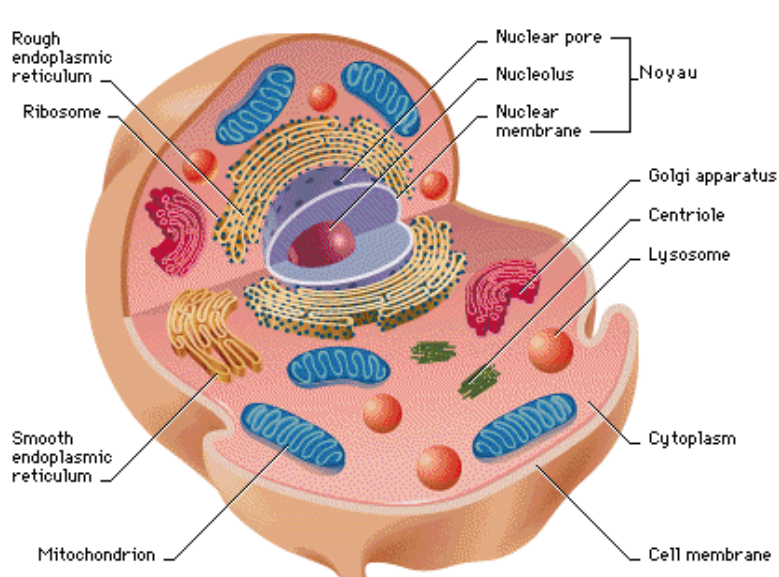


FIGURE 4.4. Coupe d'une cellule animale

La Figure 4.4 montre une cellule animale typique. Il est clair qu'un tel spécimen ou un tissu cellulaire ne peut pas être considéré comme homogène optiquement. Ceci est d'autant plus vrai que la résolution augmente. Ainsi, une zone qui pourrait être considérée comme homogène à l'échelle d'un microscope classique, dans un ellipsoïde d'environ 200 nm par 600 nm devra être considérée tout à fait différemment si cette même zone est imagée à l'aide d'un microscope 4Pi-STED dont on attend une résolution isotrope d'environ 50 nm.

Nous avons déjà étendu les modèles de formation d'image au cas d'un milieu stratifié à n -couches, ce qui permet de modéliser l'observation d'un spécimen qui est lui-même stratifié. On peut par exemple en première approximation considérer qu'une cellule unique, prise en sandwich entre lame et lamelle constitue un milieu stratifié (voir Figure 4.5).

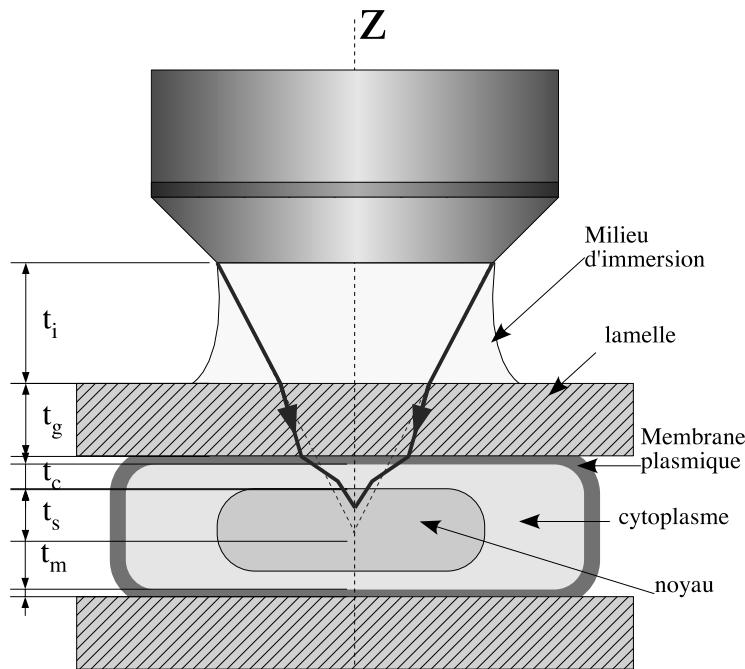


FIGURE 4.5. Exemple de spécimen stratifié

De même le cas de la focalisation à travers une interface courbe a déjà été traité, qui décrirait par exemple la focalisation dans un noyau cellulaire considéré comme sphérique.

Les cas les plus généraux ne peuvent pas se traiter de manière analytique ou semi-analytique. Il convient alors d'utiliser des modèles numériques tels que les approches de Beam Propagation Method, ou la résolution directe du problème électromagnétique à l'aide de méthodes par éléments finis ou différences finies.

Ceci constitue un travail considérable, mais pour lequel plusieurs pistes ont été défrichées. Plusieurs groupes dans le monde travaillent actuellement sur ce sujet (Imperial College, Heidelberg), tout simplement car les performances actuelles des microscopes modernes mettent en évidence les limites des modèles de formation d'image utilisés.

Ceci est vrai en terme de très haute résolution comme pour la microscopie 4Pi ou la microscopie STED, mais est aussi vrai si l'on considère un microscope classique imageant à travers un «grand» spécimen. Ce problème est en effet lié au rapport résolution / taille du spécimen traversé plutôt qu'à la résolution elle-même.

La Figure 4.6 illustre les phénomènes observés lors de l'acquisition du système nerveux de la tête d'une larve de poisson en microscopie θ à champ large (Heidelberg), le spécimen faisant moins de 1 mm^3 . On observe un regain d'intensité de fluorescence dans la zone indiquée par la flèche. Il s'agit tout simplement du cristallin de l'œil qui refocalise la lumière d'excitation, provoquant une hausse de la fluorescence. Il est donc clair que le spécimen n'est pas homogène optiquement, et que l'image 3D des zones nerveuses enregistrées est donc probablement déformée.

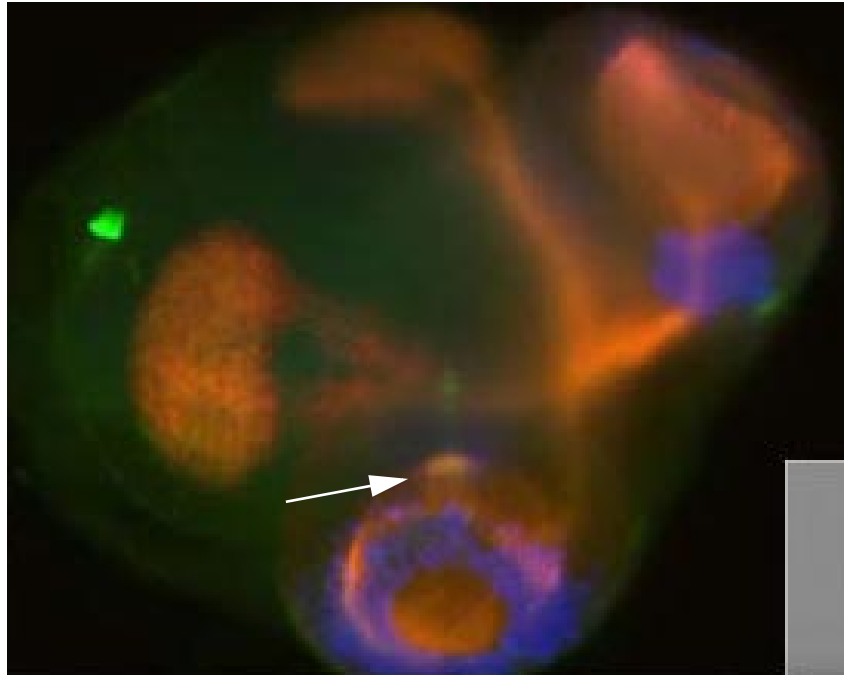


FIGURE 4.6. exemple de «grand» spécimen de fluorescence inhomogène optiquement.

4.5 Traitement de l'image

On peut grandement améliorer la résolution des images par une déconvolution utilisant la fonction de transfert du microscope. Les algorithmes de déconvolution souffrent de certaines limites : sensibilité au bruit, instabilité, fiabilité de reconstruction.

Le Label a proposé un certain nombre d'améliorations visant à palier à ces problèmes : automatisation de la régularisation des systèmes matriciels à traiter pour améliorer la qualité des résultats, préfiltrage des données pour stabiliser la solution vis-à-vis du bruit.

Un problème spécifique vient du fait que les algorithmes de déconvolution couramment utilisés supposent l'invariance spatiale de la réponse impulsionnelle optique. Celle-ci peut cependant en réalité varier, par exemple avec la profondeur du spécimen lorsqu'il y a un désaccord entre les indices optiques du milieu d'immersion et du spécimen (à cause de l'influence de l'aberration sphérique, qui augmente avec la profondeur d'observation).

La Figure 4.7 illustre ce problème, dans le cas d'un objectif à immersion à huile imageant un spécimen aqueux. La simulation montre l'image simulée de 4 billes fluorescente de $1.6\ \mu\text{m}$ de diamètre, situées à des profondeurs croissantes avec un microscope confocal. On voit nettement sur l'image de gauche la dégradation croissante de l'image en fonction de la profondeur. Avec une déconvolution classique, on est obligé de choisir une RIO unique décrivant les propriétés optiques du microscope. Si l'on déconvolue cette image avec une RIO calculée à profondeur $0\ \mu\text{m}$, $3.2\ \mu\text{m}$ et $6.4\ \mu\text{m}$ (trois images de droite), on constate deux phénomènes.

Tout d'abord, aucune RIO n'est capable de reconstruire correctement les objets de départ, qui sont censés être identiques. On obtient en fait trois images différentes.

Plus grave encore, les billes ne sont pas reconstruite à leur position correcte dans les trois images (erreur absolue), mais même leurs positions relatives sont fausses, l'écart entre les 4 centroïdes n'étant pas le même dans les trois images.

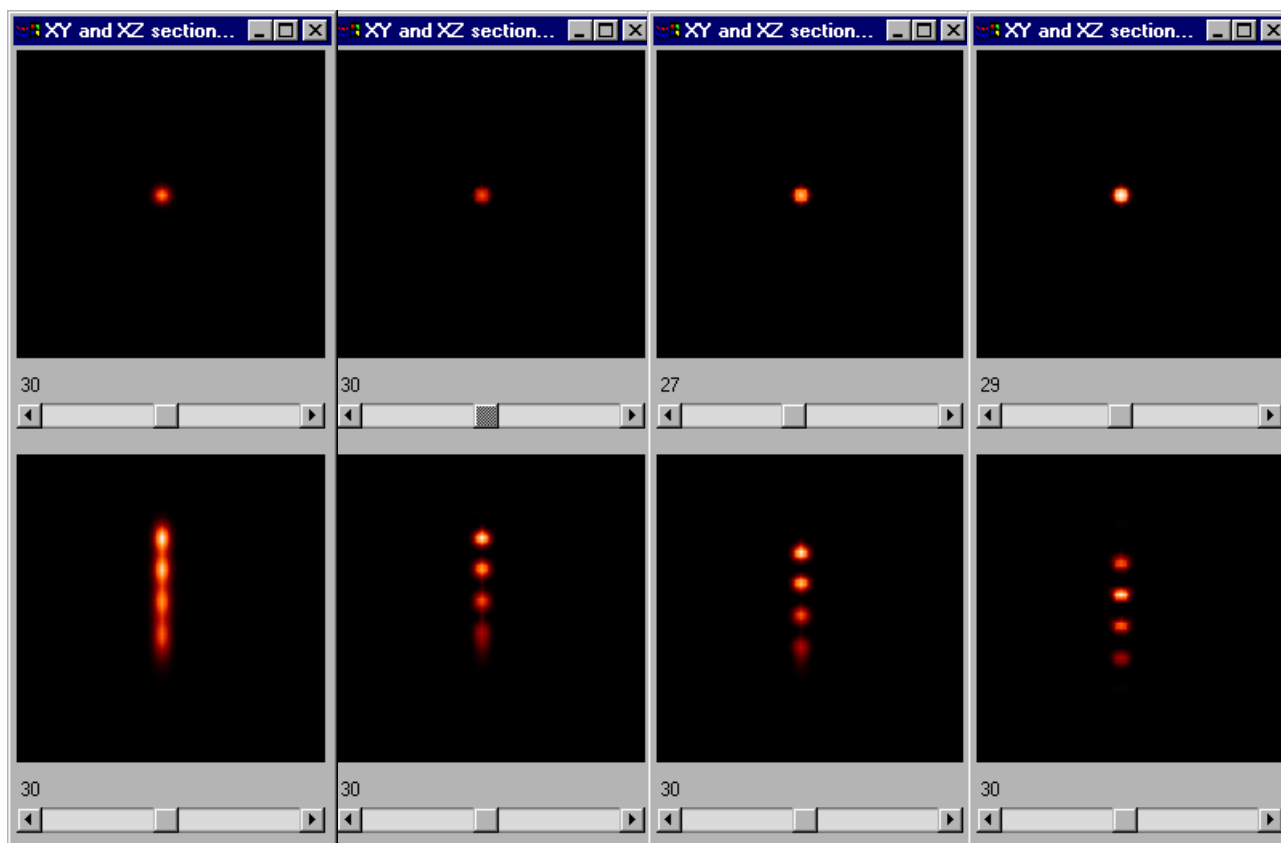


FIGURE 4.7. Pile de billes de $1.6\ \mu\text{m}$ de diamètres (a) convoluée en tenant compte de la variation en z de la RIO, (b) déconvoluée avec une RIO calculée à profondeur nulle, (c) à profondeur $3.2\ \mu\text{m}$ et (d) à profondeur $6.4\ \mu\text{m}$ (voir Paragraphe 3.3.2).

Un traitement des données pour restaurer cette image devrait tenir compte du milieu traversé, de façon à ajuster la RIO utilisée en fonction de la position dans l'image.

Une réponse à ce problème a été apportée par la mise en œuvre d'un algorithme de déconvolution basé sur la méthode Monte-Carlo (thèse de Bruno Colicchio). On a ainsi résolu le problème de la non-invariance de la RIO selon la profondeur.

L'idée est de simuler numériquement le processus de formation des images, en construisant directement l'objet, qui sera convolué avec la distribution de RIO, pour reconstituer l'image. C'est donc une méthode fondamentalement différente dans sa philosophie des méthodes d'inversion généralement utilisées, qui partent de l'image enregistrée pour reconstituer l'objet inconnu.

Notons cependant que cette méthode pourrait traiter le cas d'une non-invariance en 3D, si l'on connaît la distribution des RIO, ce qui est justement le but des travaux suggérés dans les deux parties précédentes, sur la modélisation du processus de formation des images dans des milieux hétérogènes, et la mesure de la distribution des indices optiques dans le spécimen.

Avec l'acquisition d'images à une résolution de plus en plus petite (microscopie 4Pi, STED), se posera aussi le problème du rapport signal/bruit qui ira en diminuant.

Un important travail pour améliorer la vitesse de traitement des images, diminuer la sensibilité des algorithmes de déconvolution au bruit et aux conditions initiales reste donc aussi à envisager. Enfin, de nouvelles méthodes de déconvolution, pas encore utilisées en imagerie de fluorescence 3D devraient être étudiées. On peut par exemple penser aux méthodes de recuit simulé, qui permette d'éviter les problèmes de minimums locaux.

4.6 Extensions possibles de ces travaux

Les travaux proposés ont bien entendu pour but d'améliorer l'acquisition des données en microscopie de fluorescence, de simplifier les post-traitements mathématiques, pour faciliter les mesures et interprétations faites sur des spécimens biologiques.

Il est cependant important de noter que ces travaux peuvent intéresser d'autres communautés, au delà des spécialistes de biologie, de traitement de signal ou de l'image, ou d'instrumentation biologique.

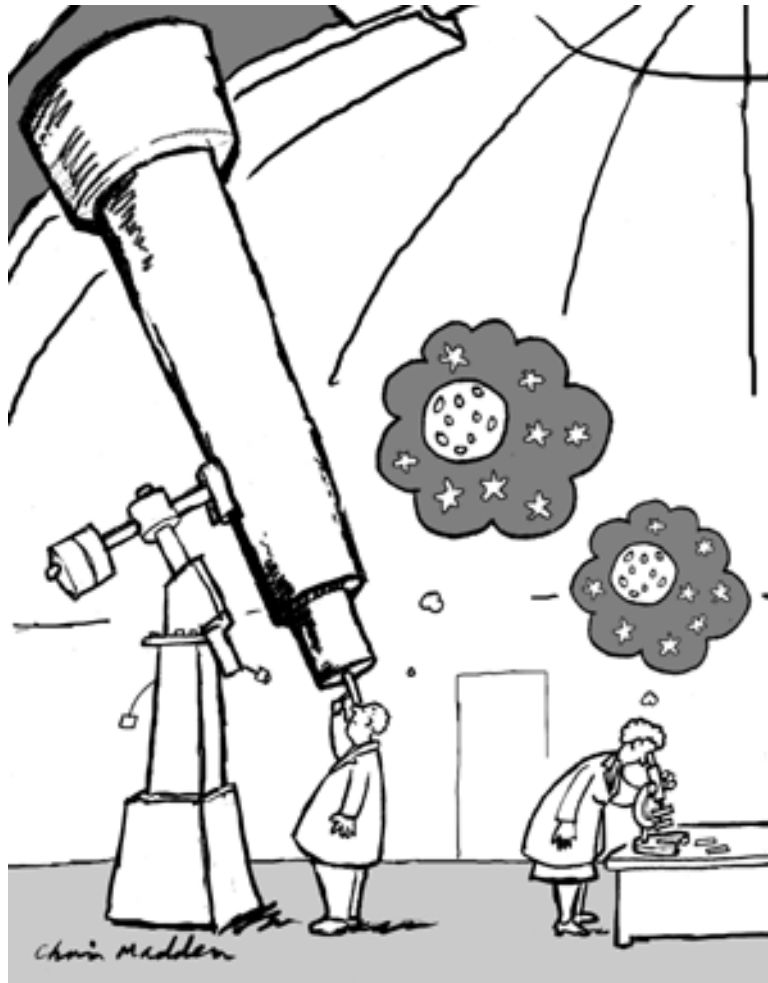
Ainsi, les nouvelles sources de rayonnement peuvent avoir des débouchés en microscopie de surface et interface, pour la physique du solide, ou le contrôle qualité par exemple. Les échantillons non-biologiques supportent en effet des types de rayonnement et des traitements incompatibles avec le vivant. C'est par exemple le cas pour le microscope à rayonnement de transition décrit dans le Chapitre I. La mécanique quantique, à travers les nouvelles sources de photons jumeaux qui apparaissent maintenant, laisse aussi entrevoir la possibilité d'utiliser des effets physiques nouveaux pour diminuer la résolution.

D'un point de vue instrumentation, si l'on arrive à diminuer la taille de la RIO d'illumination, par exemple par des techniques d'apodisation, toutes les techniques de microscopie optique en champ lointain en bénéficieront. Un débouché possible est par exemple le contrôle qualité en microélectronique. Les circuits intégrés présentent en effet des structures prévisibles, de type fils ou interconnexion, qui sont précisément orientés dans l'espace. Un axe de recherche est par exemple d'adapter la forme de la RIO aux caractéristiques des objets observés, un point qui a été négligé jusqu'à présent. Un autre domaine d'application potentiel est celui du stockage optique des données.

Les techniques de déconvolution adaptatives peuvent s'appliquer à tous les domaines de l'imagerie. On peut citer en particulier la télédétection spatiale, ou l'astronomie. Les instruments utilisés fournissent en effet aussi des images souffrant de déformation (astigmatisme, aberration de sphéricité, courbure de champ etc..) qui ne sont pas homogènes dans le champ d'observation.

Enfin, il serait prétentieux de croire que les travaux proposés dans ce document iront «naturellement» essaimer dans d'autres disciplines. Il est évident que la nature pluridisciplinaire des ces travaux impliquent aussi d'aller chercher dans ces autres disciplines (physique des sources lumineuses, informatique, traitement du signal et de l'image, astronomie etc...) les idées qui permettront d'améliorer les travaux réalisés en imagerie de fluorescence.

Les progrès en sciences résultent le plus souvent de fertilisations croisées, à partir de résultats obtenus dans des disciplines qui souvent s'ignorent alors qu'elles ont en réalité de nombreux points communs, un constat qui est probablement bien illustré par l'image suivante...



“Inner and Outer Space” Chris Madden (illustrateur au “The Guardian”)

CONCLUSION

“Qui ne bouge n’apprend rien. Aucun n’apprentissage n’évite le voyage”

Michel Serres, “Le Tiers-Instruit”

“Heureux qui comme Ulysse, a fait un long voyage”

Homère, “L’Odyssée”



Salvador Dalí “Disparition du buste de Voltaire”

Dans un célèbre article paru dans la revue Nature [1][2], le géophysicien Roel Snieder déplore la quasi-extinction d'Homo Universalis, comparant la communauté des chercheurs à une colonie de vers-tubes. "Ces animaux vivent en colonies sur le fond océanique là où les sources hydrothermales relâchent des nutriments. Les vers-tubes sont hautement spécialisés. Ils ne survivent qu'en extrayant des nutriments près de ces sources. Ils ne peuvent se déplacer vers d'autres sources, ce qui interdit les croisements entre colonies."

On pourrait rajouter que si la source hydrothermale se tarrit, la colonie de vers-tubes meurt.... Au moins les vers-tubes ont-ils un point fixe. Le chercheur débutant se rapproche bien plus souvent de la méduse, ballotée par les courants et priant pour ne pas s'échouer sur une plage déserte...

Une attitude répandue est aussi celle du rémorat, qui vit accroché à son hôte, le plus souvent un grand requin. La situation est confortable, le rémorat se nourrissant des miettes des repas du prédateur, qui le nourrit tout en le faisant voyager. Mais le rémorat lui aussi peut mourir si son hôte vient à disparaître...

On rencontre aussi dans le bestiaire de la recherche la lamproie, sorte de vampire aquatique qui s'attaque aux poissons de passage sur ce qu'elle considère comme son territoire. Tout l'art de vivre de ce poisson consiste à sucer sang et chair de sa victime, mais sans la tuer cependant, le poisson pouvant repasser par là, assurant alors un nouveau repas sans effort...

On pourrait encore souvent comparer la communauté des chercheurs à un banc de petits poissons, du genre de la sardine. Isolée, elle est insignifiante, le nombre seul lui permet une défense contre les prédateurs. Encore qu'un banc complet peut être décimé et réduit à quelques survivants, et que même dans le cas contraire, la confrontation fait des victimes, pour lesquelles la communauté n'exprime guère de regrets, tandis que l'individu survivant continue de vivre dans l'illusion d'appartenir à un méta-organisme puissant...

Dans un monde de plus en plus complexe, où les sciences et techniques jouent un rôle de plus en plus important, et alors même que ce rôle est masqué, voire nié par des sociétés où l'individualisme prime et le confort personnel passe avant le progrès commun, il serait pourtant d'autant plus du devoir de la communauté scientifique de se faire connaître et de faire connaître et reconnaître sa contribution.

Les affaires du sang-contaminé, de la vache folle, des OGM, le débat sur le nucléaire et les énergies renouvelables, le développement durable sont autant d'exemples où l'on a voulu et où on veut encore mettre en avant des fiascos scientifiques, peut-être réels, mais tellement commodes pour masquer d'autres causes d'échecs. Bien au contraire, c'est la confiscation ou la négation de certains travaux de recherche, à des fins partisans, par des lobbys socio-économiques ou politiques qui ont "permis" ces dérives. La voix des scientifiques à même d'apporter une contribution saine au débat est malheureusement souvent absente, et toujours trop discrète.

Il faut bien reconnaître que le morcellement de la communauté scientifique française, encouragé par un monde politique qui a bien assimilé l'adage «diviser pour mieux régner» et par les scientifiques eux-mêmes, si souvent tellement sûrs de leur bon droit, isolés dans leur monde de certitude, ne facilite pas les choses.

Quel peut alors être le rôle de l'université en France, seul pays industrialisé où le mot université ne constitue pas la référence de qualité, puisqu'il est «bien connu» que l'enseignement de haut niveau y est l'apanage des grandes écoles, et que la recherche de qualité s'y fait dans une plétore d'organismes divers et variés..?

Il serait prétentieux de ma part de prétendre donner LA réponse, tout au plus exprimerais-je mon opinion : à l'aube du XXI^{ème} siècle, l'université française, après avoir malgré tout, et en particulier malgré de faibles moyens, relativement réussi la massification des études supérieures, doit maintenant s'attacher à améliorer son attractivité, en rehaussant son niveau et donc son prestige, et ce à tous les niveaux, du premier cycle au doctorat et tant du point de vue de l'enseignement que de la recherche. Je souhaite y apporter ma modeste contribution, j'espère en avoir les moyens dans le futur...

[1] Roel Snieder, Millennium Essay, Nature **406**, 939 (31 Aug 2000)

[2] John D. Rummel, Correspondence, Nature **407**, 671 (12 Oct 2000)

REMERCIEMENTS

« Ne m'interrompez pas pendant que j'interromps »

Winston S. Churchill



M. C. Escher “De plus en plus petit”

Il est de tradition de consacrer une page aux remerciements...

C'est donc avec plaisir que je dédie ces quelques lignes à tous ceux et toutes celles qui m'ont aidé dans mon travail, directement ou indirectement, par leur soutien direct et indirect, par leur aide ou leurs conseils, voire par un simple sourire ou par leur seule présence parfois.

La liste est bien trop longue pour ne pas en oublier si j'entreprenais de l'écrire, exercice dans lequel je ne me lancerai donc pas. Mais je sais que vous vous reconnaitrez, et je vous adresse donc maintenant mes remerciements les plus sincères à vous, famille, amis et collègues qui avez permis l'aboutissement de ce travail.
