



HAL
open science

Microscopie tomographique diffractive en transmission et réflexion.

Matthieu Debailleul

► **To cite this version:**

Matthieu Debailleul. Microscopie tomographique diffractive en transmission et réflexion.. Physique [physics]. Université de Haute-Alsace, 2024. <tel-04948025>

HAL Id: tel-04948025

<https://hal.science/tel-04948025v1>

Submitted on 14 Feb 2025

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons CC BY-SA 4.0 - Attribution - ShareAlike - International License

UNIVERSITÉ DE HAUTE-ALSACE

HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES

**Microscopie tomographique diffractive en transmission et
réflexion**

Imagerie quantitative 3D sans marquage et topographie de surfaces

présenté dans le cadre de l'obtention de l'HDR

par

Matthieu Debailleul

le 17 Juin 2024

Jury

M. Hugues Giovannini,	Professeur, Université Aix-Marseille	Rapporteur
Mme Sandrine Lévêque-Fort,	Directrice de recherche, CNRS	Rapporteur
M. Pascal Picart,	Professeur, Le Mans université	Rapporteur
M. Laurent Héliot,	Ingénieur de recherche, CNRS	Examineur
M. Sylvain Lecler,	Professeur, Université Louis Pasteur-Strasbourg 1	Examineur
M. Denis Lebrun,	Professeur, Université de Rouen	Examineur
M. Olivier Haerberlé,	Professeur, Université de Haute-Alsace	Garant

Résumé

Les techniques de microscopie ont connu des avancées considérables ces dernières années. En imagerie de fluorescence, les microscopies dites super-résolues ont transformé la recherche, notamment en biologie en permettant d'observer des détails bien en dessous de la limite de diffraction. Les différentes microscopies sans marquage se présentent comme des alternatives ou des modes d'imagerie complémentaires à l'imagerie de fluorescence, lorsque le marquage est impossible ou pose problème (phototoxicité, photoblanchiment . . .). Parmi ces modalités sans marquage, l'imagerie de phase a également connu un développement important ces dernières années, grâce aux progrès numériques permettant d'améliorer ou faciliter à la fois l'acquisition et la reconstruction des images. Dans ce cadre, la microscopie tomographique diffractive, qui est une extension de l'imagerie holographique, permet d'accéder à une imagerie 3D quantitative sans marquage. Ce document détaille les travaux expérimentaux et théoriques/numériques menés à l'IRIMAS sur ces sujets, centrés sur le cheminement que j'ai mené sur ces sujets, et les possibles évolutions à court et moyen terme.

Préambule

Voilà un document qui arrive sans doute un peu tardivement dans la chronologie des travaux menés dans notre équipe à l'IRIMAS/MIPS. Il faut dire que sa rédaction a longtemps été inenvisagée : l'exercice de synthèse est intéressant, mais certaines responsabilités - notamment depuis la LRU - liées à la direction de recherches peuvent vite tourner aux sévices administratifs et autres tracas qui vous éloignent paradoxalement du laboratoire... À force de tourner autour de l'idée et inversement, la solution aura finalement été de rédiger le document pour s'en libérer et accepter le possible totem qui vient avec !

Étant donné la période couverte, j'avais promis d'éviter l'extraction archéologique et de produire un document synthétique. Une partie de l'effort aura été constituée par les nombreuses passes itératives visant à réduire les premières versions du document, j'espère sans le rendre trop cryptique. De nombreux documents techniques et autres détails sont cependant trouvables sur le [dépôt github](#) de l'équipe et les liens associés parsèment ce document. Ils fournissent - du moins je l'espère - les informations parfois manquantes qui permettent de reproduire les résultats, le code, les systèmes expérimentaux, etc. décrits dans ce manuscrit.

Remerciements

Voici venu l'exercice des remerciements. Il me faut d'abord remercier les rapporteurs et examinateurs, qui malgré des emplois du temps chargés (voir le préambule) ont accepté de relire ce manuscrit : Hugues Giovannini, Sandrine Levêque-Fort et Pascal Picart qui ont rapporté ce travail, ainsi que Laurent Héliot, Denis Lebrun et Sylvain Lecler qui ont accepté d'être examinateur. Souvent croisés - sans doute trop rapidement - dans les conférences, écoles d'été, GDR et autres réseaux techniques, ce document est aussi l'occasion d'échanger de façon un peu plus approfondie.

La suite de l'exercice est rendue un peu complexe par le nombre d'années que couvre ce document, mais aussi la bienveillance rencontrée parmi les collègues, ce qui n'est pas une évidence statistique quand on connaît l'écosystème «recherche» et ses espèces endémiques à l'ego parfois un peu mal placé. Les péripéties ont ainsi commencé à l'université de Lille-1, avec le porté disparu DEA Lamora, puis une thèse en optique/matériaux sur les solitons, à l'université d'Artois, à la faculté Jean Perrin. Je n'oublie pas l'ensemble des gens qui m'ont mis le pied à l'étrier et/ou accompagné : JF et Jeff, Fabrice, Sébastien, Greg, Antonio & Luc, et la direction de l'époque.

En partance pour un post-doc dans une thématique très proche de celle de la thèse, j'ai finalement renoncé à la délocalisation suite à l'obtention simultanée d'un poste d'ingénieur situé hors la « France de l'intérieur » : l'Alsace !

J'ai donc été accueilli à l'époque par Serge Jacquy, dirigeant le Lab.el à l'IUT de Mulhouse, et Pierre Ambs (MIPS) afin de développer des outils numériques et expérimentaux autour de la thématique sur la microscopie de fluorescence. Cette thématique était portée par Olivier, Alain et Bruno, Vincent étant une pièce également importée, marseillais

crypto-breton et Bertrand, à l'époque jeune pampre, aujourd'hui devenu grand cru ! Alain et Olivier essayaient chacun d'avoir la plus petite PSF et Bruno, déjà redoutable d'efficacité, arbitrait en rendant l'affaire moins floue. Merci à eux de m'avoir introduit à ces sujets !

Je dois m'attarder un instant pour remercier particulièrement Olivier, garant de cette HDR, et surtout infatigable compagnon de route au labo et en-dehors, capable de toujours tirer la situation par le haut, qu'elle soit scientifique ou non ! Parlant science ou non, je dois aussi m'attarder sur le cas de Nico, écrasant toute IA dans des domaines hyper variés, de l'holographie à la programmation python en passant par la culture pop. Très pratique d'occuper le même bureau ! Merci de subir mes monologues quand je déplace les pièces du puzzle au tableau ou caché derrière mon écran !

Les autres membres de l'équipe ne sont pas en reste. Ceux qui m'ont précédé : je m'inquiète en réalisant que seul Christophe occupe cette liste. Ceux qui ont rejoint le petit IUT de sous-préfecture de province (Stéphane), celles qui venaient d'un autre petit IUT de sous-préfecture (Sophie). La toute nouvelle équipe physique et Physique (Fabrice, Clément et Ali), l'équipe Math très appliquée (JB, Ali) et l'équipe astro-cybersécurité (Djaffar, Bushra). Il faut aussi mentionner le personnel de l'IUT de Mulhouse et UHA, remplissant des fonctions indispensables à la vie des chercheurs.

Je pense également aux collègues avec qui nous avons collaboré, de Strasbourg à Tsukuba en passant par Alger, Marseille, Lyon, Saint-Étienne et même l'IUT de Mulhouse, dont l'apport a été important ! Les doctorants et autres personnels passés par notre équipe seront aussi largement remerciés dans les pages de ce manuscrit !

Enfin, impossible de conclure sans un mot pour la famille, notamment celle qui s'est éloignée depuis mon arrivée en Alsace : parents, frères et soeurs. Enfin, au quotidien, Stella et Rina, qui supportent des horaires parfois un peu amples, et un travail qui peut déborder plus que de raison à la maison. Pour la bonne cause !

Entrons maintenant dans le vif du sujet...

1 Contexte : imagerie de phase et microscopie	9
1.1 Premier prototype : principes et limites de la microscopie holographique numérique	12
1.2 Reconstruction tomographique, tomographie par projection	15
1.2.1 Problème direct	17
1.2.2 Problème inverse, reconstruction de l'objet	18
1.2.3 Application à la microscopie optique	20
1.3 Résumé et orientations choisies	21
2 Tomographie diffractive	23
2.1 Modèles incluant la diffraction et holographie numérique	23
2.2 Microscopie tomographique diffractive	24
2.2.1 Principe	24
2.2.2 Problème direct	24
2.2.3 Problème inverse : l'approximation de Born	27
2.2.4 Approximation de Rytov	31
2.2.5 Domaine de validité	33
2.2.6 Rétropropagation filtrée (rotation de l'objet)	36
2.3 Amélioration de la résolution : synthèse d'ouverture	37
2.3.1 Tomographie par rotation de l'objet (ToRO)	38
2.3.2 Variation de la longueur d'onde, illumination fixe.	38
2.3.3 Variation du spectre angulaire d'illumination (ToRI)	40
2.3.4 Limites de l'imagerie tomographiques diffractive ToRI	43
2.4 Dispositif expérimental	45
2.5 Remarques sur la mise en œuvre numérique	54
2.6 Applications : biologie, matériaux, imagerie multimodale	57
2.6.1 Intérêt en biologie : intérêts et illustrations	57
2.6.2 Imagerie multimodale sur matériaux	61

2.6.3	Transfert de technologie	62
2.7	Résumé et orientations choisies	63
3	Extension de l'OTF en transmission	65
3.1	Motif de balayage et taux de remplissage de l'OTF	65
3.2	Optimisation du remplissage par symétrie spectrale ou contraintes	71
3.2.1	Symétries spectrales	71
3.2.2	Algorithmes itératifs de type Gerchberg-Saxton	71
3.3	Tomographie par rotation de l'objet et de l'illumination (ToRIO)	75
3.3.1	Principe	75
3.3.2	Réalisation expérimentale	77
3.4	Bilan et orientations possibles	78
4	Imagerie en réflexion : topographie et imagerie	79
4.1	Imagerie 2D et 3D	79
4.1.1	Montage expérimental	81
4.1.2	Synthèse 2D	87
4.1.3	Correction des aberrations	89
4.2	Profilométrie/topographie multi-angle	91
4.2.1	Contexte : les différentes méthodes de topographie	91
4.2.2	Profilométrie/Topographie multi-angles	95
4.2.3	Contexte : déroulement de phase & échantillonnage.	95
4.2.4	Intérêt du contrôle du spectre spatial d'illumination	98
4.2.5	Piste pour étendre la classe d'objet imageable	102
4.3	Bilan et orientations	102
5	Simplifier et fonctionnaliser la MTD	105
5.1	Tomographie 4π et tomo miroir	105
5.2	Imagerie par analyseur de front d'onde	109
5.3	La MTD polarimétrique : imagerie vectorielle	111
5.4	Conclusion et orientations	116
6	Projets et pistes	119
6.1	Couplage réflexion/transmission : tomographie 4π et λ	119
6.2	Modèles avancés et approches itératives «compatibles utilisateur»	122
6.2.1	Contexte : problème de la diffusion multiple, réfraction due à l'ob- jet et tomographie miroir/ 4π	122
6.2.2	Approches inverses itératives	123
6.2.3	Modèles directs	126
6.2.4	Méthodes exactes et l'apprentissage profond	129
6.3	Améliorations expérimentales	130
6.4	Conclusion générale : vers un système 3D sans marquage, rapide, isotrope et robuste?	131

TABLE DES MATIÈRES

A	Cursus	135
B	Liste de collaborations	137
C	Activités de recherches et associées	139
D	Liste de publications	141
E	Encadrements	145
F	Enseignements et diffusion scientifique	147

CHAPITRE 1

CONTEXTE : IMAGERIE DE PHASE ET MICROSCOPIE

L'imagerie de phase : alternative ou complément sans marquage à la fluorescence

En microscopie classique, lors de l'utilisation d'un système d'illumination-détection incohérent (champ large, contraste de phase, DIC), l'image enregistrée résulte d'une interaction complexe entre l'illumination incohérente et le spécimen. Le contraste observé - quand il existe - permet d'étudier efficacement la morphologie, mais ne donne pas directement d'information quantitative sur les caractéristiques de ce spécimen.

Pour surmonter ces problèmes, notamment en biologie, les techniques employées nécessitent souvent un marquage fonctionnel des échantillons : fluorescence en champ large, confocal, illumination structurée, STED [1] et toutes les techniques de localisation de molécules uniques dites SMLM (PALM [2], PAINT, DONALD [3], STORM ...)

De grands progrès ont été réalisés ces 25 dernières années, avec notamment - critère éternel en microscopie - une amélioration spectaculaire de la résolution dans le cas des techniques avec marquage. Ces progrès sont essentiellement dus à l'ingénierie de PSF, des fluorophores, ou à la structuration de l'illumination.

L'imagerie basée sur les marqueurs fluorescents est aujourd'hui la technique de choix employée en biologie, grâce à la grande variété de fluorophores développés et les résolutions atteintes. Le STED et le PALM ont notamment été récompensés par le prix Nobel en 2014.

Cependant, aborder la microscopie sous le seul angle de la résolution n'épuise pas les problèmes rencontrés dans le domaine. Ces modes d'imagerie peuvent en effet parfois poser des problèmes comme la phototoxicité (même à basse énergie), le photoblanchiment, ou encore la den-

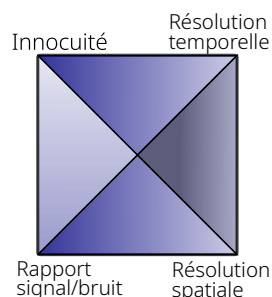


FIGURE 1.1. Illustration de compromis en imagerie microscopique

sité d'énergie importante : dans leur état excité, les fluorophores produisent des radicaux libres instables, qui peuvent alors endommager les cellules vivantes et mener à des conclusions erronées [4]. Un processus biologique aussi courant que la mitose peut être bloqué dans les premiers stades par la phototoxicité induite lors de l'imagerie [5]. La conformation 3D de certaines protéines peut être modifiée (cas de l'actine [6]). Les effets varient avec l'échantillon, la longueur d'onde, le marqueur et le stade de marquage, l'illumination. . . La simple évaluation de cette phototoxicité n'est donc pas aisée.

D'un point de vue pratique, les temps d'acquisition, notamment en 3D peuvent être élevés. D'une façon générale, les aberrations induites par l'échantillon, ou encore le rapport signal à bruit peuvent encore dégrader les résultats. Le résultat est donc un compromis entre ces différents critères (FIG.1.1 [4]). Enfin, pour les échantillons ne pouvant être imagés par ces systèmes, d'autres types de microscopie, sans marquage, doivent être utilisés.

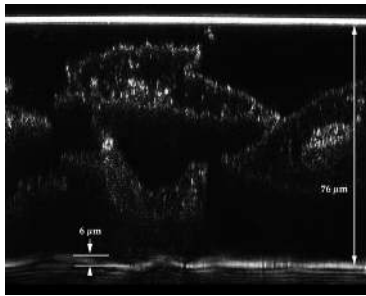


FIGURE 1.2. Image confocale (rétrodiffusion) déformée par la variation d'indice 3D du spécimen. D'après [7].

Historiquement, le laboratoire MIPS / Label à l'IUT de Mulhouse avait développé une thématique sur la microscopie de fluorescence. Les travaux portaient entre autre sur les calculs de PSF [8] ou la mesure de PSF [9] permettant de déconvoluer les images de fluorescence [10].

L'idée d'inclure l'influence du spécimen via sa carte d'indice de réfraction 3D a naturellement émergé : l'échantillon déforme en effet la RIO de l'appareil, le problème s'aggravant avec la profondeur (FIG. 1.2).

La mesure de la carte d'indice présentait donc un intérêt particulier pour ces travaux et un premier prototype de microscope tomographique a été réalisé dans ce cadre. Rapidement, ce système est devenu

indépendant, l'imagerie de phase présentant un intérêt propre en tant qu'imagerie sans marquage. Une thématique complète a été alors développée au niveau instrumental et théorique / numérique.

Remarquons enfin que de ce point de vue, les développements en imagerie de phase et les algorithmes utilisés en MTD (récupération et déroulement de phase, reconstruction, problèmes directs/inverses . . .) dépassent largement le cadre de la microscopie. Ces progrès trouvent en effet un écho (ou une source) en imagerie acoustique, OCT [11], mais aussi en imagerie par rayon X. Les reconstructions en phase incluant ou non la diffraction connaissent d'ailleurs actuellement un développement dans cette gamme de longueurs d'onde : imagerie de phase PCT, mais aussi imagerie par rayon X diffractive [12, 13].

Hors imagerie de phase, il existe différents types d'imagerie microscopique sans marquage : CARS, Raman, génération de seconde harmonique. . . Les techniques de génération d'harmonique ou basées sur l'effet Raman permettent d'observer un contraste basé sur les propriétés optiques du spécimen, mais nécessitent une instrumentation coûteuse associée à une mise en œuvre délicate (laser femtoseconde).

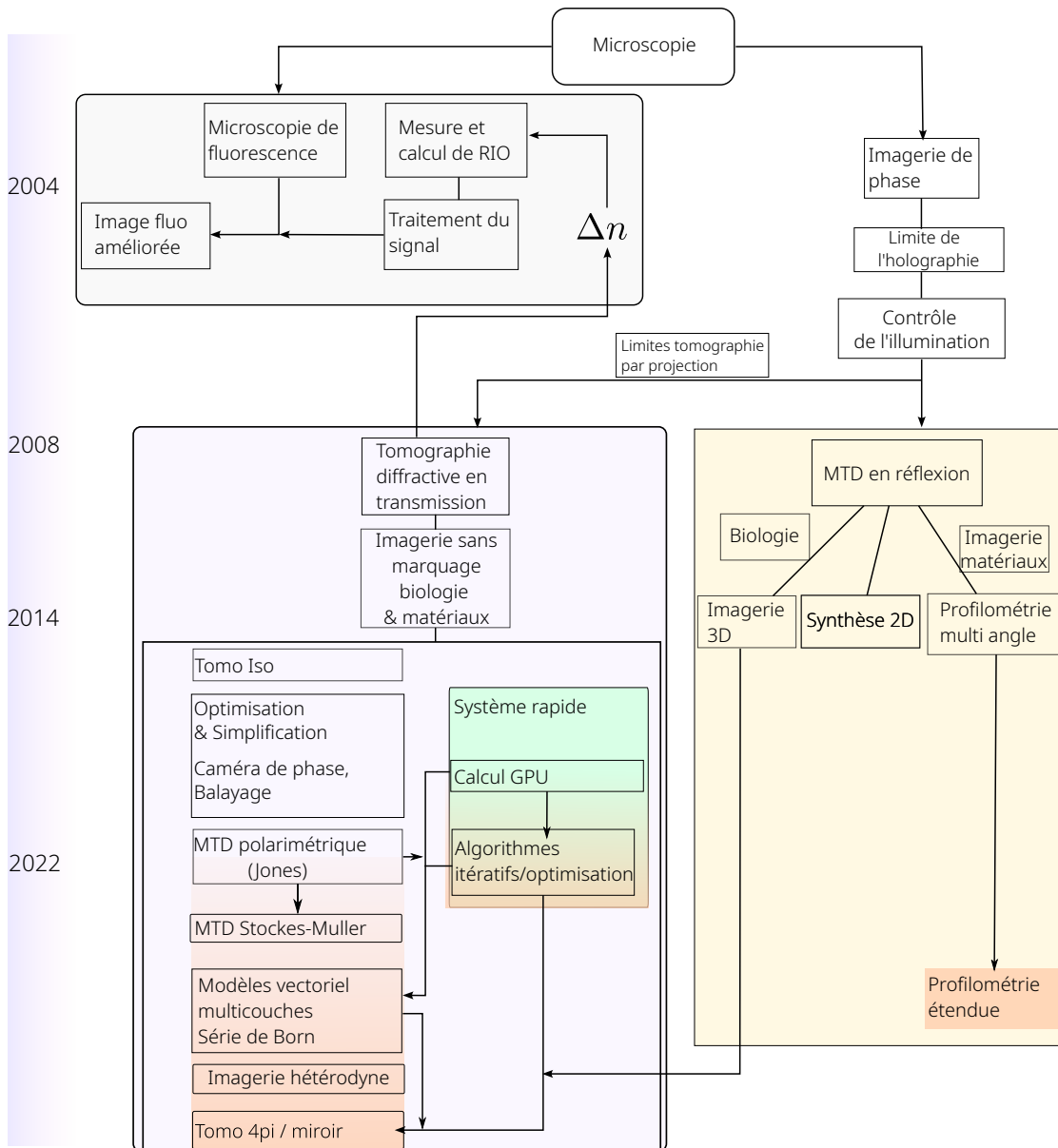


FIGURE 1.3 – Carte heuristique et chronologique simplifiée des travaux développés. En vert : éléments techniques associés. Orange : projet.

L'holographie et la tomographie diffractive s'appuient sur une mesure *relativement* simple du changement de phase induit par l'échantillon : le matériel optique utilisé repose sur des éléments couramment employés en laboratoire, les sources sont peu sophistiquées, faciles à mettre en œuvre et peu chères et les contraintes sur la détection sont faibles, ne nécessitant que des caméras standards. De plus, contrairement au DIC ou au contraste de phase, elles permettent d'accéder à une mesure *quantitative* de la phase et/ou de

l'indice de réfraction.

Au démarrage du projet MTD¹, différents projets de microscopie de phase étaient déjà menés dans d'autres laboratoires et dans un domaine différent, il faut également citer les travaux en imagerie acoustique, aussi bien expérimentaux [14] que théoriques [15], qui avaient l'avantage de travailler directement en phase, contrairement au domaine optique.

En fonction des avantages et limites de ces travaux précurseurs, des choix ont donc dû être faits sur la partie expérimentale (mesure de phase, rotation de l'objet ou de l'illumination. . .) et la partie reconstruction d'image (méthode projective, diffractive, globale ou plan à plan). Le cheminement mené lors des recherches au laboratoire MIPS/IRIMAS est décrit dans un ordre approximativement chronologique.

Le document s'organise de la façon suivante : le prochain paragraphe aborde le contexte et les premières approches en imagerie de phase, l'holographie y étant brièvement décrite. La MTD en elle-même est discutée dans la partie 2. Les techniques plus avancées, comme la tomo-iso sont ensuite décrites. Dans la 4e partie, l'imagerie en réflexion est abordée. Elle est elle-même scindée en 2 sujets différents : la topographie de surfaces et l'imagerie 3D. Le chapitre suivant aborde les améliorations qui ne sont pas directement liées à la résolution : simplification du système, robustesse ou encore spécificité, avec notamment la TDM polarimétrique. La dernière partie fournit des éléments sur les orientations possibles.

Remarquons que l'ensemble de ce document - couvrant tout de même 6 thèses et plus de 20 articles - pourrait toutefois être quasiment résumé à la figure 1.3, carte heuristique présentant de façon chronologique et conceptuelle le chemin emprunté.

Dans un esprit d'ouverture initié au laboratoire et imposé par Horizon2020, les points abordés sont en général liés en fin de section au code qui a permis d'obtenir les données publiées. La reproductibilité de ces résultats est donc assurée au moins sur la partie logicielle. Dans le même cadre d'idées, si ce document relaye avant tout une ligne de conduite expliquant comment les recherches ont été dirigées/orientées, les éléments techniques indissociables de la MTD sont très brièvement décrits.

1.1 Premier prototype : principes et limites de la microscopie holographique numérique

L'holographie consiste à transformer les variations de phase, trop rapides pour être visibles à l'œil nu ou enregistrées directement par un capteur électronique, en une variation d'intensité enregistrable, généralement grâce à une technique interférométrique. C'est une technique qui a connu un regain d'intérêt grâce aux progrès numériques, et utilisée dans un large spectre d'applications, du suivi de particules [16] à l'imagerie microscopique [17].

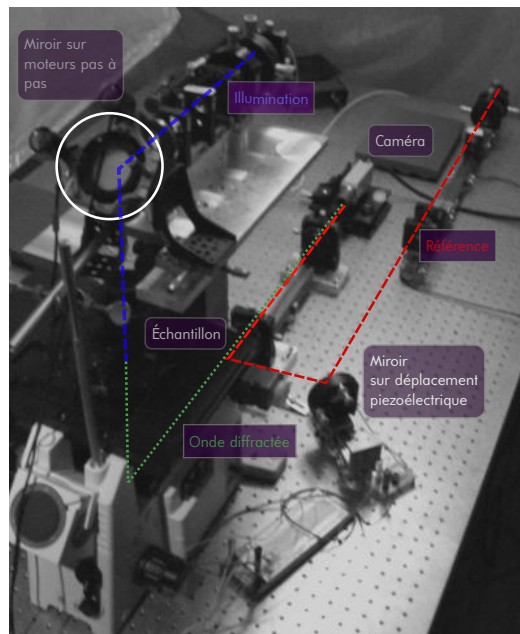
L'holographie, comme la MTD, nécessite un modèle physique de diffraction afin de

1. Différents noms sont utilisés dans la littérature : microscope tomographique diffractif ou par diffraction, holotomographie, microscopie de phase tomographique, microscope à synthèse d'ouverture. . .

lier les caractéristiques physiques de l'objet à la mesure (le champ diffracté). L'étape permettant de recalculer cette grandeur représentant l'objet à partir de l'ensemble mesure/modèle est la *reconstruction*.

Si historiquement, la mesure a pu être effectuée par une plaque photographique ou même à la main [18], il a été grandement simplifié expérimentalement par l'avènement des caméras numériques.

Le premier système développé au laboratoire dès 2004 reposait sur un montage de microscopie de phase holographique, adapté sur un bâti Olympus IX71. Il s'agit essentiellement d'un interféromètre de Mach-Zehnder fibré avec un dispositif de décalage de phase sur le bras de référence (Fig. 1.4).



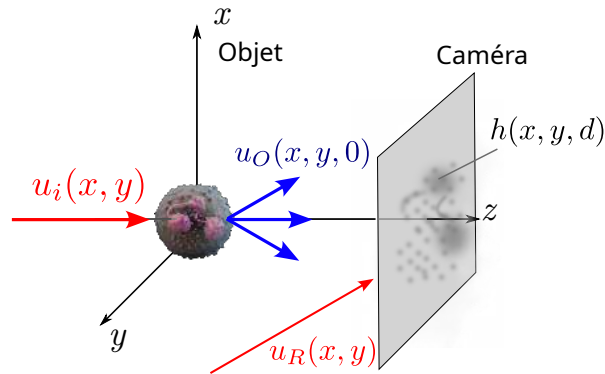


FIGURE 1.5 – Principe de l'holographie. L'illumination u_i est colinéaire à l'axe optique. L'onde de référence u_R est ici hors-axe

l'un de l'autre (ordres +1 et -1), contiennent l'information intéressante u_O , qui est une quantité complexe.

La récupération du champ complexe objet nécessite une séparation de ces 3 ordres. Cette séparation repose en général sur une modulation spatiale (dites « hors-axe ») ou temporelle (décalage de phase / phase shifting) [20].

Dans le cas du montage hors-axe, l'onde de référence est inclinée, ce qui se traduit par une séparation des trois ordres dans le spectre de l'hologramme (FIG. 1.6) : une rampe de phase dans l'espace direct se traduit en effet par un décalage dans l'espace de Fourier (théorème du décalage spectral [21]). La phase et l'amplitude sont alors récupérées par un simple filtrage passe-bande.

L'hologramme étant une fonction réelle, sa transformée de Fourier spatiale \hat{H} présente une symétrie hermitienne

$$\hat{H}(-f_x, -f_y) = \hat{H}^*(f_x, f_y)$$

Le filtrage de l'ordre ± 1 cassant cette symétrie, une fonction complexe est donc récupérée.

Le montage hors-axe permet d'extraire l'information avec un seul hologramme, mais augmente les contraintes sur l'échantillonnage et diminue le champ de vision utile. Expérimentalement, l'inclinaison de l'onde de référence peut être simplement réalisée avec un cube recombineur proche d'un plan image (FIG 2.12).

Si les contraintes d'échantillonnage augmentent, on peut en revanche remarquer qu'une partie de l'espace de Fourier reste disponible, rendant possible le multiplexage de plusieurs spectres sur un seul hologramme [22, 23] (voir le chapitre projet).

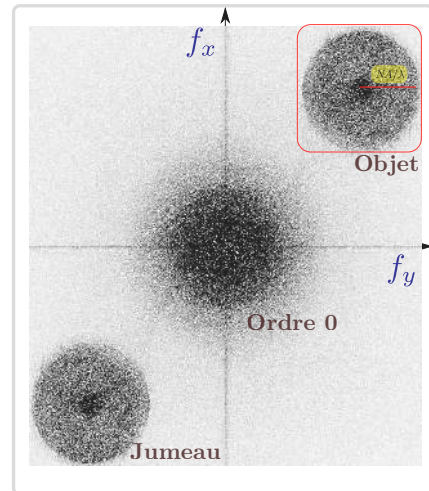


FIGURE 1.6 – Spectre d'un hologramme hors axe

Le montage à décalage de phase permet d’optimiser le champ de vision utile. Cependant, il nécessite au minimum l’enregistrement de 3 hologrammes décalés en phase, qui permettent de trouver les 3 inconnues. En outre, un modulateur de phase doit être ajouté sur le bras de référence (modulateur électro-optique, miroir sur déplacement piézoélectrique. . .). Les 2 techniques peuvent même être combinées, afin d’atteindre une grande sensibilité (mesure au bruit de grenaille [24]).

L’enregistrement en phase et en amplitude de l’onde objet donne accès à l’onde complète, c’est à dire complexe : les parties imaginaire et réelle peuvent donc être manipulées numériquement, ce qui rend le système plus robuste. Les aberrations peuvent être éliminées ou en grande partie corrigées. La mise au point peut être faite numériquement par rétropropagation depuis le plan d’acquisition, ce qui permet d’éviter les problèmes de dérives de la mise au point [25]. Les problèmes de bruit cohérent (speckle) peuvent être limités grâce à l’emploi de sources basses cohérences, de dispositifs limitant la cohérence spatiale [26], ou par fusion de données présentant de la variété dans le speckle.

La microscopie holographique est aujourd’hui une technique éprouvée, qui s’est démocratisée grâce à l’holographie numérique [17]. Elle est particulièrement efficace sur les mesures de phase, dont la précision (verticale) est de l’ordre de la dizaine de nanomètres [27], en restant conservateur. Cette caractéristique est notamment exploitée en réflexion, sur les matériaux réfléchissants (imagerie *surfacique*, voir 4.2). En transmission, l’étape de reconstruction, utilisant un propagateur plan à plan, permet d’obtenir un volume, qui fournit une information **pseudo 3D** sur l’objet complexe.

Elle souffre cependant de divers problèmes, dont le plus évident est la faible résolution en 3D en transmission.

Limites de l’holographie, tomographie

Les mesures holographiques n’enregistrent qu’une information 3D très partielle (voir paragraphe 2.2.6). Elles nécessitent donc un procédé de synthèse d’ouverture, dit *tomographique* : il s’agit d’augmenter l’information collectée par variation des conditions d’illumination. Le mode de reconstruction par simple propagation devient alors insuffisant, car la reconstruction doit désormais prendre en compte la fusion des différentes données, ce qui se traduit par un filtrage dans l’espace de Fourier.

D’une façon plus générale, les acquisitions tomographiques sont effectuées en illuminant l’objet avec une onde capable de le traverser, et on obtient alors sur le capteur une image qui fournit une information 2D sur l’objet par une mesure extérieure. Ces différentes acquisitions 2D contiennent une *projection* d’une quantité physique caractérisant l’objet. Les techniques tomographiques permettent alors de reconstruire l’objet en 3D, en multipliant ces mesures externes à cet objet.

1.2 Reconstruction tomographique, tomographie par projection

La reconstruction d’un objet en tomographie nécessite les étapes suivantes :

1. Établir le problème direct, c'est à dire le modèle donnant le lien entre la fonction objet $f(x, y)$ recherchée et la mesure.
2. Résoudre le problème inverse, c'est à dire retrouver les propriétés de l'objet à partir de la mesure, souvent entachée d'erreurs/bruit. C'est l'étape de reconstruction.
3. Du point de vue expérimental, enregistrer les projections en phase et amplitude.
4. Améliorer la résolution par un procédé de synthèse d'ouverture, ce qui nécessite une fusion appropriée des données.

Le problème inverse peut-être résolu par méthodes analytiques, algébriques² ou optimisation explicite. Dans le premier cas, la formule d'inversion analytique est discrétisée pour obtenir une solution. Dans le 2^e cas, c'est l'équation de projection (formulation du problème direct) qui est discrétisée : l'inversion directe étant en pratique irréalisable, des algorithmes itératifs sont utilisés.

Dans la section suivante, nous nous intéressons aux méthodes analytiques : elles sont basées sur le modèle physique continu décrivant les acquisitions, puis ce modèle est «inversé» pour trouver l'objet. Elles permettent de comprendre les limites en dehors des problèmes numériques associés.

La tomographie par projection : rotation de l'objet

Si historiquement le laboratoire s'est peu intéressé à ce mode d'imagerie, trop limité en microscopie haute résolution (c'est à dire au-delà du micromètre), il est difficile de le passer sous silence. D'une part parce que la tomographie par projection est une technique éprouvée grâce aux développements importants dans les années 70, qui ont mené à l'avènement du scanner (tomodensitométrie ou CT-Scan en anglais) développé par Allan McLeod Cormack et Godfrey Hounsfield (prix Nobel en 1979). D'autre part, parce que les développements de la tomographie par diffraction sont en partie basés sur ces travaux et que les modes de raisonnement utilisés pour la résolution des problèmes inverses sont similaires, comme en atteste la proximité des théorèmes ou techniques de reconstruction (théorèmes de Fourier, rétroprojection filtrée/rétropropagation filtrée).

Plusieurs laboratoires ont ainsi implémenté cette technique en microscopie ([28], [29], [30]), ce qui a constitué un élément d'inspiration pour les travaux menés dans notre équipe. La physique plus simple utilisée dans ces modèles permet dans une première approche, d'illustrer à la fois le mode de reconstruction et les aspects expérimentaux. Certaines problématiques, comme le filtrage fréquentiel nécessaire à une reconstruction de qualité, commun aux différentes techniques, sont avantageusement illustrées ci-dessous. La configuration utilisée (rotation de l'objet ou de façon équivalente de l'ensemble source/détecteur) est en outre la même qu'en tomographie iso (paragraphe 3.3).

Dans cette première approche, les phénomènes de diffraction sont négligés : on considère que les trajets des rayons sont rectilignes. La reconstruction de l'indice de

2. Remarquons que ces méthodes ne sont pas plus «algébriques» que les autres méthodes décrites, et que l'aspect itératif les qualifie mieux

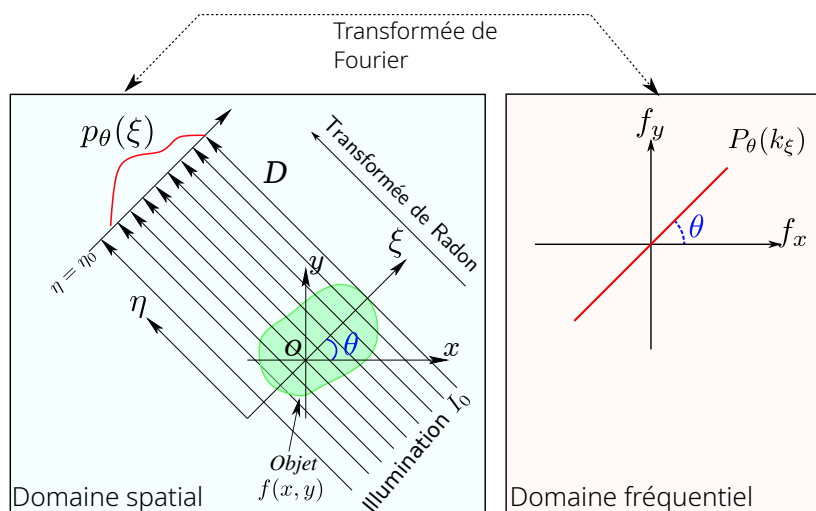


FIGURE 1.7 – Le théorème de la coupe centrale permet de relier la transformée de Fourier d’une projection $p_\theta(\xi)$ de l’objet au spectre spatial $P_\theta(k_\xi)$ de cet objet. Le repère (O, η, ξ) est le repère local tournant.

réfraction repose alors sur la rétroprojection filtrée ou le théorème de la coupe centrale, par ailleurs utilisés en tomodensitométrie à rayon X grâce à la courte longueur d’onde.

1.2.1 Problème direct

Les problèmes direct et inverse sont très largement décrits dans la littérature (voir par ex. [31]), ils sont ici très brièvement décrits. Les notations théoriques et les principes de base des systèmes expérimentaux seront repris par la suite, notamment en tomo-iso.

L’objet est illuminé par une onde plane d’intensité I_0 , et on mesure l’intensité $I(\xi)$ du champ optique obtenu après passage dans l’objet sur un capteur plan 2D (FIG. 1.7).

Ce champ est atténué par l’absorption et la diffusion dues à l’objet, lui-même représenté par une fonction objet $f(x, y)$. Cette atténuation est exprimée par la loi de Beer-Lambert : en traversant une épaisseur élémentaire $d\eta$, l’intensité varie d’une quantité $dI = -\mu I d\eta$ où μ est le coefficient d’atténuation. Pour un objet homogène d’épaisseur L : $I = I_0 \exp(-\mu L)$. Dans le cas d’un objet inhomogène, la fonction objet $f(x, y)$ représente les coefficients d’atténuation locaux $\mu(x, y)$.

Par intégration le long d’une droite $\xi = \text{constante}$, l’expression de l’intensité devient alors :

$$I = I_0 \exp\left(-\int f(x, y) d\eta\right) \quad (1.2)$$

Expérimentalement, chaque pixel du capteur (variable ξ , à la position η_0) permet de mesurer la transmittance $I_\theta(\xi)/I_0$ de l’objet, intégrée sur l’épaisseur de l’objet le long d’une droite D (variable η , $\xi = \text{constante}$) qui décrit le chemin du photon (rayon

infiniment fins). L'ensemble des pixels du capteur représente une **projection** p selon un angle fixe θ :

$$p_\theta(\xi) = \int_{\eta \in D} f(x, y) d\eta = \ln \left(\frac{I_0}{I(\xi)} \right) \quad (1.3)$$

$d\eta$ est une longueur élémentaire de cette droite.

Les projections sont enregistrées le long d'une ligne $\xi_1 = x \cos \theta + y \sin \theta = \text{constante}$ ³, ce qui permet de réécrire 1.3 à l'aide de la distribution de Dirac :

$$p_\theta(\xi) = \iint f(x, y) \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - \xi) dx dy \quad (1.4)$$

Il s'agit de la transformée de Radon de f sur laquelle repose le modèle direct.

1.2.2 Problème inverse, reconstruction de l'objet

Dans le cas non diffractif, il existe principalement 2 méthodes analytiques pour reconstruire les images à partir des projections : le théorème de la coupe centrale et la rétroprojection filtrée.

Théorème de la coupe centrale

Ce théorème relie la transformée de Fourier d'une projection 2D, $P_\theta(k_\xi)$, à la transformée de Fourier 3D de l'objet : les coefficients de Fourier du spectre d'une projection selon un angle θ sont distribués sur un plan centré sur la fréquence nulle et incliné du même angle dans l'espace de Fourier (Fig. 1.7). En accumulant des projections suivant différents angles, on peut donc remplir l'espace de Fourier, effectuant ainsi une synthèse d'ouverture qui permet d'améliorer la résolution. L'objet est enfin obtenu par transformée de Fourier inverse 3D.

Dans la pratique, cette méthode de reconstruction pose deux problèmes :

- la distribution des coefficients sur des plans inclinés impose un échantillonnage radial dans l'espace de Fourier. Le taux de remplissage diminue lorsque les fréquences augmentent et il faut interpoler les données dans l'espace de Fourier.
- dans le cas 3D, il faut stocker les volumes de données de l'objet et du spectre. Ce problème est toutefois beaucoup moins critique aujourd'hui, grâce à l'évolution de la capacité mémoire des ordinateurs.

La rétroprojection filtrée est une méthode alternative au théorème de la coupe centrale, qui permet d'interpoler et de limiter les calculs en deux dimensions.

Rétroprojection et Rétroprojection filtrée

Une première idée pour reconstruire l'objet à partir d'une projection est de simplement épandre (rétroprojeter) la valeur de la projection sur tous les pixels objet appartenant à la droite de projection. Pour un angle θ , l'image obtenue par rétroprojection simple vaut :

3. ξ_1 et θ sont donc ici des paramètres.

$$f_{\theta}^r(x, y) = p_{\theta}(x \cos \theta + y \sin \theta) \quad (1.5)$$

L'ensemble des pixels le long de la droite de projection prennent donc la valeur de la projection. L'image est ensuite obtenue par addition de toutes les contributions angulaires sur l'intervalle $[0, \pi]$:

$$f^r(x, y) = \int_0^{\pi} f_{\theta}^r(x, y) d\theta \quad (1.6)$$

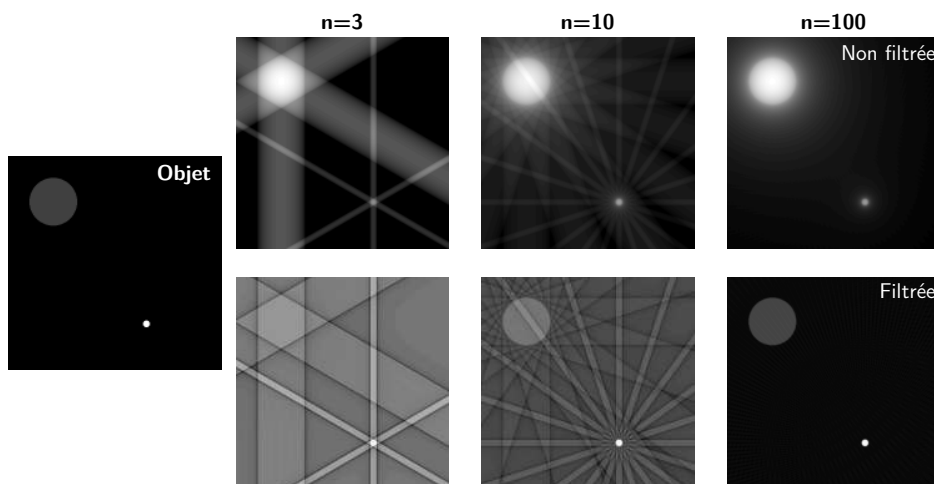


FIGURE 1.8 – Comparaison de la rétroprojection simple (haut) et de la rétroprojection filtrée (bas) pour 3, 10 et 100 projections. Des artefacts de rétroprojections (stries) apparaissent avec peu d'hologrammes, et une sur-représentation des basses fréquences fausse les valeurs dans le cas de la rétroprojection simple. Remarquer que le filtrage rampe (et ses variantes) utilisé n'est adapté qu'à la tomographie par rotation de l'objet.

Cette approche simple mène à des reconstructions floues, avec une sur-représentation des basses fréquences liée à l'échantillonnage radial dans l'espace de Fourier.

La rétroprojection filtrée (FBP) est une méthode prenant en compte cette différence de densité dans l'échantillonnage fréquentiel. Elle consiste à appliquer un filtre passe-haut de type rampe sur le spectre $P_{\theta}(\xi)$ de chaque projection $\tilde{P}_{\theta}(k_{\xi}) = |k_{\xi}|P_{\theta}(k_{\xi})$. Ce terme de filtrage apparaît naturellement lors du passage du système de coordonnées cartésien (k_x, k_y) à polaire (k_{ξ}, θ) (Jacobien) [31].

L'ensemble des projections filtrées \tilde{p}_{θ} est ensuite rétroprojeté (« épandage ») de la valeur \tilde{p}_{θ} le long de la ligne $\xi = \text{cte} = x \cos \theta + y \sin \theta$ et sommé sur l'intervalle angulaire $[0, \pi]$:

$$f^{\text{rf}}(x, y) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{\pi} \tilde{p}(\xi; \theta) d\theta \quad (1.7)$$

La procédure est résumée par l'**Algorithme** (2).

La figure 1.8 permet de comparer les algorithmes de rétroprojection simple (haut) et rétroprojection filtrée (bas). La sur-représentation des basses fréquences en rétroprojection simple est bien visible sur le disque le plus large, plus brillant alors que sa valeur est pourtant censée être la plus faible. À l'inverse, les artefacts dont souffre la rétroprojection filtrée diminuent rapidement avec le nombre de projections.

Limites. La reconstruction par le théorème de la coupe centrale avec un nombre limité d'acquisitions nécessitent en général une interpolation des données. La reconstruction par rétroprojection filtrée est plus coûteuse en temps de calcul. Dans les deux cas, **une reconstruction précise nécessite un nombre important d'acquisitions (en pratique plusieurs centaines.)**

La rétropropagation filtrée est une méthode similaire prenant en compte la diffraction. Étant proche de la rétroprojection filtrée, elle ne sera que brièvement décrite au paragraphe 2.2.6.

Algorithm 2 Rétroprojection filtrée : p projection, P son spectre. Le tilde indique les variables filtrées.

```

 $f_0 \leftarrow 0$ 
for  $n = 0$  to NumAngle do
     $P_n(k_\xi) \leftarrow \text{fft}\{p_n(\xi)\}$ 
     $\tilde{P}_n(k_\xi) \leftarrow P_n(k_\xi) |k_\xi| \text{ /*Filtrage* /}$ 
     $\tilde{p}_n(\xi) \leftarrow \text{ifft}\{\tilde{P}_n(k_\xi)\}$ 
     $f(x, y) \leftarrow f(x, y) + \text{retroprojection}\{\tilde{p}_n(\xi)\}$ 
end for

```

1.2.3 Application à la microscopie optique

Dans le cas d'un objet transparent et sous l'hypothèse de rayons non diffractés, un montage interférométrique permet de mesurer la variation de phase intégrée le long de l'épaisseur de l'objet, elle-même reliée à l'indice de réfraction de cet objet :

$$\Delta\varphi(\xi) = \frac{2\pi}{\lambda} \int \Delta n(x, y) d\eta \quad (1.8)$$

Les méthodes utilisées en tomographie sont donc similaires dans le cas de l'optique, mais la gamme de longueur d'onde utilisée (visible) et l'application à la microscopie posent des problèmes supplémentaires.

Un système précis de rotation de l'objet doit être mis en place afin d'éviter les mouvements parasites autour de l'axe de rotation, ce qui est rendu compliqué par le manque d'espace entre les deux optiques du microscope (Fig. 1.9). De plus, la minimisation des problèmes mécaniques est en général insuffisante aux échelles microscopiques, et une correction numérique des déplacements indésirables doit être appliquée [28, 32].

Ces expériences sont à la base de la tomographie-iso, décrite plus loin, qui résout ou limite grandement la plupart des problèmes décrits ici. Néanmoins, les difficultés propres à ce montage (encombrement, mouvements de précession, recalages nombreux d'images,

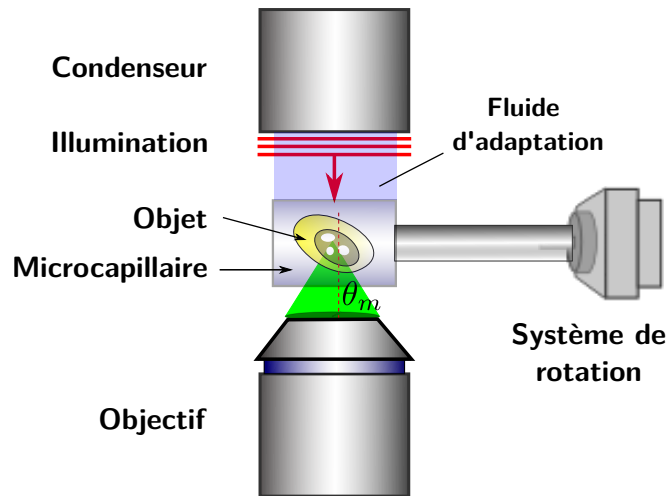


FIGURE 1.9 – Rotation de l’objet en microscopie. Détail du dispositif.

bande passante limitée en x, y) nous ont amenés à l’époque à considérer dans un premier temps un système par balayage de l’illumination (voir 2.3).

1.3 Résumé et orientations choisies

Le contexte expérimental et théorique montrait les limites posées par l’holographie ou les dispositifs de microscopie tomographique en projection réalisés par certaines équipes, parmi lesquelles :

- les difficultés expérimentales et numériques liées à la rotation de l’objet. Le recalage des projections est problématique et a minima, réduit la résolution, déjà dégradée par les algorithmes reposant sur une hypothèse non diffractive, peu réaliste aux échelles désirées.
- L’absence de vraie 3D en holographie, ainsi que des algorithmes de reconstruction tomographique adaptés uniquement au mode de rotation de l’objet, mode posant justement problème. . .

L’idée était donc de combiner l’approche diffractive utilisée en holographie avec un système de microscopie tomographique plus robuste.

Cette partie décrit les bases de la MTD, les premiers travaux menés dans le cadre de la thèse de Bertrand Simon [19] et jusqu'à la thèse de Hui Liu (chapitre 4). Les applications mentionnées couvrent cependant une période plus large.

La théorie sous les approximations de Born et Rytov est d'abord brièvement rappelée. Les possibilités de synthèse d'ouverture en mode diffractif sont ensuite décrites, expliquant à l'époque notre choix de balayage par inclinaison de l'illumination et le mode de reconstruction utilisé. La partie expérimentale expose ensuite les différents montages envisagés au laboratoire. Les différentes limites rencontrées, théoriques ou expérimentales, sont ensuite expliquées. Une partie sur les applications permet enfin d'illustrer les capacités de la MTD, qui sont notamment comparées à l'imagerie holographique ou de fluorescence. Son intérêt en biologie ou sur certains matériaux est enfin illustrée sur différents échantillons.

2.1 Modèles incluant la diffraction et holographie numérique

L'état de l'art à l'époque montrait donc une variété de techniques microscopiques 3D : microscope holographique, tomographie par projection ou diffraction par rotation de l'objet.

En holographie numérique, les images obtenues ne révèlent pas vraiment la structure 3D de l'échantillon, mais plutôt le retard de phase lié au chemin optique parcouru, c'est à dire le produit de l'épaisseur par l'indice de réfraction moyen [28]. Une technique de synthèse d'ouverture par tomographie était donc nécessaire.

Les techniques tomographiques soulevaient cependant deux problèmes : d'une part l'absence de diffraction pour les modèles projectifs, d'autre part des problèmes techniques importants - logiciel et matériel - liés à la rotation de l'objet à l'échelle microscopique.

Les techniques diffractives déjà existantes posaient également un problème sur la reconstruction : la rétropropagation filtrée est adaptée uniquement à la rotation d'objet, notamment le filtre rampe diminuant le poids des basses fréquences, dont le rôle important est illustré en rétroprojection sur la figure 1.8.

2.2 Microscopie tomographique diffractive

La tomographie diffractive est également une technique d'imagerie 3D sans marquage, qui permet de mesurer quantitativement la distribution d'indice de réfraction complexe 3D. L'idée de base est identique à la tomographie par projection : combiner différentes mesures de l'onde diffractée (phase et amplitude) par l'objet sous différentes conditions d'illumination, puis fusionner numériquement les données. Toutefois, les problèmes direct et inverse doivent prendre en compte la diffraction et les possibilités de synthèse d'ouverture sont plus nombreuses.

2.2.1 Principe

L'obtention de la carte d'indice de réfraction nécessite les mêmes étapes que dans le cas de la tomographie par projection, mais avec un modèle direct prenant en compte la diffraction :

- Établir le problème direct, c'est à dire le modèle de diffraction qui donnera le lien entre l'indice de réfraction $n(\mathbf{r}')$ recherché et le champ diffracté $u_d(\mathbf{r})$ mesuré. Le modèle général repose sur l'équation d'Helmholtz en milieu faiblement inhomogène.
- Résoudre le problème inverse.
- Du point de vue expérimental, enregistrer la phase et l'amplitude du champ total : ceci est assuré par un procédé holographique.
- Améliorer la résolution par un procédé de synthèse d'ouverture (extension du spectre et fusion des données).

2.2.2 Problème direct

Dans ce paragraphe sont exposées les bases théoriques fondamentales la MTD. La théorie au premier ordre est bien sûr connue depuis longtemps : il ne s'agit pas tant ici de la réécrire sous forme synthétique, que de se servir de ces résultats pour souligner les limites que nous avons rencontrées, comment (en partie) les contourner et enfin, proposer des pistes dans la partie projet.

Équation d'Helmholtz en milieu faiblement inhomogène

Nous supposons que l'onde est monochromatique, le milieu linéaire et l'illumination plane. L'objet est entouré par un milieu d'indice homogène n_0 (FIG. 2.1). Le problème direct repose sur l'équation de propagation en milieu faiblement inhomogène (équation

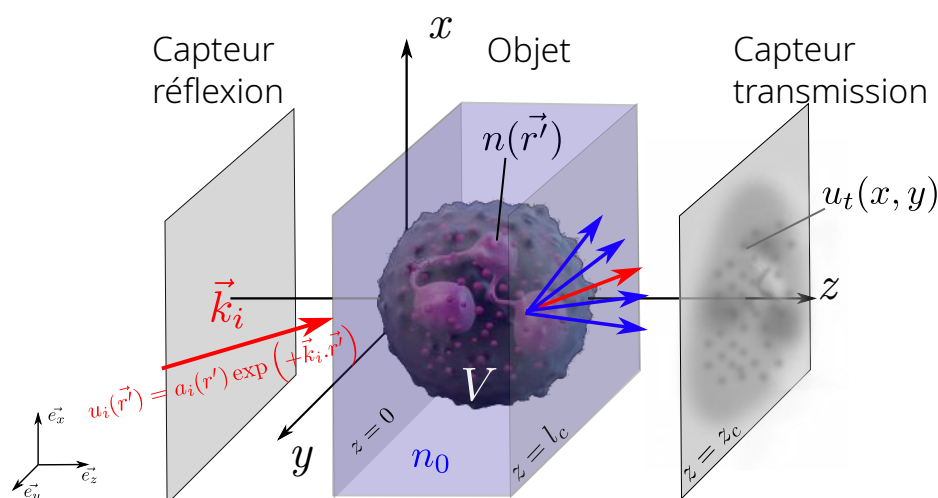


FIGURE 2.1 – Géométrie et notations utilisées pour le problème de diffraction. L'objet d'indice complexe $n(\mathbf{r})$ prend place dans un milieu de montage d'indice n_0 . Il est illuminé par une onde plane incidente de direction \mathbf{k}_i , d'amplitude a_i . L'onde totale u_t est mesurée sur le capteur. Un capteur placé en amont assure une détection en réflexion (voir chapitre 4).

d'Helmholtz *scalaire*)

$$\nabla^2 u_t(\mathbf{r}) + k^2 u_t(\mathbf{r}) = 0 \quad (2.1)$$

avec $k = k_v n(\mathbf{r})$ et $k_v = \frac{2\pi}{\lambda_v}$ où λ_v est la longueur d'onde dans le vide, $n(\mathbf{r})$ l'indice du milieu, et $u_t(\mathbf{r})$ le champ scalaire total (incident+diffracté). Les positions sont repérées par le vecteur 3D : $\mathbf{r} = (x\vec{e}_x, y\vec{e}_y, z\vec{e}_z)$.

Remarquons que si cette équation est obtenue à partir des équations de Maxwell, elle nécessite de négliger le terme $\nabla(\nabla \cdot \mathbf{u}_t(\mathbf{r}))$. Cette formulation 3D du problème de diffraction impose que le gradient de l'indice de réfraction soit faible (voir le paragraphe 5.3).

Le champ total $u_t(\mathbf{r})$ peut-être décomposé en la somme de l'onde incidente u_i et de l'onde diffractée :

$$u_t(\mathbf{r}) = u_i(\mathbf{r}) + u_d(\mathbf{r}) \quad (2.2)$$

De plus l'onde incidente plane u_i satisfait l'équation de Helmholtz en dehors de l'objet :

$$\nabla^2 u_i(\mathbf{r}) = -k_0^2 u_i(\mathbf{r})$$

avec $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda_0} = k_v n_0$, où n_0 est l'indice du milieu d'immersion entourant l'objet.

Ceci permet d'obtenir :

$$(\nabla^2 + k_0^2)u_d(\mathbf{r}) = -k_v^2[n^2(\mathbf{r}) - n_0^2]u_t(\mathbf{r}) \quad (2.3)$$

$$= -k_0^2 \left(\frac{n^2(\mathbf{r})}{n_0^2} - 1 \right) u_t(\mathbf{r}) \quad (2.4)$$

$$= -f(\mathbf{r})u_t(\mathbf{r}) \quad (2.5)$$

On a donc

$$(\nabla^2 + k_0^2)u_d(\mathbf{r}) = -f(\mathbf{r})u_t(\mathbf{r}) \quad (2.6)$$

où

$$f(\mathbf{r}) = k_0^2 \left(\frac{n^2(\mathbf{r})}{n_0^2} - 1 \right) = k^2(\mathbf{r}) - k_0^2 \quad (2.7)$$

est le **potentiel de diffraction**, lié à l'indice complexe de l'objet. C'est une grandeur réelle sur les objets sans absorption (purements déphasants) et complexe sinon.

L'équation différentielle est en général résolue grâce aux propriétés de la distribution de Dirac et de la fonction de Green, qui représente la solution de l'équation d'onde (champ diffracté en \mathbf{r}) pour une distribution de Dirac (point source en $|\mathbf{r}'| < |\mathbf{r}|$) :

$$(\nabla^2 + k_0^2)G(|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|) = -\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \quad (2.8)$$

où $G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') = \frac{1}{4\pi} \frac{e^{jk_0|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|}}{|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|}$ [33] est la fonction de Green de l'équation d'Helmoltz 3D, satisfaisant la condition de rayonnement de Sommerfeld [34]¹, c'est à dire sa réponse impulsionnelle 3D. Elle décrit l'onde générée à la position \mathbf{r} par la source située en \mathbf{r}' . Dans l'espace des fréquences, la fonction de Green peut être représentée par une «coquille» sphérique infiniment mince, la **sphère d'Ewald**.

En multipliant par $f(\mathbf{r}')u_t(\mathbf{r}')$ puis en intégrant de chaque côté de 2.8 :

$$\int (\nabla^2 + k_0^2)G(|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|)f(\mathbf{r}')u_t(\mathbf{r}')d\mathbf{r}' = - \int \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')f(\mathbf{r}')u_t(\mathbf{r}')d\mathbf{r}' \quad (2.9)$$

En utilisant la propriété $f(\mathbf{r})u_t(\mathbf{r}) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(\mathbf{r}')u_t(\mathbf{r}')\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')d\mathbf{r}'$ et par identification avec 2.6, on obtient la solution en champ total :

$$u_t(\mathbf{r}) = u_i(\mathbf{r}) + \int_V f(\mathbf{r}')u_t(\mathbf{r}')G(|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|)d\mathbf{r}' \quad (2.10)$$

où le potentiel objet est nul en dehors de V .

À première vue, il semble y avoir un lien linéaire entre l'objet recherché f et la mesure u_d , mais en réalité u_t contient le terme u_d , qui dépend lui-même de f .

1. Le coefficient constant peut varier, conjointement à celui de l'équation 2.8. Wolf reprend la définition utilisée par Baños [35] : $G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') = \frac{\exp(jk_0|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|)}{|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|}$

Techniquement, cette équation intégrale 2.10 (équation de Lippmann-Schwinger) fait partie des intégrales de Fredholm du second type homogène². Ces équations présentent la particularité de contenir l'inconnue à la fois à l'intérieur et à l'extérieur de l'intégrale³.

2.2.3 Problème inverse : l'approximation de Born

La solution (2.10) pose problème car l'intégrande contient le champ diffracté u_d , qu'il faudrait isoler. L'idée consiste alors à chercher une solution approchée à l'aide d'une approximation sur le champ. La plus simple est l'approximation de Born au premier ordre, qui fait l'hypothèse d'objet faiblement diffractant, ce qui se traduit sur l'indice par [36, 37] :

$$|n(r) - n_0| \ll 1 \quad (2.11)$$

Dans ce cas, l'amplitude du champ diffracté est faible devant le champ incident : $u_d \ll u_i$ et le champ total se résume au champ incident dans l'équation 2.10 :

$$u_d(\mathbf{r}) \simeq u_B^{(1)}(\mathbf{r}) = \int_V f(\mathbf{r}') u_i(\mathbf{r}') G(|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|) d\mathbf{r}' \quad (2.12)$$

$u_B^{(1)}$, ou plus simplement u_B , est le champ diffracté au 1^{er} ordre sous l'approximation de Born. Le champ diffracté est alors lié linéairement au potentiel, via la fonction de Green. Afin d'inverser l'équation 2.12, on introduit la décomposition en onde plane de la fonction de Green [38]⁴ :

$$G(|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|) = \frac{j}{4\pi\lambda} \iint_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{m} \exp\left[jk_0(p(x - x') + q(y - y') + m(|z - z'|))\right] dpdq \quad (2.13)$$

où (p, q, m) sont les cosinus directeurs des vecteurs diffractés.

Cette forme est alors utilisée dans l'équation 2.12, et on suppose que l'onde d'illumination est plane :

$$u_i(\mathbf{r}') = a_i(\mathbf{r}') \exp(j\mathbf{k}_i \mathbf{r}') \quad (2.14)$$

en prenant pour convention le signe “+” pour les ondes se propageant de la gauche vers la droite (Fig. 2.1). En réarrangeant les termes, et pour $z > z'$, on obtient alors :

$$u_B(\mathbf{r}) = \frac{ja_i}{4\pi\lambda} \iint_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{m} \exp[+jk_0(px + qy + mz)] dpdq \quad (2.15)$$

$$\iint \iiint_V f(\mathbf{r}') \exp\left[-jk_0\left((p - p_i)x' + (q - q_i)y' + (m - m_i)z'\right)\right] d^3r'$$

2. Les intégrales de Fredholm du second type ont des bornes fixées, et la forme générique est $\varphi(x) + \lambda \int_a^b K(x, t)\varphi(t)dt = f(x)$ où φ est l'inconnue, λ un réel, f une fonction connue (nulle dans le cas homogène). La fonction K , appelée le noyau de l'équation intégrale, est une fonction connue, en général fixée par le problème physique.

3. Remarquez que dans notre cas, il s'agit du champ diffracté, donc connu car mesuré

4. En physique, cette décomposition d'une onde sphérique en ondes plane décrite à l'origine par Hermann Weyl [39] est aussi connue sous le nom *d'identité de Weyl*

où (p_i, q_i, m_i) sont les cosinus directeurs du vecteur incident. On reconnaît à droite la transformée de Fourier du potentiel en fréquences ordinaires, définie par :

$$\hat{F} = \iiint f(x, y, z) \exp[-j2\pi(f_x \cdot x + f_y \cdot y + f_z \cdot z)] dx dy dz \quad (2.16)$$

Ce qui permet de réexprimer le champ diffracté :

$$u_B(\mathbf{r}) = \frac{ja_i}{4\pi\lambda} \iint_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{m} \hat{F}[2\pi(p - p_i)/\lambda, 2\pi(q - q_i)/\lambda + 2\pi(m - m_i)/\lambda] \exp[+jk_0(px + qy + mz)] dp dq \quad (2.17)$$

Aux coefficients constants près, le terme de droite est la transformée de Fourier de

$$\frac{1}{m} \hat{F}(f_x, f_y, f_z) \exp[+jk_0(+mz)] \quad (2.18)$$

Il suffit alors de prendre la transformée de Fourier inverse (en x, y) de l'équation 2.17. La transformée de Fourier 2D de $u_B(\mathbf{r})$ est définie par :

$$\hat{u}_B(f_x, f_y; z) = \iint u_B(f_x, f_y, f_z) \exp[-2j\pi(f_x \cdot x + f_y \cdot y)] dx dy \quad (2.19)$$

On effectue le changement de variable $f_x = p/\lambda$ et $f_y = q/\lambda$ afin d'exprimer les variables de l'équation 2.17 en fréquences ordinaires.

Le spectre diffracté étant mesuré sur un capteur 2D, on exprime ensuite u_d à la position z_c du capteur (configuration expérimentale de Wolf, sans lentille reformant l'image).

On obtient la relation fondamentale de la MTD :

$$\hat{F}(k_{ox}, k_{oy}, k_{oz}) = \frac{-2jk_{dz}}{a_i} \exp(-jk_{dz}z_c) \hat{u}_B(k_{dx}, k_{dy}; z_c) \quad (2.20)$$

où \hat{F} et \hat{u}_B sont respectivement les transformées de Fourier 3D du potentiel objet et 2D du champ diffracté par l'objet. Remarquer que la division par a_i rend le potentiel (logiquement) indépendant de l'onde d'illumination. Expérimentalement, l'onde totale est mesurée : l'entrée de l'algorithme de reconstruction nécessite donc une méthode d'extraction de l'onde incidente.

Les vecteurs \mathbf{k}_d sont les vecteurs d'onde diffractée. Les vecteurs \mathbf{k}_o sont les vecteurs objet (parfois appelés vecteurs d'Ewald [37]) s'exprimant par :

$$\mathbf{k}_o = \mathbf{k}_d - \mathbf{k}_i \quad (2.21)$$

avec \mathbf{k}_i le vecteur d'onde incident, i.e. $\mathbf{k}_o = \mathbf{k}_d - k_0\mathbf{e}_i$, \mathbf{e}_i étant de norme 1, orienté selon la direction d'illumination.

L'équation (2.20) montre que le spectre du champ diffracté \hat{u}_B mesuré en 2D permet d'obtenir la transformée de Fourier 3D de l'objet. La reconstruction 3D s'effectue grâce à ces propriétés géométriques sur les coordonnées fréquentielles.

Le terme $\exp(-ik_{dz}z_c)$ est un terme de rétropropagation (en $z = z_c$). Ce terme ne variant pas avec l'illumination, il est identique pour tous les champs complexes obtenus à chaque acquisition, c'est donc un terme de décalage *global* du volume 3D. Dans le cas de la configuration expérimentale supposée par Wolf, il sert à remettre au point l'objet 3D dans le volume reconstruit à partir des ondes diffractées hors focus. Dans notre cas, la lentille de tube reforme l'image sur la caméra (via les lentilles relais) et ce terme peut être simplement éliminé. Le plan central ($z = 0$) du volume 3D reconstruit sera le plan de mise au point fixé lors de l'acquisition des hologrammes.

Remarquons enfin qu'il existe une correction en amplitude : le terme kd_z réalise ainsi une correction en $\cos(\theta_d)$ sur l'amplitude spectrale mesurée (voir figure 2.8 pour la définition des angles) : il s'agit donc d'une correction d'obliquité sur l'amplitude, qui est atténuée notamment aux hautes fréquences latérales (k_{dx}, k_{dy}).

L'équation (2.20) diffère de celle obtenue par Wolf [40] par le coefficient constant, qui dépend de la convention utilisée pour la transformée de Fourier et du signe moins provenant de la différence de définition du potentiel objet. Les transformées de Fourier sont exprimées par Wolf en vecteur d'onde. La convention adoptée ici correspond à celle utilisée pour les transformées de Fourier discrète (TFD), qui sont calculées en fréquences spatiales (voir le paragraphe 2.5 sur les aspects numériques).

Support spectral dans l'espace de Fourier 3D

L'équation 2.21 montre qu'à chaque vecteur \mathbf{k}_d mesuré en 2D (coordonnées latérales k_{dx}, k_{dy}) correspond un vecteur d'onde 3D objet \mathbf{k}_o .

Les coordonnées latérales des vecteurs \mathbf{k}_d et \mathbf{k}_i sont obtenues grâce à la mesure sur le capteur (le spéculaire fournissant \mathbf{k}_i), alors que les coordonnées longitudinales (k_{dz} et k_{iz}) sont obtenues grâce à la relation d'élasticité :

$$k_x^2 + k_y^2 + k_z^2 = k_0^2 \quad (2.22)$$

Appliquée aux vecteurs \mathbf{k}_d , cette relation exprime l'élasticité de la diffraction (pas de changement de longueur d'onde). À vecteur incident \mathbf{k}_i fixé, les coefficients du spectre objet sont donc répartis sur des portions de sphères d'Ewald de rayon k_0 (fig. 2.2).

Ces sphères sont limitées par l'angle maximum de collection θ_m lié à l'ouverture numérique de l'objectif, qui donne la fréquence maximale enregistrable sur la caméra.

Pour obtenir le support spectral de l'objet, il faut enfin décaler l'ensemble des vecteurs d'onde diffractés en soustrayant le vecteur incident \mathbf{k}_i (fig. 2.3). L'objet peut alors être obtenu par simple transformée de Fourier 3D inverse.

Algorithme

Un algorithme basique de reconstruction avec un seul hologramme peut donc être écrit de la façon suivante :

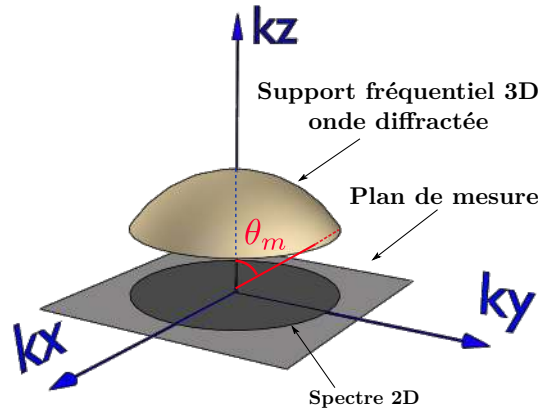


FIGURE 2.2 – L'ensemble des vecteurs diffractés définit une portion de la sphère d'Ewald limitée par l'ouverture numérique de l'objectif. Le spectre 2D est limité par l'ouverture numérique du système, définissant l'angle maximum de collection θ_m . Noter que la représentation est ici parfaite (surface continue), ce qui n'est pas le cas des données expérimentales.

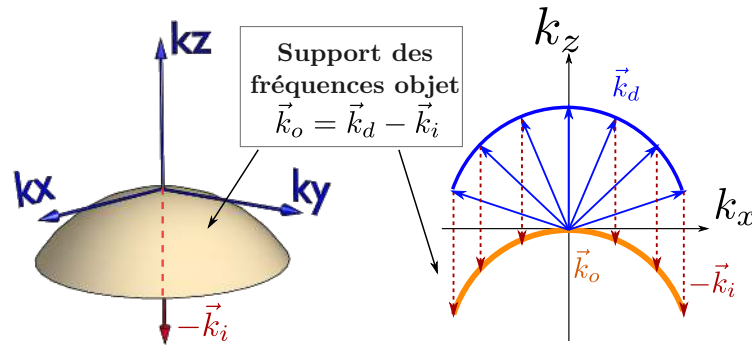


FIGURE 2.3 – Support des fréquences spatiales objet obtenu en transmission pour une illumination selon l'axe optique et selon l'équation 2.21. Détail de l'opération dans une coupe centrale 2D à droite.

- Extraire la phase et l'amplitude du champ diffracté u_B . Cette opération nécessite une étape d'extraction de l'amplitude de l'onde incidente a_i .
- Calculer la TF2D du champ diffracté
- Extraire la composante spéculaire du champ diffracté afin d'obtenir $k_{i\perp} = (k_{ix}, k_{iy})$
- Calculer la coordonnée k_{iz} avec la relation : $k_{ix}^2 + k_{iy}^2 + k_{iz}^2 = k_0^2$
- Extraire les valeurs $k_{d\perp} = (k_{dx}, k_{dy})$ et calculer k_{dz} avec la relation

$$(k_{dx} - k_{ix})^2 + (k_{dy} - k_{iy})^2 + (k_{dz} - k_{iz})^2 = k_0^2 \quad (2.23)$$

- Projeter les coefficients spectraux de l'amplitude complexe à la coordonnée vectorielle \mathbf{k}_o obtenue avec l'équation 2.21, et enfin calculer la TF3D inverse.

On voit que la solution proposée par Wolf est élégante : le système est simplement

caractérisé par une fonction de transfert/une PSF spatialement invariante, ce qui permet de travailler dans le cadre de l'optique de Fourier. Dans sa version de base, cette solution propose une mise en oeuvre algorithmique assez simple, efficace car basée sur des transformées de Fourier (et donc des `fft` au niveau logiciel) et dont le spectre re-propagé a un aspect géométrique facilement interprétable. Ce dernier aspect est encore plus remarquable après l'opération de synthèse d'ouverture, et facilite grandement la compréhension de la formation des images en 3D.

2.2.4 Approximation de Rytov

L'approximation de Rytov est une alternative à l'approximation de Born, qui repose sur une réexpression du champ total sous la forme d'une phase complexe $\varphi(\mathbf{r})$, le champ total s'exprimant alors sous la forme [15] :

$$u_t(\mathbf{r}) = \exp(\varphi_t(\mathbf{r})) = u_i(\mathbf{r}) + u_d(\mathbf{r}) \quad (2.24)$$

avec $u_i(\mathbf{r}) = \exp(\varphi_i(\mathbf{r}))$ l'onde plane incidente, solution en milieu homogène, c'est à dire quand Δn est nul. La phase complexe totale est la somme de la phase complexe incidente et de la phase complexe diffractée :

$$\varphi_t(\mathbf{r}) = \varphi_i(\mathbf{r}) + \varphi_d(\mathbf{r}) \quad (2.25)$$

La partie réelle de la phase complexe φ_t est le logarithme de a_t , amplitude de l'onde totale u_t . La partie imaginaire correspond aux fluctuations de phase, corrigées de la phase de l'onde incidente.

Repasant de l'équation de Helmholtz scalaire (2.1), on introduit cette nouvelle forme du champ :

$$(\nabla^2 + k^2)e^{\varphi_t(\mathbf{r})} = 0 \quad (2.26)$$

Après développement de $\nabla^2 e^{\varphi_t} = \nabla(\nabla(e^{\varphi_t}))$, on obtient :

$$\nabla^2 \varphi_t(\mathbf{r}) + (\nabla \varphi_t(\mathbf{r}))^2 + k(\mathbf{r})^2 = 0 \quad (2.27)$$

en soustrayant k_0^2 à chaque membre, on introduit le potentiel objet (2.7) :

$$\nabla^2 \varphi_t(\mathbf{r}) + (\nabla \varphi_t(\mathbf{r}))^2 + k_0^2 = -f(\mathbf{r}) \quad (2.28)$$

On réintroduit alors la phase complexe totale comme la somme des phases complexe incidente et diffractée (2.25), ce qui donne après développement :

$$\nabla^2 \varphi_i + \nabla^2 \varphi_d + (\nabla \varphi_i)^2 + (\nabla \varphi_d)^2 + 2\nabla \varphi_i \nabla \varphi_d + k_0^2 + f = 0 \quad (2.29)$$

Dans le cas d'un milieu homogène ($f(\mathbf{r}) = 0$ et $\varphi_t = \varphi_i$), on obtient de la même façon :

$$k_0^2 + (\nabla \varphi_i)^2 + \nabla^2 \varphi_i = 0 \quad (2.30)$$

ce qui substitué dans 2.29 permet d'obtenir la forme simplifiée :

$$\nabla^2 \varphi_d + (\nabla \varphi_d)^2 + 2\nabla \varphi_i \nabla \varphi_d + f = 0 \quad (2.31)$$

Cette équation est non-linéaire. L'idée est ensuite de retrouver une forme similaire à celle obtenue avec l'approximation de Born, ce qui repose sur une astuce algébrique et l'approximation de Rytov. Considérons la relation :

$$\nabla^2(u_i\varphi_s) = \varphi_s\nabla^2u_i + 2\nabla u_i\nabla\varphi_s + u_i\nabla^2\varphi_s \quad (2.32)$$

qui avec la relation $\nabla^2u_i = -k_0^2u_i$ et $u_i = e^{\varphi_i}$ donne une forme simplifiée :

$$2u_i\nabla\varphi_i\nabla\varphi_s + u_i\nabla^2\varphi_s = \nabla^2(u_i\varphi_s) + k_0^2u_i\varphi_s \quad (2.33)$$

Introduit dans 2.29, on obtient finalement :

$$(\nabla^2 + k_0^2)[u_i(\mathbf{r})\varphi_d(\mathbf{r})] = -u_i(\mathbf{r})[(\nabla\varphi_s(\mathbf{r}))^2] + f(\mathbf{r}) \quad (2.34)$$

L'approximation de Rytov consiste à négliger $(\nabla\varphi_d(\mathbf{r}))^2$ devant $f(\mathbf{r})$ [14] et permet de linéariser l'équation (lien fonction objet/phase complexe) :

$$\boxed{(\nabla^2 + k_0^2)[u_i(\mathbf{r})\varphi_d(\mathbf{r})] = -u_i(\mathbf{r})f(\mathbf{r})} \quad (2.35)$$

dont la forme est similaire à celle obtenue avec l'approximation de Born. On obtient alors la solution $\varphi_R(\mathbf{r}) \simeq \varphi_d(\mathbf{r})$:

$$\varphi_R(\mathbf{r}) = \frac{\int G(\mathbf{r} - \mathbf{r}')f(\mathbf{r}')u_i(\mathbf{r}')d^3\mathbf{r}'}{u_i(\mathbf{r})} \quad (2.36)$$

dont la forme est également similaire à la solution obtenue sous l'approximation de Born. En comparant l'expression obtenue sous l'approximation de Born, on a un lien simple entre φ_R et u_B : $\varphi_R(\mathbf{r})u_i(\mathbf{r}) = u_B(\mathbf{r})$.

Les mêmes algorithmes de reconstruction peuvent donc être utilisés, à condition d'utiliser en données d'entrée la grandeur $\varphi_R(\mathbf{r})u_i(\mathbf{r})$.

L'obtention de φ_R nécessite le calcul du logarithme complexe des champs u_t et u_i mesurés expérimentalement :

$$\varphi_R(\mathbf{r}) = \ln u_t(\mathbf{r}) - \ln u_i(\mathbf{r}) \quad (2.37)$$

Le logarithme d'un nombre complexe z étant défini par $\ln z = \ln|z| + i\arg(z)$, on doit évaluer

$$\ln \frac{a_t(\mathbf{r})}{a_i(\mathbf{r})} + j(\phi_t - \phi_i) \quad (2.38)$$

Si la mesure des amplitudes a_t et a_i des ondes $u_t = a_t e^{j\phi_t}$ et $u_i = a_i e^{j\phi_i}$ est directe, la différence de phase $(\phi_t(\mathbf{r}) - \phi_i(\mathbf{r}))$ est mesurée modulo 2π : cela ne pose pas de problème sous approximation de Born (utilisation du champ complexe) mais **sous approximation de Rytov, la phase devra généralement être déroulée**. C'est une étape cruciale pour obtenir des images de qualité [14], un paragraphe spécifique est donc dédié plus loin (voir 4.2.3). Chronologiquement, les algorithmes de déroulement ont été implémentés au laboratoire suite aux travaux en imagerie des surfaces en mode réflexion, car la mesure de hauteur dépend de la phase déroulée. Le principe et les algorithmes les plus courants sont donc brièvement décrits dans le chapitre correspondant.

2.2.5 Domaine de validité

Bien que la forme de la solution obtenue sous l'approximation de Rytov soit similaire à celle obtenue sous l'approximation de Born, il est important de noter que le domaine de validité de ces 2 approximations est différent : sous approximation de Born, on suppose que la partie diffractée est de faible amplitude comparée à l'onde incidente, alors que l'approximation de Rytov repose sur l'hypothèse de faible variation locale d'indice.

La gamme de validité de l'approximation de Born est en général définie sur le cas modèle d'une sphère de rayon a , de contraste d'indice Δn . Dans ce cas, la condition montre un compromis entre la dimension, le contraste d'indice et la longueur d'onde :

$$k\Delta n \times a \ll 1 \quad (2.39)$$

Des calculs plus rigoureux montrent cependant que cette approximation est très restrictive [41] et que l'approximation de Born est indépendante de l'angle d'illumination ou de la position par rapport au plan focal de la lentille.

Dans l'approximation de Rytov, on suppose que le gradient de phase est faible devant la perturbation. En effet, la solution (2.36) est obtenue en supposant que :

$$(\nabla\varphi_d(\mathbf{r}))^2 + f(\mathbf{r}) \simeq f(\mathbf{r}) \quad (2.40)$$

soit

$$f(\mathbf{r}) \gg (\nabla\varphi_d(\mathbf{r}))^2 \quad (2.41)$$

Le choix de l'une ou l'autre approximation a longtemps été sujet à controverse. Certains auteurs considèrent que les 2 approximations ont la même limite de validité, l'utilisation étant dans les 2 cas restreinte par la taille de l'objet et le choc d'indice avec le milieu d'immersion. D'autres auteurs considèrent que sous approximation de Rytov, seule la différence d'indice est limitée, sans contrainte sur les dimensions de l'objet.

Stamnes et Chen [42] ont testé numériquement les limites de ces 2 approximations en utilisant des objets présentant des solutions exactes au problème direct de diffraction (cylindres transparents). La forme connue de l'objet est comparée aux formes reconstruites sous les approximations de Born et Rytov. L'étude montre une nette supériorité de l'approximation de Rytov sur une large gamme de paramètres. L'épaisseur du cylindre varie de 5 à 20 λ pour une différence d'indice allant jusque 2%. Sur la gamme de paramètres utilisée, l'approximation de Rytov permet d'imager des objets 3 fois plus épais que l'approximation de Born. Typiquement, l'objet peut mesurer une quinzaine de micromètres d'épaisseur pour un Δn de l'ordre de 10^{-2} . Il faut de plus noter que dans cette étude, l'approximation de Rytov est limitée par le déroulement de phase.

Le consensus couramment admis est qu'à faible choc d'indice entre le milieu environnant et l'objet, l'approximation de Rytov resterait valide indépendamment de la taille de l'objet, contrairement à l'approximation de Born, limitant le domaine de validité aux objets minces, dont l'indice de réfraction est proche de celui du milieu les environnant.

La figure 2.4 illustre le phénomène, montrant l'échec de reconstruction d'une bille de quelques micromètres de diamètre, avec une différence d'indice assez importante

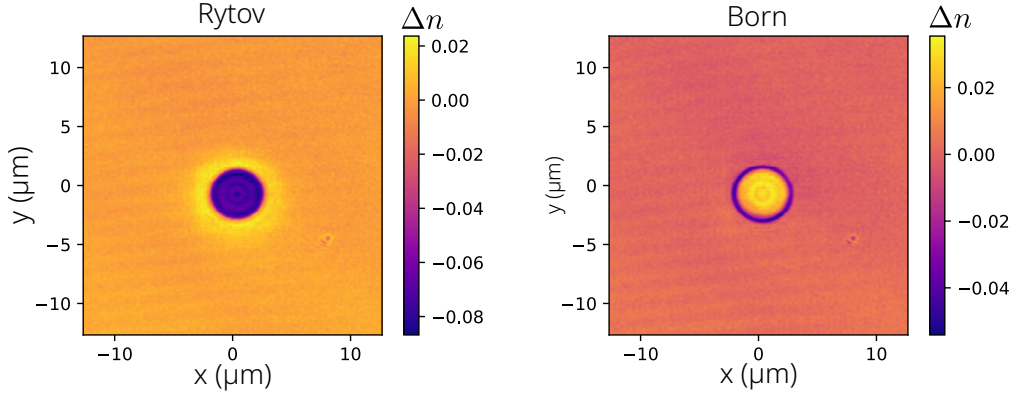


FIGURE 2.4 – Bille de silice de $4,9 \mu\text{m}$, reconstruite sous les approximations de Rytov et Born avec 400 hologrammes. La valeur attendue (environ -0.07) est correctement restituée sous l’approximation de Rytov, alors que la bille semble creuse sous l’approximation de Born. Noter que l’échelle de couleur est adaptée à la dynamique de chaque image.

($\Delta n \simeq -0.07$). C’est pourquoi l’approximation de Rytov est en général préférée pour les objets biologiques [43], [31]. Le problème de la reconstruction des objets présentant des contrastes d’indice plus importants sera abordé dans la partie projet.

Les calculs des champs complexes sous approximation de Born et Rytov sont implémentés dans le [fichier principal](#) du programme de prétraitement (variable `UBornFinal`).

Diffusion multiple

Remarquons toutefois que dans les deux cas, la diffusion multiple n’est pas prise en compte dans ces modèles linéaires⁵. La diffraction à l’ordre 2 peut être obtenue en introduisant dans l’équation de Lippmann-Schwinger la somme $u_i + u_B$:

$$u_B^{(2)}(\mathbf{r}) = \int_V f(\mathbf{r}')G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') [u_i(\mathbf{r}') + u_B(\mathbf{r}')] d\mathbf{r}' \quad (2.42)$$

Le processus peut-être répété pour l’ordre suivant : il est itératif et l’équation intégrale peut être exprimée sous la forme d’un développement en série (série de Born), dans laquelle chaque terme représente la k^e diffraction [14] :

$$u_B^{k+1}(\mathbf{r}) = \int f(\mathbf{r}')u_B^k(\mathbf{r}')G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') d\mathbf{r}' \quad (2.43)$$

Cette équation est similaire à l’équation (2.12), mais la source de la $(k+1)^e$ onde diffractée est donnée par le terme précédent, d’ordre k . Remarquons que cette formulation n’a rien de surprenant, la fonction de Green donne le champ diffracté par un diffuseur

⁵. Les termes diffusion/diffraction sont classiquement séparés par le ratio dimension/ λ (objets minces/épais), frontière plutôt floue : ces termes sont donc ici utilisés de façon interchangeable

ponctuel : l'intégrale « originale » est le champ diffracté par u_i puis chaque point de l'objet diffracte ensuite un champ proportionnel au potentiel de diffusion et à l'onde source à cet endroit, interprétation déjà donnée par Huygens.

Les modèles plus avancées reposent en général sur 2 points : un modèle direct incluant cette diffusion multiple (série de Born, équation de Lippmann-Schwinger, modèles multicouches, équations de Maxwell. . .), et sur une inversion type problème inverse [44-49] (algorithme itératifs / optimisation). Ces points seront abordés dans la partie projet.

Lien avec l'indice de réfraction et l'absorption, susceptibilité

L'indice complexe \tilde{n} présente une partie réelle n égale à l'indice de réfraction n et une partie imaginaire κ liée à l'absorption α .

$$\tilde{n}(\lambda) = n_r(\lambda) + i\kappa(\lambda) \quad (2.44)$$

La partie imaginaire κ , indice d'extinction ou coefficient d'extinction⁶, est responsable de l'atténuation exponentielle de l'amplitude. L'intensité étant donnée par le carré du module du champ, dans un milieu sans diffusion, κ est lié à l'absorption par la relation $\alpha = \frac{4\pi}{\lambda}\kappa$ en m^{-1} .

On peut également noter que la quantité apparaissant naturellement dans l'équation de propagation est la permittivité relative complexe ϵ ou la susceptibilité diélectrique χ :

$$\tilde{n}(\lambda) = \sqrt{\epsilon'_r(\lambda) + j\epsilon''_r(\lambda)} = \sqrt{1 + \chi(\lambda)} \quad (2.45)$$

Avec une illumination monochromatique, le potentiel objet $o(\mathbf{r}) = f(\mathbf{r})$ vaut :

$$o(\mathbf{r}) = k_v^2[n^2(\mathbf{r}) - n_0^2] \quad (2.46)$$

avec $n(\mathbf{r}) = n_0 + \delta_n(\mathbf{r}) + j\kappa(\mathbf{r})$ soit $n^2 - n_0^2 = 2n_0\delta_n + \delta_n^2 - \kappa^2 + 2j(n_0\kappa + \Delta n\kappa)$. Pour un milieu faiblement inhomogène et faiblement absorbant, les éléments au second ordre sont négligés :

$$\text{Im}[o(\mathbf{r})] = 2k_v^2\kappa(\mathbf{r})(n_0 + \Delta n(\mathbf{r})) \quad (2.47)$$

$$\simeq 2k_v^2\kappa(\mathbf{r})n_0 \quad (2.48)$$

et pour la partie réelle du potentiel :

$$\text{Re}[o(\mathbf{r})] = k_v^2(\delta n^2(\mathbf{r}) + 2n_0\Delta n(\mathbf{r}) - \kappa(\mathbf{r})^2) \quad (2.49)$$

$$\boxed{\text{Re}[o(\mathbf{r})] \simeq 2k_v^2n_0\Delta n(\mathbf{r})} \quad (2.50)$$

On peut enfin noter que la mesure concerne l'écart d'indice avec le milieu de montage, et que cela peut parfois modifier l'indice réel de l'objet si celui est micro-structuré : le

6. À ne pas confondre avec le coefficient d'extinction molaire, rapport entre le coefficient d'absorption et la concentration d'une entité chimique absorbante

milieu de montage utilisé - par exemple l'huile - peut remplir les micropores d'objet comme les diatomées [50], relevant les valeurs de l'indice. Les mesures sont donc plus fiables sur les zones homogènes.

Ces coefficients sont implémentés dans le fichier principal du programme [Reconstruction](#) (variable `ctePot2Ind`).

2.2.6 Rétropropagation filtrée (rotation de l'objet)

La reconstruction décrite dans le paragraphe précédent repose sur le théorème de Fourier généralisé. De façon similaire à la rétroprojection, la reconstruction prenant en compte la diffraction peut être effectuée par un algorithme ne nécessitant que des calculs en 2D, dans le cas de la tomographie par rotation de l'objet : il s'agit de la rétropropagation filtrée (*filtered backpropagation*) introduite par Devaney en 1982 [51]. La configuration d'acquisition est identique à celle représentée en figure 1.7.

La solution pour un angle peut être écrite sous la forme de la transformée de Fourier des données spectrales $\hat{\Gamma}_{\theta_0}$ filtrées par deux fonctions :

$$O_{\theta_0}(\mathbf{r}) = \int_{-k_0}^{k_0} \hat{H}(k_\xi) \hat{\Gamma}_{\theta_0}(k_\xi) \hat{G}(k_\xi) \exp(jk_\xi \xi) dk_\xi \quad (2.51)$$

Le terme $\hat{\Gamma}$ est le spectre de

$$\Gamma_{\theta_0}(\xi) = \frac{jk_0}{u_i} \varphi_R(\xi, \eta = \eta_0)$$

représentant les données sous l'approximation de Rytov. On reconnaît le filtre rampe $\hat{H} = |k_\xi|$, qui intervient également dans l'algorithme de rétroprojection filtrée (Algorithme 2).

La deuxième fonction est un filtre de phase pure dépendant de la profondeur η :

$$\hat{G}_\eta(k_\xi) = \exp[j(\gamma - k_0)\eta] \exp(-j\gamma\eta_0) \exp(jk_0\eta_0) \quad (2.52)$$

où $\gamma = \sqrt{k_0^2 - k_\xi^2}$.

La rétroprojection est ici remplacée par une *rétropropagation* dans un milieu homogène (indice moyen ou plus simplement, celui du milieu de montage si $\Delta n \ll 1$) : il est intéressant de noter qu'un opérateur de type spectre angulaire, déjà utilisé classiquement en holographie, apparaît naturellement dans ce calcul.

Le premier terme montre que la valeur de la projection doit être recalculée pour chaque plan (profondeur η) de la reconstruction, ce qui rend cet algorithme plus intensif en terme de calcul que le théorème de Fourier en diffraction.

Les reconstructions obtenues par interpolation (bilinéaire) dans l'espace de Fourier ou par rétropropagation filtrée sont équivalentes en terme de qualité [52].

Il faut enfin souligner une nouvelle fois que les filtres de type rampe $\hat{H}(k_\xi)$ ne sont adaptées qu'à la configuration en rotation d'objet, renforçant notre choix de l'inversion directe par transformée de Fourier. Néanmoins, un problème proche sera abordé dans la

partie projet (application des algorithmes BPM / Born multicouche à la tomographie diffractive et algorithmes itératifs utilisant la rétropropagation).

Bande passante en holographie et synthèse d'ouverture

Plutôt que de caractériser la résolution par un chiffre unique, de type pouvoir séparateur au sens de Rayleigh, on s'intéresse ici à la bande passante obtenue en imagerie cohérente. En microscopie holographique, les mesures reposent sur une illumination spatialement cohérente et sont limitées par le filtrage passe-bas de l'objectif de microscope.

Ceci est illustré sur la figure 2.5, qui représente le support spectral obtenu en holographie dans une coupe centrale 2D. La base de l'arc de cercle est limitée par l'angle maximum, fixé par l'ouverture numérique de l'objectif : $\theta_m = \arcsin(\text{NA}/n_0)$.

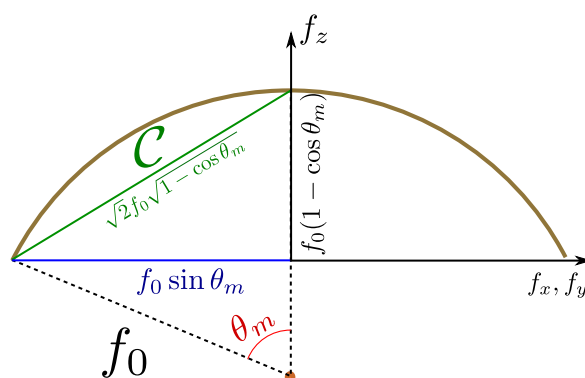


FIGURE 2.5 – Bande passante en holographie.

La bande passante latérale en holographie est fournie par les distances $\Delta f_{x,y} = 2f_0 \sin \theta_m = 2\text{NA}/\lambda_0$ et $\Delta f_z = f_0(1 - \cos \theta_m)$ avec $f_0 = k_0/2\pi$. Le support illustré sur la figure montre les limites de l'imagerie holographique : la bande passante latérale est deux fois moins étendue qu'en imagerie en champ large, et si le support présente bien une extension Δf_{oz} qui lui confère des propriétés d'imagerie 3D, le taux de remplissage de l'espace fréquentiel est très limité puisqu'il est obtenu à l'aide d'une surface. Remarquons que l'imagerie en lumière cohérente présente toutefois l'avantage de transmettre parfaitement chaque fréquence sur l'ensemble de la bande passante (FIG. 2.18)

2.3 Amélioration de la résolution : synthèse d'ouverture

Afin d'étendre et remplir le support spectral, on utilise une technique de synthèse d'ouverture dans l'espace de Fourier. Les possibilités sont plus nombreuses qu'en tomographie par projection :

- par rotation de l'objet (ToRO). Une rotation de l'objet dans l'espace direct autour de l'axe (Ox) se traduit par une rotation du support du spectre autour de l'axe (O, f_x).

- par inclinaison de l'onde d'illumination (rotation de \mathbf{k}_i) de l'onde d'illumination (ToRI).
- par modification de la longueur d'onde (modification du rayon de la sphère d'Ewald)

Quelle que soit la technique de synthèse d'ouverture, la résolution n'est augmentée que par rapport à la mesure holographique, sans jamais dépasser la limite d'Abbe de l'instrument : à strictement parler, elles ne sont donc pas « super résolues » [53].

2.3.1 Tomographie par rotation de l'objet (ToRO)

D'une façon similaire à la technique employée en tomodynamométrie dans laquelle le remplissage de l'espace de Fourier est assuré par rotation de l'ensemble source/détecteur, il est possible de récupérer une partie de l'information manquante par rotation de l'objet. En effet, la rotation de l'objet permet d'accéder à une autre partie du spectre, le nouveau support spectral obtenu subissant une rotation du même angle (FIG. 2.6 a). L'opération permet d'obtenir une information différente pour chaque angle, et donc de remplir progressivement l'espace fréquentiel. La fonction de transfert optique 3D obtenue présente une symétrie circulaire autour d'un des axes (FIG. 2.6 b) et la bande passante est élargie au maximum d'un facteur $\sqrt{2}k_0$ (FIG. 2.6 c). Cependant, l'OTF 3D obtenue n'est pas isotrope : une partie de l'information est manquante le long d'un des axes [54, 55], sous une forme ressemblant à un trognon de pomme (FIG. 2.6 b et d).

Dans le cas de la microscopie, diverses méthodes sont utilisées pour assurer la rotation de l'objet : objet embarqué dans un micro-capillaire et guidé par une micro-rainure, collage par photopolymérisation sur fibre optique, fibre optique creuse [56], pinces optiques ou système dérivé, comme la rotation de fibre bimodale piégeant l'objet [57]. Des systèmes utilisant le flux naturel en cytométrie ont également été développés, utilisant la rotation aléatoire des cellules dans le canal microfluidique [58].

Dans le cas du micro-capillaire, les applications en biologie nécessitent de remplir le micro-tube avec un milieu de culture cellulaire : la rotation assure une bonne couverture des fréquences, mais le microtube introduit des aberrations [59] à cause de la différence d'indice entre le milieu d'immersion et le verre du capillaire. L'effet est encore plus prononcé avec les objectifs à basse ouverture numérique, car il n'y a pas de liquide d'immersion assurant le contact optique avec le microcapillaire.

Cette méthode nécessite un nombre d'angles élevé, afin d'échantillonner correctement l'espace de Fourier, ce qui rend critique le recalage entre chaque hologramme et augmente les sources d'erreurs. Une solution à ces problèmes est apportée par la tomo-iso (voir section 3.3).

2.3.2 Variation de la longueur d'onde, illumination fixe.

La modification de la longueur d'onde permet de faire varier le rayon de la sphère d'Ewald et donc de remplir l'espace fréquentiel avec les sphères successivement obtenues. Cette méthode a été proposée pour la première fois par Dändliker [60] qui a par ailleurs donné une illustration graphique détaillée de différents cas de synthèse d'ouverture.

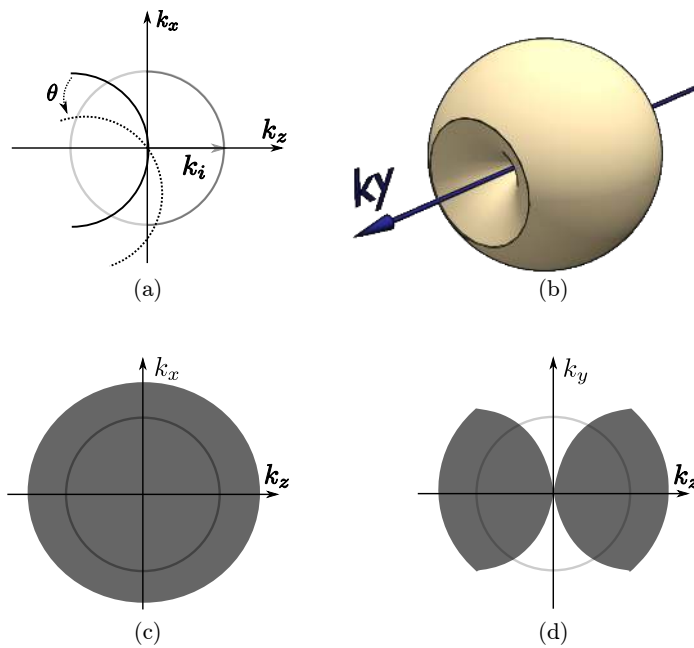


FIGURE 2.6 – Support des fréquences objet obtenu par rotation de l'objet. **a)** Schéma de principe en 2D. **b)** Fonction de transfert optique 3D. **c)** Coupe 2D centrale dans le plan $k_y=0$. **d)** Coupe dans le plan (k_y, k_z) pour $k_x = 0$, faisant apparaître la zone de fréquence manquante. Le cercle indique les fréquences maximum atteignables en holographie (sphère d'Ewald de rayon k_0).

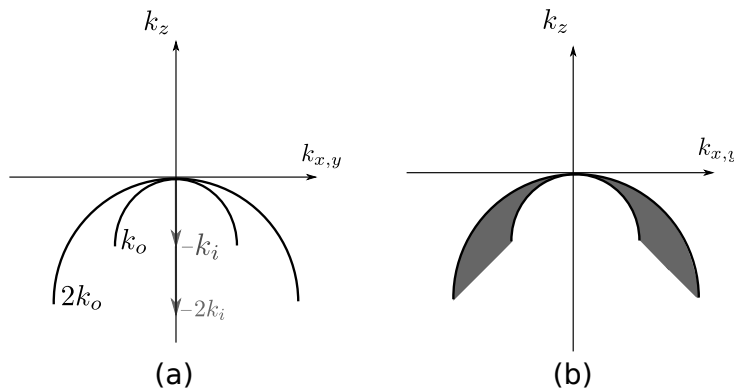


FIGURE 2.7 – Support fréquentiel en tomographie en transmission, par variation de la longueur d'onde. **(a)** Représentation pour 2 longueurs d'onde. **(b)** Spectre obtenu par variation continue de la longueur d'onde.

La figure 2.7 montre la construction d'une OTF lorsque la longueur d'onde varie d'un facteur 2 en transmission. Le remplissage de l'espace de Fourier est très limité avec cette méthode et la variété de longueur d'onde rend plus difficile la résolution numérique du

problème inverse. Cette technique est donc en pratique peu utilisée en l'état.

Un variante développée dans [61], consiste à utiliser une source basse cohérence, associée à un scan longitudinal (déplacement de l'objectif ou de l'objet selon l'axe z) et à une illumination incohérente (pleine ouverture numérique du condenseur). Cependant, les données mesurées sont déconvoluées grâce à un algorithme itératif avec régularisation. Ceci nécessite la connaissance de la fonction de transfert en terme de fréquences spatiales, mais aussi temporelles : la source doit notamment être caractérisée à l'aide d'un spectromètre [62]. La phase est mesurée grâce à un système associant anneau de phase et SLM (interférométrie à 4 décalages de phase) suivi par un déroulement de phase logiciel de type Goldstein. L'acquisition est de l'ordre de la minute ([61], *supplementary information*) pour une centaine de plans en z .

Malgré l'intérêt limité de cette technique, les outils développés pourraient avoir une utilité dans le cadre de la tomographie 4π multispectrale (voir [le projet](#)).

2.3.3 Variation du spectre angulaire d'illumination (ToRI)

La prise en compte de la diffraction autorise une synthèse d'ouverture à partir de la variation du spectre angulaire de l'illumination : en inclinant l'onde d'illumination, il est possible de récupérer des fréquences perdues lors du filtrage passe-bas par l'objectif de microscope sous incidence normale. L'idée n'est pas nouvelle puisqu'elle apparaît

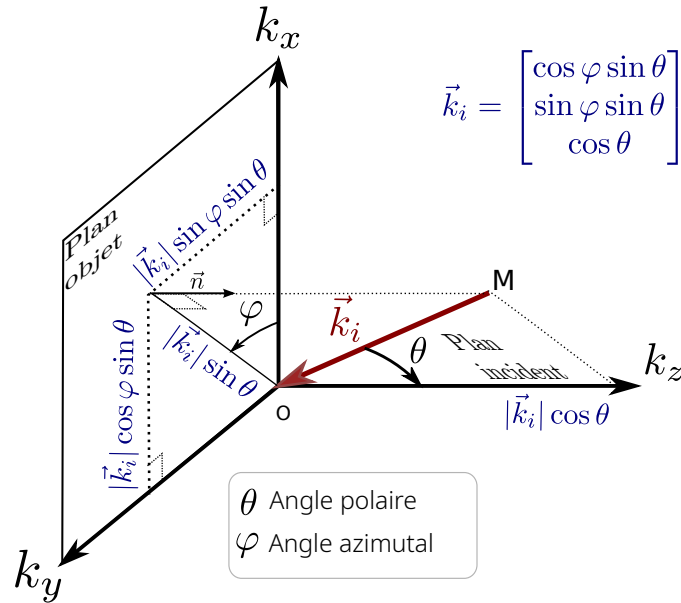


FIGURE 2.8 – Repère et notations utilisées pour le balayage tomographique par inclinaison de l'illumination. Remarquez que dans la norme ISO/CEI 80000-2, les angles θ et φ sont appelés respectivement colatitude et longitude.

déjà dans le papier d'Abbe sur la résolution en optique [53, 63] ! C'est la technique historiquement implémentée au laboratoire [19], inspirée d'articles publiés par V. Lauer

en 2002 [64] en transmission et Destouches en 2001 en réflexion [65]. L'échantillon restant fixe, cette technique est particulièrement stable mécaniquement, résolvant les problèmes rencontrés en rotation de l'échantillon.

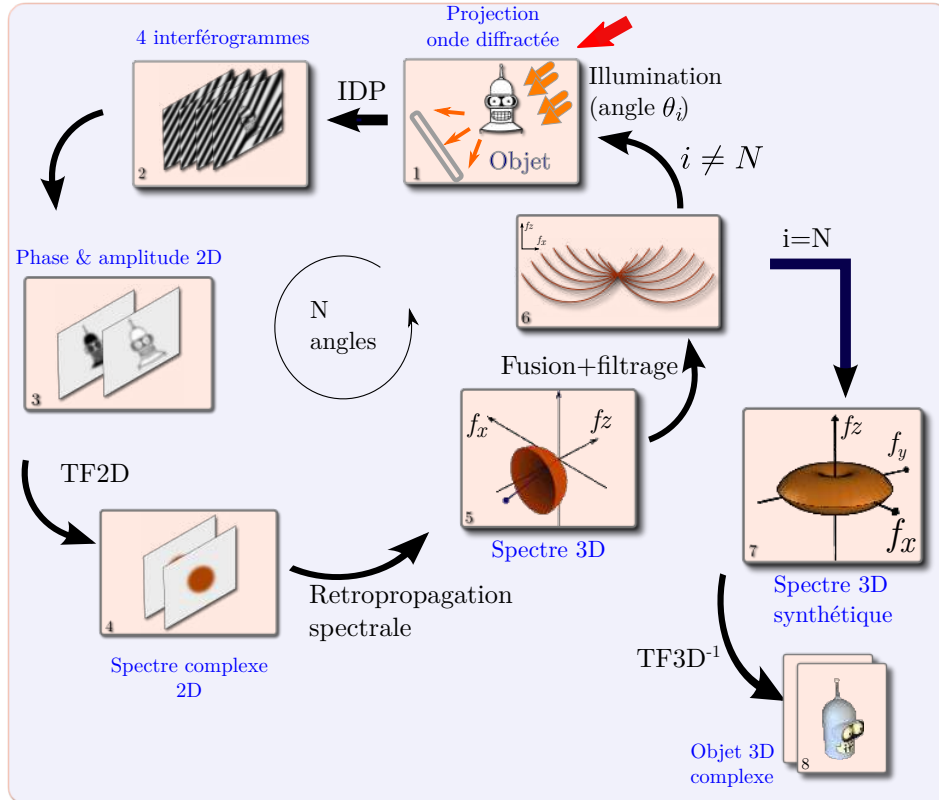


FIGURE 2.9 – Tomographie ToRI : schéma de principe en phase-shifting (début au niveau de la flèche rouge). L'étape de fusion nécessite une normalisation en phase et une division par le support de redondance.

L'équation (2.22) montre que l'ensemble des vecteurs \mathbf{k}_i définit un cercle de rayon k_0 . Une variation de l'angle d'illumination (FIG. 2.8) provoque un déplacement du centre de la sphère d'Ewald sur ce cercle (fig 2.10 a). Lorsque l'angle d'illumination varie continûment, ce procédé mène à une OTF de forme pseudo-annulaire (fig 2.10 b et c), en « doughnut ». Cette forme est bien connue, puisqu'il s'agit de l'OTF d'un microscope conventionnel en éclairage incohérent [10]. Cependant, en MTD, l'OTF est obtenue de façon séquentielle, et chaque composante fréquentielle est totalement transmise (voir FIG. 2.18). Remarquons que ce mode de construction permet d'expliquer la bande passante obtenue en Ptychographie de Fourier (FPT), qui utilise également un enregistrement séquentiel pour augmenter le produit espace-bande passante [66].

La bande passante est doublée suivant tous les axes par rapport à l'holographie (Fig. 2.5), et surtout le taux de remplissage de l'espace de Fourier peut être grandement augmenté en multipliant suffisamment le nombre d'hologrammes.

En outre, en multipliant le nombre d’acquisitions, des données redondantes apparaissent, ce qui permet de moyenniser l’information et donc de diminuer le bruit.

Si le nombre d’hogrammes est insuffisant, le support fréquentiel peut présenter des absences de fréquences («trous» ou lacunes) qui se traduisent par un échantillonnage irrégulier et des artefacts. Pour limiter ce problème on peut utiliser la rétropropagation filtrée avec un filtrage adapté à la tomo ToRI, qui n’existe que dans un cas particulier de balayage [67], soit interpoler dans l’espace fréquentiel avec une méthode plus ou moins sophistiquée.

Alternativement, on peut chercher à optimiser ce remplissage et/ou remplir le support par des algorithmes itératifs sous contraintes (voir la section 3.1).

Fusion des champs complexes

La fusion des informations fournies par chaque hologramme est importante, car elle détermine la qualité de l’image 3D finale. Plusieurs problèmes doivent être résolus :

1. D’une part, la rotation du miroir entraîne inévitablement un saut de phase difficilement contrôlable à l’échelle nécessaire, de l’ordre de grandeur de la résolution en z .
2. D’autre part, les différents hologrammes se superposent fréquemment, entraînant une sur-représentation des basses fréquences, problème également rencontré en rétroprojection/rétropropagation filtrée (voir la figure 1.8).

La fusion nécessite donc un recalage en phase entre hologrammes et un filtrage fréquentiel.

Ces opérations sont réalisées numériquement de façon assez simple :

- Le recalage en phase peut être réalisé par simple normalisation complexe grâce au spéculaire, c’est à dire en divisant par la valeur de l’amplitude complexe [68]. L’opération revient à soustraire la variation aléatoire de phase de chaque hologramme. Un recalage en phase plus abouti peut être effectué lors de la correction des aberrations (voir 4.1.3).

Sans cette opération, la synthèse d’ouverture réaliserait une fusion d’images aléatoirement décalées, ce qui se traduirait par une dégradation de l’image finale lorsque le nombre d’hogrammes augmente.

- Le filtrage fréquentiel s’effectue aussi simplement, par comptage des données redondantes. Un support 3D de redondance est créé lors de la projection des données sur les sphères d’Ewald, puis une simple division est effectuée dans l’espace de Fourier (variable `sup_redon` du programme `Reconstruction`).

L’ensemble des étapes est résumé sur la figure 2.9.

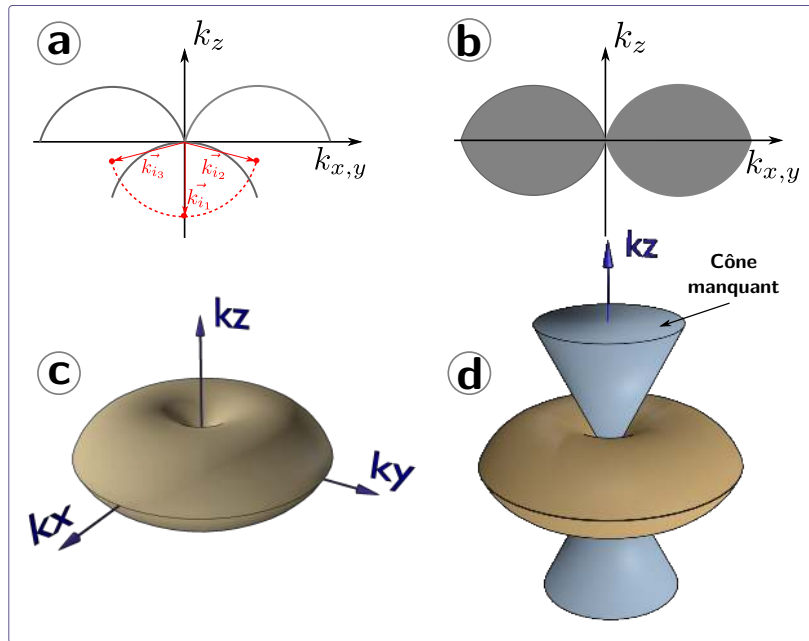


FIGURE 2.10 – OTF obtenue par changement de l’angle d’illumination. (a) Principe illustré avec 3 angles d’illumination. (b) OTF finale 2D (c) OTF finale 3D (d) Illustration du cône manquant de fréquences. L’OTF obtenue en réflexion est illustrée dans le chapitre correspondant (voir section 4.1).

2.3.4 Limites de l’imagerie tomographiques diffractives ToRI

Le problème du cône manquant de fréquence

Si l’on écarte - pour l’instant - les problèmes techniques (bruit cohérent, aberrations, etc.) qui ne sont pas propres à la MTD, la limite la plus évidente est l’anisotropie de l’OTF 3D, mentionnée plus haut.

L’OTF obtenue possède une extension latérale supérieure à celle obtenue par rotation de l’objet, mais présente un défaut de fréquence le long de l’axe f_z , qu’on illustre souvent par un cône manquant de fréquence, d’axe f_z (Fig. 2.10 d). Ces fréquences manquantes entraînent une élongation de la RIO le long de l’axe z , et par conséquent une déformation de l’objet selon cet axe.

De la même façon que le problème des «lacunes spectrales» à l’intérieur de l’OTF, ce problème peut-être partiellement résolu par des algorithmes itératifs sous contraintes (section 3.1 et projet) ou de façon expérimentale par la tomo-iso (paragraphe 3.3).

Les approximations physiques

Rappelons enfin que le modèle direct et les approximations utilisées lors de la reconstruction ont un rôle essentiel et que des limites sont imposées par ces modèles linéaires

(voir paragraphe 2.2.5) : absence de diffusion multiple, onde plane d'illumination non déformée par l'échantillon. Ces problèmes seront abordés dans la partie [projet](#).

Dégradation de l'image avec la distance au meilleur focus

On peut également noter que les 2 modes de reconstruction souffrent d'une baisse de la qualité lorsque l'on s'éloigne du plan central. Notons quand même une différence entre la configuration ToRI et ToRO : dans la configuration de rotation de l'objet, la qualité de la reconstruction obtenue avec FBPJ et FBPP diminue uniformément dans toutes les directions avec la distance à l'axe de rotation, alors que dans la configuration ToRI, la qualité de la reconstruction diminue avec la profondeur depuis le plan focal.

Cet effet de dégradation avec la distance au meilleur focus est lié à la mise en défaut de l'approximation de Rytov. Il peut être limité en rétropropageant le champ avant d'appliquer le déroulement de phase et la formule 2.37 [46, 69]. L'algorithme est cependant beaucoup plus intensif pour le CPU/GPU, puisque ces calculs doivent être appliqués à chaque section de l'image 3D après repropagation⁷, et non plus uniquement le champ complexe mesuré. Les temps de calculs sont donc allongés d'un facteur N, nombre de plans reconstruits en rétropropagation filtrée, voire par la taille M de l'image 3D (généralement 512) en reconstruction IFD (Inversion Fourier Directe). Ces problèmes peuvent être gérés dans le cadre d'une inversion itérative (voir la partie [projet](#)).

Amplification du bruit de fond en tomographie

Lors d'une acquisition tomographique, le bruit cohérent associé à la référence est constant. Autrement dit les acquisitions partagent toutes ce même fond parasite, amplifié en tomographie, car identique et répété sur chaque hologramme. Ce problème se traduit de façon différente selon le mode tomographique.

Dans le cas de la rotation de l'objet, il provient à la fois de la référence et du bras objet. Ce fond est quasi invariant lors de la rotation de l'échantillon. Il se traduit par des lignes parallèles dans le sinogramme et dans la reconstruction, par des arcs concentriques dont le centre est localisé selon l'axe de rotation [70] (FIG. 2.11). Ce genre d'artefacts en anneaux est également rencontré en tomodensitométrie.

Dans le cas de la tomographie par balayage de l'illumination, les inhomogénéités présentes sur le bras objet sont moins gênantes, car elles sont reconstruites et donc « dispersées » dans le volume 3D. Le bruit provient essentiellement du fond constant lié à la référence. Il se traduit par l'existence d'un plan parasite, qui une fois convolué par l'OTF de l'appareil, contamine quelques plans autour du plan central. L'effet est maximum dans le plan $z = 0$.

Afin de supprimer ou limiter ce bruit, plusieurs solutions expérimentales sont envisageables :

7. généralement, on compte 512 sections dans l'image 3D reconstruite par IFD, mais la reconstruction par rétropropagation filtrée permet de limiter la reconstruction à la zone "utile"

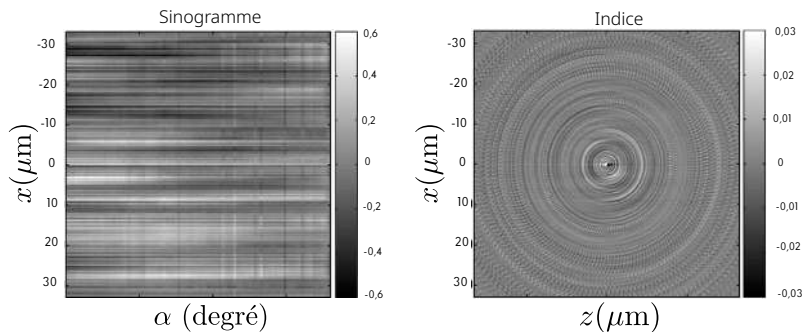


FIGURE 2.11 – Effet du bruit des hologrammes sur les reconstructions en tomographie ToRO. D’après [70].

- Éloigner l’objet de l’axe dans le cas de la tomographie ToRO. En effet, comme le bruit décroît avec la distance à l’axe, le rapport signal à bruit augmente. Cependant cette méthode pose des problèmes de refocalisation et recalage (précession).
- effectuer une acquisition à blanc (sans l’objet), puis soustraire les contributions sur les parties imaginaires et réelles.

La 3^e option est directe et semble simple à mettre en œuvre. Cependant la platine doit être très stable mécaniquement lors du déplacement effectué pour passer de l’objet à une zone «blanche».

Enfin, le bruit peut aussi être limité par l’emploi de sources basse cohérence, temporelle ou spatiale [26], notamment couplées à une caméra mesurant directement le front d’onde ou un système d’interférométrie à chemin commun. Ce sujet sera abordé dans la section 5 et la partie projet.

L’échantillonnage fréquentiel : influence du type de balayage et du nombre d’hologrammes

Il faut également noter que les images obtenues vont dépendre de la quantité de données (nombre d’hologrammes) collectées et du type de balayage. Le remplissage fréquentiel va bien sûr dépendre du nombre d’hologrammes, mais aussi du motif de balayage utilisé. Ce problème est abordé dans la section 3.1 et le projet.

2.4 Dispositif expérimental

La mesure en phase et amplitude du champ optique diffracté repose classiquement sur un montage interférométrique associé à un système de balayage angulaire de l’illumination et/ou de rotation de l’objet. La figure 2.12 détaille un interféromètre de type Mach-Zehnder, utilisé dans la plupart de nos systèmes en transmission. L’aspect microscopie est assuré par des optiques de grande ouverture numérique.

Mesure en phase. Une source cohérente est divisée par un cube séparateur en une onde d’illumination et une onde de référence. Ces deux ondes peuvent être injectées dans

des fibres optiques monomodes qui permettent d'ajuster la différence de chemin optique.

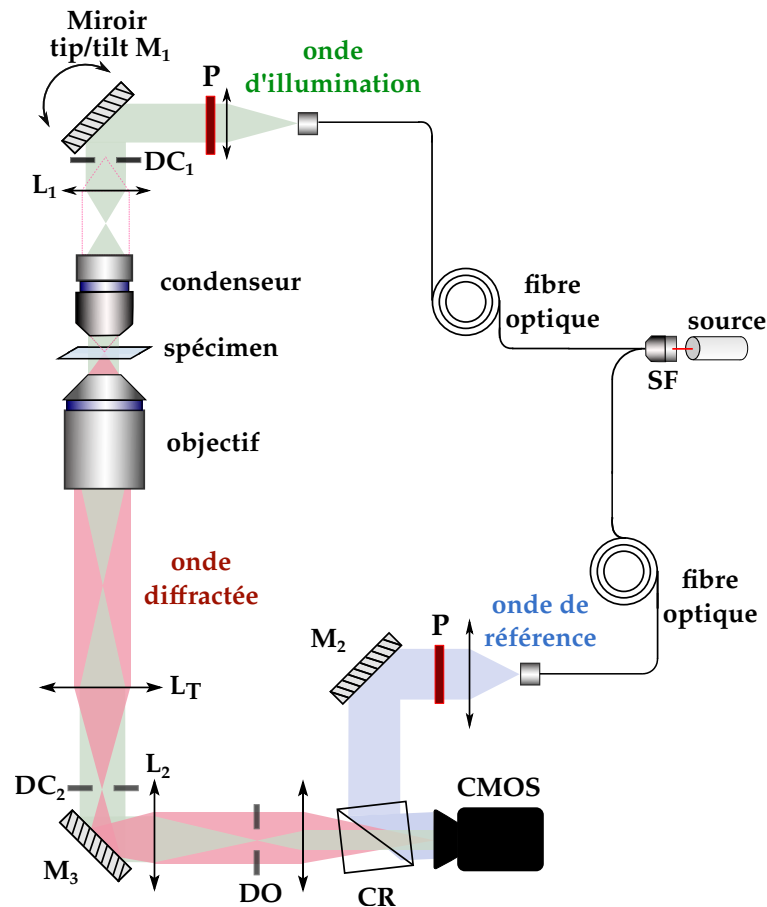


FIGURE 2.12 – Schéma du montage basé sur un interféromètre de Mach-Zehnder. DC : diaphragme de champ. DO : diaphragme d'ouverture. CR : cube recombineur. P : contrôle de polarisation.

Balayage. L'onde d'illumination est collimatée, puis réfléchi par le dispositif rotatif M1 (paires de miroirs galvanométriques, miroir unique actionné par moteurs, DMD, SLM...) qui permet de contrôler l'angle d'illumination. Dans notre cas, nous utilisons un miroir sur membrane actionné par bobines mobiles (*voice coil actuators*), référence FSM 300 chez Newport MKSI. Ce système permet des mouvements rapides, une grande répétabilité et un contrôle précis de ces mouvements grâce à l'asservissement assuré par la rétroaction entre le capteur angulaire et le pilotage électronique. Il permet un mouvement directement sur les 2 axes, contrairement aux 2 miroirs galvanométriques traditionnellement utilisés, qui rendent l'alignement plus difficiles et/ou le système plus encombrant. Contrairement aux systèmes à base de DMD, aucun filtrage n'est nécessaire, évitant l'ajout de bruit lié à la diffraction. Ce dispositif permet d'embarquer des miroirs plus épais, et donc de meilleure qualité ($\lambda/10$) que sur les dispositifs galvanométriques.

La bande passante est élevée par rapport aux moteurs pas à pas utilisés sur les premiers montages, le système pouvant théoriquement atteindre le kilohertz. En contrepartie, La plage angulaire est limitée à $\pm 1,5^\circ$, ce qui impose des contraintes sur le système de balayage.

Le pilotage de l'instrument s'effectue par l'ajustement des 2 tensions d'entrées V_x et V_y , contrôlant le mouvement selon les deux axes, dont la plage de fonctionnement est $[-10 \text{ V}; +10 \text{ V}]$.

Un convertisseur analogique-numérique U3 de la marque labJack [71] associé à un module `ljtick-dac` permet d'accéder à cette gamme de tension sur 14 bits.

L'onde d'illumination collimatée, issue du miroir de balayage, est focalisée par la lentille de balayage L1 dans le plan focal arrière du condenseur et une rotation du miroir entraîne alors un changement d'angle de l'onde plane illuminant l'objet (FIG. 2.13). D'une façon pratique, plutôt que d'utiliser un simple achromat, la lentille de balayage peut être avantageusement remplacée par un doublet de Plössl, qui permet de diminuer les aberrations [72] et qui est facilement obtenu à partir d'achromats disponibles au laboratoire. Des lentilles de tube conçues spécifiquement pour chaque marque, incluant des corrections associées à l'objectif, sont également disponibles [73].

La zone illuminée est limitée par le diaphragme de champ (DC1) proche du miroir M1. Il faut en effet s'assurer que le plan image soit proche du miroir de balayage, afin que le faisceau illumine toujours le diaphragme, et donc par conjugaison, l'objet. Ceci est facilité par la faible gamme angulaire (car en amont d'un objectif à fort grossissement), qui limite le déplacement du faisceau. Il n'y a donc pas besoin d'avoir une conjugaison stricte avec le plan du miroir de balayage, ce qui rend plus souple le placement de ce miroir.

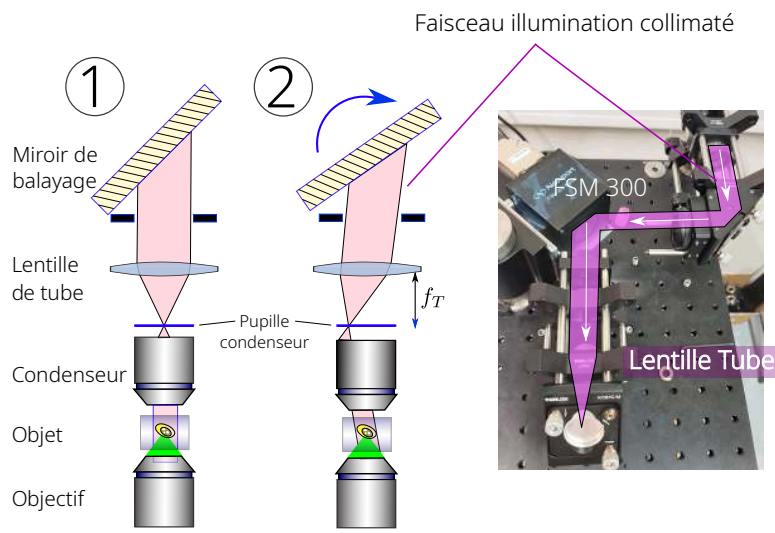


FIGURE 2.13 – Balayage de l'illumination en tomographie ToRI (double objectif). f_T : focale lentille de tube.

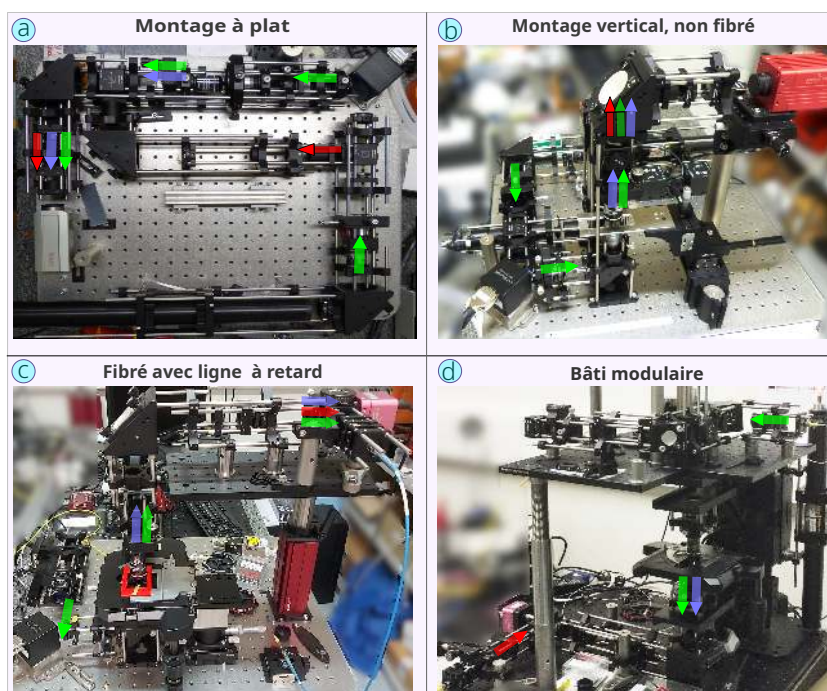


FIGURE 2.14 – Différentes structures utilisées pour la MTD en transmission. Flèche verte : illumination. Rouge : référence. Bleu : onde objet.

Formation de l'image. Un objectif corrigé à l'infini associé à une lentille de tube collecte l'onde diffractée. Les deux lentilles finales permettent d'ajuster le grandissement et donc de contrôler l'échantillonnage sur la caméra. Un diaphragme d'ouverture (DO) effectue un filtrage dans l'espace de Fourier, afin d'éliminer d'éventuelles réflexions parasites.

La détection est ici effectuée au focus (au plan de meilleure netteté) plutôt que dans un plan défocalisé, usuellement utilisé en holographie. La détection dans un plan image présente certains avantages au niveau de l'échantillonnage, du déroulement de phase et de la dynamique de la caméra (distribution d'intensité plus homogène, absence des hautes fréquences de la zone de Fresnel).

Structures utilisées. Le choix de la structure résulte d'un compromis entre modularité (souplesse d'adaptation), stabilité mécanique et facilité d'utilisation (FIG.2.14). Les montages à plat sont les plus simples, ils peuvent être simplement mis à la verticale une fois montés. Ils sont cependant peu adaptés aux contraintes en microscopie (stabilité, motorisation, encombrement des platines). Les montages complets à partir d'éléments optomécaniques personnalisés sont très modulaires et leur coût limité, au détriment de la stabilité à haute ouverture sans un travail opto-mécanique avancé. Les bâtis modulaires offrent un bon compromis. Remarquons toutefois qu'un montage utilisant 2 bras verticaux côte à côte est difficilement adaptable au bâti modulaire.

Remarques sur le capteur. Le détecteur est une caméra CMOS, utilisée en 8

bits, le bruit lié à la quantification étant indétectable au-delà de 6 bits [74, 75]. Dans la littérature, la qualité de la phase a été également mesurée en fonction de la profondeur en bits de la caméra : l'écart type minimum est de $\lambda/72000$ en 16 bits, et $\lambda/5370$ en 8 bits, montrant qu'une caméra 8 bits est suffisante⁸.

L'ensemble des programmes de contrôle est disponible dans le dossier [manipTomo5](#).

Comparaison holographie et tomographie diffractive ToRI

La figure 2.15 illustre la différence holographie/MTD dans l'extension et le remplissage de l'espace de Fourier avec un support obtenu expérimentalement sur un nombre limité d'hologrammes. Dans la pratique, le nombre d'acquisitions doit être suffisamment important pour assurer l'échantillonnage dans les hautes fréquences.

La différence avec l'imagerie holographique et les capacités de sectionnement selon l'axe optique sont illustrées sur les figures 2.16, 2.17.

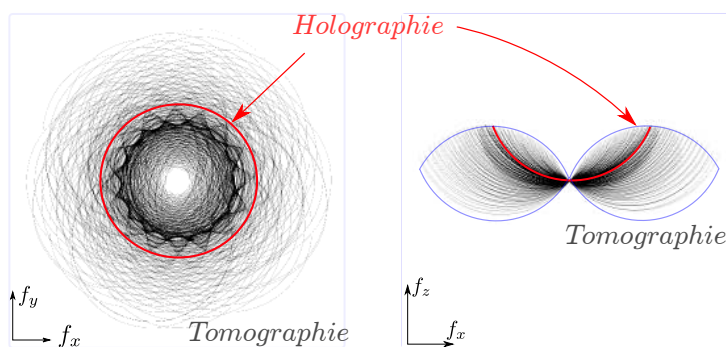


FIGURE 2.15 – Comparaison des supports fréquentiels obtenus expérimentalement en holographie et en tomographie diffractive ToRI. À gauche : coupe latérale basse fréquence (mais à fréquence f_{o_z} non nulle) en f_z . À droite : coupe longitudinale centrale ($f_{o_y} = 0$).

De plus comparé à un système de microscopie en champ large classique, l'imagerie tomographique diffractive amène aussi une amélioration de la transmission aux hautes fréquences, grâce à l'utilisation séquentielle d'ondes spatialement cohérentes (fig 2.18). La bande passante en tomographie est identique à celle en champ large, mais les fréquences sont transmises à 100% dans le cas tomographique sur un système parfait (sans aberration).

Il faut néanmoins remarquer que les amplitudes des fréquences spatiales sont donc transférées avec une valeur unité jusque sur les bords de l'OTF, puis tombent brutalement à zéro, ce qui peut entraîner des artefacts dans l'espace direct. À la façon des fenêtres d'apodisation classiquement utilisées (Hamming, Tukey, etc.), une apodisation peut être appliquée afin de lisser l'OTF sur les bords. Par exemple, un filtrage gaussien avec une largeur correspondant à 5% de la largeur maximum de la bande passante transverse, est appliquée à l'OTF dans [61].

8. Certains cas particuliers, par exemple en cas d'enregistrement multiple d'hologrammes par multi-

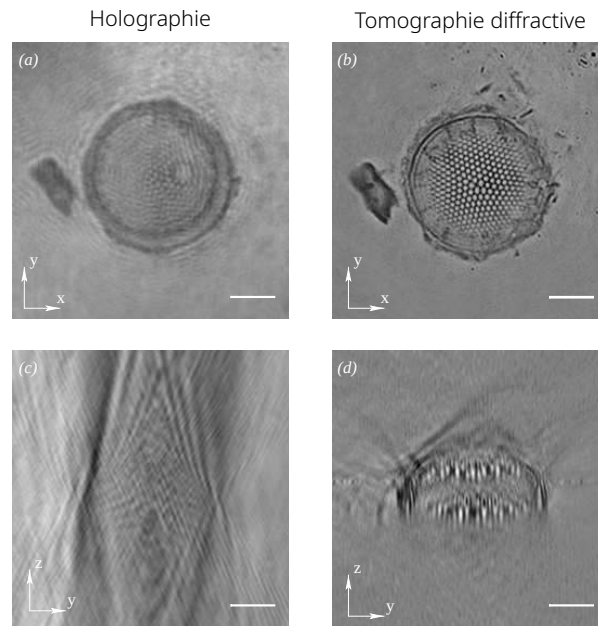


FIGURE 2.16 – Comparaison des images (partie réelle) obtenues en holographie (Born) et tomographie ToRI (Born) sur une frustule de diatomée de type *Coscinodiscus* SP. Barre d'échelle : 5 μm .

plexage, peuvent toutefois demander une dynamique plus importante [76].

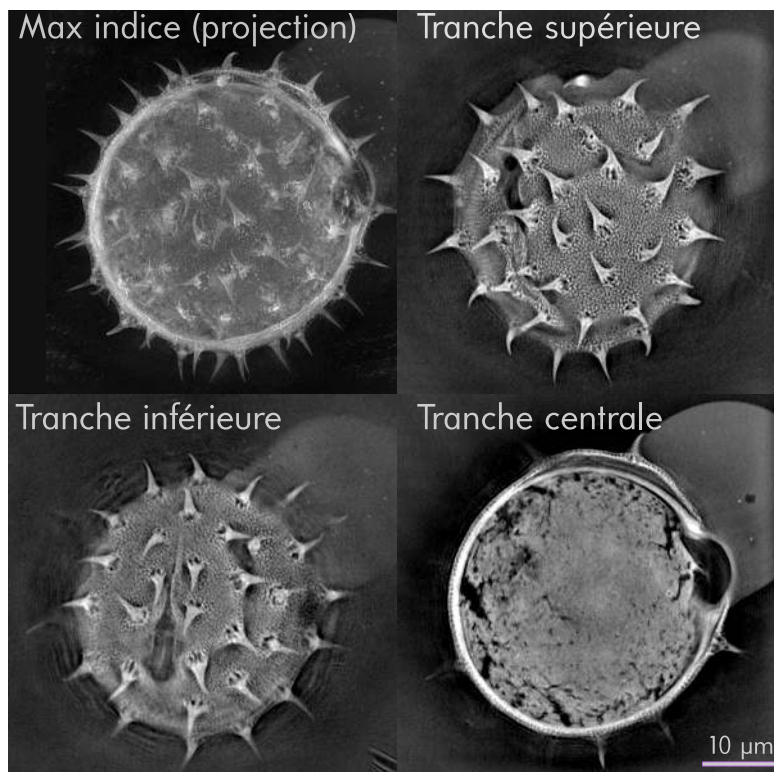


FIGURE 2.17 – Capacité de sectionnement illustrée sur 3 sections du volume d’indice d’un pollen de topinambour (*Helianthus tuberosus*). Pour comparaison, en haut à gauche, une projection du maximum.

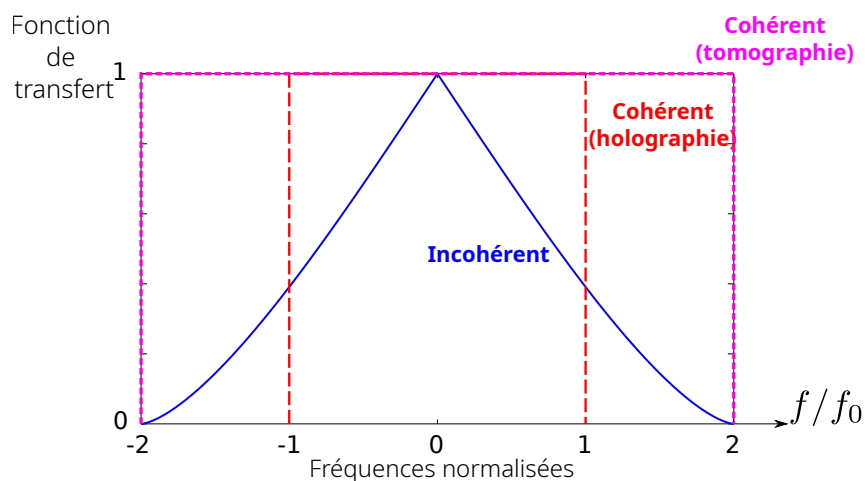


FIGURE 2.18 – Fonctions de transfert des fréquences en imagerie cohérente et incohérente pour un système parfait (D’après [34]). La fréquence f_0 est la fréquence de coupure dans le cas cohérent (holographie).

Microscope «universel»

La MTD permet d'enregistrer l'onde complète, en phase et en amplitude. Cette caractéristique permet de reconstruire d'autres modalités d'imagerie photonique, par manipulation de ces grandeurs, tout en les étendant à la troisième dimension. Les premiers tests ont été effectués dans la thèse de Hui Liu [77] (champ large, champ sombre . . .) puis étendus à de nombreuses modalités (Rheinberg, DIC . . .) dans le cadre du stage de master de Steve Laroche et la thèse de Riadh Abbessi [78, 79]. Le principe est illustré dans

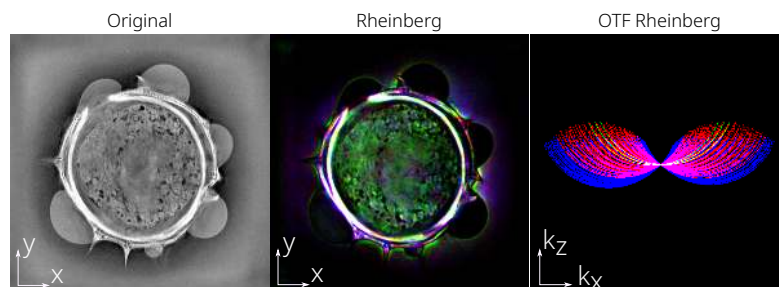


FIGURE 2.19 – Simulation d'une autre modalité d'imagerie, par illumination de Rheinberg. Pollen de topinambour (*Helianthus tuberosus*)

le cas d'une illumination de Rheinberg sur la figure (2.19) : le filtre coloré permettant d'illuminer par différentes couleurs des sections (annulaires) fréquentielles différentes est ici simplement remplacé numériquement par une sélection de ces colorations dans l'OTF.

Remarquons toutefois que des différences peuvent exister avec la modalité originale. Par exemple, l'absence de spéculaire dans le cas du champ sombre permet expérimentalement d'extraire des signaux très faibles, ce qui n'est pas le cas quand cette modalité est reproduite numériquement.

Calibration en transmission : quel matériau de référence ?

Le système est ensuite testé avec des échantillons au moins partiellement connus en taille et indice, montées dans l'Eukitt : billes silice ($\Delta n < 0$), billes latex ($\Delta n > 0$) ou PMMA.

Il n'existe pas de matériaux de référence possédant toutes les qualités pour calibrer la MTD en transmission, c'est à dire à l'échelle microscopique, 3D, calibré en taille, indice et absorption. Vérifier le grandissement en 2D avec un objet de dimensions connues est assez aisé, mais calibrer en indice ou absorption à l'échelle du micron en 3D est plus problématique. Les billes utilisées en microscopie de fluorescence peuvent ainsi avoir des caractéristiques en indice voire en taille très dispersées.

Cas des billes de silice. À l'échelle microscopique, les billes de dioxyde de silice (SiO_2) sont fabriquées par le procédé sol-gel⁹ Stöber-Fink-Bohn (SFB) [80] qui utilise la

9. La technique sol-gel permet la synthèse de verres, céramiques et de composés hybrides organominéraux, à partir de précurseurs en solution, dans des conditions dites de chimie douce (températures nettement plus basses que celles des voies classiques de synthèse)

réaction des tetraalkyl silicates avec l'eau dans l'alcool et permet d'obtenir des matériaux de taille et de forme contrôlée. Ces billes présentent cependant parfois des variations de taille (solution non monodisperse) et surtout un intervalle d'indice possible non seulement assez étendus d'après le fabricant, mais encore plus variables d'après la littérature, notamment quand les dimensions diminuent.

L'intervalle typique $\Delta n = [1,43-1,46]$ peut varier selon le lot et la taille, et présenter des valeurs nettement inférieures : $[1,38-1,42]$ pour les billes de $5 \mu\text{m}$ [81]. Notons qu'ici l'indice de réfraction est mesuré par la méthode d'adaptation d'indice (Index Matching Method) qui consiste à mesurer l'intensité de la diffusion d'une solution contenant le matériau en silice dans un mélange glycérine/eau. C'est donc une méthode volumique, et non d'imagerie : la variation de la concentration de glycérine produit un changement contrôlé de la constante diélectrique du solvant et la correspondance entre l'indice de réfraction (connu) du solvant et celui des billes de silice a lieu lorsque la transmission de la lumière est maximale. Un signal de diffraction minimum indique en effet l'adaptation d'indice entre billes et glycérine. La méthode est aussi utilisée pour caractériser la diffraction de suspension de billes de polystyrène [82] dans une solution de sucrose. L'indice à $632,8 \text{ nm}$ peut varier de $1,33$ à $1,44$ selon la concentration en sucrose. On peut remarquer que c'est une méthode simple pour adapter l'indice du milieu de montage.

Une méthode modifiée de fabrication, proposée en 1999, nécessite un traitement au fluorure de sodium et une étape de calcination [83]. Il semble que la température lors de la calcination joue un rôle important sur l'indice de réfraction [84]. Pour les diamètres plus élevés, les valeurs d'indice se rapprochent de celles du verre de quartz (*fused silica*), $n = 1,456$. Les variations d'indice avec la température de calcination sont notamment expliquées par l'hydrophilie de la silice en surface et la formation de nanopores à l'intérieur du matériaux, qui peuvent aussi provoquer des changements dans les dimensions [84].

En conclusion, on voit donc que ces billes permettent d'encadrer les valeurs d'indice, mais pas d'avoir une calibration absolue en indice. Elle permettent toutefois de vérifier rapidement le grandissement (solution monodisperse) ainsi que l'ordre découpé en hors-axe (signe de la phase) lors de la phase de montage du système. L'intervalle maximum permet également de tester les algorithmes itératifs sous contraintes (voir paragraphe 3.2.2). Ces objets présentent aussi un intérêt pour vérifier les algorithmes de diffraction, grâce aux solutions exactes en diffusion de Mie ([85], annexe B).

Enfin, bien que confidentiel, on peut noter qu'une équipe [86] a développé un fantôme 3D calibré en dimensions et indice. Il est fabriqué par lithographie biphotons, dans laquelle un faisceau laser focalisé est balayé dans une résine liquide afin de la polymériser. L'ajustement de la trajectoire de balayage et du temps d'exposition du faisceau laser permet de contrôler simultanément la géométrie imprimée en 3D (précision de l'ordre de 100 nm) et l'indice (précision de l'ordre de 5×10^{-4} , Δn maximal = $0,03$ dans la structure) en 3D.

2.5 Remarques sur la mise en œuvre numérique

Voici une section qui pourra paraître basement technique et donc relativement décalée¹⁰ dans un tel document. Il semble pourtant difficile d’oublier complètement les aspects numériques dans un microscope ne donnant d’image que dans un ordinateur. . . De façon aussi brève que possible, le cadre de développement, et certains aspects spécifiques à la MTD sont décrits, ainsi qu’un passage sur l’intérêt du GPU dans un contexte de volume de données de plus en plus important (données 3D, complexes, polarimétriques. . .).

Cadre de développement

Différents liens vers le code parsèment déjà le document général, mais rappelons que l’ensemble du code est public et disponible sur [le dépôt github de l’équipe](#). Le code que j’ai développé à l’origine en `C` a été réécrit en `C++` : il utilise surtout la bibliothèque standard et des APIs de haut niveau. Les parties faisant appel à de l’arithmétique de pointeurs ou de la gestion mémoire ont disparu. Une version python, développée par Nicolas Verrier est également disponible. La plupart des licences logicielles sont libres et les APIs sont multiplate-formes : `fftw` pour la `fft` CPU (GPL), `Arrayfire` (BSD2-clause) pour le GPU, `liblabjackusb` (MIT) pour le contrôleur analogique numérique, `OpenCV` (BSD/Apache2) pour divers traitements (inversion SVD, interpolation etc.), `libTiff` (BSD) et `wXWidget` pour l’interface graphique (L-GPL). Seule la bibliothèque caméra, `eBUS-sdk`, possède une partie propriétaire.

Intérêt du calcul sur GPU

L’intérêt des utilisateurs pour l’imagerie temps réel ainsi que la complexité croissante des traitements (déroulement, imagerie tomographique polarimétrique . . .) nous a poussé à étudier l’intérêt du calcul sur GPU. Une partie des calculs peut en effet être basculée sur l’architecture d’une carte graphique, dont l’intérêt est d’être massivement parallèle.

En dehors des entrée/sorties et des algorithmes itératifs, les parties les plus gourmandes concernent le découpage hors-axe ([fonction `Holo2TF`](#), dont le coût principal est la `fft`, en général 1024x1024 en scalaire et 2048x2048 en polarimétrie) et le déroulement de phase global [87] reposant lui aussi fortement sur des `fft`. L’algorithme de la `fft` est particulièrement efficace, permettant de passer d’une complexité quadratique $O(n^2)$ en une complexité linéarithmique $O(n \log(n))$. Mais l’efficacité repose aussi sur la parallélisation entre hologrammes. La première partie est encore plus critique dans le cas de l’imagerie polarimétrique 3D, puisque la conception de la caméra polarimétrique impose des champs encore plus grands, typiquement 2048x2048, multipliant par 4 le nombre d’éléments.

Si les premiers travaux réalisés par Jonathan Bailleul [88] ont été effectués avec le SDK CUDA, [la bibliothèque `ArrayFire`](#) a été ensuite utilisée, avec l’avantage d’être assez

10. Et aussi rapidement obsolète, vus les progrès rapides des APIs et des systèmes de génération automatique de code. Mais il s’agit d’une bonne nouvelle. . .

haut niveau comparée aux SDK CUDA et OpenCL. Elle est aussi multi-plateforme et indépendante du matériel : le code écrit avec cette bibliothèque peut donc être compilé sur différents systèmes, mais aussi fonctionner sur carte Nvidia, AMD, Intel voire CPU en l'absence de carte graphique dédiée. L'API essaiera successivement de trouver CUDA, OpenCL, avant de basculer sur CPU. Cette API offre donc une grande souplesse par rapport à un développement spécifiquement dédié à une classe de GPU.

Le tableau 2.1 regroupe les temps de calcul pour les 2 opérations les plus coûteuses. Lors du calcul sur GPU, le transfert de l'hôte à la carte est une étape qui peut peser beaucoup sur la vitesse.

Deux cas sont ici illustrés :

- pour la première opération, les hologrammes sont d'abord placés dans une pile, le volume obtenu (typiquement $1024 \times 1024 \times \text{Nombre d'hologrammes}$) n'est transféré qu'une seule fois vers l'hôte, afin de minimiser ce coût de transfert.
- Pour la 2^e opération, chaque opération est effectuée image par image, et contient donc autant de transferts (aller-retour) vers le GPU que d'hologrammes.

	Nvidia	OpenCL	CPU	t_{cpu}/t_{cuda}	t_{cpu}/t_{opencl}
Holo2TF	0.075	0,380	20,7	276	55
Déroutement de phase	1,78	2,70	7,76	4,4	2,9

TABLE 2.1 – Temps en ms pour 1 hologramme et gain comparé au calcul sur CPU. Acquisition en 1024×1024 pour Holo2TF.

Les calculs ont été effectués sur Nvidia RTX 2060 (6Go, 1920 cœurs CUDA) pour OpenCL (build 823e8e39) et CUDA (10.2, 64-bit Linux, build 823e8e39), et AMD Ryzen 3600X (6 threads pour la `fftw`). La version 3.8.1 de l'API ArrayFire a été utilisée.

Les gains sont très importants pour la 1^e fonction : la découpe hors-axe ne prend plus que 30 ms pour 400 hologrammes si bien que dans la 1^e partie du code (extraction des champs complexes), le chargement des images est de loin l'opération la plus coûteuse. L'ensemble (chargement des images+découpe) prend environ 1s pour 400 hologrammes.

Pour la 2^e fonction, les transferts de et vers la carte graphique pénalisent beaucoup la vitesse, mais le facteur de gain reste intéressant, aussi bien en OpenCL qu'en CUDA. Le déroulement sur GPU prend moins d'une seconde pour 400 hologrammes.

Ces résultats montrent que même en prenant en compte les entrées (chargement des hologrammes), les calculs des champs complexes peuvent se faire en temps réel [89], c'est à dire ici plus rapidement que l'acquisition, qui prend typiquement 4s pour 400 hologrammes. Au delà de l'aspect temps réel sous la 1^e approximation de Born, le calcul sur GPU prend une importance cruciale avec les reconstructions avancées évoquées dans la partie projet.

Les fonctions GPU sont implémentées dans le fichier `GPU_fonctions`.

La TFD : calibration de l'indice et normalisation, symétrisation

La transformée de Fourier discrète en espace et en fréquence (Discrete Fourier transform ou DFT) est un des éléments de base du code de reconstruction. La reconstruction (CPU utilisant la bibliothèque `fftw` ou GPU utilisant la bibliothèque `arrayfire`) calcule une transformée de Fourier discrète spatiale par un algorithme de transformée de Fourier rapide (FFT). Pour un signal x monodimensionnel de N échantillons dans l'espace direct, l'amplitude du k^e coefficient X_k dans l'espace de Fourier est donnée par :

$$X_k = \sum_{n=0}^{N-1} x_n e^{-2j\pi \times kn/N} \quad (2.53)$$

La DFT inverse vaut :

$$x_n = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} X_k e^{2j\pi \times kn/N} \quad (2.54)$$

Le terme $1/N$ est un terme de normalisation qui n'est pas inclus dans le calcul par la `fftw` : un calcul de FFT suivi par une FFT inverse via la `fftw` donne donc des valeurs multipliées par N en 1 dimension, N^2 en 2D etc. Le façon de normaliser le calcul est laissée à l'utilisateur et dépend de la convention choisie. On peut par exemple simplement multiplier par \sqrt{N} à l'aller et au retour ou multiplier par N uniquement au retour pour économiser une division. Cependant, dans le cas de la tomographie 3D, il faut prendre quelques précautions lors de la normalisation car la FFT directe est calculée en deux dimensions, alors que la FFT inverse est calculée en 3D, ce qui empêche de normaliser de façon classique : un facteur N apparaîtrait lors du calcul. Si on définit la transformée de Fourier continue (CFT) comme :

$$X(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t) e^{-j\omega t} dt \quad (2.55)$$

On peut rapidement faire le lien avec la DFT en discrétisant la transformée de Fourier continue sur un intervalle fini de N échantillons (voir par ex [90], p23) :

$$X(2\pi k \Delta f) \simeq T_e \sum_{n=0}^{N-1} x(nT_e) e^{-2j\pi kn/N} \quad (2.56)$$

avec $N = 1/(\Delta f T_e)$ où $T_e = \Delta t$ est la période d'échantillonnage. Le signal $x(t)$ appartient à $[0, NT_e]$. Elle permet de calculer une valeur numérique approchant la transformée de Fourier continue. L'amplitude de la DFT doit donc être multipliée par la période d'échantillonnage (Δx et Δy dans le cas spatial). Cette opération permet de toujours calculer les valeurs approchées de la transformée et donc résout le problème de normalisation lors du passage de la 2D à la 3D.

Il faut enfin noter que Wolf utilise une convention de transformée non unitaire, en vecteur d'onde, qui introduit un coefficient $1/(2\pi)^D$ (D la dimension) lors du calcul de la transformée de Fourier inverse, ce qui ajoute un coefficient 2π supplémentaire par rapport à la valeur du potentiel objet calculée numériquement.

Ces fonctions sont implémentées dans le fichier `fft_fonctions.cpp`. Les coefficients (physiques) de normalisation peuvent être trouvée dans la fonction `retropropag_born` du fichier `fonctions.cpp`.

2.6 Applications : biologie, matériaux, imagerie multimodale

Il est connu depuis longtemps que l'imagerie phase agit comme agent de contraste sans marquage, permettant d'étudier la morphologie d'un objet biologique et d'imager des structures invisibles avec d'autres techniques. La MTD apporte en plus une précision sur la grandeur physique et la localisation spatiale grâce à sa meilleure résolution 3D.

La MTD peut donc être une solution alternative à l'imagerie microscopique de fluorescence sur les échantillons difficilement marquables par des fluorophores et/ou trop transparents pour être observés en champ clair. En imagerie corrélative, elle apporte une information différente et complète donc celle apportée par la fluorescence aussi bien en imagerie biologique qu'en sciences des matériaux. Ceci est illustré dans les 2 paragraphes suivants, ainsi que dans la partie sur l'imagerie en réflexion.

2.6.1 Intérêt en biologie : intérêts et illustrations

L'information de phase intégrée est reliée à la masse sèche. Par exemple, dans le cas de la globuline et de l'albumine sérique, il existe un lien simple entre la concentration \mathcal{C} en masse sèche (en mg.L^{-1}) et la phase intégrée φ [91] :

$$\varphi = \alpha \mathcal{C} d \tag{2.57}$$

où d est l'épaisseur, α est le coefficient d'incrément spécifique de réfraction, $\frac{\partial n}{\partial \mathcal{C}}$, qui caractérise le taux de variation de l'indice de réfraction d'un composé en fonction de sa concentration dans un solvant.

Les modifications de cette grandeur sont liées à tous les processus métaboliques et structuraux de la cellule [92]. L'imagerie de phase ou en indice permet ainsi de suivre les modifications des paramètres quantitatifs au cours du cycle cellulaire [92]. Elle peut révéler des structures spécifiques à certaines pathologies : par exemple, une différence significative entre les cellules normales et malignes peut être mise en valeur [93]. L'indice de réfraction du noyau cellulaire est ainsi très sensible dans la détection de certains cancers, présentant un intérêt particulier dans les cellules d'apparence histologiquement normale.

La microscopie tomographique diffractive a donc été appliquée à des échantillons biologiques très variés : diatomée, globules blanc, globules rouges infectés par plasmodium [43], bourgeonnement viraux [94], macrophages, neurones [95], hépatocytes, immunologie, croissance et migration cellulaire [96, 97], etc.

Imagerie multimodale, complémentarité fluorescence/MTD

L'imagerie corrélative permet d'associer différents modes d'imagerie microscopique (SHG, CARS . . .), complétant en général l'information de fluorescence [98, 99]. De la même façon, l'imagerie de phase étant non fonctionnelle, des mesures corrélatives phase et imagerie de fluorescence sont particulièrement intéressantes ([5, 94]).

Ces mesures permettent de souligner l'apport en tomographie diffractive sur des structures biologiques variés : mitochondries, adiposomes (gouttelettes lipidiques [100]), lysosomes, chromosomes, nucléoles (FIG. 2.22, 2.27) . . .

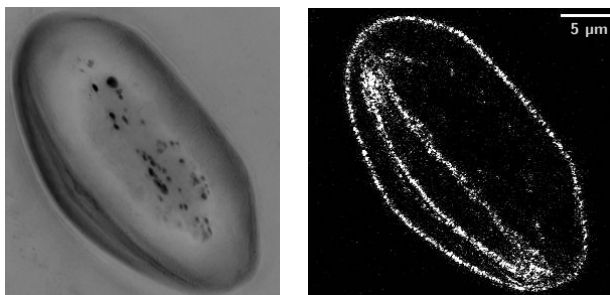


FIGURE 2.20 – Pollen de perce-neige en tomographie diffractive ToRI (partie réelle) et confocal (auto fluorescence)[101].

Pour réaliser cette imagerie corrélative au laboratoire, le MTD original a été équipé avec une tête confocale Olympus FV300 fonctionnant à 543 nm. Le système permet alors de comparer facilement holographie, tomographie et imagerie confocale.

La figure (2.20) montre une image de pollen de perce-neige en confocal (autofluorescence) et en tomographie diffractive. Afin de travailler avec la meilleure résolution possible, nous travaillons avec le sténopé (pinhole) fermé au maximum et une image obtenue en 10 passes (10 images moyennées) afin de maximiser le rapport signal sur bruit. L'imagerie tomographique permet, sans marquage, d'imager à la fois les structures externes et internes du pollen, ces dernières étant difficilement visibles en confocal.

L'intérêt de l'imagerie simultanée MTD-fluorescence est illustré par 2 autres exemples ci-dessous.

Bourgeoisement viral

L'imagerie tomographique a été appliquée à l'observation de bourgeoisement viral [94]. Les échantillons ont été préparés selon le protocole brièvement décrit ci-dessous, par Anne Beghin (centre de quantimétrie, Université Claude Bernard, Lyon). Les cellules fixées et immunomarquées ont été imagées au centre commun de quantimétrie avec un microscope confocal Leica TCS-SP2, objectif 63X NA 1.32, HLX PL APO. Les coordonnées de la zone d'intérêt sont repérées puis retrouvées grâce à la platine motorisée.

Il s'agit de cellules A549 (carcinome pulmonaire humain) conservées dans un milieu DMEM, et contaminée par la souche virale A/Moscow/10/99 A(H3N2), obtenue au Centre National de Référence (Lyon, France) et cultivée sur une lignée cellulaire

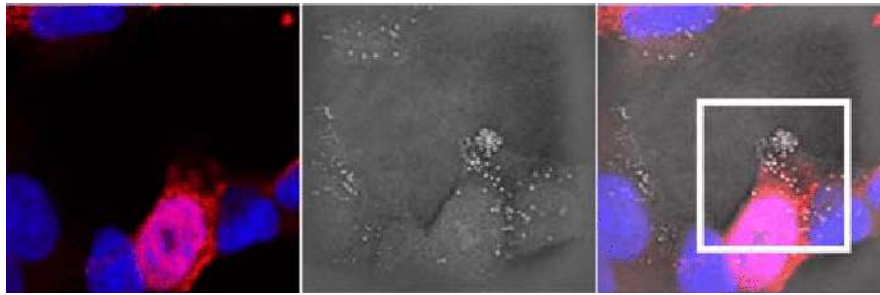


FIGURE 2.21 – Bourgeonnement viral observé en MTD (milieu) et confocal (gauche). À droite : imagerie multimodale superposant les deux précédentes.

MDCK (Madin–Darby Canine Kidney). Les cellules ont été fixées au formaldéhyde, perméabilisées à l’aide du détergent Triton X-100. L’échantillon a été marqué à l’aide du fluorochrome Alexa633¹¹ et au DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, marquage du noyau). Le protocole complet de préparation est décrit dans [102].

La MTD a permis de mettre en évidence des particules sphériques présentes uniquement sur les cellules infectées (FIG. 2.21). Ces structures, non observées sur l’imagerie de fluorescence, pourraient correspondre aux bourgeonnements viraux.

Adhérence de cellule Saos-2 sur micropiliers

L’imagerie corrélative fluorescence/MTD a également été utilisée pour vérifier l’ac-croche de cellules Saos2 sur des micropiliers de 4 μm de hauteur (FIG. 2.22). Les cellules ont été marquées à la phalloïdine (actine) et au DAPI (noyau). Certaines structures (nucléoles) ainsi que l’interaction avec les micro-piliers sont mises en évidence en MTD.

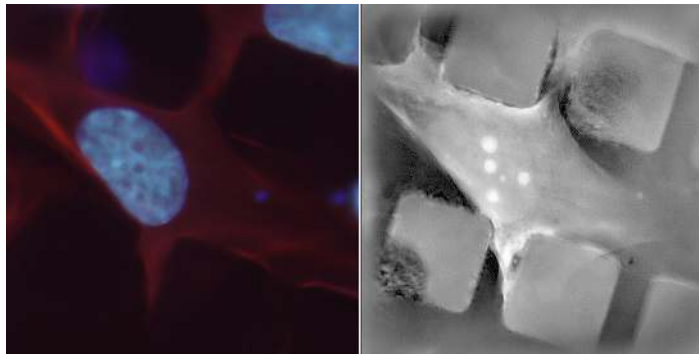


FIGURE 2.22 – Observation multimodale de l’adhérence de cellules Saos-2 sur un sub-strat spatialement hétérogène (Échantillon K. Anselme/IS2M Mulhouse). À gauche : microscopie de fluorescence (DAPI, phalloïdine). À droite : tomographie diffractive.

11. Ces fluorochromes peuvent être couplés à des anticorps primaires ou secondaires (qui se lient aux anticorps primaires), ou encore à des molécules permettant de révéler la structure cellulaire comme l’actine ou la tubuline

Cellules épithéliales de joues : intérêt comparé absorption/indice

La croissance et la morphogenèse de l'épithélium sont essentielles au développement de nombreux organes. Elles sont gouvernées par le programme génétique intrinsèque mais aussi par les signaux fournis par les tissus ou cellules voisines. Les cellules se développant dans du matrigel développent des structures complexes difficiles à observer autrement (construction du réseau de cellules endothéliales, structures 3D). C'est pourquoi des techniques d'ensemencement tridimensionnel des cellules épithéliales dans la matrice extracellulaire ont été développées et sont maintenant utilisées dans de nombreux domaines (embryologie, biologie cellulaire, oncologie, etc.)

Ces milieux sont particulièrement intéressants à observer en MTD, qui permet d'imager sans marquage ces structures 3D complexes. Dans le cadre de l'imagerie corrélative, on peut aussi remarquer que le MTD donne accès *directement* à deux grandeurs 3D, absorption et indice, fournissant des informations différentes.

Protocole. Des cellules épithéliales de la lignée cellulaire HME-1C (*human microvascular endothelial cells*) préparées en milieu DMEM ont été insérées dans du matrigel, polymérisé ensuite à 37°C. Après une semaine de culture, les grappes de cellules ont été fixées au liquide de Bouin, déshydratées à l'alcool puis immergées dans du xylène et enrobées de paraffine. Le xylène est enfin utilisé comme milieu de montage. Pour davantage de détails concernant le protocole de préparation, voir [94, 102].

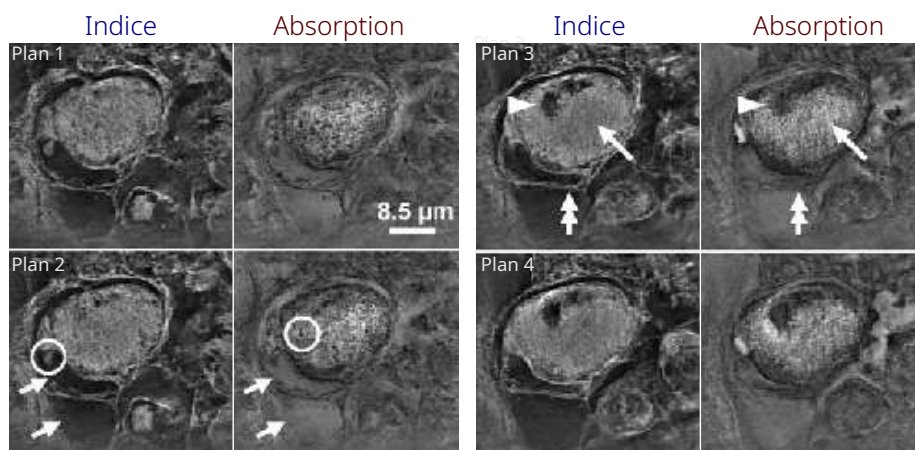


FIGURE 2.23 – Cellules HME1-c, absorption et réfraction. Sections en z à 4 profondeurs différentes.

La nature des différents éléments observés a été identifiée par analogie. Les flèches blanches (plan 2) désignent de probables vésicules de sécrétions. Les pointes de flèches blanches (plan 3, haut) correspondent probablement aux nucléoles. La flèche blanche (plan 3 à droite) à un noyau et la double pointe de flèches à une membrane cytoplasmique (plan 3, bas). D'autres détails (cercle blanc, plan 3) dans les vésicules de sécrétion et le noyau restent néanmoins indéterminés.

2.6.2 Imagerie multimodale sur matériaux

La MTD présente également un intérêt dans le domaine des matériaux. Cet aspect sera particulièrement souligné dans la partie concernant le montage en réflexion. L'imagerie en transmission a toutefois été testée sur un support « lacey carbon » utilisé en microscopie électronique. Ces films minces avec une structure en dentelle (*lacey*) sont utilisés en microscopie électronique, en alternative aux supports en forme de grilles. Ils sont utilisés pour l'étude des cristaux en sciences des matériaux ou les échantillons en cryo-microscopie électronique [103]. Leur épaisseur varie de 20 à 190 nm selon le fabricant [104] : elle est donc sous la résolution des dispositifs optiques utilisés dans notre comparaison.

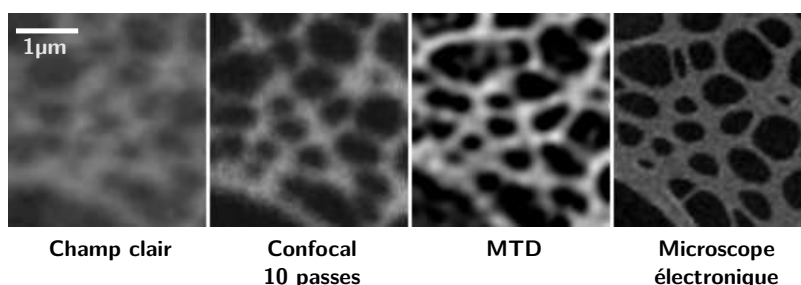


FIGURE 2.24 – Image d'un support lacey carbon par 4 techniques : champ clair, confocal, microscope tomographique par balayage de l'illumination et image de référence en microscopie électronique [105].

Ces échantillons nous ont permis de comparer différentes modalités de microscopie (FIG. 2.24) : champ large en lumière blanche, confocal en autofluorescence (10 passes moyennées pour améliorer le rapport signal sur bruit), la microscopie tomographique diffractive et enfin la microscopie électronique donnant l'image de référence.

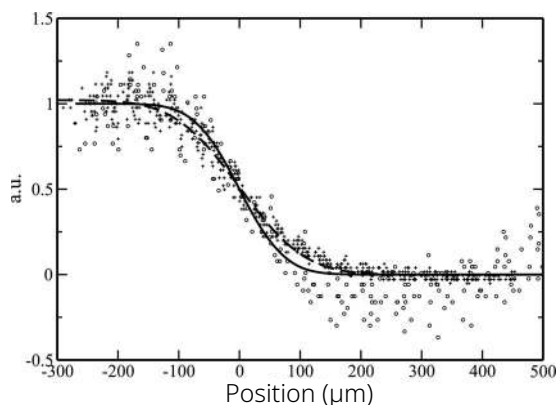


FIGURE 2.25 – Ajustement de l'ERF sur les 25 profils de bord extraits de la figure 2.24 pour l'image confocale (croix et tirets) et MTD (cercles et traits pleins).

Pour de tels objets composés de filaments, la résolution peut être estimée par la pleine

largeur à mi-hauteur (FWMH : *Full width at half maximum*) de la fonction d'étalement de ligne (LSF : *line spread function*). Cependant, cette mesure est rendue difficile par le bruit et surtout l'échantillonnage correct d'une telle fonction. Il est cependant possible d'estimer la LSF à partir de la fonction de réponse d'un bord (ERF : *edge response function*) qui n'est pas alignée avec la grille d'échantillonnage du capteur [106, 107]. Ceci permet de multiplier les profils de bord insuffisamment échantillonnés : ces profils sont décalés de façon sous-pixelique grâce au désalignement. On estime alors par un ajustement sur une fonction de bord les positions successives de chaque courbe pour enfin les réajuster numériquement et les fusionner sur une même fonction. La fusion de ces données permet de reconstituer une ERF correctement échantillonnée. La méthode a été ici appliquée à 25 profils ajustés sur la fonction de bord décrite dans [107] à l'aide d'un algorithme de Levenberg–Marquardt. La résolution obtenue est de 129 nm sur l'image MTD, supérieure à celle obtenue pour le confocal (199 nm) qui travaille pourtant à une longueur d'onde inférieure (540 contre 633 nm). Il faut bien sûr noter que le principal avantage de l'imagerie confocale (meilleur sectionnement) ne peut être illustré sur un échantillon mince : ce type d'échantillon favorise donc l'imagerie MTD.

Remarquons enfin que l'intérêt du contrôle du spectre angulaire sur des échantillons 2D sera mis en perspective dans le chapitre concernant la réflexion (profilométrie ou topographie multiangle), mais dans un rôle tout à fait différent.

2.6.3 Transfert de technologie

Dans le cadre de l'IDEX de Strasbourg (AAP projet innovant), un MTD a été développé à l'IGBMC (Institut de Génétique, Biologie moléculaire et Cellulaire, Illkirch) dans l'équipe de Marc Ruff en collaboration avec l'équipe imagerie/optomécanique (resp : Bertrand Vernay/Didier Hentsch). Les applications concernent la biologie, notamment l'étude de la structure et des fonctions des complexes impliqués dans le cycle de réplication du VIH. Le système a suivi un processus itératif d'amélioration, afin de

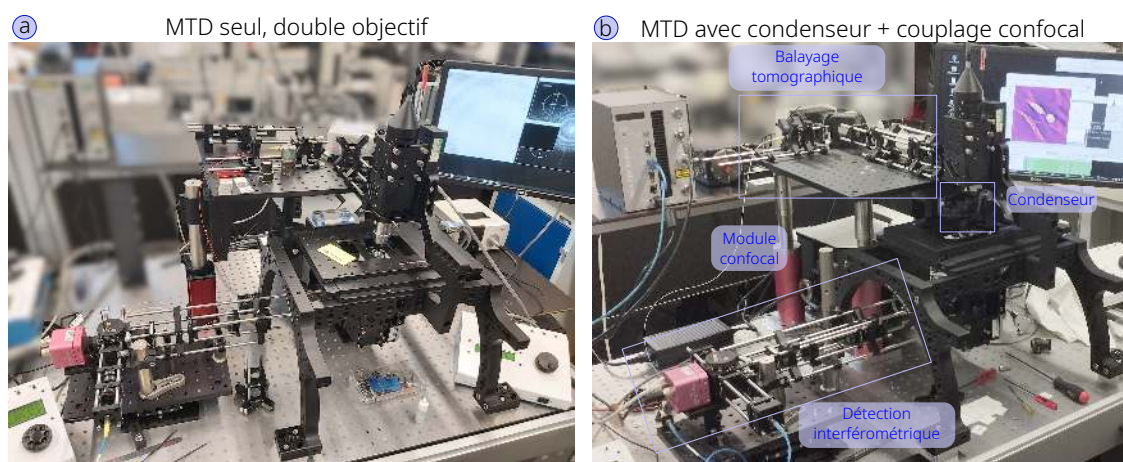


FIGURE 2.26 – Systèmes ASI développés à l'IGBMC

rendre la technique accessible aux non-physiciens : ergonomie de la partie expérimentale, distance de travail, interface graphique, accélération des temps de calcul via GPU...

La structure originellement développée (système à cage) a été ensuite remplacée par un bâti RAMM de la société ASI (FIG. 2.26). La dernière version dispose d'un condenseur (NA 1,4) à grande distance de travail, remplaçant le condenseur objectif : la taille de pupille supérieure explique la présence de lentilles relais afin d'augmenter la plage angulaire de balayage (FIG. 2.26 b). L'ensemble a été couplé à une tête confocale.

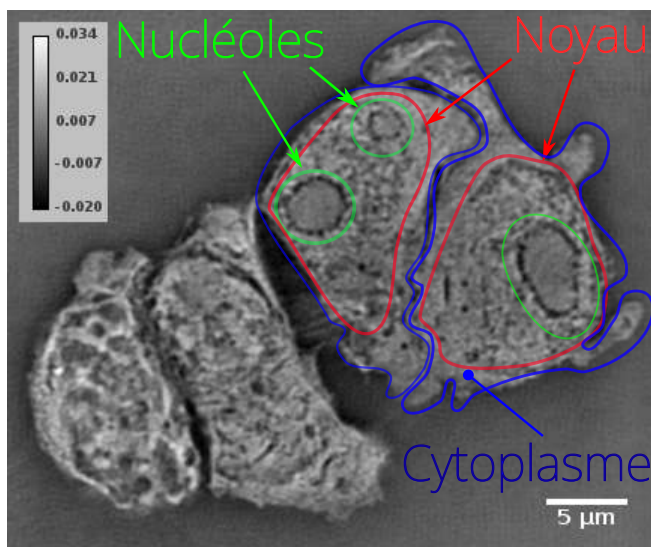


FIGURE 2.27 – Cellules HEK293, valeurs du contraste d'indice sans post-traitements. Échantillon : Julien Batisse. Système : Didier Hentsch.

Une des images obtenues est visible sur la figure 2.27.

2.7 Résumé et orientations choisies

Le premier système a été réalisé avec un système d'holographie à décalage de phase, utilisant une reconstruction sous approximation de Born ou Rytov.

Ces modèles associés ensuite à un montage d'holographie hors-axe et à la synthèse d'ouverture, permettent d'obtenir une imagerie 3D quantitative sans marquage dans des temps de l'ordre de la seconde, avec une bande passante supérieure à l'holographie ou une OTF améliorée par rapport à l'imagerie en champ large. Le choix de la synthèse d'ouverture par variation du spectre angulaire d'illumination est apparu le plus judicieux, compte tenu des problèmes expérimentaux et/ou logiciels des autres techniques mentionnées précédemment.

Ces qualités trouvent de nombreuses applications en biologie ou en matériaux, pour les échantillons non marquables ou en imagerie corrélative.

Ce mode d'imagerie souffre cependant de plusieurs problèmes : dégradation de l'illumination avec la profondeur, invalidité de l'approximation de Born, remplissage (échanti-

llonnage) de l'OTF, problème du cône manquant de fréquence. Les 2 premiers problèmes seront abordés dans la partie projet. La partie suivante aborde les 2 derniers problèmes.

Dans le cadre de l'imagerie de Fourier, l'OTF obtenue en MTD est limitée par plusieurs phénomènes : échantillonnage limité (lacunes fréquentielles au sein de l'OTF), cône manquant et bien sûr bande passante latérale limitée.

L'extension du support fréquentiel au sens large vise donc à améliorer le remplissage et étendre ce support dans toutes les directions. La première partie concerne l'optimisation du motif de balayage, étudiée dans les thèses de L. Foucault [108] et A.M. Taddese [85]. L'utilisation des symétries est ensuite évoquée : elle permet d'éviter les artefacts liés à un remplissage asymétrique. Les algorithmes itératifs sous contraintes permettent d'obtenir une imagerie *vraiment quantitative*, toujours sans modifier le système de base. Enfin l'imagerie par tomo-iso (ToRIO) permet d'obtenir directement une imagerie quantitative, au prix d'un système expérimental plus complexe (Thèse de J. Bailleul [88]).

3.1 Motif de balayage et taux de remplissage de l'OTF

Problématique. La qualité de l'image 3D reconstruite dépend étroitement de la synthèse d'ouverture qui permet d'augmenter l'information spectrale mais aussi la redondance d'information qui assure un lissage du bruit. Le taux de remplissage de l'espace de Fourier dépend évidemment du nombre d'hologrammes acquis, mais aussi de leur répartition dans l'espace de Fourier, c'est à dire des positions des sphères d'Ewald qui sont liées au motif de balayage. Par la suite, nous appellerons motif ou pattern de balayage la position successive des composantes latérales des vecteurs incidents (k_{ix}, k_{iy}) dans l'espace de Fourier 2D (pupille de l'objectif).

Intuitivement, on comprend bien qu'un motif imposant une forte redondance sera moins efficace sur le taux de remplissage spectral qu'un motif répartissant les sphères de façon plus variée, mais comment répartir le plus efficacement possible ces sphères

d'Ewald, et quel critère de qualité doit on adopter sur les images reconstruites ?

Les motifs de balayage. Dans la suite, l'échantillon est balayé par l'onde d'illumination de coordonnées spectrales (voir FIG. 2.8) :

$$k_{ix} = |\vec{k}_i| \cos \varphi_i \sin \theta_i \quad (3.1)$$

$$k_{iy} = |\vec{k}_i| \sin \varphi_i \sin \theta_i \quad (3.2)$$

$$k_{iz} = |\vec{k}_i| \cos \theta_i$$

Historiquement, un balayage suivant une grille cartésienne (x, y) était utilisé, mais ce motif crée de larges vides dans l'OTF. Il a donc été rapidement abandonné pour un motif en rosace. Il présente cependant un intérêt pratique : c'est le motif fixe des grilles de LED, qui ont été utilisées en MTD basse cohérence [109].

Spirale. Parmi les motifs curieusement utilisés dans la littérature, on trouve le balayage en spirale (FIG. 3.1b) qui ne présente pourtant pas d'avantage particulier si ce n'est une certaine simplicité et un mouvement relativement lisse du balayage. En outre, le motif est asymétrique et l'OTF qui en résulte est elle aussi asymétrique, ce qui peut potentiellement faire apparaître des artefacts (voir paragraphe 3.2). Des doubles spirales permettent de limiter le problème, sans l'éliminer complètement. Ce motif n'est donc pas utilisé.

Rosace. Le motif en grille a été remplacé par un balayage en étoile (axes séparés de 60°), qui présente une symétrie centrale. Un motif en rosace (FIG. 3.1a) a ensuite été envisagé, car il augmente la densité aux hautes fréquences et limite les mouvements brusques du miroir, ce qui était critique pour le temps d'acquisition avec les moteurs pas à pas utilisés sur le premier système.

Ce motif permet une répartition plus homogène des fréquences, mais un remplissage légèrement moins bon. On remarque cependant sur la figure 3.1(a) que les zones hautes fréquences sont malgré tout peu denses. Cette idée d'augmenter la densité aux hautes fréquences nous a incités à réfléchir sur l'efficacité des motifs décrits ci-dessous.

Fermat. Le motif de Fermat repose sur l'idée d'échantillonner de façon homogène le plan de balayage. C'est un motif connu pour son homogénéité obtenue à partir d'une courbe analytique et des valeurs précises des paramètres. Si dans l'équation des coordonnées paramétriques $(x, y) = (\sqrt{\theta} \cos m\theta; \sqrt{\theta} \sin m\theta)$ le paramètre m est égal au nombre d'or $m = \pi(3 - \sqrt{5}) \simeq 2,40$, on obtient le schéma particulier répartissant les points de façon relativement uniforme [110] (FIG. 3.1 c). Ce motif améliore le remplissage mais manque encore de densité aux hautes fréquences.

3D uniforme

On cherche finalement à échantillonner la surface d'Ewald (et non le motif de balayage 2D) des rayons incidents de façon uniforme : comment alors choisir le plus efficacement les coordonnées (k_{ix}, k_{iy}) des N spéculaires afin de générer des coordonnées 3D «bien» réparties sur cette sphère ?

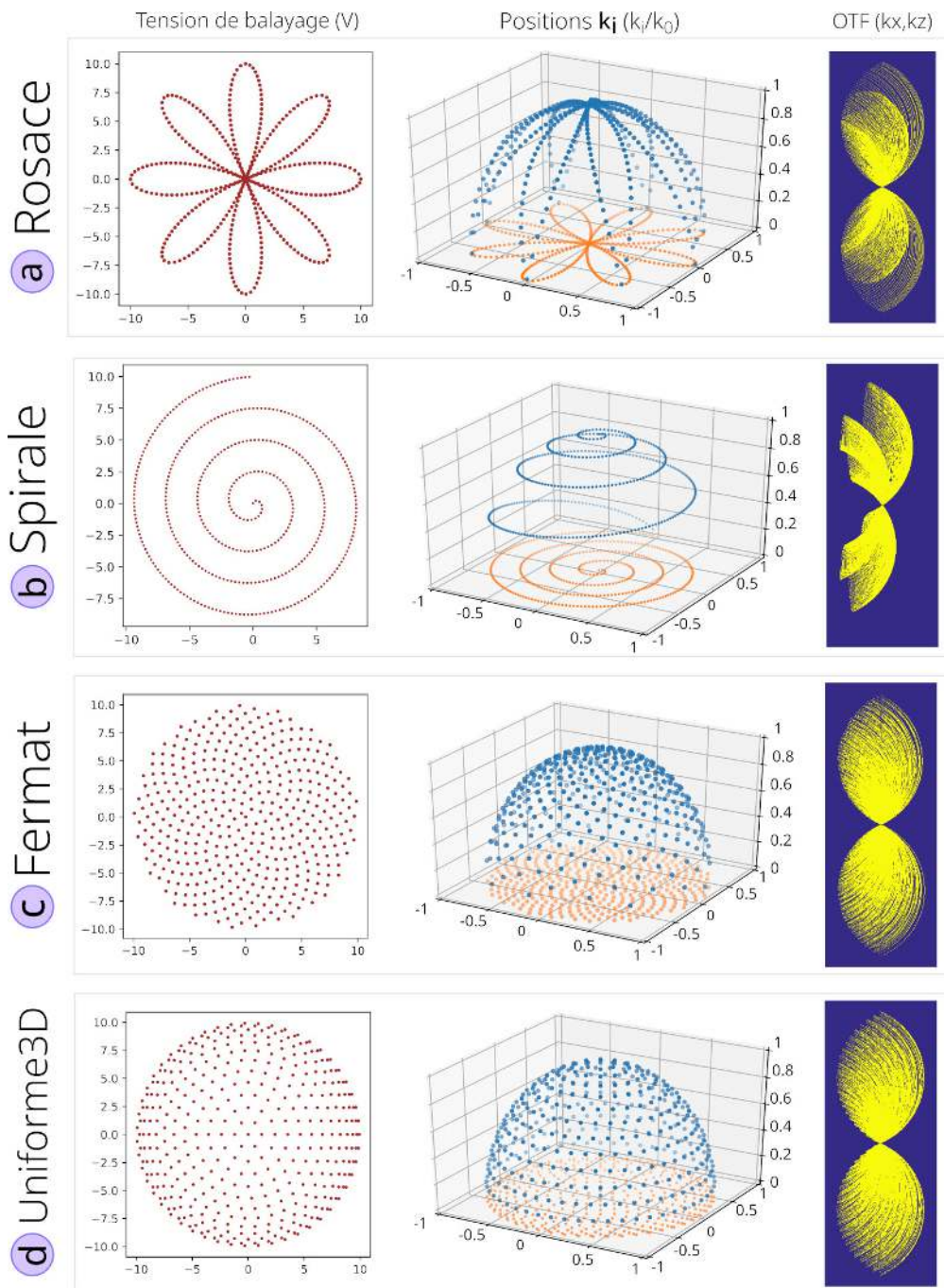


FIGURE 3.1 – Balayages sur 400 angles. À gauche : Positions (k_{ix}, k_{iy}) dans la pupille de l'objectif. Au centre : positions 3D des \mathbf{k}_i . À droite : coupe longitudinale de l'OTF. a) Rosace 4 axes, avec échantillonnage régulier en abscisse curviligne. b) Spirale d'Archimède (échantillonnage angulaire constant). Noter que l'OTF produite est dissymétrique c) Fermat. Échantillonnage régulier en abscisse curviligne. d) Uniforme3D.

Des problèmes similaires ont déjà été étudiés, comme le problème de Thomson, concernant la minimisation de l'énergie d'un ensemble d'électron placés sur une sphère, ou en biologie, le problème de Tammes, concernant la distribution des pores sur un grain de pollen, mais ils ne présentent pas de solution pour un nombre de points arbitraires [111, 112]). On peut néanmoins facilement produire une solution approchée de bonne qualité. Pour cela, on ne peut échantillonner régulièrement selon les angles θ et ϕ : il faut placer des cercles séparés d'une distance constante l_θ , puis sur ces cercles, placer des points à une distance régulière $l_\phi \simeq l_\theta = d$ (FIG. 3.2).

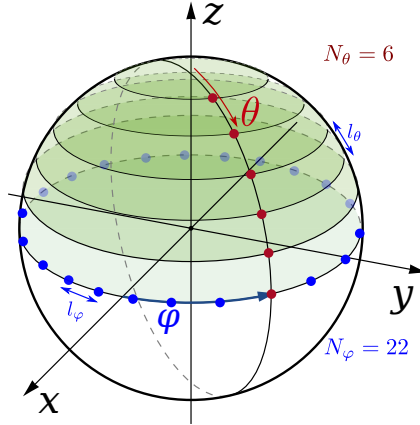


FIGURE 3.2 – Principe du schéma uniforme 3D : $l_\theta \simeq l_\phi \simeq d$

Le problème est de déterminer le nombre de points N_ϕ dans chaque cercle concentrique (en bleu) et le nombre N_θ de ces cercles. Pour cela on part d'une astuce pour estimer ce chiffre, en utilisant la surface moyenne par point : $A = \frac{\text{Surface totale}}{N}$ qui doit être égale à la surface élémentaire délimitée par $l_\theta l_\phi = A$, dont on déduit la distance approximative entre points $d = \sqrt{A}$.

On peut alors facilement déduire le nombre N_θ de cercles concentriques à placer sur le quart de cercle "polaire" (en rouge), de contour $\pi R/2$ pour une demi-sphère d'Ewald : $N_\theta = \frac{\pi R}{2d}$. La variation angulaire $\Delta\theta$ vaudra $\frac{\pi-0}{2N_\theta}$.

On procède ensuite de même en échantillonnant le périmètre de chaque cercle concentrique avec $l_\phi \simeq d$, de rayon $R \sin \theta$:

$$N_\phi = \frac{\text{périmètre cercle}}{l_\phi} = \frac{2\pi R \sin \theta}{l_\phi} \quad (3.3)$$

Enfin, on échantillonne en ϕ .

La répartition peut-être faite sur une demi-sphère (3D-UDHS) ou une portion de demi-sphère (3D-UDCS). L'algorithme 3 résume les opérations pour une demi-sphère.

Ce motif possède le taux de remplissage le plus élevé¹ en transmission et réflexion, et il est privilégié lors des acquisitions [113, 114]. Le tableau 3.1

1. Pour un échantillon absorbant. Dans le cas d'un échantillon transparent, le motif annulaire est optimal pour des raisons de symétrisation, voir ci-dessous.

Algorithm 3 Répartition homogène de N points sur une demi sphère de rayon unité. A : surface moyenne par point. d : distance moyenne entre 2 points. cptHolo : numéro de l'hologramme. N_ϕ : nombre de points par cercles concentriques. Voir FIG. 3.2 pour les variables d'espace

```

 $N \leftarrow \text{nbHolo}$ 
 $A \leftarrow \frac{2\pi}{N}$  /*surface moyenne par point*/
 $d \leftarrow \sqrt{A}$  /*distance entre points*/
 $N_\theta \leftarrow \frac{\pi}{2d}$ 
 $\theta_m \leftarrow \pi/2$ 
 $\Delta\theta \leftarrow \frac{\theta_m}{N_\theta}$ 
for numCercle=0 to  $N_\theta$  do
     $\theta \leftarrow \text{numCercle} \times \Delta\theta$ 
     $N_\varphi \leftarrow \left(\frac{2\pi \sin \theta}{d}\right)$ 
    for numPt = 0 to  $N_\varphi$  do
         $\varphi \leftarrow 2\pi \frac{\text{numPt}}{N_\varphi}$ 
         $ki_x = \sin \theta \cos \varphi$ 
         $ki_y = \sin \theta \sin \varphi$ 
         $ki_z = \cos \theta$ 
    end for
end for

```

Motif	Taux de remplissage (%)
Annulaire (3 cercles)	50,0
Annulaire (max NA)	39,0
Étoile	46,0
Fermat	48,9
Rosace	49,3
Spirale	46,4
Uniforme3D	52,9

TABLE 3.1 – Taux de remplissage de la FTO en fonction du motif de balayage (400 hologrammes)

récapitule les taux de remplissage obtenus entre différents motifs. Un critère d'erreur quadratique a également été appliqué entre un objet référence et les résultats obtenus avec les différents motifs [113], sur données simulées et expérimentales. Dans le cas expérimental, l'objet de référence est reconstruit avec 600 hologrammes et un motif 3D-UDHS (FIG. 3.4), et l'efficacité entre les différents motifs est comparée avec 60 hologrammes. La figure 3.3 illustre les résultats en simulation avec un nombre limité d'hologrammes.

L'implémentation de l'ensemble des motifs est trouvable dans le fichier [scan.functions](#).

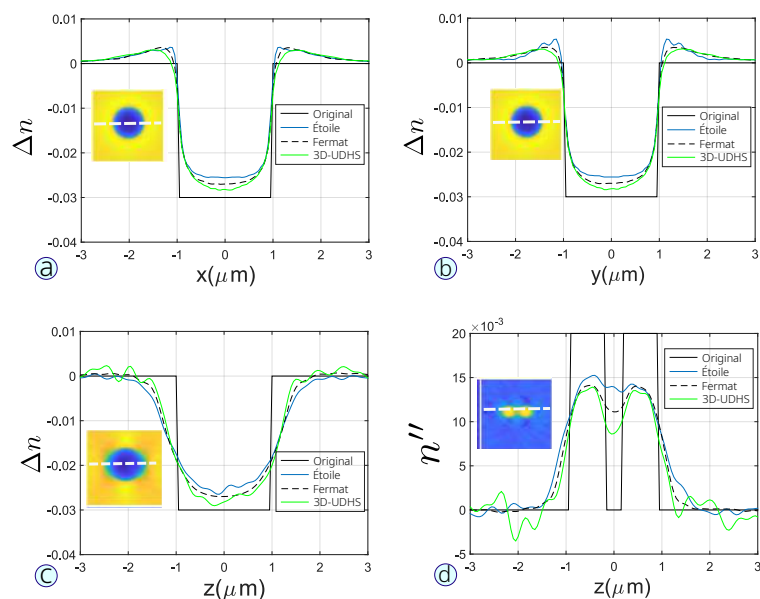


FIGURE 3.3 – Illustration de l’efficacité des différents motifs par simulation avec un nombre limité d’angles (60) : Étoile (3 branches), Fermat et 3D-UDHS. L’objet est une bille possédant 2 inclusions centrales absorbantes. Les profils d’indice (a-b-c) sont extraits sur une coupe centrale selon les 3 axes. Les inclusions absorbantes sont tracées sur la figure d.

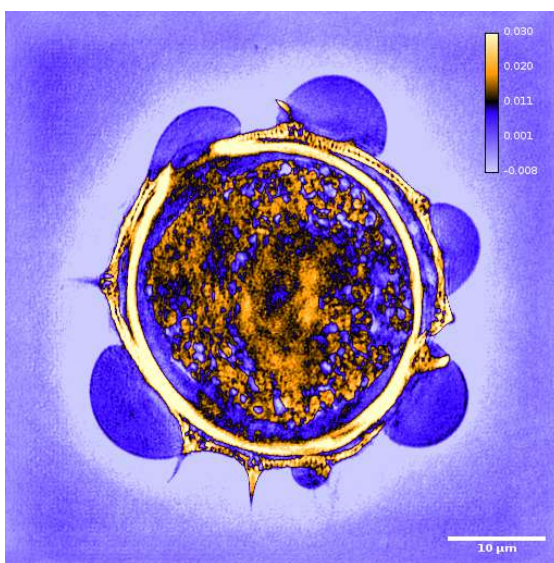


FIGURE 3.4 – Contraste d’indice de réfraction d’un pollen de topinambour, obtenu par balayage 3D-UDHS, sans post-traitement, avec 60 hologrammes, donc de qualité maximum : il s’agit de l’image de référence. Les écarts de profils entre les différents balayages obtenus pour 60 hologrammes sont disponibles dans [113].

3.2 Optimisation du remplissage par symétrie spectrale ou contraintes

3.2.1 Symétries spectrales

Une OTF asymétrique conduit à une mauvaise estimation de l'indice complexe, principalement en mélangeant les parties réelles et imaginaires des fréquences spatiales de l'objet.

Pourtant, quel que soit le motif de balayage utilisé, l'OTF obtenue en transmission ne peut être symétrique par rapport au plan (xoy) à cause du principe même de construction. Le placement des calottes de sphère d'Ewald montre que la limite des basses fréquences est construite avec les bords inférieurs de ces calottes, ce qui brise la symétrie par rapport au plan (f_x, O, f_y) (FIG. 3.5). Les erreurs de reconstruction sont logiquement d'autant plus prononcées que le nombre d'hologrammes est faible.

Au delà des artefacts morphologiques, cette dissymétrie peut entraîner l'apparition de structures inexistantes, liée aux propriétés de symétrie de la transformée de Fourier. Par exemple, les échantillons non absorbants, qui ont un intérêt particulier en biologie, présentent une symétrie spectrale hermitienne : $\hat{F}(k) = \hat{F}^*(-k)$. Autrement dit, la dissymétrie créée par le mode de construction de l'OTF peut faire apparaître une absorption inexistante. Dans le cas général, quand cela est possible, augmenter le nombre d'hologrammes acquis permet de masquer ce phénomène en améliorant l'échantillonnage sur les bords inférieurs, au détriment de la vitesse d'acquisition et de la quantité de données à gérer.

Mais on peut également tirer profit de ces propriétés de symétries spectrales de l'échantillon. Ainsi, pour un échantillon transparent, une solution simple est de symétriser le spectre : un balayage annulaire à ouverture numérique maximum suivi d'une symétrisation présentera un excellent taux de remplissage, proche des 90% pour 600 angles [85].

L'utilisation de la symétrie est donc un moyen d'améliorer l'image via l'échantillonnage, mais également de simplifier l'acquisition et le traitement (durée, complexité).

Les échantillons axisymétriques sont un exemple extrême, pour lesquels la symétrie permet de restituer complètement l'information 3D par simple rotation des spectres tomographiques, l'OTF obtenue est alors équivalente à celle obtenue en tomo-iso [115].

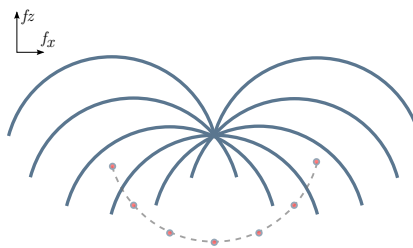


FIGURE 3.5 – Par construction, l'OTF obtenue est dissymétrique par rapport au plan (f_x, f_y) .

3.2.2 Algorithmes itératifs de type Gerchberg-Saxton

L'aspect quantitatif de la MTD est limité par la présence du cône manquant de fréquence : le contraste d'indice est alors sous-estimé. Si l'on dispose de connaissances a priori sur l'objet, la reconstruction peut-être associée à un algorithme itératif sous contraintes, pour compenser les asymétries de l'OTF et/ou les lacunes spectrales. D'une

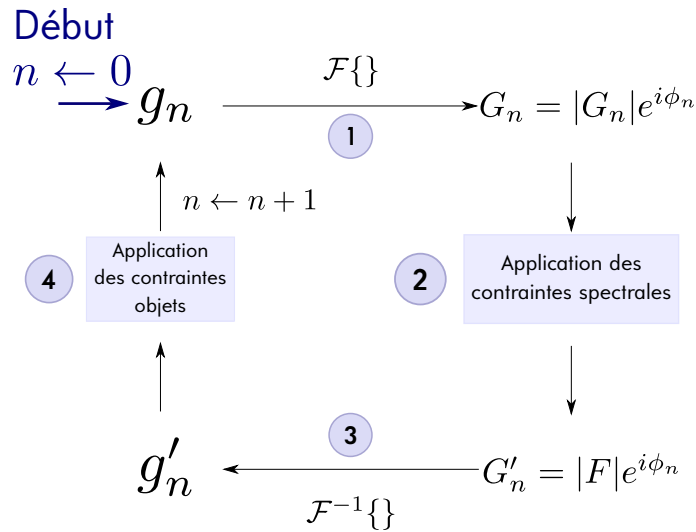


FIGURE 3.6 – Algorithme de Gerchberg-Saxton pour le problème du recouvrement de phase avec 2 mesures d’intensités. Les lettres majuscules désignent les spectres. L’algorithme débute en haut à gauche, avec une estimée g_0 de l’objet. $|F|$ est le module spectral expérimental, ϕ la phase, n le numéro d’itération.

façon générale les fréquences manquantes (nombre limité d’hologrammes, cône manquant de fréquence, etc.) peuvent être partiellement restaurées.

L’algorithme de Gerchberg-Saxton (GS) a été initialement mis au point pour résoudre le problème de la reconstruction de la phase à partir de deux mesures d’intensité (spectre et espace direct) [116]. Ces algorithmes reposent sur une série d’aller-retour (*méthode des projections alternées*) entre 2 espaces à l’aide d’un opérateur de propagation, par exemple la transformée de Fourier. Des contraintes liées à l’objet ou les données expérimentales sont appliquées successivement dans l’espace de Fourier et l’espace direct.

L’algorithme de base, démarrant sur une estimée de l’objet, repose sur quatre étapes simples (FIG. 3.6) :

1. Transformation de Fourier d’une estimée de l’objet
2. Remplacement du module de la TF calculée par le module de Fourier mesuré pour obtenir une estimation de la transformée de Fourier
3. Transformation de Fourier inverse de cette estimation
4. Remplacer le module de l’image obtenue par le module de l’objet mesuré afin d’obtenir une nouvelle estimée de l’objet.

Fondamentalement, le mécanisme repose sur le fait qu’une modification de la distribution d’amplitude d’une partie de la transformée de Fourier entraîne une modification globale des distributions d’amplitude et de phase dans l’espace direct, et inversement. L’algorithme de Gerchberg-Saxton est généralisable à une large classe de problèmes [117] : tout problème dans lequel des contraintes (mesures expérimentales ou information a priori) sont connues dans deux espaces, usuellement l’espace direct et l’espace de

Fourier. Par exemple, dans le cas du recouvrement de phase avec une seule mesure d'intensité spectrale, la mesure du module objet est manquante et l'étape 4 est remplacée - par exemple - par une contrainte de positivité, à savoir :

$$g_{n+1}(x) = \begin{cases} g'_n(x) & \text{si } x \in \gamma \\ 0 & \text{sinon} \end{cases}$$

avec γ l'ensemble des points respectant les contraintes objet (points à valeurs positives).

Cette généralisation de l'algorithme de Gerchberg-Saxton est parfois appelée *algorithme de réduction des erreurs* car l'erreur diminue à chaque itération. Elle est équivalente à une méthode de minimisation de l'erreur par descente de gradient [117]. L'erreur est en général calculée à chaque itération par un calcul de différence quadratique dans l'espace image ou de façon équivalente dans l'espace de Fourier (écart entre estimée et spectre mesuré), le théorème de Parseval assurant leur égalité.

Ces algorithmes présentent l'avantage de n'utiliser que des `fft` et des opérations basiques : ils peuvent donc être implémentés efficacement et simplement. Un algorithme de type GS a été implémenté dans le [programme Tomo_GPS](#).

Application à la MTD

En MTD, la contrainte sans doute la plus évidente est celle de positivité pour le coefficient d'extinction κ , mais des contraintes plus fortes peuvent être appliquées si l'échantillon n'absorbe pas ($\kappa = 0$) ou si l'on dispose de connaissances a priori sur l'indice.

Choix d'un objet de test et de contraintes réalistes. Les billes de silice sont des objets simples, calibrés en taille et non absorbants, dont les valeurs d'indice se rapprochent des protéines condensées et amorphes ($n = 1,40$ [118]). Une contrainte réaliste et assez souple peut être obtenue par encadrement des valeurs possibles de l'indice : ces billes ont une variabilité d'indice liée à leur mode fabrication (voir paragraphe 2.4), dont les valeurs extrêmes fixent un intervalle $[1,38-1,46]$, soit un intervalle maximum $\Delta n_{\min-\max} = [-0,12, -0,03]$ dans l'Eukitt (valeurs fabricant entre 1,49 et 1,51). La contrainte utilisée ici sera plus souple, avec un intervalle $[-0,15, 0]$.

Simulations et reconstructions. La figure 3.7 montre les résultats obtenus en simulation sur une bille de silice de $5 \mu\text{m}$ de diamètre, les 3 colonnes montrant la bille originale, la bille reconstruite en TDM et le traitement GS. Les valeurs obtenues sont illustrées sur les profils de la figure 3.8. La simulation TDM est réalisée en suivant les mêmes étapes de reconstruction que les données expérimentales.

La bille reconstruite en TDM montre les artefacts classiques de reconstruction : cône manquant de fréquence entraînant une déformation selon z et une sous estimation de l'indice. L'algorithme itératif montre deux améliorations intéressantes. D'une part le remplissage des lacunes de fréquences à l'intérieur de l'OTF en doughnut, rendant inutile une interpolation dans l'espace de Fourier. D'autre part, un remplissage partiel du cône manquant de fréquences, qui se traduit par une restauration du profil et une

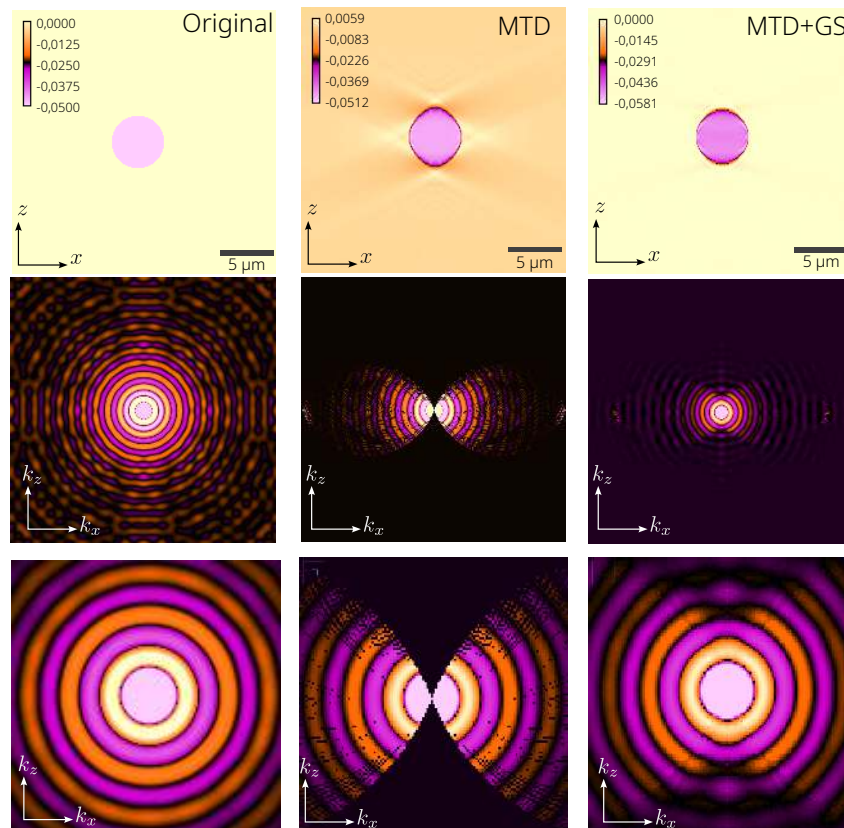
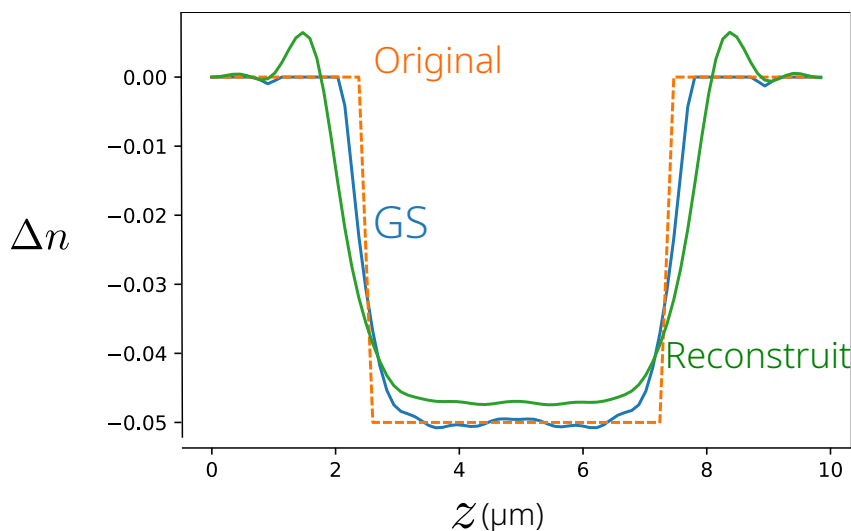


FIGURE 3.7 – Algorithme Gerchberg-Saxton appliqué à une bille de $5 \mu\text{m}$ de diamètre (Δn original= $-0,05$) simulée, 10 itérations. Les colonnes montrent respectivement la bille originale, la reconstruction et l'image traitée. Ligne 1 : section de l'image dans un plan ($x - z$). Ligne 2 : spectre complet dans un plan ($k_x - k_z$). Ligne 3 : agrandissement de la ligne 2 sur la zone centrale. Les contraintes sont $\kappa = 0$ et $-0.15 < \Delta n < 0$.


 FIGURE 3.8 – Comparaison des profils selon l'axe z dans une coupe centrale.

amélioration de la résolution, notamment en z . Ces fréquences dépassant la limite d'Abbe de l'instrument, c'est le seul cas pour lequel on peut parler d'image «super résolue».

Cet algorithme, offrant un bon compromis rapidité/qualité de reconstruction, est une alternative intéressante aux reconstructions par problème inverse. Il a servi de base de comparaison à l'algorithme itératif utilisant la méthode BPM, et développé dans le cadre de l'ANR HORUS [119], détaillé dans la partie projet.

Si elles sont relativement simples à implémenter et rapides, ces méthodes présentent cependant plusieurs limites, notamment en cas d'un rapport signal à bruit dégradé. Si elles garantissent que l'erreur diminue à chaque itération, la convergence vers un optimum global n'est pas garantie. Des problèmes de surinterprétation des données (*overfitting*) peuvent apparaître, le bruit augmentant après un certain nombre d'itérations. Les données ne tiennent pas compte de la statistique de bruit et donc de la qualité inégale des mesures [120]. Signalons toutefois que récemment, des approches associant méthodes des projections alternées et régularisation sont apparues [121]. Cependant, ces problèmes sont plus classiquement gérés dans le cadre plus général des problèmes inverses (minimisation explicite d'un critère d'attache aux données). Elles seront abordées dans la partie projet.

3.3 Tomographie par rotation de l'objet et de l'illumination (ToRIO)

3.3.1 Principe

Le cône manquant de fréquence peut donc être rempli de façon numérique par des techniques itératives sous contraintes, mais cela nécessite des connaissances a priori sur

l'objet.

La tomographie par rotation de l'objet (décrite à la section 2.3.1) est une solution à première vue évidente au problème du cône manquant. Expérimentalement, elle pose cependant des problèmes spécifiques : les échantillons doivent être préparés de façon spécifique, les objets étant classiquement insérés dans une micropipette [28], une fibre creuse [56], etc. qui sont ensuite entraînées en rotation par un moteur.

De plus, la rotation de l'objet souffre de problèmes de précession et de défocalisation [122]. La multiplication des angles de rotation de l'objet pose des problèmes au niveau du recalage des images. Enfin, même si ce mode tomographique est effectué parfaitement, le spectre reste incomplet (trognon de fréquence manquant) et la résolution latérale reste inférieure à la tomographie ToRI.

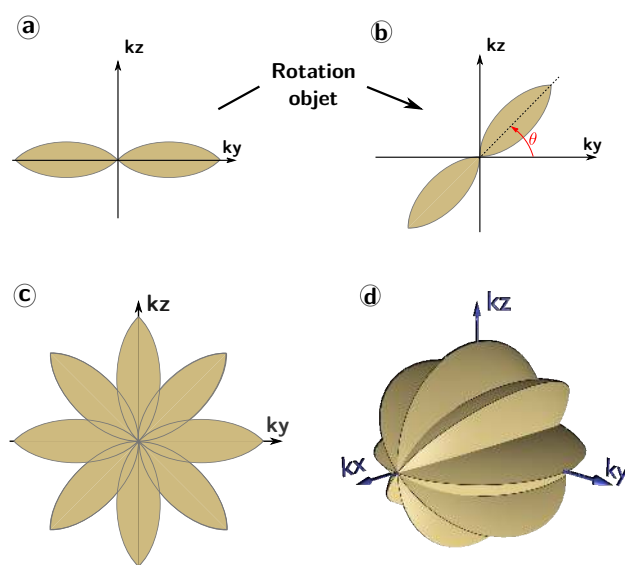


FIGURE 3.9 – Combinaison du balayage de l'illumination et de la rotation objet. (a) Tomographie par balayage de l'illumination. (b) Rotation d'un angle θ de l'objet en tomographie. (c) FTO obtenue pour 4 angles. (d) FTO 3D obtenues pour 4 angles [123].

Une idée simple pour pallier ces problèmes est de combiner la stabilité de l'échantillon en tomographie ToRI à la rotation de l'OTF en tomographie ToRO *sur peu d'angles*. Le principe, illustré sur la figure 3.9, a été développé dans la thèse de Jonathan Bailleul [88].

Plutôt que d'effectuer un grand nombre de rotations de l'objet, on effectue une tomographie ToRI pour quelques rotations de l'échantillon. La rotation d'une tomographie ToRI se traduit par une rotation de l'OTF de base (fig 3.9 a-b). Le support dans l'espace de Fourier est ainsi rapidement rempli, avec un faible nombre de rotations (fig 3.9 c-d).

L'OTF obtenue est quasi-isotrope, mais la résolution latérale est légèrement dégradée à cause de la fusion des données (recalage spatial et en phase). Les images obtenues montrent une grande qualité, quelle que soit la direction d'observation (FIG.3.10).

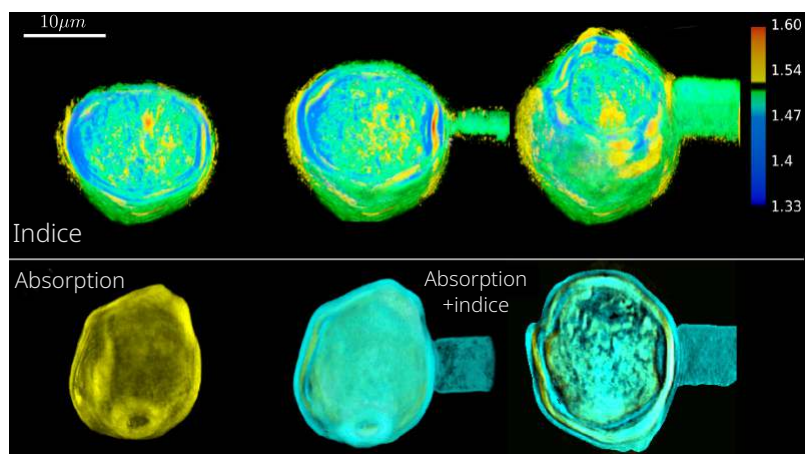


FIGURE 3.10 – Pollen de bouleau (*Betula*) en tomographie combinant rotation de l'objet et du vecteur illumination, montrant l'absence d'artefact selon l'axe (Oz). Haut : indice de réfraction pour différents angles de vue. Bas : vue externe de l'absorption (à gauche) et combinaison indice/absorption. Noter l'absence du polymère d'accroche sur l'image en absorption.

3.3.2 Réalisation expérimentale

Le dispositif original reposait sur le microscope « historique » du laboratoire. Cependant, si ce système était suffisant pour la preuve de concept, la capacité à enregistrer rapidement une grande série d'hologrammes s'est vite avérée nécessaire. Le principe repose en effet sur l'acquisition de plusieurs tomogrammes, contenant eux-mêmes des centaines d'hologrammes. L'acquisition d'une image 3D avec 4 rotations du support nécessitait alors plus de 2 heures avec la présence en continu d'une personne. Une version plus rapide a donc été envisagée.

Elle repose sur un montage hors-axe qui permet d'enregistrer les hologrammes à cadence caméra, associé à un miroir sur membrane (*voice coil motor*) de faible amplitude angulaire (voir paragraphe 2.4). Cette faible amplitude angulaire impose l'utilisation d'un objectif en tant que condenseur.

Cette version ajoute donc plusieurs contraintes expérimentales liées au montage hors axe et à l'utilisation d'un objectif condenseur. Le montage hors-axe impose en effet davantage de contraintes sur l'échantillonnage, ce qui oblige à augmenter le grandissement du système, et limite le champ de vision disponible.

En outre, l'utilisation d'un objectif-condenseur pose deux problèmes.

- D'une part le réglage de l'illumination de Köhler est plus délicat. À l'inverse d'un condenseur qui présente un faible grossissement, l'objectif présente un grossissement important : un déplacement minime le long de l'axe optique dérègle l'illumination de Köhler et modifie la planéité de l'onde d'illumination. Un moteur de déplacement selon l'axe z avec vitesse ajustable est donc conseillé.
- La faible distance de travail, nettement inférieure au millimètre, va imposer l'uti-

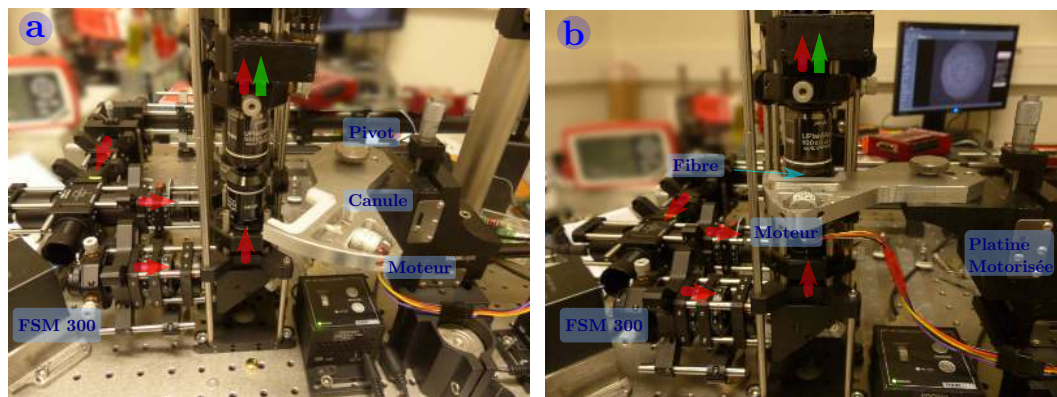


FIGURE 3.11 – Système développé pour la tomographie ToRIO : (a) mise en place de la platine sur le microscope, (b) insertion de l'échantillon entre les objectifs.

lisation de lamelles à la place de lames, rendant plus fragile l'ensemble.

Remarquons que notre système n'est pas la seule solution envisagée : des dispositifs à base de pinces optiques ont ensuite été proposés [124] et même des systèmes de rotation de l'ensemble source/caméra [125].

On peut enfin noter que l'utilisation de 2 objectifs trouve une utilité dans le cas de la tomographie 4π , qui peut être une alternative à la tomo-iso. Ce point sera abordé dans la partie projet.

3.4 Bilan et orientations possibles

Les lacunes fréquentielles liées à l'échantillonnage peuvent être diminuées significativement par des motifs de balayage appropriés et/ou les propriétés de symétrie de l'échantillon (symétries morphologiques ou de la transformée de Fourier). Le problème du cône manquant peut être limité par des algorithmes itératifs sous contraintes (méthode des projections alternées). Une alternative numérique plus robuste (problème inverse explicite) sera abordée dans la partie projet. En l'absence de connaissances a priori, la tomographie iso garantit le remplissage du cône manquant tout en évitant les écueils liés à la pure rotation de l'objet : résolution latérale inférieure, nombre élevé de rotation entraînant un travail de recalage numérique important. Sa mise en œuvre expérimentale nécessite cependant un équipement spécifique. Ces différentes techniques peuvent être combinées pour optimiser le support.

Une alternative expérimentale pour étendre l'OTF réside dans les mesures en réflexion, ce qui sera l'objet du prochain chapitre. La fusion des informations de transmission et réflexion sera abordée dans la partie projet.

La tomographie diffractive en transmission peut être complétée par un dispositif en réflexion. Celui-ci permet en imagerie d'accéder à d'autres fréquences spatiales, plus élevées dans la gamme longitudinale (f_z). De plus, un nouveau mode d'imagerie de surface a été développé au laboratoire (thèse de Théo Hui Liu [77]) afin d'imager les échantillons purement réfléchissants. Ce système d'imagerie des surfaces se rapproche de la profilométrie par interférométrie ou par holographie, mais le contrôle du spectre angulaire d'illumination propre à la tomographie permet d'augmenter la résolution sur la partie diffractive, et présente des avantages au niveau de la calibration, de la robustesse (bruit, déroulement de phase, ombrage) et de la simplicité d'utilisation du dispositif.

4.1 Imagerie 2D et 3D

Pour compléter expérimentalement le cône de fréquence manquant, l'imagerie tomographique en réflexion est sans doute l'idée la plus attrayante [126], car elle évite les problèmes liés à la rotation de l'objet. En effet, en réflexion, les faisceaux diffractés se propagent dans la direction opposée au vecteur incident. La relation

$$\mathbf{k}_o = \mathbf{k}_d - \mathbf{k}_i$$

montre que les composantes en k_{dz} vont désormais s'ajouter à celle en k_{iz} , ce qui permet d'atteindre des hautes fréquences en k_{dz} , inaccessibles en transmission. La figure 4.1(a) montre le principe de construction de l'OTF en réflexion : cinq calottes de sphère ont été tracées et les limites de l'OTF sont soulignées par 5 vecteurs \mathbf{k}_o maximum (\mathbf{k}_d colinéaires à $-\mathbf{k}_i$).

Cette construction permet d'obtenir l'OTF en réflexion de la MTD mais également celle de l'interférométrie basse cohérence (SWLI, voir paragraphe 4.2.1) et de l'OCT [11] : la basse cohérence se traduit par un étalement en kz dans les 2 cas. L'OTF finale est

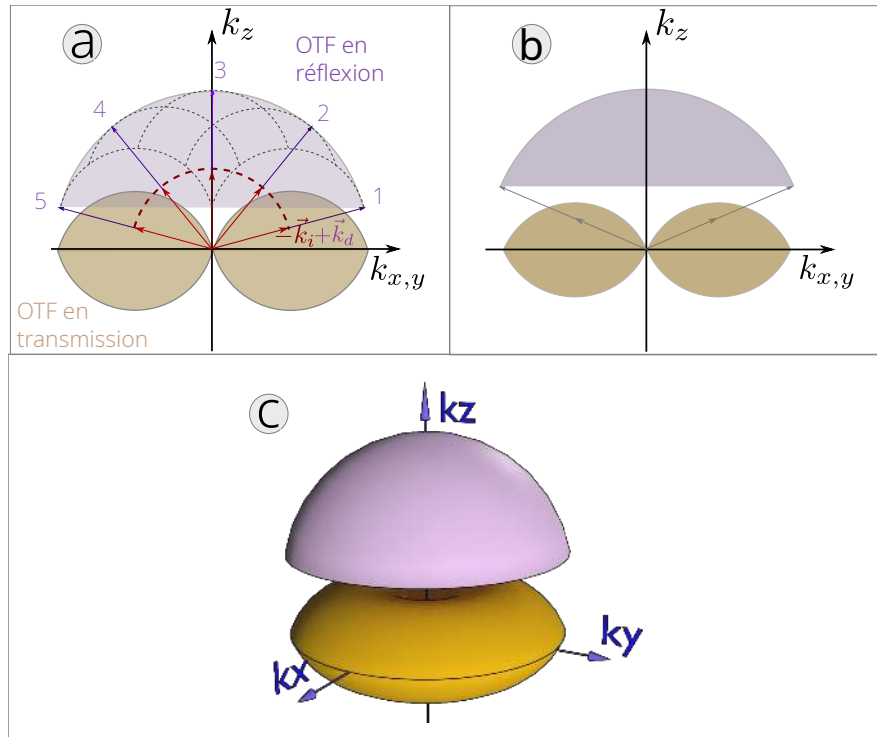


FIGURE 4.1 – OTF en réflexion et transmission. (a) Construction de la partie réflexion à haute ouverture numérique, avec recouvrement transmission/réflexion. Les 5 vecteurs diffractés colinéaires avec le vecteur incident montrent les limites de l’OTF. (b) OTF construite avec l’ouverture numérique expérimentale, montrant l’absence de recouvrement. (c) Illustration du cas (b) en 3D.

trouvée en tronquant fréquentiellement à l’ouverture de ces 2 techniques, généralement plus basse que la MTD. On voit encore ici tout l’intérêt de travailler dans l’approximation des systèmes linéairement invariant, car elle permet non seulement une description élégante et simple de ces systèmes, mais aussi une comparaison de leur capacité d’imagerie.

Dans tous les cas, l’OTF en réflexion ne présente pas de basses fréquences le long de l’axe \mathbf{k}_z et un couplage avec la transmission est donc pertinent : le problème de la fusion des deux supports se pose alors. La figure 4.1(a) a été tracée avec une ouverture numérique élevée qui autorise un recouvrement des OTF en transmission et en réflexion.

En réalité avec l’ouverture numérique maximale autorisée expérimentalement (NA 1,4) utilisée à la fois pour le condenseur et l’objectif, il n’y a pas de zone de recouvrement (FIG. 4.1(b)). L’ouverture numérique minimale permettant un recouvrement ($d = 0$) peut être facilement calculée : d’après la figure 2.5 et la figure 4.3, on a $d = k_0(3 \cos \theta_m - 1)$, distance devenant nulle pour $\cos \theta_m = 1/3$, soit $NA \simeq 1,43$. Même en travaillant à haute ouverture numérique, on ne peut donc avoir de recouvrement entre les supports, ce qui complique la fusion transmission-réflexion puisque l’écart de phase

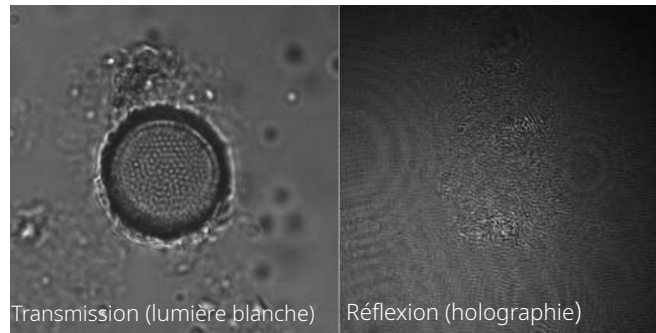


FIGURE 4.2 – Diatomée transmission (lumière blanche) et réflexion [127].

n'est pas directement mesurable¹.

Les acquisitions en réflexion posent d'autres problèmes, notamment sur les objets biologiques. Le problème le plus évident concerne simplement la visualisation des échantillons : dans la première version du montage, on ne pouvait simplement visualiser les projections à la fois en transmission et en réflexion.

Les objets visualisés en réflexion et non reconstruits peuvent alors être difficiles à interpréter comme le montre la figure 4.2, ce qui souligne encore une fois la nécessité de coupler ce montage avec un dispositif en transmission fonctionnant simultanément.

Enfin le signal réfléchi, notamment sur les objets biologiques peut être faible. Une stratégie anti-réflexion peut s'avérer nécessaire afin que les réflexions parasites n'écrasent pas totalement le signal des membranes cellulaires ou intra-cellulaires [128] et le cas échéant, les hologrammes basses fréquences doivent même être éliminés de la pile d'acquisitions. Un système de filtrage par cohérence (*coherence gating*) pourra aussi être envisagé.

4.1.1 Montage expérimental

Réglages de l'illumination de Köhler

Le dispositif en réflexion, décrit sur la figure 4.4 est proche du dispositif en transmission, l'objectif collecteur jouant cependant aussi le rôle de condenseur. Le condenseur sert habituellement à régler l'illumination de Köhler (conjugaison DC, plan objet, caméra),

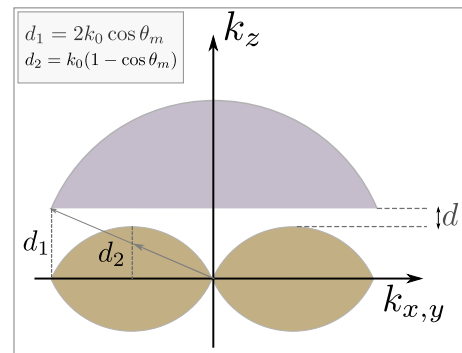


FIGURE 4.3 – Ouverture numérique minimum autorisant un recouvrement entre OTF.

1. En réalité, il est possible d'utiliser des objectifs NA=1,45, ce que nous avons fait sur le système de l'IGBMC, mais expérimentalement, le recouvrement resterait infime.

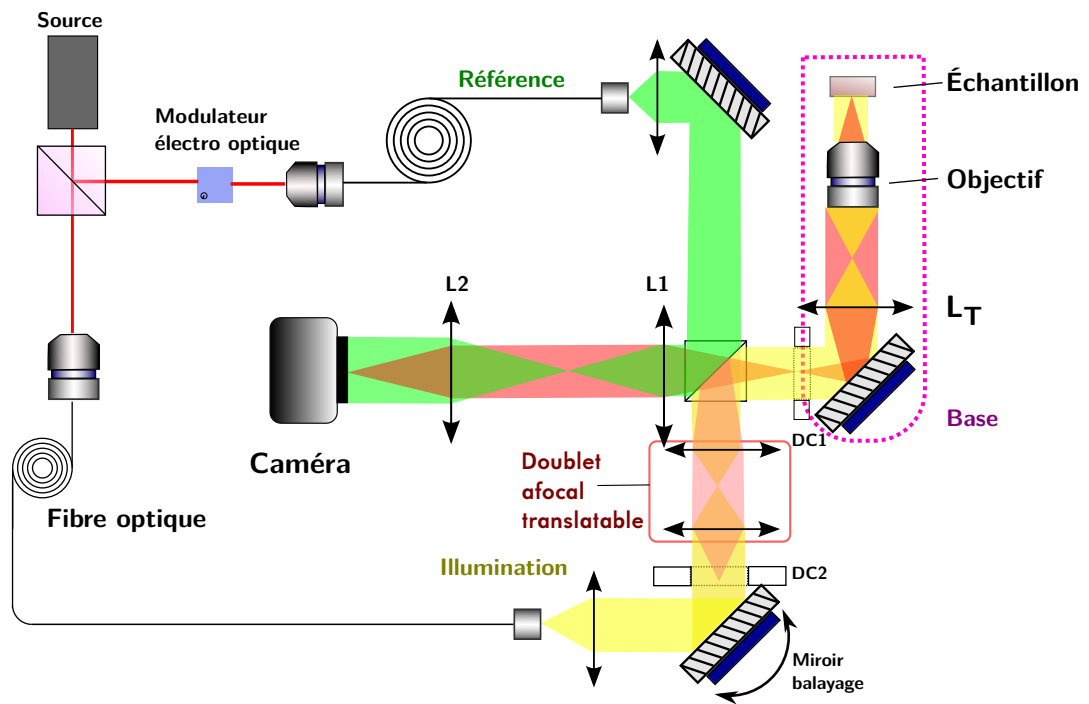
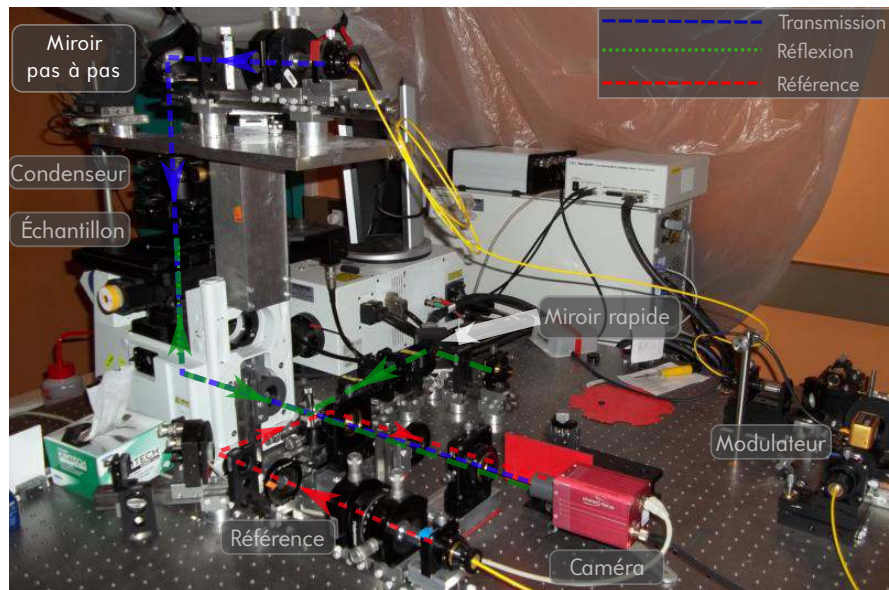


FIGURE 4.4 – Schéma de principe du montage en réflexion



mais l'utilisation d'un objectif condenseur à fort grossissement rend délicat cet ajustement. On utilise plutôt un doublet afocal translatable pour régler la conjugaison avec les diaphragmes de champ sans modifier la planéité de l'onde d'illumination.

Principe de recalage des hologrammes en réflexion. En l'absence de faisceau spéculaire (ou signal du spéculaire très réduit), le recalage entre les hologrammes est plus délicat : il faut déterminer la phase entre les hologrammes successifs, mais aussi l'angle d'illumination par un autre procédé. Cette absence de spéculaire présente toutefois un avantage : l'acquisition des flux lumineux, souvent plus faibles en réflexion, ne sont pas gênés par le spéculaire, intense et diminuant la dynamique de la caméra.

La direction d'illumination peut être retrouvée par corrélation entre les champs complexes. Pour éviter le cumul d'erreurs, on choisit un hologramme de référence, par exemple celui extrait de l'hologramme acquis à incidence nulle. Les sphères d'Ewald de chaque champ ont une intersection avec celle de la référence : les points communs forment un cercle (FIG.4.6), et peuvent servir à recalibrer successivement en phase chaque champ.

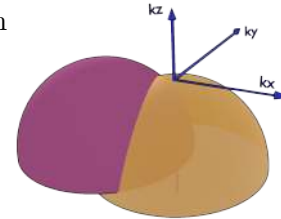


FIGURE 4.6 – Intersection de 2 sphères d'Ewald

Le système de recalage a d'abord été testé en transmission, afin de montrer la faisabilité : la présence du faisceau spéculaire permet en effet d'obtenir une image de référence avec un système matériel et logiciel déjà éprouvé. Le recalage par point commun est effectué sur les données en transmission, mais en excluant le spéculaire. Ce protocole présente néanmoins un désavantage : le spéculaire diminue la dynamique des images acquises et donc le rapport signal à bruit.

Recalage des calottes en position. La corrélation de phase est une technique courante de recalage d'image. Cette méthode utilise le domaine des fréquences et permet de déterminer d'une manière optimale l'intensité de la liaison qui peut exister entre deux images, dans notre cas les spectres des hologrammes. Cette technique utilise la propriété de translation de la transformée de Fourier. Prenons l'exemple de deux images f_1 et f_2 décalées de (x_0, y_0) : $f_2(x, y) = f_1(x - x_0, y - y_0)$. Ce décalage se traduit par une rampe de phase dans l'espace réciproque :

$$F_2(\xi, \eta) = e^{-2i\pi(\xi x_0 + \eta y_0)} F_1(\xi, \eta) \quad (4.1)$$

Le facteur de phase est isolé simplement par :

$$\frac{F_1(\xi, \eta) F_2^*(\xi, \eta)}{|F_1(\xi, \eta) F_2^*(\xi, \eta)|} = \exp(-j2\pi(\xi x_0 + \eta y_0)) \quad (4.2)$$

où F^* est le conjugué de F .

En appliquant la transformée de Fourier inverse dans le domaine fréquentiel, on obtient une fonction sous la forme d'une impulsion de Dirac, théoriquement nulle partout sauf à l'endroit du décalage entre les deux images (les deux spectres).

Recalage en phase. Les points communs sont déterminés numériquement dans le module du spectre et un seuillage est effectué pour rejeter les points d'amplitude trop faible.

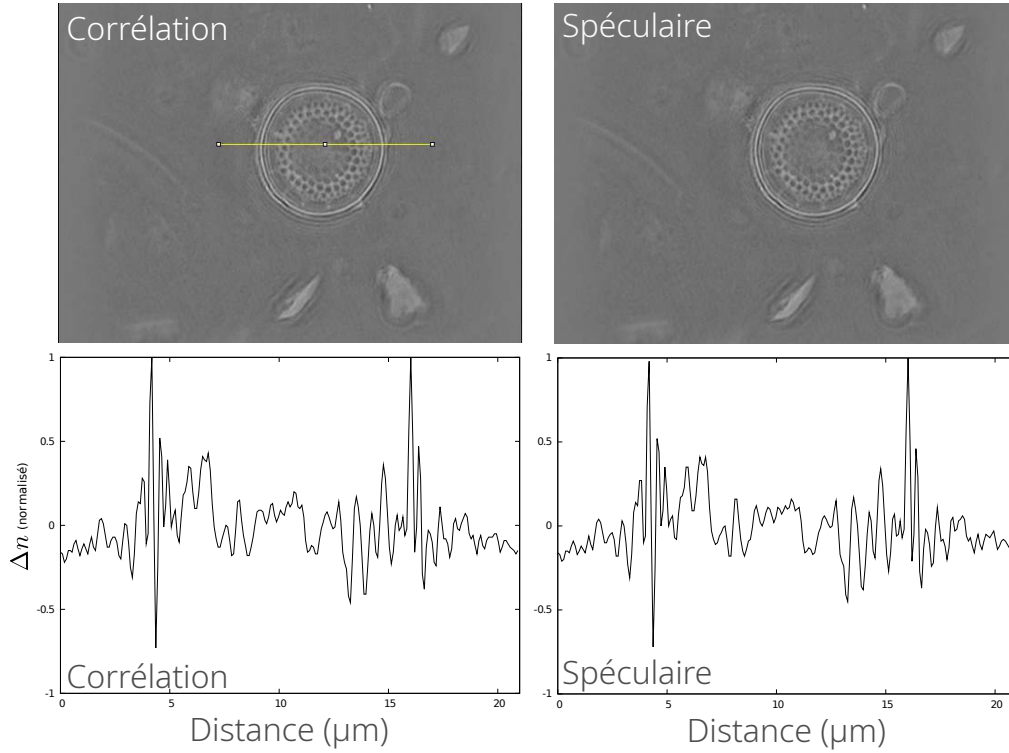


FIGURE 4.7 – Diatomée reconstruite par corrélation et par la méthode du spéculaire.

Pour le front d'onde du champ complexe de référence : $u_r = A_r e^{i\varphi_r}$, le n^e front d'onde diffère d'une quantité complexe $\gamma_n = \delta A_n e^{i\delta\varphi_n}$:

$$u_n = A_r \delta A_n e^{i\varphi_r} e^{i\delta\varphi_n} \quad (4.3)$$

Autrement dit, pour calculer γ_n , il suffit d'effectuer une division complexe par la référence :

$$\gamma_n = \frac{u_n u_r^*}{|u_r|} \quad (4.4)$$

La quantité γ_n est censée être une constante sur les points communs : on prendra donc la moyenne γ_n^{moy} de ces décalages sur l'ensemble des points communs afin d'être plus robuste au bruit.

Résultats sur des images obtenues en transmission.

Afin de contrôler les résultats, nous utilisons des données en transmission, qui permettent de comparer par simple division complexe avec l'amplitude complexe du spéculaire.

Sur les diatomées de type *Coscinodiscus*, présentant un signal de réflexion correct, les résultats obtenus par les deux techniques sont très proches, avec en moyenne moins de 4% d'écart entre les profils obtenus (FIG. 4.7).

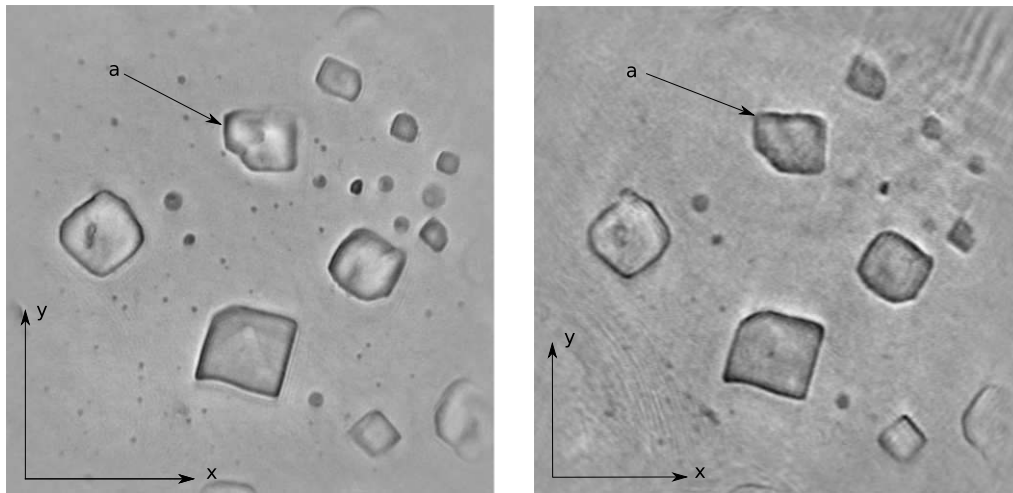


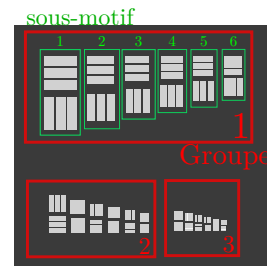
FIGURE 4.8 – Reconstruction de cristaux de KI par corrélation et par la méthode du spéculaire [126].

Le résultat semble néanmoins dépendre des capacités de diffraction de l'objet : les cristaux de KI, moins diffractants que les diatomées, présente un moindre rapport signal à bruit par la méthode des points communs (FIG. 4.8).

Reconstruction en réflexion

La validité de la méthode a été testée en réflexion sur différents échantillons minces (dépôts métalliques, mire USAF) afin de valider le principe et de vérifier simplement la capacité de sectionnement en réflexion [129].

Une mire microscopique 1951 USAF a été fabriquée par gravure d'une couche de platine de 75 nm d'épaisseur, elle-même pulvérisée sur une lame Matsunami (18 mm x 18 mm x 0.15 mm). La mire a été gravée par sonde ionique focalisée (FIB : focused ion beam) qui permet de graver de façon précise des motifs de taille microscopique. La plus grande barre a une longueur de $2,5 \mu\text{m}$ et une largeur de $0,5 \mu\text{m}$. Six éléments forment un sous-motif : les deux séries de barres sont orientées dans des sens différents (horizontal et vertical) afin de repérer les éventuels problèmes d'astigmatisme.



La partie imagée est constituée de 3 groupes (numéro N_g de 1 à 3, voir figure ci-dessus), eux-même composés de 6 sous-motifs ou sous-ensembles (numéro N_s de 1 à 6). Les dimensions des sous-motifs suivent une progression géométrique de raison $2^{1/6}$. Avec ce type de mire, on exprime en général la résolution en terme de paires de lignes (1 ligne + 1 interligne) par micromètre ($\text{lp} \cdot \mu\text{m}^{-1}$). On peut alors estimer la résolution en identifiant les structures les plus petites discernables et en utilisant la formule

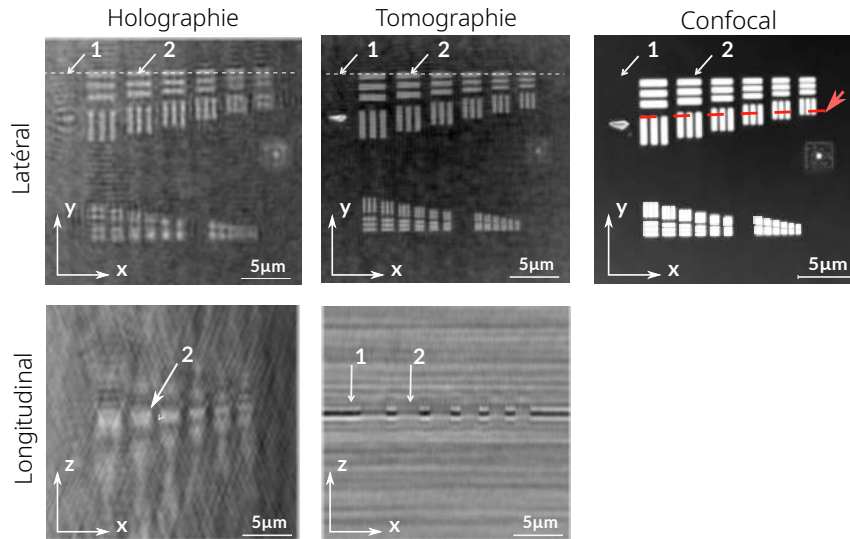


FIGURE 4.9 – Mire USAF en réflexion [129] : comparaison holographie, tomographie diffractive et confocal. Le dépôt de métal apparaît en noir et la gravure en clair. Une section (x, z) (bas) est extraite selon la ligne blanche en tirets. Les marquages fléchés 1 (dépôt) et 2 permettent de se repérer sur ces 2 sections.

$$R(\text{lp} \cdot \mu\text{m}^{-1}) = 2^{N_g - (N_s - 1)/6}$$

Le 2e sous-ensemble du groupe 3 est le dernier clairement identifiable. Il présente des barres large de 111 nm et de longueur 555 nm ($4,5 \text{ lp} \cdot \mu\text{m}^{-1}$). La qualité des images est logiquement améliorée lors du passage de l'holographie à la tomographie, aussi bien en résolution qu'en rapport signal sur bruit, grâce à la redondance d'information. L'image confocale est quant à elle caractérisée par un bas niveau de bruit et un excellent contraste.

Sur l'image holographique, on peut identifier le sous ensemble 3 du groupe 1, le sous ensemble 2 du groupe 2 sur l'image confocale et enfin le sous ensemble 3 du groupe 2. Ces résultats se convertissent en un résolution de $1,26 \text{ lp} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ en holographie, $2,24 \text{ lp} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ en confocal et $2,52 \text{ lp} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ en TDM. On retrouve bien le facteur 2 théorique entre holographie et tomographie, mais un écart de 11% entre MTD et confocal, inférieur à celui trouvé en transmission [105]. De plus le confocal a une résolution latérale théorique au mieux (pinhole complètement fermé) supérieure de 40% au champ large, alors que le MTD devrait montrer un facteur 2 avec le champ large.

Le fait que les structures horizontales et verticales soient reconstruites de façon légèrement différentes (sous motif 1 du groupe 3) semble montrer un effet de polarisation, qui n'est pas pris en compte par le modèle scalaire de diffraction sous l'approximation de Born. Un modèle plus complet devrait donc être utilisé pour les échantillons de type métallique [44, 130].

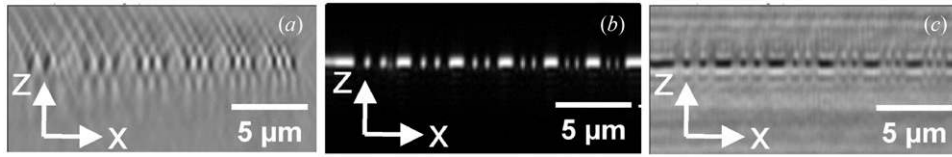


FIGURE 4.10 – Comparaison du sectionnement longitudinal : (a) MTD transmission, (b) confocal réflexion et (c) MTD réflexion [129]. Les sections sont extraites des barres verticales du groupe 1 (ligne en tirets rouges sur la figure 4.9).

Comparaison avec la transmission. Dans une dernière partie, nous comparons les capacités de sectionnement du MTD en transmission, en réflexion avec l'imagerie confocale. La figure 4.10 montre un plan (x, z) extrait du volume 3D pour chaque technique. Le plan est extrait selon la ligne rouge en tirets indiquée sur la figure 4.9.

Les capacités de sectionnement optique sont ici clairement illustrées. Le mode transmission souffre du cône manquant de fréquence et présente une élongation marquée de la mire le long de l'axe z . À l'inverse, le confocal présente une bonne capacité de sectionnement (FIG.4.10). Enfin le mode tomographique en réflexion possède une capacité de sectionnement nettement supérieure à la transmission grâce aux hautes fréquences acquises, comme l'illustre la figure 4.1. Cependant, des rebonds apparaissent aux limites des objets (phénomène de Gibbs) et l'absence de basses fréquences se traduit par un fond inhomogène. Ces images montrent cependant que même en tenant compte des limitations du modèle utilisé pour la reconstruction, le couplage de la réflexion à la transmission présente un grand intérêt pour améliorer le sectionnement optique (voir la partie projet).

4.1.2 Synthèse 2D

Le système tomographique présente également un intérêt sur les échantillons 2D. Une synthèse d'ouverture 2D peut être facilement réalisée et permet d'améliorer la résolution et de lisser le bruit.

Lors du balayage, l'inclinaison de l'onde d'illumination crée une rampe de phase dans l'espace direct, qui provoque un décalage du spectre 2D, centré sur les coordonnées spectrales de l'onde d'illumination (porteuse). Ceci est illustré par un balayage annulaire sur la figure FIG. 4.12.

On voit dans le cas (b) que $N=8$ hologrammes suffirait à obtenir le spectre étendu, mais le nombre d'hologrammes peut éventuellement être augmenté (jusqu'à $N=100$ dans le cas présent) afin d'améliorer le rapport signal à bruit. Le calcul du coefficient de corrélation entre deux hologrammes successifs (et donc aux spectres superposés) a montré que les valeurs étaient faibles, indiquant une bonne décorrélation [77]. La figure FIG. 4.11 montre une comparaison avec l'imagerie AFM sur une surface de blueray (sur 2 zones différentes).

Remarquons que des techniques de multiplexage en holographie hors-axe sont apparues [76], permettant d'effectuer la synthèse 2D et la profilométrie en 1 seule exposition, donc potentiellement à haute vitesse (voir la partie projet). Ceci permettrait d'avoir

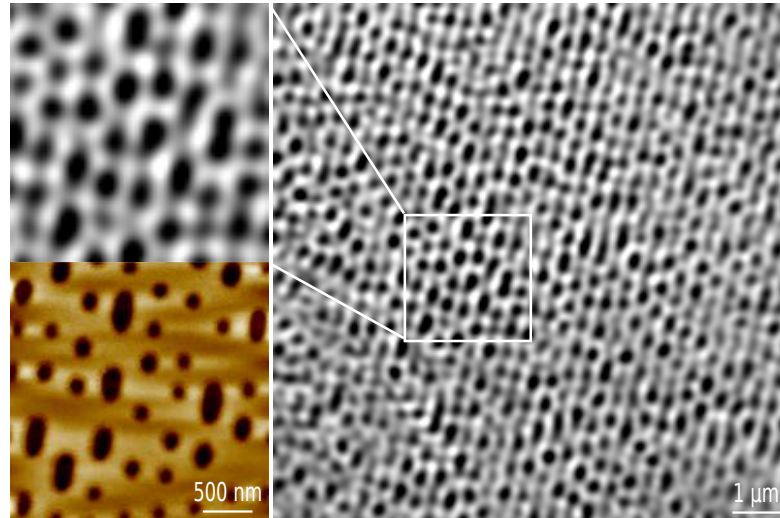


FIGURE 4.11 – Surface d’un disque blue ray MTD en réflexion. Bas gauche : imagerie AFM d’une surface de blueray.

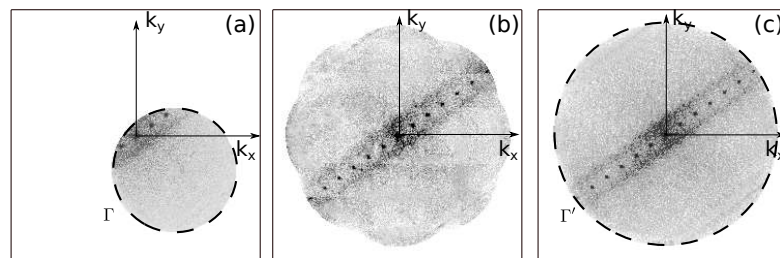


FIGURE 4.12 – Synthèse d’ouverture (spectre) sur une surface de compact disc. De gauche à droite : 1 hologramme, 8 hologrammes et 100 hologrammes. La redondance et la variété angulaire permettent de lisser le bruit.

une imagerie MTD 2D en 1 acquisition, mais aussi un mode de prévisualisation haute résolution sur les images 3D.

Reconstruction. L'échantillon étant 2D, la reconstruction est particulièrement simple, puisqu'elle se limite à la fusion des spectres (**Algorithme 4**). Dans le cas le plus simple, le spéculaire fournit toutes les informations de recalage. Une division complexe du spectre par la valeur du spéculaire recale le champ complexe en phase, et un simple décalage des coordonnées du spectre de la valeur $\Delta = (k_{ix}, k_{iy})$ (position du spéculaire) permet d'enlever la rampe de phase introduite par l'inclinaison du faisceau d'illumination. Les spectres sont enfin fusionnés : après sommation de l'ensemble des spectres, une

Algorithme 4 Synthèse d'un objet 2D à partir de N hologrammes. H_n : n^e hologramme issu du phase shifting. E : champ complexe. S : spectre du champ complexe. CTF : fonction de transfert de l'ensemble des spectres fusionnés (redondance)

```

for numHolo=0 to  $N$  do
     $E(x, y) \leftarrow H_1 - H_3 + j(H_4 - H_2)$  /*phase shifting*/
     $S(k_x, k_y) \leftarrow \text{fft}\{E(x, y)\}$ 
     $S_i \leftarrow \max(S(k_x, k_y)) = S(k_{ix}, k_{iy})$ 
     $\bar{S}(k_x, k_y) \leftarrow S(k_x, k_y)/S_i$  /*recalage en phase*/
     $\bar{S}(k_x, k_y) \leftarrow \bar{S}(k_x - k_{ix}, k_y - k_{iy})$  /*centrage du spectre*/
     $\bar{S}_f(k_x, k_y) \leftarrow \bar{S}(k_x, k_y) + \bar{S}(k_x, k_y)$ 
    numHolo++
end for
Objet  $\leftarrow \text{ifft}\{S_f(k_x, k_y)/\text{CTF}\}$  /*Normalisation fréquentielle*/

```

division permet d'éliminer la redondance spectrale d'information.

4.1.3 Correction des aberrations

Les aberrations sont une autre source de dégradation, qui peut devenir critique en imagerie par réflexion, lorsque la mesure concerne la précision verticale en phase (cas abordé dans la section 4.2).

Les systèmes de correction d'aberrations reposent en général sur l'évaluation d'un critère de qualité à optimiser, par ex. ratio de Strehl en intensité, ou l'estimation d'un écart à l'onde parfaite (sphérique ou plane). L'écart à l'onde parfaite peut être mesuré en absence de l'objet, par double exposition ou en choisissant manuellement des points hors objet sur un modèle simple ([131]).

En optique adaptative, on peut utiliser un modèle d'aberration qui permet d'ajuster itérativement les paramètres du modèle pour optimiser le critère de qualité. Il n'y a donc pas besoin d'avoir un hologramme de référence [132].

Ces méthodes sont peu adaptées à la MTD : l'ajustement manuel par hologramme serait fastidieux, et l'optique adaptative compliquerait inutilement le dispositif. Une méthode automatique basée sur l'extraction du fond a donc été développée. Elle repose sur ces étapes :

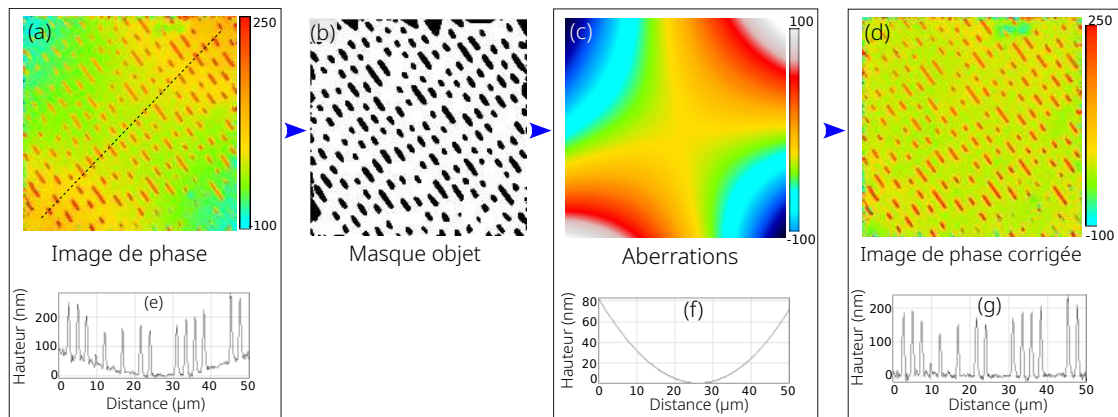


FIGURE 4.13 – Correction d’aberration sur une surface de compact disc. (a) Phase et profil originaux. (b) Masque binaire excluant l’objet. (c) Aberrations extraites. (d) Image de phase corrigée.

- un filtre de Canny afin de détecter l’objet. Une dilatation est appliquée puis une détection de contour. Un masque objet binaire est créé. Remarquons que ce masque n’a pas besoin d’être précis et remplit sa fonction tant que l’objet est exclu.
- Le fond de l’image est alors extrait à l’aide du masque, puis un tirage aléatoire fournit les points utilisés par l’ajustement polynomial.
- Le polynôme d’aberration est soustrait à la carte de phase déroulée.

Le principe est illustré sur la figure 4.13 sur une surface de CD, objet de forme complexe et occupant tout le champ. La méthode présente plusieurs avantages : elle ne nécessite pas d’hologramme de référence. De plus, au lieu de tirer un profil en ligne, on peut utiliser la zone complète hors objet. Le traitement est automatique et rapide : environ 0,5 ms sur CPU (2013) pour une image 256×256 , soit un quart de seconde sur une acquisition typique de 500 hologrammes. Le code de correction d’aberration peut être trouvé dans le fichier [Correction.aberration.cpp](#).

Normalisation complexe du champ incident

La même méthode est utilisée pour la correction d’amplitude. Elle permet donc de normaliser le champ incident à la fois en phase et en amplitude. Après correction, la différence de phase est nulle et l’amplitude du fond vaut 1. Les termes a_i et u_i (onde incidente) présent dans les équations 2.20 et 2.38 permettant l’inversion sous Born et Rytov valent donc l’unité après la correction d’aberration, ce qui rend donc la mesure indépendante de l’onde incidente.

On peut remarquer que la normalisation par le spéculaire décrite précédemment est une forme moins aboutie de la correction des aberrations et de l’amplitude, puisqu’elle ne corrige la phase que d’une constante, c’est à dire du piston.

4.2 Profilométrie/topographie multi-angle

L'imagerie 2D en réflexion permet donc d'imager des échantillons minces avec une amélioration de la résolution latérale, mais avec une résolution longitudinale limitée. Dans le cas d'objets réfléchissants à structures nanométriques selon l'axe z , la topologie de surface $z(x, y)$ est avantageusement obtenue depuis l'information de phase. L'idée est d'associer la résolution latérale améliorée à la précision de mesure longitudinale en interférométrie, puis d'exploiter l'information multi angle, spécifique à la MTD. Il faut bien insister sur le fait que l'information selon l'axe z est obtenue d'une façon différente de l'information latérale.

La topographie de surface à ces échelles joue un rôle important dans l'étude des propriétés fonctionnelles des composants [133] : MEMS, revêtements industriels, lentilles, pièces usinées... L'état de surface porte la signature des étapes fabrication et l'information obtenue sur la surface permet de caractériser certaines propriétés ou états comme la rugosité, l'adhésion, la friction, la corrosion... Différentes techniques bien établies sont donc déjà utilisées en laboratoire ou dans l'industrie pour obtenir ces informations. Elles sont ici passées très brièvement en revue avant de détailler l'intérêt du MTD dans ce domaine.

4.2.1 Contexte : les différentes méthodes de topographie

Techniques non optiques, profilomètres à contact

Les systèmes profilométriques reposent classiquement sur des techniques avec contact (profilomètre à stylet) ou de champ proche², comme le microscope à force atomique ou le microscope à effet tunnel (STM). Ces appareils génèrent des profils en balayant point par point la surface.

Profilomètres à contact. Les profilomètres à contact (stylet) reposent en général sur une pointe diamant de forme conisphérique (cône à pointe arrondie) qui balaye la surface à étudier. Le déplacement vertical de la pointe fournit le profil $z(x)$ de la surface. Très répandus dans les laboratoires ou l'industrie des semi-conducteurs [134], ils sont polyvalents, peu chers et le résultat est indépendant des propriétés optiques de la surface. Ils souffrent cependant d'une relative lenteur, de l'encombrement stérique des pointes qui influe sur la résolution [27] et des problèmes de rayage (FIG. 4.14) même à des pressions faibles sur polymères, verres

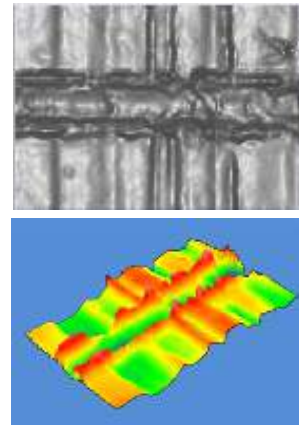


FIGURE 4.14 – Image par interférométrie d'un échantillon endommagé par la pointe d'un stylet. D'après [133].

2. Au sens de la détection d'un signal issu d'une interaction à courte portée, entre une sonde fine et une surface

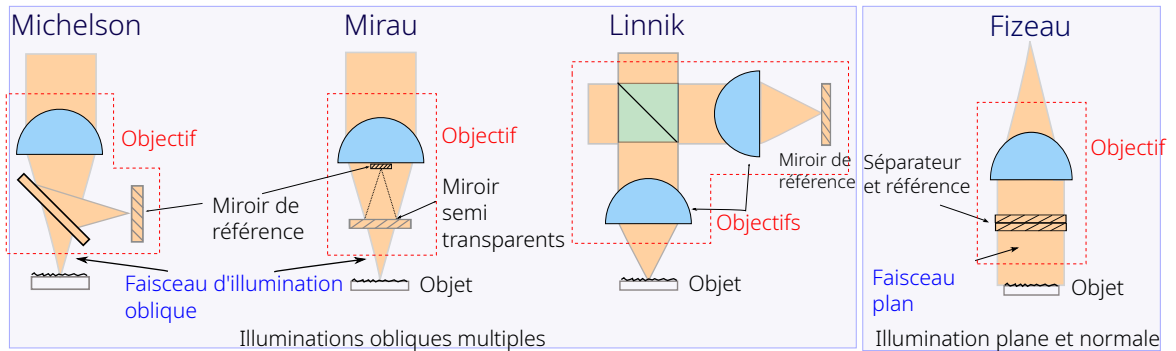


FIGURE 4.15 – Les différents profilomètres interférométriques.

mais également métaux. La réduction de pression permet de minimiser le problème au détriment de la vitesse et de la qualité de mesure [133].

Champ proche. Le microscope à effet tunnel (STM) [135] et le microscope à force atomique (AFM) utilisent une pointe très fine, qui permet de mesurer les détails à l'échelle atomique. Les surfaces balayées sont relativement petites (typiquement $100 \mu m^2$) et le temps d'acquisition supérieur aux techniques interférométriques.

Profilomètres interférométriques

Ces appareils reposent sur une mesure de phase interférométrique, qui est ensuite convertie en hauteur. Ils se rapprochent donc des mesures effectuées au laboratoire. Il faut distinguer les mesures par PSI (phase shifting interferometry) en lumière monochromatique (cas étudié ici) des mesures par balayage à basse cohérence en lumière blanche (CSI : coherence scanning interferometry³). Les profilomètres CSI combinent un balayage en z et une basse cohérence pour résoudre le problème d'ambiguïté 2π rencontré en interférométrie PSI. Cependant, la précision est moindre et la technique souffre d'artéfacts liés à l'enveloppe de cohérence sur les bords abrupts (effet "bat wings"), d'autant plus prononcés que l'ouverture numérique augmente. Certains systèmes combinent donc les 2 techniques afin d'obtenir la meilleure précision, avec un intervalle de hauteur maximisé [136].

Différentes configurations existent présentant chacune avantages et inconvénients :

- L'interféromètre de Michelson impose des objectifs à longue distance de travail, la séparatrice étant insérée entre l'échantillon et l'objectif. Les ouvertures numériques sont donc assez limitées. Il est cependant très stable car une grande partie du chemin optique est commune pour la référence et le faisceau objet.
- l'interféromètre de Mirau contient 2 miroirs semi transparents, l'un utilisé comme référence et l'autre comme séparatrice. Il est également très stable, et les aberrations subies par la référence et l'objet sont identiques. Le miroir central crée cependant une zone obscurcie, qui va modifier le profil de hauteur mesuré.

3. ces profilomètres sont désignés par différents noms, parmi lesquels : SWLI/ WLSI (white light scanning interferometry), VSI (vertical scanning interferometry),...

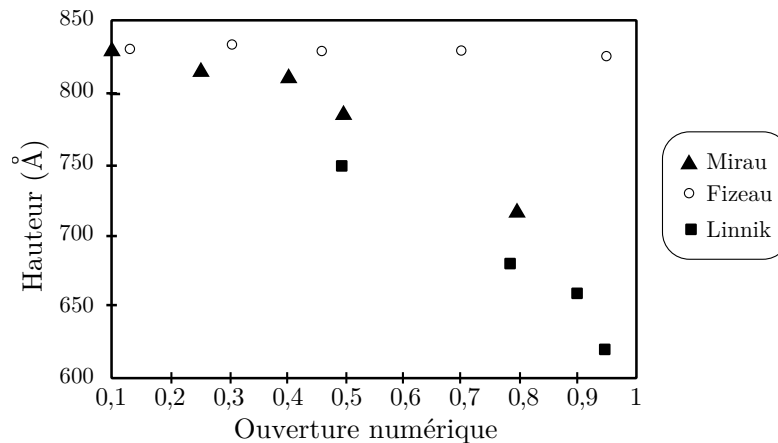


FIGURE 4.16 – Mesure de hauteur sur un échelon de 83,2 nm, effectuée avec 3 interféromètres différents.

- Le Linnik utilise des objectifs à grande ouverture numérique, ce qui oblige à déplacer le séparateur avant les optiques. La conception est plus complexe, car les 2 chemins optiques sont censées être identiques. C'est le système le plus sensible aux vibrations, et l'utilisation de grandes ouvertures numériques n'est pas sans poser de problème pour la calibration.

Il faut enfin noter que le laboratoire Icube a développé une version assistée par micro-sphère de l'interféromètre de Mirau, qui permet de dépasser latéralement la limite de diffraction [137].

Le problème de la calibration des microscopes interférométriques

Les interféromètres utilisant des faisceaux incidents obliques effectuent la mesure avec des angles d'illumination variant de 0 à θ_{\max} , angle maximum imposé par l'ouverture numérique. Une partie du problème est que la contribution de chaque rayon dépend de son facteur d'obliquité (variant en $\cos \theta$, voir plus bas).

Sans calibration, les mesures de hauteur faites avec un objectif à forte ouverture numérique seront plus faibles qu'avec un objectif à basse NA. La mesure est également affectées par des variations locales de pente liées à l'objet, la modification de l'ouverture par l'appareil lui même (séparatrice du Mirau par exemple [138]) et d'une façon générale par les effets d'apodisation [139], c.à.d la variation de l'amplitude complexe dans la pupille de sortie. La figure 4.16 montre que les écarts de mesure peuvent être importants en l'absence de correction. Seul l'interféromètre de Fizeau donne une mesure fiable à haute ouverture numérique.

Il n'existe pas de théorie donnant un facteur de correction exact, qui de plus change avec les systèmes et les échantillons. Les corrections diffèrent selon les auteurs [139-141]. Un des facteurs de correction couramment utilisé est celui d'Ingelstam $\eta = (1 + \text{NA}_{\text{eff}}^2)/4$ [138], mais il reste insuffisant à forte ouverture numérique. Les effets liés à

la valeur de NA (donc aux angles d'inclinaison maximum) peuvent être modélisés en pondérant la contribution de chaque rayon sur l'intervalle angulaire [142] menant à l'intensité mesurée :

$$I \propto \int_0^{2\pi} \int_0^{\theta_{\max}} R(\theta)P(\theta) \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda}z \cos\theta\right) \sin\theta d\varphi d\theta \quad (4.5)$$

avec $R(\theta)$ la réflectivité du matériau (souvent considérée constante) et $P(\theta)$ la fonction pupille liée à l'illumination. Après intégration, on constate que le coefficient n'est pas linéaire avec la hauteur, en dehors d'une fonction pupille idéale $P(\theta) = \delta(\theta)$, applicable lorsque l'ouverture numérique d'illumination est nulle (cas cohérent décrit plus bas)[142]. Une approche simplifiée consiste à calculer l'intégrale avec un angle moyen unique, puis à appliquer la correction au profil mesurée. Cette approche «moyenne» permet d'obtenir l'équivalent d'une fonction de transfert et donc d'utiliser une théorie à base de transformée de Fourier [143].

La calibration doit être faite expérimentalement, quand cela est possible. Elle peut par exemple être faite sur des mires calibrées - en général fournies par le fabricant - comportant des sauts de hauteurs successifs. Elles sont faites à l'aide d'objectifs basse ouverture, moins sensibles à ces problèmes.

Notons que d'une façon générale, la modélisation des réponses de ces interféromètres a récemment connu un regain d'intérêt [37, 143-146].

Dans l'approche ci-dessous, l'utilisation successive d'illuminations cohérentes spatialement en MTD et d'une correction des aberrations permet non seulement de s'affranchir de ces problèmes mais également d'exploiter le facteur d'obliquité pour améliorer la technique.

Remarque sur la précision en mesure topographique

La résolution latérale de la carte topographique est liée à la résolution au sens donné en imagerie (capacité de séparation au sens de Rayleigh par ex.). L'expression «résolution» porte à confusion et elle est malheureusement entretenue par les appareils commerciaux : la plus petite différence de hauteur détectable (par exemple entre 2 plateaux de hauteur) selon l'axe vertical dépend du bruit de mesure [147] et il ne s'agit donc pas d'une résolution au sens optique du terme. On préférera ici parler de sensibilité ou de précision verticale⁴. Remarquons enfin qu'en dehors de la limite liée au bruit, ces mesures sont limitées par le modèle de formation de l'image.

4. Pour être complet, notons que "vertical" signifie selon l'axe z de l'appareil d'après la dernière version de la norme ISO concernant les mesures métrologiques par topographie surfacique[148].

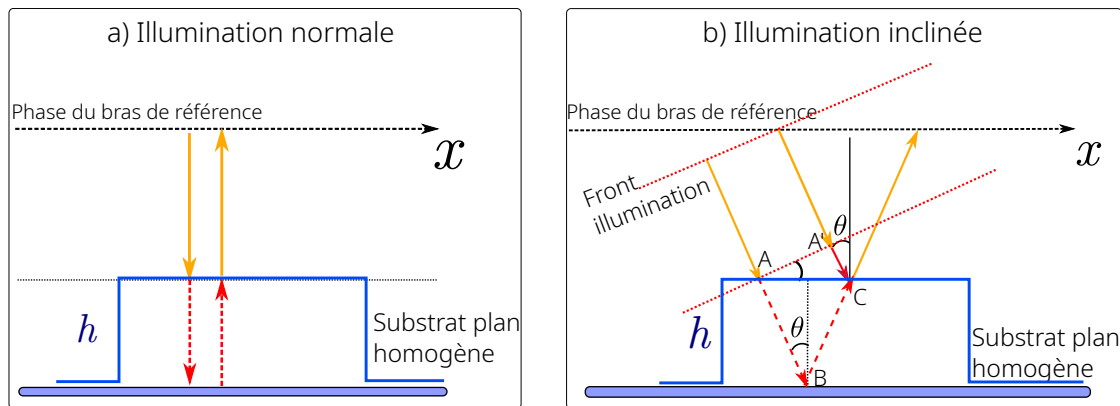


FIGURE 4.17 – Différence de chemin optique entre le rayon réfléchi sur le substrat et l'objet, de type saut de hauteur et homogène. L'inclinaison provoque une augmentation de la phase mesurée d'un facteur $\cos \theta$.

4.2.2 Profilométrie/Topographie multi-angles

Les mesures effectués en incidence normale reposent sur le même principe que les interféromètres précédemment décrits. Si on considère un échantillon de type saut de hauteur (créneau) homogène, sous illumination normale, la hauteur h est liée à l'écart de phase ϕ entre référence et objet. En prenant arbitrairement la valeur de hauteur nulle pour le substrat (FIG. 4.17.a) :

$$h(x, y) = \frac{\lambda}{4\pi} \phi(x, y) \quad (4.6)$$

où λ est la longueur d'onde dans le milieu d'immersion d'indice n .

La phase est mesurée par une technique d'holographie hors-axe ou de phase shifting. Dans le cas du phase shifting, on utilise préférentiellement une technique à 4 décalages ($\delta = \pi/2$). La phase est alors calculée à partir des 4 interférogrammes (I_1 à I_4), soit directement par la formule $\phi = \arctan_2\left(\frac{I_4 - I_2}{I_3 - I_1}\right)$, soit par un double calcul à 3 interférogrammes, qui permet de réduire le bruit. La fonction \arctan_2 teste les signes du sinus et du cosinus afin de redistribuer la phase dans les 4 quadrants et d'obtenir une phase dans l'intervalle $[-\pi, \pi]$. La phase doit enfin être déroulée afin d'éliminer les discontinuités de phase tous les 2π .

4.2.3 Contexte : déroulement de phase & échantillonnage.

Nécessité du déroulement et inconvénients. Par principe, la phase étant calculée modulo 2π , elle présente des discontinuités qui doivent être traitées pour récupérer la phase en pleine échelle.

Au delà de la microscopie, le déroulement de phase est une étape souvent cruciale dans divers domaines d'imagerie puisque tout traitement lié à la phase nécessite un déroulement : de nombreux travaux s'y sont donc intéressés [149] et le sujet reste très

actif, avec plus de 700 publications uniquement sur *Optica publishing group* entre 2019 et 2022.

Principe. La valeur enroulée (*wrapped*) de la phase est définie par une valeur principale φ_w , comprise entre 0 et 2π , alors que la valeur physique réelle φ peut facilement excéder plusieurs fois π , y compris en microscopie. Le problème est simplement décrit par

$$\varphi_w(\mathbf{r}) + 2\pi m(\mathbf{r}) = \varphi(\mathbf{r}) + b(\mathbf{r}) \quad (4.7)$$

où b est le bruit et m le champ de nombres entiers permettant le déroulement.

L'opération est d'apparence simple puisqu'il s'agit d'ajouter un multiple de 2π à la phase mesurée enroulée, une fois les sauts de phase détectés. Elle devient cependant non triviale en présence de bruit et en 2D. Les problèmes d'échantillonnage (*aliasing*) sont critiques et peuvent mettre totalement en défaut ces algorithmes : l'échantillonnage devrait respecter le critère de Nyquist, ce qui impose qu'entre 2 pixels adjacents, la différence de phase ne devrait pas excéder $\pm\pi$, soit une différence de hauteur de $\lambda/4$, ce qui va limiter la classe d'objets caractérisables. Cette limite est encore plus critique dans notre cas, à cause de l'utilisation d'un milieu d'immersion d'indice n .

On peut distinguer 2 grands types d'algorithmes : local (par suivi de chemin, pixel à pixel) ou global (indépendant du chemin).

Déroulement local

Les méthodes locales effectuent un déroulement pixel par pixel en suivant un chemin. Le problème est qu'un pixel invalide, par exemple à cause d'un mauvais rapport signal à bruit, peut fausser l'algorithme : l'erreur se propage alors à l'ensemble du déroulement. Le résultat devient dépendant du chemin suivi : on observe un résidu en calculant la somme des différences entre pixels sur un contour fermé [150, 151], alors qu'elle devrait être nulle pour un champ parfaitement déroulé. L'analyse de ces résidus peut cependant aider à dérouler correctement la carte de phase enroulée.

Une solution pour limiter ce problème est de guider le déroulement avec une carte de confiance, qui attribue une fiabilité aux pixels [152]. La fiabilité peut par exemple être déterminée à partir de la fonction de contraste γ (voir la section concernant l'ombrage). Pour éviter la propagation d'erreur, les pixels de haute qualité sont traités dans un premier temps, puis les pixels de basse qualité. Cette solution, proposée par Herráez [152, 153] a été implémentée/adaptée et utilisée pour les mesures en réflexion. L'implémentation en C++ est disponible [dans ce fichier](#).

Déroulement global

Les algorithmes 2D par suivi de chemin sont en général des extensions de la version 1D : le signal 2D est alors déroulé en suivant un chemin particulier, censé éviter la propagation d'erreur. Leur nature reste cependant unidimensionnelle : ils n'utilisent que les valeurs de phase des voisins qui se trouvent sur un chemin (1-D) parcouru. Le bruit de mesure peut alors rendre dépendant le résultat du chemin choisi. Le principal

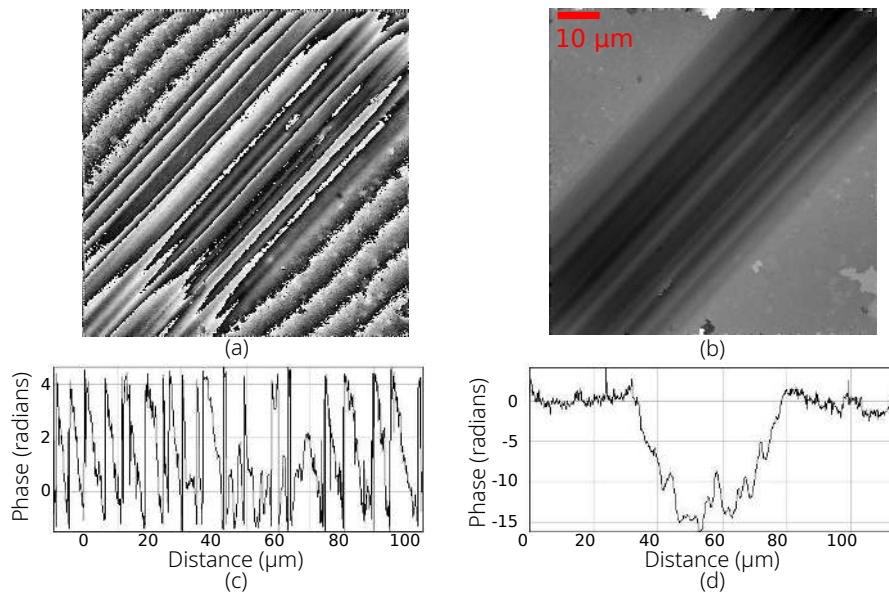


FIGURE 4.18 – Déroulement de phase [153] appliqué à un frottement sur une surface d'un alliage $\text{Ti}_{0,5}\text{Al}_{0,5}\text{N}$. (a) Avant et (b) après déroulement. Échantillon laboratoire LPMT Mulhouse.

problème à l'origine de l'échec de nombre de ces approches est donc qu'elles sont unidimensionnelles, basées sur un fonctionnement colonne par colonne (ligne par ligne). Des solutions n'utilisant pas des méthodes par suivi de chemin existent cependant. Song a par exemple développé un algorithme basé sur la résolution de l'équation de Poisson [154]. Cette méthode a été améliorée par Volkov [87] : à l'inverse des méthodes basées sur la résolution de l'équation de Poisson, elle ne nécessite aucune condition aux limites spéciales. La méthode finale proposée est robuste au bruit, aux variations rapides de phase ou encore aux données sous échantillonnées. La valeur du saut de phase ne doit cependant pas excéder 2π entre 2 pixels, ce qui exclut les objets fortement sous échantillonnés et/ou très déphasants, mais double toutefois la limite imposée par les méthodes locales sur l'échantillonnage. La méthode est potentiellement rapide car basée sur des FFT, ce qui peut s'avérer critique avec les algorithmes itératifs (voir la partie projet).

On peut enfin remarquer que cette méthode utilise le gradient 2D de la phase comme intermédiaire de calcul, ce qui la rend utile (et rapidement adaptable) aux méthodes d'interférométrie à décalage multilatéral (voir le chapitre 5 et la partie projet).

Une version de cet algorithme a été implémentée en CPU, et en GPU.

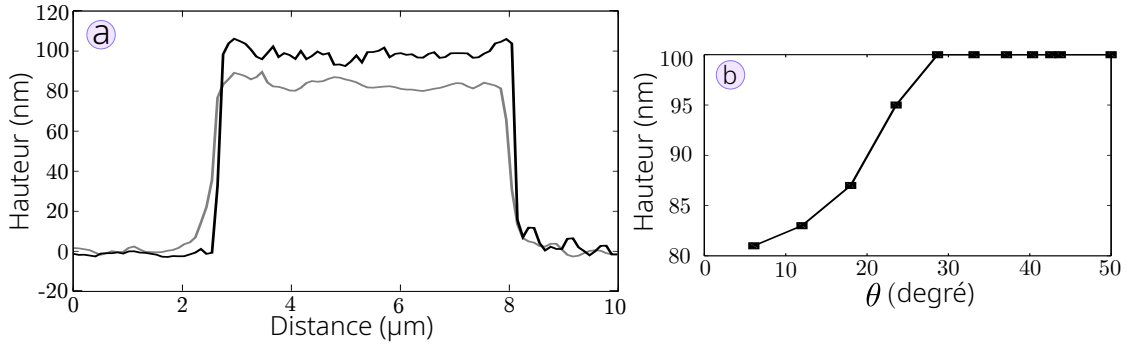


FIGURE 4.19 – Valeurs d’un saut de hauteur de 100 nm obtenue pour différentes inclinaison. À gauche : incidence normale (gris) souffrant du problème d’aliasing et incidence inclinée à 40° (noir) fournissant la bonne hauteur. À droite, illustration sur 11 angles : au delà de 30°, la hauteur est correcte.

4.2.4 Intérêt du contrôle du spectre spatial d’illumination

Longueur d’onde apparente

Le dispositif tomographique permet de facilement contrôler le spectre angulaire de l’illumination. Lorsque l’onde d’illumination est inclinée, la différence de chemin optique parcourue entre substrat et point objet vaut (FIG. 4.17) $AB + BC - A'C = 2h \cos \theta_i - 2h \sin \theta \tan \theta_i = 2h \cos \theta_i$, soit

$$h(x, y) = \frac{\lambda}{4\pi \cos \theta_i} \phi(x, y) \quad (4.8)$$

Le lien entre hauteur et phase est simplement modifié du facteur $\cos \theta_i$ et tout se passe comme si on travaillait avec une longueur d’onde *apparente* plus longue $\lambda_{\text{ap}} = \frac{\lambda}{\cos \theta_i}$, ou une hauteur apparente plus faible. Il s’agit en réalité de la composante k_{iz} du spectre d’illumination, que l’on retrouve dans l’expression plus générale d’une onde diffractée par une surface sous l’approximation de Kirchhoff [155]. Cette longueur d’onde apparente permet d’accéder à l’équivalent d’un spectre continu de fréquence, mais dans le cas du spectre angulaire d’ondes planes.

Cette première observation permet d’affirmer que simplement incliner l’illumination va étendre la capacité de mesure sans problème d’aliasing et éventuellement éviter l’opération de déroulement de phase décrite précédemment.

La figure 4.19 illustre l’effet sur une mire de hauteur en créneau (*step height*) de 100 nm en holographie (mire de calibration STR10-1000P VLSI). La limite de hauteur mesurable en illumination normale avec un objectif à eau et la source laser à 475 nm est de $\lambda/4 = 475 / (1.332 \times 4)$ soit 89 nm. Le profil en gris est en effet sous estimé (FIG. 4.19 a). La valeur correspond à une phase de $\pi - \phi [\text{mod } \pi]$, soit 78,5 nm.

Lorsque la longueur d’onde apparente atteint environ 600 nm, la mesure restitue la bonne valeur (FIG. 4.19 b). Le facteur de correction doit être supérieur à $\arccos(\frac{\lambda}{4h_{\text{max}}})$ soit environ 27° ici.

Longueur d'onde synthétique

Si cette stratégie est simple à mettre en œuvre, elle reste bien sûr assez limitée, puisque l'angle maximum fixé par l'ouverture numérique, au mieux 67.5° avec un objectif à huile ($NA=1,4$), donne un facteur de correction optimum (minimum) d'environ 0,38 (0,43 pour l'objectif à eau). Elle permet donc d'améliorer la gamme de saut de hauteur/pente accessible d'un facteur supérieur à 2, avec cependant l'emploi d'un angle d'illumination maximal, ce qui peut être contraignant, notamment avec les problèmes d'ombrage qui s'accroissent avec l'angle.

Il est possible de dépasser cette limite avec 2 sources de longueurs d'onde différentes, en utilisant la méthode proposée par Wyant et Cheng [156].

Deux mesures de phase sont faites sur le saut de hauteur : $\phi_1(x, y) = \frac{4\pi h(x, y)}{\lambda_1}$ et $\phi_2(x, y) = \frac{4\pi h(x, y)}{\lambda_2}$. L'écart des deux mesures modulo 2π vaut alors :

$$\Delta\phi(x, y) = 4\pi h(x, y) \frac{\lambda_1 - \lambda_2}{\lambda_2 \lambda_1} \quad (4.9)$$

La mesure donne une longueur d'onde synthétique

$$\lambda_s = \frac{\lambda_1 \lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_2} \quad (4.10)$$

dont on peut contrôler la valeur, notamment via le dénominateur qui permet théoriquement d'obtenir des longueurs d'onde aussi longues que voulues.

Ces deux longueurs d'onde peuvent être remplacées par des longueurs d'onde apparentes, décrites au paragraphe précédent. Cette approche présente plusieurs avantages :

- on dispose d'un spectre continu de longueurs d'onde apparentes avec un dispositif simple
- la source peut être un simple laser bas coût
- la technique bi longueur d'onde classiques présente certains problèmes : les caractéristiques de la fonction de transfert optique dépendent de la longueur d'onde et peuvent entraîner d'importantes erreurs dans la topographie mesurée [144]. Ces problèmes sont inexistantes dans le cas présenté ici.
- les problèmes de chromatismes sont inexistantes. Dans ce cadre, il faut noter que les problèmes de chromatisme peuvent aussi entraîner des sauts de 2π indésirables en topographie CSI [157], technique supposée éliminer le problème...

Considérant $\lambda_a = \lambda / \cos \theta_a$ et $\lambda_b = \lambda / \cos \theta_b$, l'équation 4.10 devient

$$\lambda_s = \frac{\lambda}{|\cos \theta_b - \cos \theta_a|} \quad (4.11)$$

La hauteur mesurée vaut finalement

$$h(x, y) = \frac{\lambda_s \Delta\phi(x, y)}{4\pi} \quad (4.12)$$

Cette méthode permet donc d'éviter le problème critique lié à l'échantillonnage, puisque la limite de variation entre pixel est repoussée à $\lambda_s/4$.

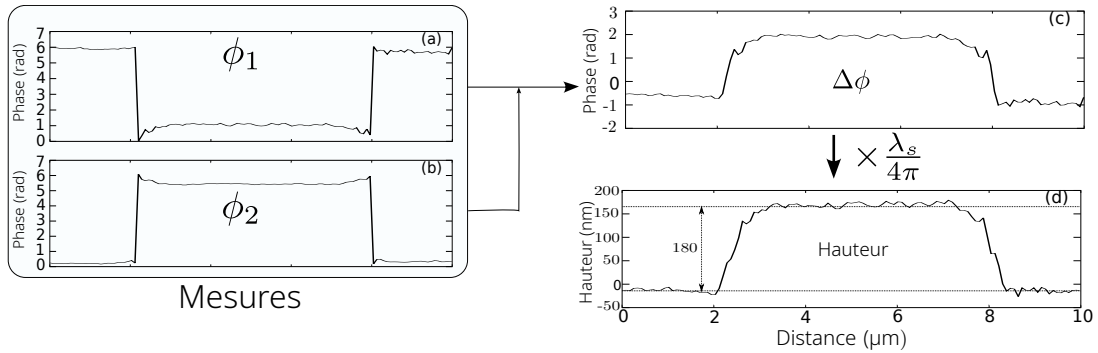


FIGURE 4.20 – Mesure d’une mire de 180 nm de hauteur à l’aide de 2 ondes inclinées : (a) 8° et (b) 51° . Le problème de l’échantillonnage est résolu grâce à la méthode bi longueur d’onde. Remarquer toutefois l’augmentation du bruit.

Pour valider l’approche, nous avons utilisé un saut de phase ne pouvant être reconstruit avec une simple inclinaison (mire STR10-1800S) : la limite d’échantillonnage est de 78 nm sous incidence normale, et il faudrait un angle de 64° minimum pour reconstruire correctement le profil. Cet angle est expérimentalement difficilement exploitable, car proche de la limite de l’objectif ($67,5^\circ$).

Les deux angles utilisés sont de $\theta_a = 8^\circ$ et $\theta_b = 51^\circ$, donnant des facteurs d’obliquité respectifs de 0,99 et 0,63, pour une longueur d’onde synthétique $\lambda_s = 874$ nm. On obtient les profils a et b de la figure 4.20, sous échantillonnés.

La hauteur est obtenue malgré le problème d’échantillonnage. La phase $\Delta\phi$ obtenue à la longueur synthétique présente des discontinuités, mais qui sont simplement éliminées par addition (resp. soustraction) de la valeur 2π si $\Delta\phi < -\pi$ (resp. $+\pi$).

Gestion de l’amplification du bruit

Une idée évidente serait de synthétiser une longueur d’onde aussi longue que possible, afin d’augmenter au maximum l’intervalle de mesure de l’appareil. Cependant, même en considérant une mesure ultra précise des longueurs d’ondes apparentes, le résultat se heurte à la montée du bruit : si la longueur originale est modifiée d’un facteur $K = \frac{1}{|\cos\theta_b - \cos\theta_a|}$, ce facteur multiplicatif s’applique également au bruit : le rapport signal à bruit diminue avec la longueur d’onde synthétique. Par ex. dans [158], la mesure présente un écart type de 2 nm avant synthèse de longueur d’onde, mais 27 nm après.

Ce phénomène est illustré sur la figure 4.21, le profil reconstruit avec $\lambda = 2516$ nm étant plus bruité que celui reconstruit avec $\lambda = 874$ nm.

On peut cependant utiliser la longueur d’onde synthétique pour le déroulement, mais conserver une des longueurs d’onde d’origine pour le calcul de la phase [159].

Limite ultime. Une limite ultime est toutefois fixée par l’échantillonnage dans l’espace de Fourier. L’écart angulaire minimum est fixé par l’échantillonnage dans l’espace de Fourier, donc au grandissement total et à la taille des pixels caméra.

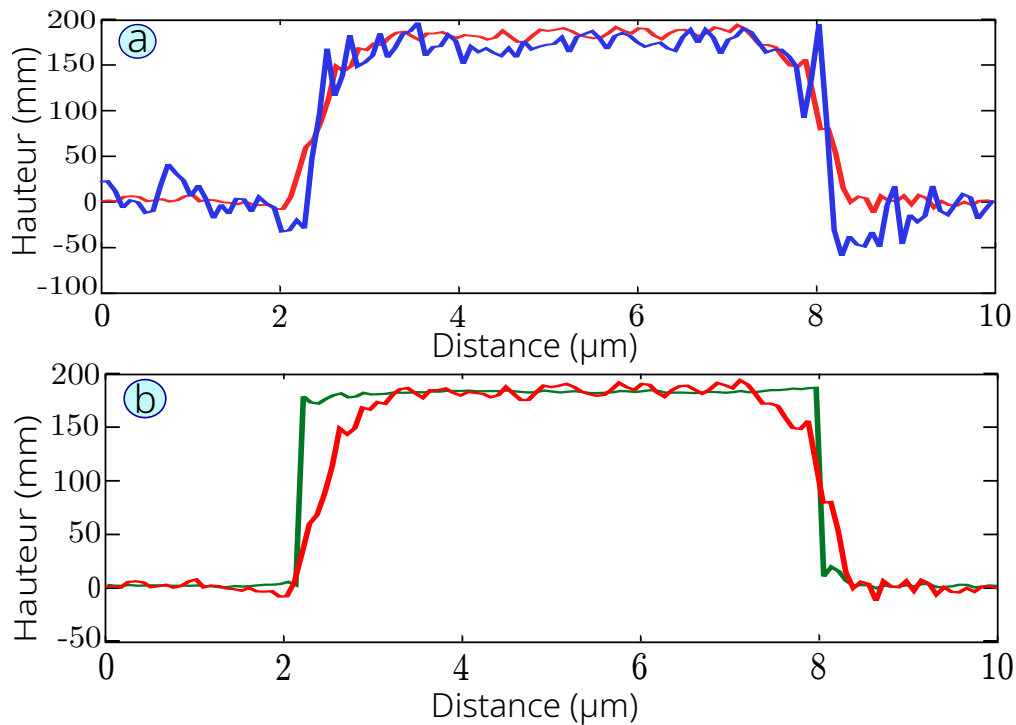


FIGURE 4.21 – (a) : Illustration de l’augmentation du bruit avec la longueur d’onde synthétique. Le profil le plus bruité (bleu) correspond à une longueur d’onde synthétique de 2516 nm, contre 874 nm (rouge). (b) : Reconstruction (vert) à partir de la longueur la plus courte.

Robustesse des mesures

Étant donnée la précision de la technique, la qualité de la mesure de phase est plus critique qu’en imagerie 3D. Outre les problèmes liés au bruit et aux aberrations, le balayage peut faire apparaître des phénomènes de défocalisation ou d’ombrage, notamment aux grands angles d’illumination.

Cependant, lors d’un balayage circulaire ($k_{iz}=\text{cte}$), les zones d’ombrages vont varier : on peut alors choisir un critère de qualité pour chaque pixel et sélectionner les meilleurs points pour la reconstruction. Dans notre cas, nous utilisons le taux de modulation [134] :

$$\gamma(x, y) = \frac{2\sqrt{(I_4 - I_2)^2 + (I_1 - I_3)^2}}{I_1 + I_2 + I_3 + I_4} \quad \text{III-6}$$

La redondance d’information permet de sélectionner le point de meilleur qualité.

La mesure doit être faite au plan de meilleure mise au point car les acquisitions hors focus présentant une baisse de la résolution latérale [160]. Les problèmes de défocalisation éventuels sont traités avec un système d’autofocus numérique. L’onde est repropagée numériquement jusqu’au plan le plus net, trouvé grâce au critère du gradient absolu.

Les aberrations sont enfin traitées par la méthode décrite précédemment.

4.2.5 Piste pour étendre la classe d'objet imageable

L'équation liant la phase au profil de hauteur est en réalité une approximation. Un modèle de diffraction des surfaces sous l'approximation de Kirchhoff permet de comprendre la limite. Le spectre du champ diffracté par une surface de profil $s(x)$ peut être exprimé par [155] :

$$\tilde{u}_K(\mathbf{k}_d - \mathbf{k}_i) = - \left(\frac{p^2 + q^2 + R^2}{q} \right) \iint \exp(-jk_0(px + Ry)) \exp(-jk_0qs(x, y)) dx dy \quad (4.13)$$

avec (p, R, q) les composantes du vecteur normalisé $(\mathbf{k}_d - \mathbf{k}_i)/k_0$ définies angulairement sur la figure 2.8. On voit que l'exponentielle contenant le profil mélange une information d'angle (pente et inclinaison du vecteur d'illumination via la composante q) et de hauteur (profil $s(x)$). Cette intégrale peut être réduite à une transformée de Fourier liée au profil si le coefficient $q = \cos \theta_d + \cos \theta_i$ est maintenu constant quand p et R varient.

La première possibilité est évidemment de considérer de faibles angles, ce qui réduit le coefficient à $q \simeq 2$: on retrouve alors la formule classique liant hauteur et phase.

Une autre possibilité est de faire varier le couple de composantes latérales tout en maintenant q constant par un tri fréquentiel numérique. L'idée a été proposée par Wombell en 1D [155], mais réalisée uniquement numériquement, les auteurs soulignant que multiplier les angles d'incidence et collecter les champ diffractés serait très ardu au laboratoire : c'est pourtant le mode de fonctionnement standard du MTD !

L'inversion consiste alors à effectuer une mesure classique en MTD (incidences multiples séquentielles) puis à extraire les valeurs $e^{-jq.s(x,y)}$ par découpe d'un plan d'altitude constante dans les fréquences préalablement projetées en $\mathbf{k}_d - \mathbf{k}_i$. Enfin, on effectue une `fft2D` et une correction du facteur q . Le procédé de tri est illustré simplement sur la figure ci-contre (FIG.4.22).

La procédure d'inversion est donc simple et rapide, mais il faut remarquer qu'elle est limitée par l'approximation de Kirchhoff et que les gains obtenus par Wombell en 1D sont faibles en 1D. Il s'agira donc d'étudier le gain apporté par la multiplicité des données en 2D, et les limites liés au modèle direct.

Remarquons enfin qu'une solution est apportée par une modélisation plus rigoureuse du problème direct, et une inversion de type problème inverse, au prix d'une certaine complexité et donc de temps de calcul plus élevés [161].

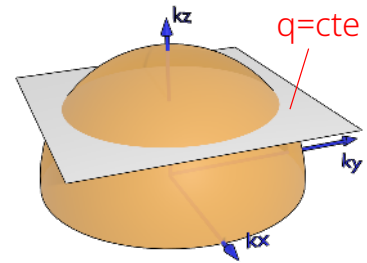


FIGURE 4.22 – Tri fréquentiel permettant une inversion par `fft2D`

4.3 Bilan et orientations

Le MTD en réflexion permet une amélioration de la résolution en 2D, par un procédé simple de synthèse d'ouverture.

En topographie de surface, dans la limite des faibles pentes/hauteurs, la mesure de phase associée à une correction d'aberration automatique permet d'atteindre une précision nanométrique sur les profils de hauteur. Le contrôle du spectre angulaire d'illumination (et l'illumination successive) permet de résoudre les problèmes associés à la calibration des microscopes interférométriques, de faciliter le déroulement de phase/réduire les problèmes d'échantillonnage et d'améliorer certains aspects limitant en microscopie interférométrique (ombrage, rapport signal/bruit, problèmes de chromaticité...).

En 3D, le système en réflexion permet d'atteindre des hautes fréquences le long de l'axe longitudinal et donc une bonne qualité de sectionnement, mais souffre d'une absence de basses fréquences : la fusion transmission-réflexion est une solution qui sera évoquée dans la partie projet.

Ces deux thématiques regroupent des apports à la MTD qui ne sont pas directement liés à l'amélioration de la résolution. Certains progrès peuvent en effet être des apports supplémentaires d'informations ou une simplification des systèmes déjà existants. Ces méthodes numériques et expérimentales ont en grande partie été développées durant les thèses de Ludovic Foucault [108] et Asemare Mengistie Taddese [85].

5.1 Tomographie 4π et tomo miroir

L'imagerie en réflexion abordée dans la partie précédente permet d'étendre le support spectral, cependant l'OTF résultante est très asymétrique.

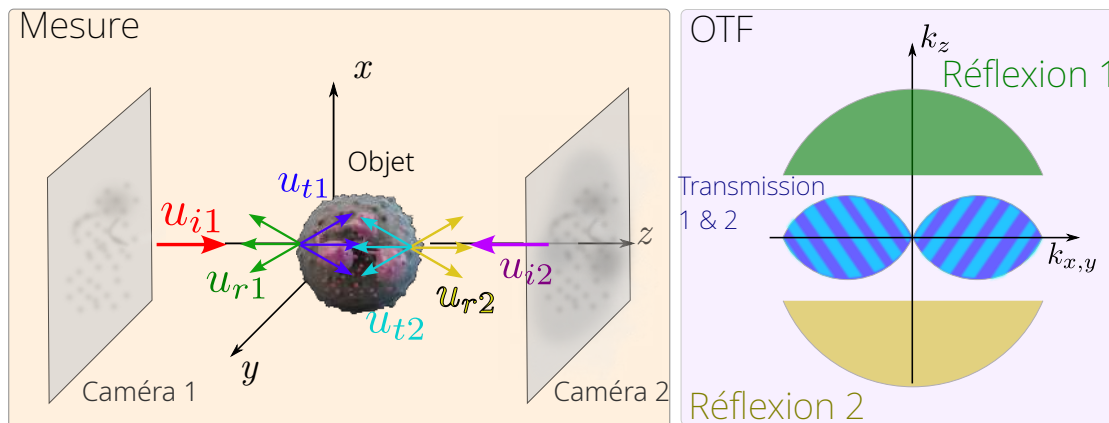


FIGURE 5.1 – Principe de la tomographie 4π : une double illumination permet de collecter 4 supports fréquentiels en transmission/réflexion

Il est possible de rendre isotrope l'OTF en capturant l'onde en réflexion obtenue par

une illumination à 180° de la première. La méthode, déjà mentionnée par V. Lauer en 2002 [64], nécessite un double système tomographique afin d'illuminer l'échantillon par les 2 côtés, et collecter les ondes rétrodiffusées associées.

Cette méthode évite les problèmes mécaniques liés à la rotation de l'échantillon. Le principe de la mesure est illustré sur la figure 5.1 : deux illuminations u_{i1} et u_{i2} permettent de collecter 2 signaux rétrodiffusés u_{r1} , u_{r2} . La partie basse fréquence collectée avec la 2^e onde en réflexion permet de symétriser l'OTF à l'exception d'une zone limitée dans la partie intermédiaire du spectre.

La mise en œuvre expérimentale nécessite de dupliquer l'interféromètre de Mach-Zehnder décrit sur la figure 2.12. Sans poser de problèmes techniques vraiment supérieurs à celui de la version en MTD classique, ce système reste toutefois fastidieux à mettre en œuvre et plus coûteux (2 caméras, 2 systèmes de balayage). Une solution a été pro-

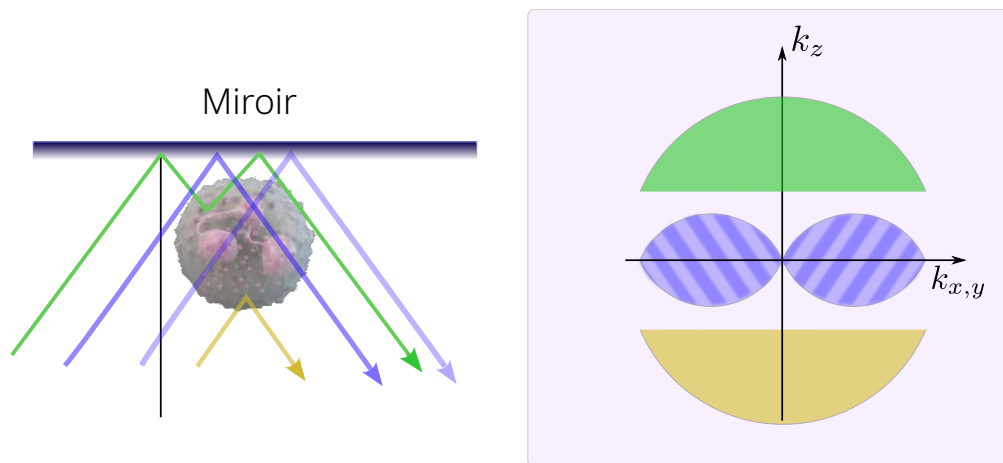


FIGURE 5.2 – Principe de la tomographie miroir. Les 4 signaux peuvent être collectés avec une seule illumination.

posée de façon théorique par Mudry [162]. La moitié dupliquée du système peut-être avantageusement remplacée par un miroir, placé à une distance faible de l'objet. Une telle configuration permet une détection 4π , mais en utilisant un seul objectif et un seul système de balayage. En remplaçant la caméra 2 de la figure 5.1 par un miroir, u_{i1} joue également le rôle de la 2^e onde d'illumination u_{i2} (FIG. 5.2).

La reconstruction/démodulation, basée sur la transformée discrète en cosinus, nécessite un modèle vectoriel prenant en compte le miroir. Cette méthode a été testée expérimentalement au laboratoire sur des objets simples (billes, cristaux) dans les thèses de L. Foucault [108] et H. Liu [77]. La figure 5.3 illustre le type d'image obtenue en tomographie miroir par une reconstruction brute en transmission de cristaux de iodure de potassium. Les 3 images correspondent à 3 projections de l'image 3D, obtenues pour différents angles de rotation du volume 3D (0° , angle intermédiaire, 90°).

Intérêt d'une tomographie miroir simplifiée

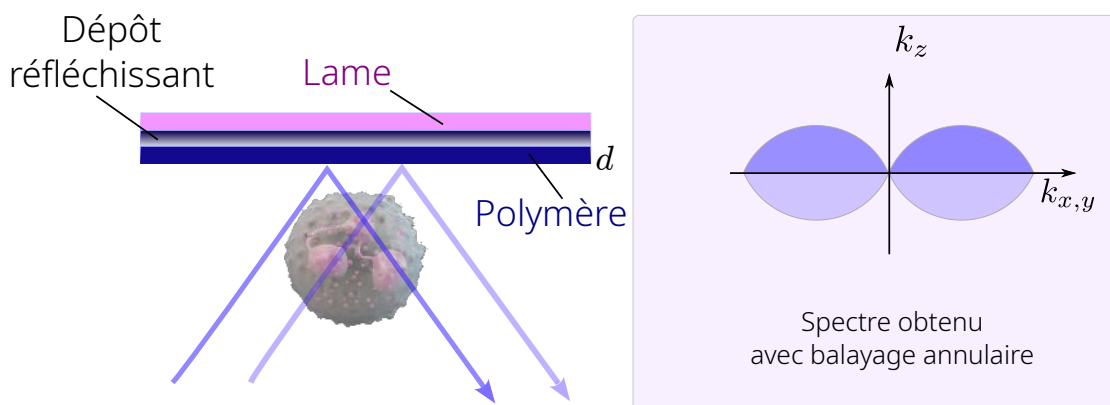


FIGURE 5.4 – Tomographie miroir utilisée pour la transmission. Le polymère assure la séparation de l’image et de celle obtenue par l’effet du miroir. Le spectre obtenu est symétrique.

Une reconstruction et une démodulation simplifiée ont été proposées par L. Foucault [163]. L’image obtenue est une ”simple” image en transmission : dans le cas d’un balayage annulaire, l’intérêt réside dans la diminution par 2 du nombre d’acquisitions (multiplexage dans l’espace image), mais aussi dans l’élimination des artefacts liés aux problèmes de dissymétrie pour les échantillons absorbants.

Dans le cas d’un balayage complet, cette version simplifiée permet aussi de tester le principe de la tomographie miroir, car les 2 informations obtenues sont censées redonner le même objet, une différence indiquant un problème de reconstruction ou expérimental.

La démodulation nécessite une préparation spéciale des échantillons (FIG. 5.4) : afin de séparer l’image classique de l’image miroir, un polymère d’épaisseur d permet de contrôler la séparation des 2 images après reconstruction. La qualité du dépôt, effectué à la tournette (spin coating) est critique : toute variation va entraîner une erreur sur la phase locale.

L’image reconstruite directement en TDM est composée de 2 images : leur séparation est faite spatialement (espace direct), puis leurs spectres sont combinés pour reconstituer le spectre complet FIG.(5.5).

Ce mode de reconstruction a été testé expérimentalement sur des billes de polystyrène. La fusion des données permet d’améliorer la valeur attendue, mais la reconstruction brute montre une différence de dimensions qui n’apparaît pas sur les cristaux de KI. Une explication possible est que ces billes présentent des différences d’indice importantes, ce qui entraîne une modification de l’onde d’illumination. L’algorithme de reconstruction devrait donc prendre en compte cet effet. Ce problème sera abordé dans

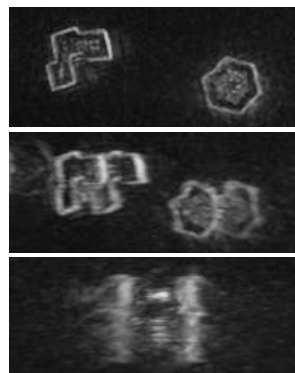


FIGURE 5.3 – Images 3D obtenues par tomographie miroir sur des cristaux de KI (projections)

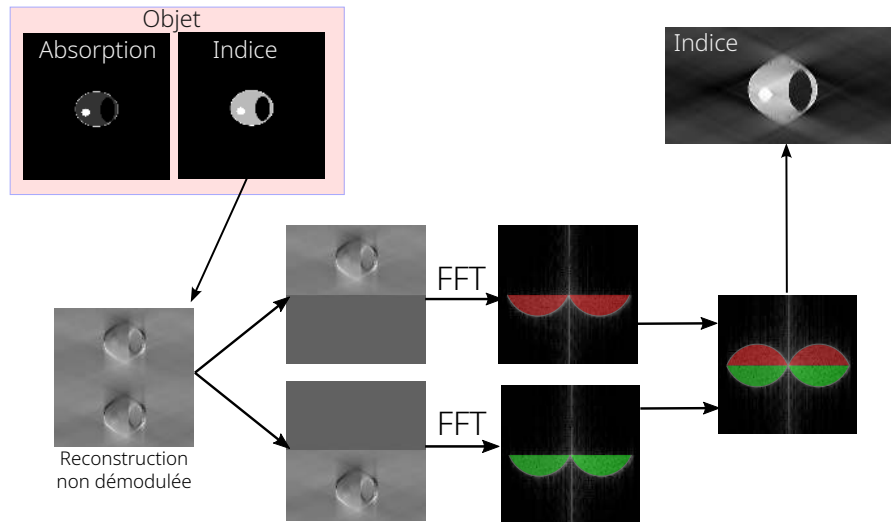


FIGURE 5.5 – Principe de la reconstruction en tomographie miroir en transmission, illustré par l'information d'indice (simulation)

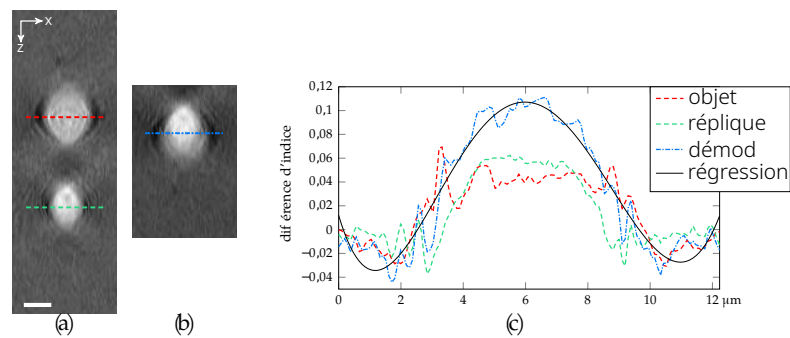


FIGURE 5.6 – Reconstruction d'une bille de polystyrène de 5 μm . (a) : Image et sa réplique. (b) La fusion des données améliore la valeur attendue, mais la réplique présente une différence de diamètre avec l'image. (c) : profils d'indice

la partie projet.

5.2 Imagerie par analyseur de front d'onde

Pour la mesure de phase, les analyseurs de front d'onde sont une alternative à l'interférométrie, dont ils éliminent certains inconvénients : source cohérente (et bruit associé), stabilité liée à la variation de phase entre les 2 bras, encombrement lié au bras de référence . . . Il existe plusieurs type d'analyseurs de front d'onde :

- analyseur de courbure, qui calculent la dérivée seconde du front d'onde à partir de la mesure de 2 profils d'intensité
- Les interféromètres à décalage latéral (shearing [164].)
- Les analyseurs de Shack-Hartmann

Le laboratoire s'est doté d'une caméra Phasics [165], dont la mesure de phase repose sur l'interférométrie à décalage multi-latéral (QWLSI¹).

L'interférométrie à décalage multilatérale

Les analyseurs de Shack-Hartmann figurent parmi les analyseurs les plus populaires. Ils possèdent des qualités de rapidité, sensibilité, compacité qui les rendent très adaptés par exemple aux traitements en optique adaptative, mais ils présentent aussi une limitation fondamentale : le modèle est basé sur l'optique géométrique et les sous pupilles de chaque lentille travaillent de façon indépendante.

Les analyseurs MWLSI ("M" pour «multi») reposent également sur un masque diffractant, mais travaillent de façon globale en considérant l'ensemble des sous-pupilles. La grille de microlentilles est décrite comme un réseau diffractif bidimensionnel, dont les ondes interfèrent entre elles. Les différentes répliques ont un vecteur d'onde incliné d'un angle proportionnel à λ/p , p étant le pas du réseau (distance entre les micro-lentilles). Une description plus avancée du Shack Hartmann peut donc s'inscrire naturellement dans la catégorie des interféromètres à décalage latéral, mais en travaillant sur un gradient bi-dimensionnel [166].

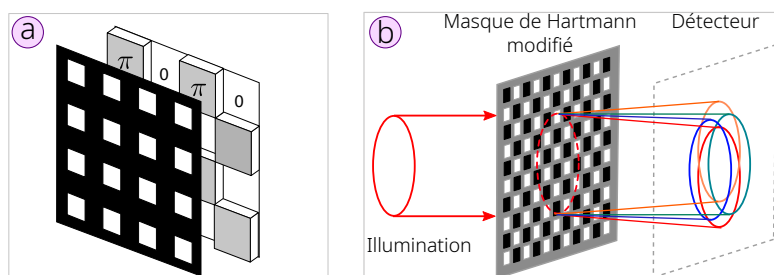


FIGURE 5.7 – (a) Détail du masque de Hartmann modifié et (b) Principe de la mesure. D'après [166] et [167].

1. QWLSI : quadri wave lateral shearing interferometry ou interférométrie à décalage quadrilatéral

Afin de limiter la complexité de traitement, ces systèmes ont d'abord été limités à 3 répliques [168], nombre minimal pour conserver la propriété de mesure multidirectionnelle du gradient. Cette version nécessite un filtrage dans un plan de Fourier intermédiaire, pour éliminer les répliques, ce qui rend le dispositif plus encombrant. La version quadrilatérale permet essentiellement de rendre le système plus compact et moins coûteux.

Le principe repose alors sur l'association d'un réseau de diffraction 2D (matrice d'ouvertures carrées, agissant comme un masque de Hartmann) et d'un masque de phase $[0 - \pi]$ avec un rapport cyclique largeur/pas approprié. Ce système ne diffracte en première approximation que les ordres $+1$ et -1 ² : le front d'onde à mesurer est ainsi reproduit en quatre copies interférant ensembles (FIG. 5.7).

Techniquement, le réseau est constitué d'un verre optique modulé en profondeur sur lequel est imprimé un masque de chrome.

On peut néanmoins remarquer que par construction, l'utilisation d'un tel masque est incompatible avec les applications nécessitant un contrôle de la référence (multiplexage, imagerie hétérodyne [169], contrôle en polarisation etc.). Son utilisation est également limitée par l'échantillonnage et à une gamme spectrale située entre 480 et 700 nm, le rapport signal à bruit se dégradant au delà [170].

À noter enfin que la modulation de phase peut être réalisée par un SLM [171] ou le masque lui-même placé dans un montage $4f$ [172], ce qui rend le système accessible au laboratoire avec une simple caméra industrielle.

Le dispositif a été utilisé en microscopie de phase en transmission [173, 174] notamment en biologie [167], ainsi qu'en tomographie diffractive en réflexion [175].

Il a été implémenté dans un dispositif classique de MTD au laboratoire par Ludovic Foucault [108] : la source laser et balayage avec FSM300 produisent l'illumination et le balayage, mais le montage est simplifié par l'absence d'interféromètre (FIG. 5.8). La position du spéculaire est récupérée à posteriori via les tensions de balayage.

Les images obtenues avec ce montage expérimental simplifié montrent une nette amélioration en MTD avec 32 angles malgré un signal d'absorption asymétrique et qui devrait être très faible sur un objet quasi transparent. L'asymétrie est provoquée par la construction de l'OTF (voir paragraphe sur la symétrie spectrale 3.2.1), et accentuée par le nombre peu élevé d'hologramme acquis. En outre le recalage des différentes sphères d'Ewald, est moins précis qu'avec une position du spéculaire extraite d'un hologramme en MTD classique. Certains points sont donc à améliorer du côté expérimental : travail en lumière blanche, détermination plus précise des spéculaires, augmentation des acquisitions ou algorithmes avancés. . .

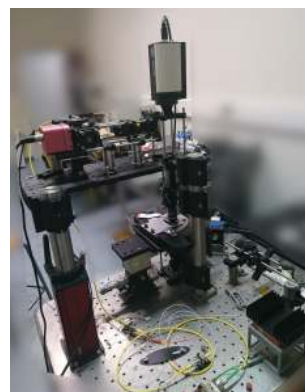


FIGURE 5.8 – Installation sur le montage MTD

2. Il existe en réalité des ordres supérieurs, mais 90% de l'énergie est concentrée dans les 4 ordres principaux

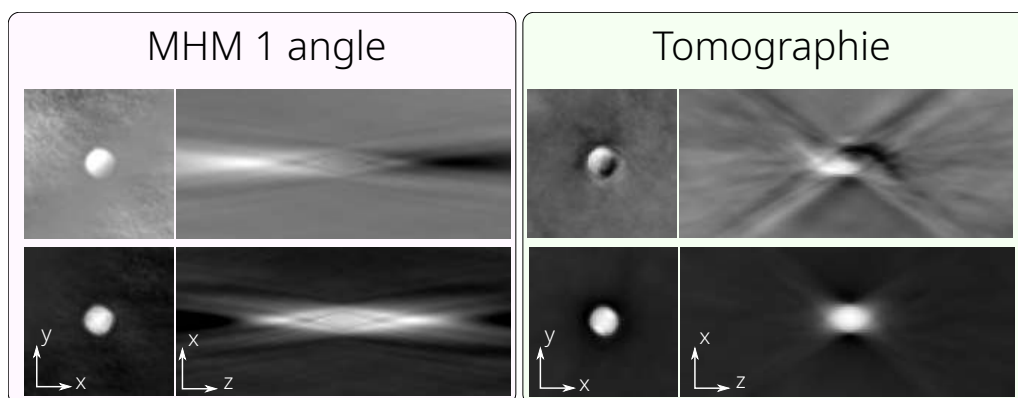


FIGURE 5.9 – Images d’une bille de polystyrène ($8 \mu m$) avec le masque de Hartmann modifié : (a) Ouverture numérique d’illumination nulle et (b) Tomographie [108]

5.3 La MTD polarimétrique : imagerie vectorielle

Jusqu’ici, les modèles utilisés reposaient sur une théorie scalaire : la nature vectorielle de la lumière a été ignorée. La limite la plus évidente concerne les échantillons microscopiques anisotropes : leur interaction avec la lumière change en fonction de la polarisation et de l’orientation des molécules.

L’imagerie polarimétrique est une technique bien établie dans certains domaines où les échantillons sont biréfringents par nature (cristaux liquides, tissus biologiques comme le collagène, amidon, etc.). En microscopie 2D classique (intensité), les échantillons présentant un contraste faible gagnent immédiatement un contraste en imagerie polarimétrique. C’est donc d’abord un mode d’imagerie permettant de dégager une certaine spécificité.

Ces dernières années, ce mode d’imagerie microscopique a été étendu en le couplant à l’imagerie de phase : plusieurs équipes se sont ainsi intéressées à l’imagerie polarimétrique interférométrique/holographique [176-178] ou ptychographique [179]. Le système a été également amélioré par une synthèse d’ouverture 2D, afin d’augmenter la sensibilité de la technique [180]. Des modèles plus complets ont également été traités en MTD en réflexion [45, 175].

Au-delà de l’information spécifique fournie par certains échantillons, la prise en compte de la polarisation permet d’améliorer les modèles physiques, par nature vectoriels.

Formalisme simplifié

Le problème est ici traité par le formalisme de Jones dans lequel les vecteurs représentent l’état de polarisation des ondes. L’état de polarisation de l’onde sortante d’un objet est lié à l’état entrant via la matrice de Jones :

$$\mathbf{u}_d(\mathbf{r}) = J_{obj}(\mathbf{r})\mathbf{u}_i(\mathbf{r}) \quad (5.1)$$

La matrice de Jones est a priori une matrice [3x3]. L'objet est quant à lui caractérisé par un tenseur diélectrique $\bar{\epsilon}$, et non plus par une valeur unique de l'indice de réfraction.

L'imagerie polarimétrique en TDM consiste à retrouver le tenseur diélectrique à partir de la mesure de la matrice de Jones liant l'onde incidente et l'onde diffractée, ce qui nécessite un modèle physique direct vectoriel. Parmi les modèles existants en transmission, on peut citer par ex. V. Lauer qui avait déjà proposé un modèle direct vectoriel en 2002 [64], mais ces modèles sont restés peu utilisés jusqu'ici, l'inversion étant impossible ou peu efficace en terme de temps de calcul.

Modèle direct. Repartant des équations de Maxwell, pour une onde monochromatique, dans un milieu linéaire, non magnétique, la propagation est décrite par :

$$\nabla \wedge \nabla \wedge \mathbf{u}_t(\mathbf{r}) - k_0^2 \mathbf{u}_t(\mathbf{r}) = k_0^2 [\bar{\epsilon}(\mathbf{r}) - \mathbb{I}] \mathbf{u}_t(\mathbf{r}) \quad (5.2)$$

Les notations sont les mêmes qu'au paragraphe 2.2.2, dédié au modèle direct sous l'approximation de Born.

Malgré la prise en compte de la nature vectorielle, nous utilisons un modèle simplifié qui nécessite certaines approximations. En développant le double rotationnel :

$$\nabla \wedge \nabla \wedge \mathbf{u}_t = -\nabla^2 \mathbf{u}_t + \nabla \nabla \cdot \mathbf{u}_t \quad (5.3)$$

Le terme $\nabla \nabla \cdot \mathbf{u}_t$ peut induire un couplage des composantes de polarisation, même en l'absence de biréfringence [34, 181]. Cette expression peut être réduite à³

$$-\nabla(\mathbf{u}_t \cdot \nabla \ln(\epsilon)) \quad (5.4)$$

en l'écrivant de façon simplifiée.

En dehors du cas où le plan de diffraction est perpendiculaire au champ, Le terme $\mathbf{u}_t \cdot \nabla \ln(\epsilon)$ peut être négligé si les variations de la permittivité sont petites devant la longueur d'onde [181, 182]. **Les seuls couplages de polarisation sont alors dus à la biréfringence de l'échantillon : c'est le cas envisagé ici.** L'équation de propagation prend alors la forme vectorielle :

$$(\nabla^2 + k_0^2) \mathbf{u}_s(\mathbf{r}) = k_0^2 \left[\frac{\bar{n}(\mathbf{r})}{n_0^2} - \mathbb{I} \right] \mathbf{u}_t(\mathbf{r}) \quad (5.5)$$

Dans ce cadre, la résolution, basée sur les fonctions de Green, est également très proche du cas développé pour l'approximation de Born. Outre le champ total \mathbf{u}_t et le tenseur d'indice \bar{n} , la fonction de Green est aussi tensorielle (fonction de Green "dyadique") : $\mathbf{G}(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \mathbb{I}g(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$ avec $g(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \frac{\exp(jk_0|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|)}{4\pi|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|}$, déjà définie au paragraphe 2.2.3. Dans ce cas :

$$\mathbf{u}_s(\mathbf{r}) = \int_V \bar{\bar{G}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \bar{\bar{f}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \mathbf{u}_t(\mathbf{r}, \mathbf{r}') d\mathbf{r}' \quad (5.6)$$

3. En notant que $\nabla \ln g = \frac{\nabla g}{g}$ et en l'absence de courants/charges libres, i.e. $\nabla \cdot (\epsilon \mathbf{u}_t) = 0$

Cette forme vectorielle pose les mêmes problèmes que l'équation scalaire 2.10. En utilisant la première approximation de Born, avec une onde plane $\mathbf{u}_i(\mathbf{r}') = \mathbf{a}_i(\mathbf{r}') \exp(j\mathbf{k}_i \mathbf{r}')$, on obtient :

$$\mathbf{u}_B(\mathbf{r}) = \int_V \overline{\overline{G}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \overline{\overline{f}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \mathbf{a}_i(\mathbf{r}') \exp(j\mathbf{k}_i \mathbf{r}) d\mathbf{r}' \quad (5.7)$$

où \mathbf{a}_i est l'amplitude complexe vectorielle de l'onde incidente.

Sous l'approximation de Born, on considère que les composantes de polarisation de l'onde incidente ne dépendent pas de la position \mathbf{r} .

$$\mathbf{u}_B(\mathbf{r}) = \left[\int_V \overline{\overline{G}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \overline{\overline{f}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \exp(j\mathbf{k}_i \mathbf{r}) d\mathbf{r}' \right] \mathbf{a}_i \quad (5.8)$$

Cette équation est similaire au cas scalaire, à l'exception de la présence du terme \mathbf{a}_i à droite, et des grandeurs tensorielles.

Nous supposons ici que les tenseurs se limitent à une matrice [2x2] soit pour le potentiel :

$$\overline{\overline{f}}_{3 \times 3} = \begin{pmatrix} \overline{\overline{f}}_{2 \times 2} & f_{xz} \\ & f_{yz} \\ f_{zx} & f_{zy} & f_{zz} \end{pmatrix}$$

Malgré cette simplification, 4 mesures sont nécessaires.

Mesure polarimétrique. Ces 4 mesures sont faites simplement par contrôle des polarisations d'entrée et de sortie, chaque état (entrée/sortie) de polarisation pouvant prendre 2 valeurs.

La mesure est effectuée en utilisant une polarisation d'entrée circulaire gauche ou droite, afin d'éviter les problèmes liés à l'analyse entre polariseurs croisés (fond d'intensité nulle [182]). En outre, l'automatisation des mesures est simplifiée, car seul le changement de la polarisation d'entrée est nécessaire.

La mesure des 2 états de polarisation de sortie est ici réalisée automatiquement par une caméra de polarisation, qui possède l'avantage de multiplexer les mesures en polarisation (4 états mesurés, dont 2 utiles, sur une image). En contrepartie, cela impose un démosaïquage de la mesure [183]. Remarquons qu'en l'absence de démosaïquage, la caméra de polarisation permet d'effectuer une mesure de type DIC [184].

En pratique, il faut :

- 2 mesures avec une illumination polarisée circulaire droit (état «a»), détectée à 0° (direction x) et 90° (direction y) sur la caméra : $[u_B^{ax}; u_B^{ay}]$
- 2 mesures avec une illumination polarisée circulaire gauche (état «b»), détectée sur la caméra à 0° et 90° $[u_B^{bx}; u_B^{by}]$.

L'équation 5.8 peut être réécrite pour les 4 mesures, dans l'espace de Fourier :

$$\overline{\overline{F}}(k_d - k_i) = \frac{k_{dz}}{2\pi j} \mathcal{F} \left\{ \begin{pmatrix} u_B^{ax} & u_B^{bx} \\ u_B^{ay} & u_B^{by} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} u_i^{ax} & u_i^{bx} \\ u_i^{ay} & u_i^{by} \end{pmatrix}^{-1} \right\} \quad (5.9)$$

Cette équation fournit la base pour la tomographie vectorielle sous l'approximation de Born.

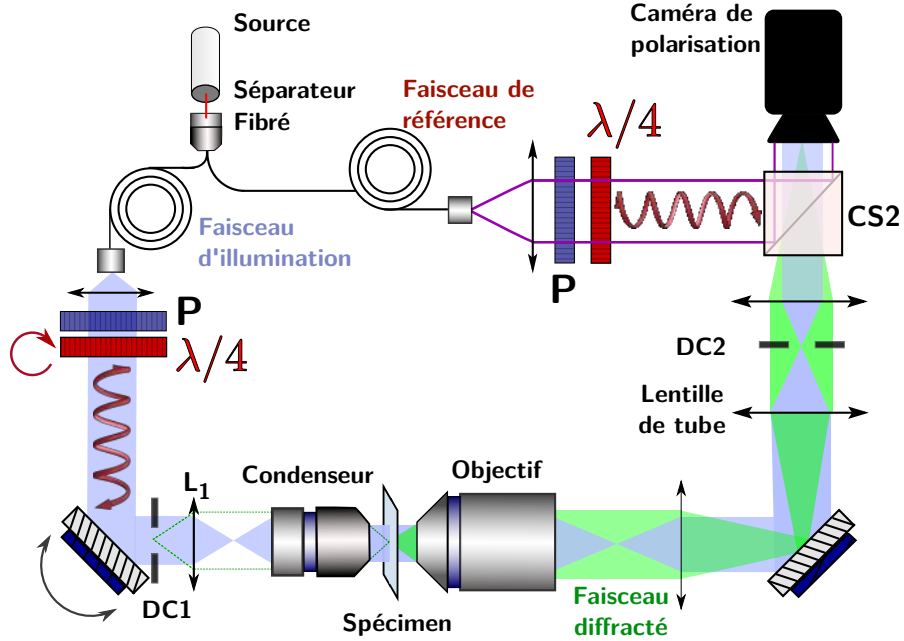


FIGURE 5.10 – Principe du montage de la MTD polarimétrique.

Cas de l'incidence normale. Pour une onde incidente normale, les 2 possibilités d'illumination sont :

$$u_i^{a,b} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} 1 \\ \pm i \end{pmatrix} \quad (5.10)$$

La multiplication matricielle de l'eq. 5.9 mène alors à la solution dans le cas holographique :

$$\overline{\overline{F}}(k_d - k_i) = \frac{k_{dz}}{2\sqrt{2}\pi j} \mathcal{F} \left\{ \begin{pmatrix} u_B^{bx} + u_B^{ax} & j(u_B^{bx} - u_B^{ax}) \\ u_B^{by} + u_B^{ay} & j(u_B^{by} - u_B^{ay}) \end{pmatrix} \right\} \quad (5.11)$$

Effet de l'illumination oblique. En MTD, l'illumination via un objectif de grande ouverture numérique permet d'atteindre des angles importants. Autrement dit, l'angle polaire (voir FIG. 2.8) est quasi nul avant le condensateur ou après l'objectif collecteur, mais les composantes de polarisation de l'onde incidente u_i ou diffractée u_d subissent une modification qu'il est impossible de négliger entre les 2 objectifs. Les équations précédentes décrivent le système avec les champs u_i et u_B juste avant et après l'objet. Pour lier ces champs à ceux en entrée du système optique u_e et mesuré u_m (FIG. 5.11), une matrice de rotation R dépendant des angles polaire et azimutal θ , φ décrits sur la figure 2.8 doit être appliquée [182, 185] :

$$\mathbf{u}_B = R^{-1} \mathbf{u}_m \quad (5.12)$$

$$\mathbf{u}_i = R \mathbf{u}_e \quad (5.13)$$

$$(5.14)$$

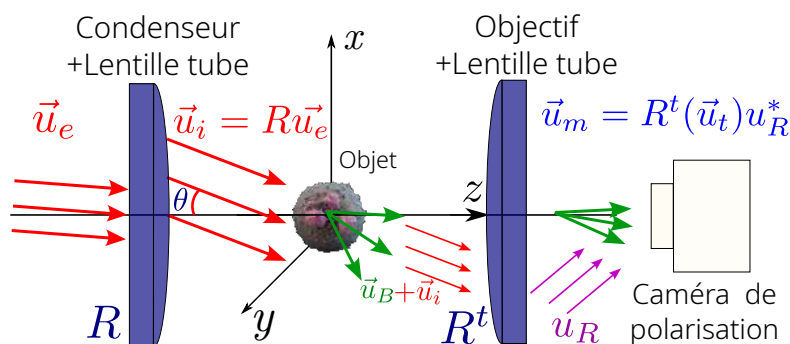


FIGURE 5.11 – Le travail à grandes ouvertures modifie les composantes de polarisation (matrice de rotation R)

Ces angles sont déterminés a posteriori, grâce à la mesure de la position du spéculaire dans l'espace de Fourier, qui permet déjà en MTD scalaire de recalibrer les sphères d'Ewald entre elles.

Enfin, le champ \mathbf{u}_m est relié à la mesure holographique par l'équation 1.1, dans laquelle l'ordre 1 est sélectionné : $\mathbf{u}_m = \mathbf{u}_o \mathbf{u}_R^*$.

Notons qu'une correction supplémentaire doit être utilisée pour corriger \vec{k}_i et les composantes de polarisation si une interface (air/eau par ex.) modifie cet angle.

Validation de l'approche et interprétation des mesures

Afin de tester la validité de l'approche, la microscopie TDM a d'abord été testée au laboratoire sur des simulations s'appuyant sur l'algorithme BPM amélioré. En calculant le champ diffracté par un objet biréfringent, on dispose d'un objet de référence permettant de valider la partie reconstruction sur une large gamme de paramètres. L'algorithme repose sur un découpage en tranche de l'objet et une séparation des opérateurs de diffraction et réfraction. Il est brièvement décrit au paragraphe 6.2.3.

Le MTD polarimétrique est plus riche en données que le MTD scalaire : il fournit 2 tenseurs (indice et absorption), c'est à dire 8 valeurs par pixel de l'image 3D. Les données peuvent être interprétées sous différentes formes. Il est par exemple possible de recalculer les indices principaux n_1 et n_2 par une diagonalisation pixel à pixel :

$$\bar{\bar{n}}(\mathbf{r}) = \begin{pmatrix} n_{xx} & n_{xy} \\ n_{yx} & n_{yy} \end{pmatrix} = R' \begin{pmatrix} n_1 & 0 \\ 0 & n_2 \end{pmatrix} R'^{-1} \quad (5.15)$$

où R' est une matrice de rotation 2D, lié à l'angle de l'axe rapide. L'indice moyen, la biréfringence ($n_1 - n_2$) ou la retardance (écart de phase entre états propres), l'orientation $\gamma = \frac{1}{2} \arctan \left[\frac{n_{xy} + n_{yx}}{n_{xx} - n_{yy}} \right]$ de l'axe rapide peuvent être calculées à partir de ces données.

Ces capacités d'imagerie sont illustrées sur la figure 5.12. L'échantillon est un mélange de billes de silice (isotrope) et d'amidon de pomme de terre (biréfringent) qui permet d'illustrer l'apport de la polarimétrie, les données concernant les billes n'apparaissant pas dans les informations polarimétriques. La fécule de pomme de terre est composée

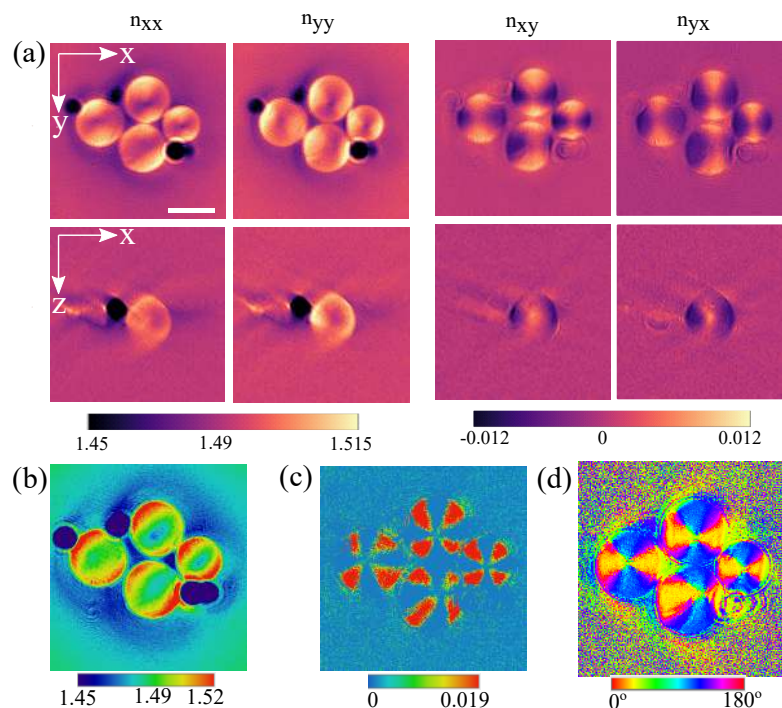


FIGURE 5.12 – Application de la MTD polarimétrique sur un mélange amidon (biréfringent) et billes de silice (isotrope) : (a) tenseur d'indice, (b) indice moyen, (c) biréfringence (d) orientation de l'axe rapide. Noter la disparition des billes de silice sur les images avec information polarimétrique. Barre d'échelle : $10 \mu m$.

d'environ 20% d'amylose, dont l'image en polarimétrie montre une structure typique en croix de Malte. La structure cristalline de l'amidon est clairement visible sur les grandeurs hors diagonale du tenseur et illustrée sur la biréfringence ou l'orientation des axes.

5.4 Conclusion et orientations

La MTD miroir ou les modes d'enregistrement des ondes complexes à chemin commun permettent de simplifier les acquisitions (nombre d'acquisitions, disparition des bras de référence interférométriques...). La tomographie 4π miroir sera abordée dans une autre configuration dans le dernier chapitre.

Via l'anisotropie d'indice ou d'absorption, la MTD polarimétrique permet d'ajouter une source de contraste, et donc de spécificité, à l'imagerie classique MTD. Le système à base de caméra de polarisation et d'une illumination en onde polarisée circulairement offre une certaine simplicité de mise en œuvre. L'imagerie sous le formalisme de Jones et le système actuel montre certaines limites : le degré de polarisation n'est pas mesuré, et les résultats obtenus sont pour l'instant restreints aux tenseurs 2×2 . Une mesure du

degré de polarisation fait partie des premières améliorations envisageables, au prix d'une augmentation du nombre d'acquisitions.

Au-delà de l'intérêt intrinsèque de la MTD polarimétrique (mode de contraste spécifique), la mesure des composantes de polarisation présente une utilité particulière dans les modèles directs avancés. Un couplage avec la tomographie 4π miroir et un système d'interférométrie à chemin commun permet d'envisager des mesures simplifiées et robustes. Cette combinaison sera détaillée dans la partie projet.

Les différents modes d'imagerie développés au laboratoire présentent des limites à la fois sur l'aspect expérimental et théorique/numérique. Des pistes sont proposées dans les 3 parties de ce chapitre.

Dans le cadre de l'imagerie linéaire, l'OTF reste limitée dans les hautes fréquences et le cône manquant. La fusion des données en réflexion-transmission déjà acquises *séparément* au laboratoire offre une solution naturelle à ce problème à l'aide d'un montage 4π .

D'un point vu plus fondamental, les reconstructions sous l'approximation de Born montrent leurs limites avec des objets à contraste d'indice important ou présentant de la diffusion multiple. Ce problème trouve une issue avec une reconstruction de type problème inverse associée à un modèle direct avancé. L'accent est mis sur les modèles physiques dont le coût de calcul reste contenu.

Les modèles directs les plus complets (vectoriels) couplés à la TDM polarimétrique permettent d'envisager à terme une imagerie 3D sans marquage polyvalente en terme d'échantillon. Ces modes de reconstruction pourront être couplés aux montages basse cohérence à chemin commun, certains ayant déjà été étudiés au laboratoire, afin de fournir un mode d'imagerie simplifié (imagerie en lumière blanche/absence de bras de référence), robuste (stabilité, bruit) et rapide (multiplexage).

6.1 Couplage réflexion/transmission : tomographie 4π et λ

Même en tomographie 4π , une lacune fréquentielle pose toujours problème dans la partie intermédiaire du spectre. De plus, la fusion numérique des 2 informations n'est pas directement possible, car les 2 supports ne se recouvrent pas (écart Δk_z sur la FIG. 4.3). Les deux OTF commencent à se recouvrir pour une ouverture numérique d'environ 1,43, valeur supérieure à l'ouverture numérique des objectifs actuellement disponibles, hors objectifs TIRF.

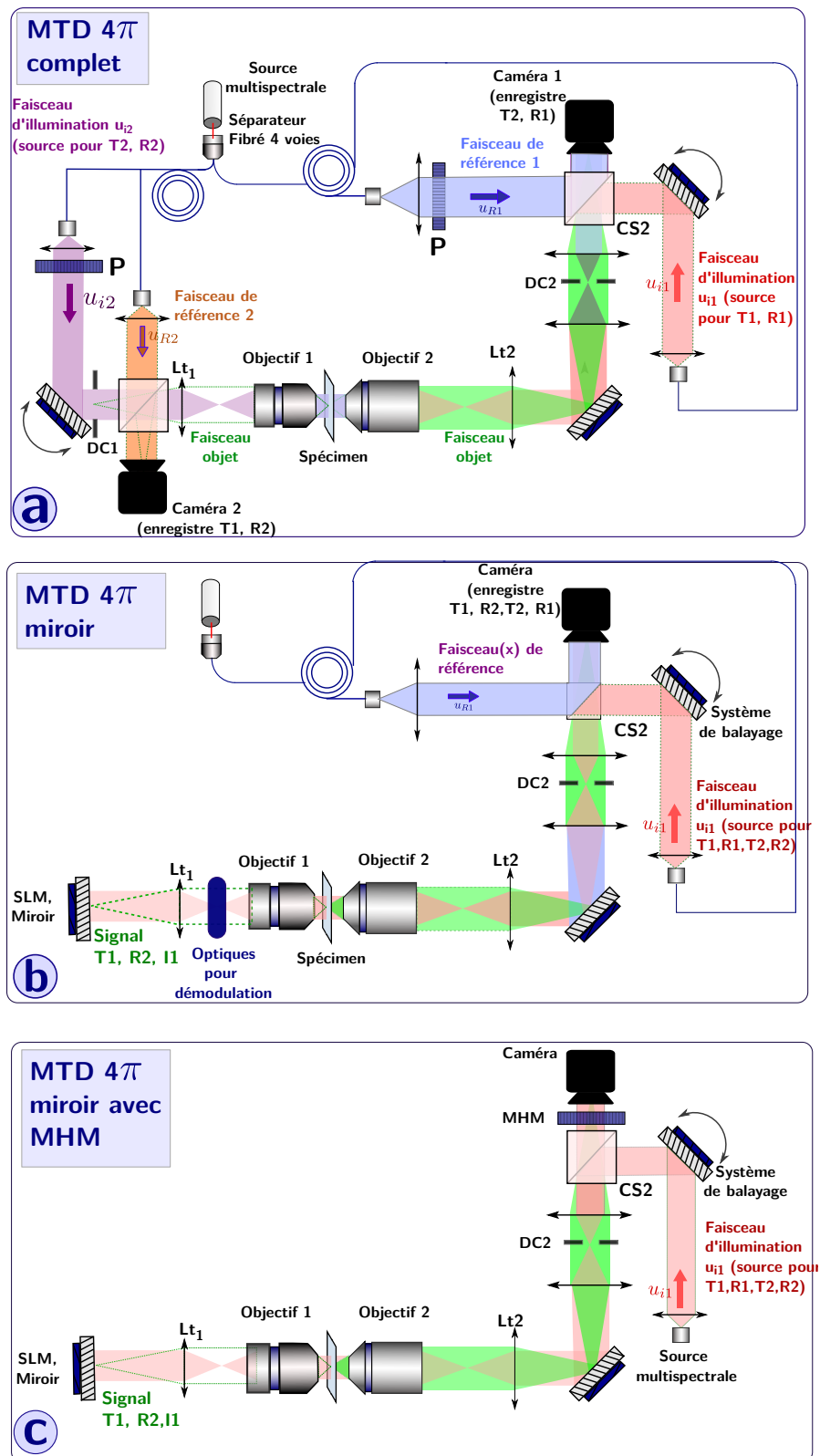


FIGURE 6.2 – Systèmes expérimentaux MTD 4π . La complexité expérimentale décroît de haut en bas, mais la séparation des différents signaux se complique. Par simplicité, les illuminations ne sont pas tracées au-delà de l'objet dans le cas a).

Une solution pour remplir cet espace intermédiaire au moins partiellement existe en mode réflexion : l'imagerie à une longueur d'onde supérieure permet en effet d'atteindre la zone intermédiaire. Peu efficace en transmission, le balayage en longueur d'onde en réflexion permet d'atteindre les zones basses fréquence, en principe inaccessibles. Des zones de recouvrement apparaissent alors entre réflexion et transmission avec des ouvertures numériques pourtant inférieures à 1.43 (FIG. 6.1).

Enfin, l'aspect multispectral permettrait aussi de redonner de la spécificité sur l'image d'absorption.

Simplification : tomographie 4π avec miroir déporté.

Les premières implémentations de la tomographie miroir [77, 108] ont été réalisées avec un miroir directement sur la lame. Cette configuration limite les possibilités d'action sur les différentes composantes transmises/réfléchies. Une possibilité serait de déporter le miroir près d'un plan image conjugué, ce qui permet de séparer le chemin des 2 composantes (R+T). Il est alors possible d'agir sur ces composantes «déportées» pour dissocier les 2 signaux (par sélection de polarisation, filtrage de cohérence, etc.)

et faire une acquisition simultanée des différents signaux. Ce type de montage évite de dupliquer l'ensemble (caméra/balayage/référence) mais nécessite cependant une configuration 4π .

Les différentes possibilités de montage 4π sont illustrées sur la figure FIG. 6.2. Il existe un compromis entre complexité expérimentale, souplesse et séparation des différentes contributions.

1. La MTD 4π complète (FIG. 6.2a) est le système expérimentalement le plus exigeant, mais la séparation des composantes (R/T) est plus aisée, grâce au doublement des caméras et de l'illumination. Un contrôle indépendant des différentes références permettrait en outre d'envisager un multiplexage / une séparation transmission-réflexion.
2. La MTD 4π miroir (FIG. 6.2b) simplifie considérablement le montage en supprimant un ensemble illumination/caméra/référence. L'utilisation d'un interféromètre compact de type Michelson simplifie l'implémentation de certaines techniques (diffuseur tournant [26, 186], basse cohérence temporelle. . .) qui pourraient s'avérer nécessaires pour extraire le signal de réflexion.
3. Le montage à base de masque de Hartmann modifié est le plus simple : il peut prendre place sur un bâti commercial de microscope. L'absence de contrôle sur les références complique cependant la séparation des composantes, au moins dans le cadre d'une inversion «linéaire».

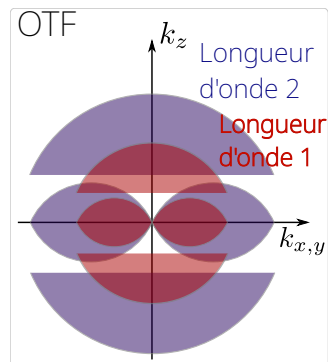


FIGURE 6.1 – MTD 4π bi-longueur d'onde

Techniquement, quel que soit le montage expérimental, la séparation de l'onde réfléchie et des signaux parasites réfléchis par les différentes optiques (lentille de tube, pupille arrière de l'objectif. . .) peut poser problème étant donné le niveau du signal de réflexion. Une méthode de séparation devra être implémentée : balayage spécifique et filtrage, système basse cohérence spatiale ou temporelle. . .

Enfin, une solution repose sur la modélisation complète du signal 4π et une inversion type problème inverse, décrite plus bas.

6.2 Modèles avancés et approches itératives «compatibles utilisateur»

Le contexte de cette section est fourni par les travaux initiés dans l'ANR HORUS et la première partie aurait donc pu être décrite dans le chapitre concernant l'amélioration du TDM original. Il prend cependant toute sa place dans la partie projet, car dépassant le cadre de l'imagerie de Fourier.

6.2.1 Contexte : problème de la diffusion multiple, réfraction due à l'objet et tomographie miroir/ 4π

Que ce soit dans l'étude du problème direct ou inverse, des approximations peuvent être utilisées soit pour arriver à un résultat (inversion brute impossible), soit pour accélérer l'obtention de ce résultat.

La MTD classique repose sur l'équation d'Helmholtz scalaire (problème direct) et sur l'hypothèse de faible diffraction (problème inverse). Sous ces conditions, le champ est linéairement relié à l'indice de réfraction via l'approximation de Born ou de Rytov. Le système peut être décrit par son OTF, ou de façon équivalente par sa réponse impulsionnelle optique. L'outil est élégant, mais pose plusieurs problèmes. Chaque tranche de l'échantillon interagit uniquement avec le faisceau incident non modifié par la réfraction, sans tenir compte de l'effet de la couche précédente. La diffusion multiple est ignorée et l'onde d'illumination considérée plane, quelle que soit la profondeur. Certaines approches expérimentales ont été proposées pour exclure la diffusion multiple par filtrage de cohérence [187] ou de polarisation, mais elles sont limitées aux échantillons très épais et ne prennent pas en compte la réfraction due à l'objet.

En réalité, réfraction et diffusion rendent ces hypothèses de moins en moins valables au fur et à mesure que l'onde progresse dans l'objet. L'inversion directe (Born) devient donc d'autant plus inefficace avec la profondeur. Le problème s'accroît encore en réflexion, notamment par tomographie miroir.

Du point de vue optique de Fourier, on peut aussi remarquer que cela revient à considérer la RIO variante en chaque point, et se dégradant de plus en plus avec la profondeur, ce qui connecte cette partie du projet aux travaux d'O. Haeberlé et A. Dieterlen [8, 188], qui avaient initié la MTD au laboratoire.

L'idée est ici d'utiliser une approche résolvant ces problèmes et applicable au projet de tomo 4π et/ou miroir.

Des reconstructions super résolues ? Au-delà des artefacts de reconstruction (morphologie, valeurs d'indice ou d'absorption) dus à ces effets, la prise en compte de la diffusion multiple permettrait dans certains cas d'augmenter la résolution et de dépasser la limite d'Abbe. Une explication est que les ondes évanescentes générées dans un milieu inhomogène sont converties en ondes propagatives par diffusion multiple [189-191]. Comme les ondes évanescentes peuvent contenir une information super-résolue, la diffusion multiple pourrait encoder l'information de super résolution dans les données de diffraction en champ lointain.

Ceci montre également que les simples critères de résolution basés sur la bande passante ou le critère de Rayleigh sont insuffisants pour caractériser la limite inférieure du pouvoir de résolution. Une alternative peut être proposée en inférence statistique : la borne de Cramér-Rao fournit une limite inférieure à la variance d'un estimateur non biaisé (au moins pour un grand nombre de mesures) [192-194] et permet donc d'estimer la limite de résolution théorique en utilisant quelques hypothèses «raisonnables» (modèle de formation de l'image, statistiques de bruit...). Si l'apport de la diffusion multiple en MTD semble dépendre de la configuration expérimentale, et notamment être plus intéressant dans les configurations expérimentales limitées (nombre limité d'acquisitions, accès limité aux sphères d'Ewald dans les hautes fréquences [195]), le sujet reste ouvert.

6.2.2 Approches inverses itératives

Afin de prendre en compte les effets réfractifs ou de diffusion multiple, l'utilisation d'un modèle direct plus précis semble nécessaire. L'inversion par approches itératives offre certains avantages dans ce cadre. Outre le bruit rendant instable l'inversion, l'inversion matricielle brute de tels modèles n'est en pratique pas réalisable, en raison de la taille des matrices obtenues en discrétisant le problème. Des informations a priori ou des contraintes souples (statistique de bruit...) peuvent aussi être utilisées dans l'algorithme, contrairement aux méthodes analytiques.

On peut distinguer les approches itératives dites algébriques des approches type problème inverse, basées sur un problème d'optimisation explicite.

On peut ici dresser un parallèle avec la tomographie CT. Bien que peu utilisées en pratique avant les années 2010, les méthodes itératives dites algébriques ont connu un important développement dans ce domaine depuis les années 70 (méthodes ART, SIRT...). La méthode ART a même originellement été utilisée en tomographie avant la FBP ! Elles sont reliées à l'algorithme de Kaczmarz (publié en 1937), lui-même relié à l'algorithme de Gauss-Seidel et sont particulièrement adaptées à la résolution de systèmes de grandes tailles [196]. En tomographie CT, elles ont notamment permis d'améliorer les reconstructions sur des données avec un faible rapport signal à bruit, ou un faible nombre d'acquisitions, cas utiles pour réduire l'irradiation [197].

Les méthodes basées sur les approches de type problèmes inverses, formulées explicitement comme un problème d'optimisation, permettent d'inclure une grande variété de régularisation et elle peuvent être utilisées sur une plus large classe de problèmes. Elles complètent les méthodes récemment implémentées en MTD.

Le principe de ces algorithmes est décrit brièvement, l'intérêt étant surtout porté sur le problème physique (modèle direct) qui va différencier la MTD des travaux effectués dans d'autres domaines et servir dans le cas présent.

Méthodes itératives «algébriques» et MTD

Ces méthodes construisent la solution par approximations successives d'un objet estimé, en effectuant des corrections à chaque itération. Le problème direct, permet de calculer une estimation \hat{m} des mesures (projections ou sinogramme en tomo CT) à partir d'un objet estimé \hat{f} . Une correction est appliquée à chaque estimation pour obtenir l'estimée suivante. Le type de correction différencie les variantes de l'algorithme.

Relativement simples à implémenter, elles nécessitent peu de connaissances a priori sur les données ou l'objet et des contraintes peuvent être utilisées. Ces méthodes sont cependant sensibles au bruit, qui doit être géré par contrainte, filtrage et/ou contrôle de la bande passante.

Une des plus anciennes méthodes itératives algébriques - et l'une des plus simples - est la méthode ART et ses dérivées (SIRT, SART...), elle-même proche [198] des algorithmes de type Van Cittert et dérivées [199-201]. Un objet estimé initial \hat{f}_0 est utilisé comme entrée du modèle direct, qui produit une image estimée \hat{m}_0 . La différence ϵ (résidu) avec la mesure m est alors utilisée pour corriger l'objet estimé :

$$\hat{f}^{k+1} = \mathcal{C}(\hat{f}^k - \Delta\hat{f}^k) \quad (6.1)$$

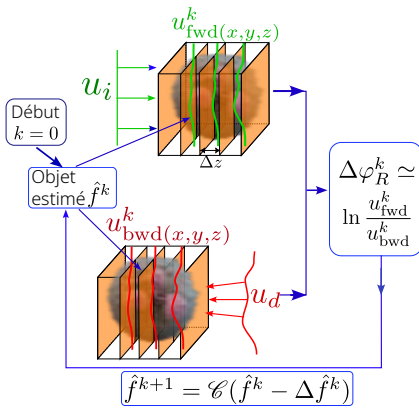


FIGURE 6.3 – Reconstruction itérative d'après [46].

intermédiaires. En MTD, le modèle direct employé est une variante du BPM, et la reconstruction à chaque itération est effectuée sous l'approximation de Rytov.

Un coefficient \mathcal{C} vient ajuster la correction. \mathcal{C} peut aussi prendre la forme d'une fonction de contrainte dépendante de l'itération et du problème physique, améliorant la convergence et stabilité [202].

Cette méthode converge vers le filtre inverse correct s'il en existe un, sinon les itérations sont arrêtées après un nombre fini d'itérations (régularisation implicite) pour obtenir une approximation de l'image réelle.

Ce principe a été appliqué en MTD par Fan en 2020 [46]. La correction utilisée à chaque itération est similaire à celle de l'algorithme SART en tomo CT, utilisant une alternance de projection et rétroprojection. Remarquons que cette méthode nécessite une solution analytique pour les calculs

Principe. Le champ propagé u_{fwd} dans l'objet x à partir de l'onde incidente u_i devrait être identiques à celui rétropropagé u_{bwd} à partir de l'onde diffractée u_d (voir FIG. 6.3).

L'objet estimé étant différent de l'objet vrai à cause des effets sur l'onde des couches précédentes, il existe un écart de phase $\Delta\varphi_R$ qui par rétropropagation (dans le milieu d'immersion) donne la correction sur l'objet Δf .

La relation entre les champs diffractés perturbés et la fonction objet perturbée est linéarisée à chaque itération, mais au final l'objet reconstruit est lié de manière non-linéaire aux champs diffractés mesurés. Les simulations et les expériences montrent qu'on peut reconstruire des objets avec de grandes différences d'indice, des structures complexes et de grandes épaisseurs optiques.

Reconstruction type problème inverse

À l'exception notable de Fan en 2020 [46], les méthodes dites algébriques ont trouvé assez peu d'échos en MTD. Dans la majorité des cas, une approche d'optimisation avec régularisation est utilisée. Ces méthodes itératives cherchent à minimiser un critère d'erreur (attache aux données) entre une estimée \hat{m} et la mesure m , classiquement par un critère d'erreur quadratique $\|m(x, y) - \hat{m}(x, y)\|_2^2$ (norme L_2). Un terme de régularisation R est en général ajoutée à la minimisation [119, 120] :

$$\operatorname{argmin}_{\Delta n} \left\{ \| \hat{m} - m \|_2^2 + \tau \cdot R(\Delta n) \right\} \quad (6.2)$$

où τ permet de régler le poids de la régularisation. L'estimée \hat{m} est calculée grâce au modèle direct de formation de l'image. Ce modèle peut être très général, évitant les approximations liées à l'inversion analytique.

Les approches de types problèmes inverses sont utilisées depuis longtemps en MTD : on peut notamment citer les travaux pionniers en réflexion effectués à l'institut Fresnel [44, 130, 203] utilisant des modèles directs avancés et prenant en compte la polarisation (*contrast source inversion*, méthodes des dipôles couplés). Dans le cas de la MTD en transmission, cette thématique a connu récemment un important développement, à l'instar de la tomographie CT/PET auparavant.

Cette formulation permet de lever certaines contraintes expérimentales par rapport à la précédente. Les travaux récents en imagerie de phase super résolue s'orientent vers une simplification des montages [204] : dans ce cadre, les approches problème inverse permettent de simplifier le montage [47] par exemple en travaillant en intensité à la façon de la FPT (pas d'interférométrie). De façon plus globale, l'approche permet d'inclure d'autres améliorations, comme le traitement des aberrations, du bruit...

Le principal frein est que ces méthodes sont assez coûteuses en temps de calcul et peuvent être piégées dans des minimums locaux. Le problème inverse est en général mal posé au sens d'Hadamard (conditions nécessaires d'existence, unicité et dépendance continue de la solution avec les données), ce qui se traduit par des matrices mal conditionnées : une faible erreur de mesure se traduit alors par des grandes variations sur le résultat. Il faut avoir recours à des techniques de régularisation dont le poids doit être

réglé, ce qui peut nécessiter un certain savoir-faire... Ces raisons expliquent en partie que l'algorithme de rétroprojection reste très utilisé en tomodensitométrie, malgré les progrès importants réalisés dans les algorithmes de reconstruction [205]. Les premiers algorithmes itératifs n'ont ainsi été implémentés dans les systèmes commerciaux qu'en 2009 [197]!

Néanmoins, dans le cas de la MTD, l'utilisation d'une estimée initiale proche de la solution (solution sous la 1^e approximation de Born) semble beaucoup aider la convergence vers une solution globale [206] et une convergence en peu d'itérations [46], ce qui est plus délicat en FPT par exemple [207]. Cette propriété est en outre encore renforcée par la redondance des données et la diversité (variation angulaire) qui permettent de créer un espace de solutions contraint [208].

Notons que de nombreux cadres logiciels sous licences libres ont ainsi été développés. Ils peuvent être spécifique, c'est à dire incluant un modèle direct, par exemple adapté à la tomographie CT (CIL[209], TomoPy, ASTRA, TIGRE ...) ou plus général, concernant les problèmes inverses (FOM [210], GlobalBioIm [211], Ceres [212], ODL, ProxImaL, TFOCS [213]).

6.2.3 Modèles directs

La précision du modèle direct est critique, car il affecte la qualité de la reconstruction mais influence aussi beaucoup le temps de calcul, puisqu'il intervient à chaque itération de l'algorithme, pour chaque hologramme.

Il s'agit donc de trouver un compromis entre les reconstructions classiques, rapides mais limitant la classe d'objets, et les modèles avancés coûteux en temps de calcul, qui les rendent en pratique difficilement utilisables. Des solutions très précises peuvent en effet être calculées, par exemple par méthodes FDTD (Finite-Difference Time-Domain), qui permettent de résoudre directement les équations de Maxwell sans approximation physique. La taille maximale du problème n'est limitée que par la puissance de calcul disponible et la mémoire disponible. Des outils libres (Meep, FDTD) ou commerciaux (Comsol, éléments finis) sont disponibles, et ont déjà été utilisés en tomographie ([182, 214]) en général pour obtenir un champ diffracté de référence en simulation et ainsi tester des algorithmes plus légers. Cependant, le coût en temps de calcul devient prohibitif lorsque le nombre d'acquisitions augmente, particulièrement en 3D sur les volumes utiles en biologie, interdisant leur utilisation dans un algorithme itératif.

Modèles directs : 2D multicouches ou 3D

Parmi les alternatives simplifiées, on peut distinguer les approches 2D multicouches des approches 3D, qui décrivent chacune la diffraction, mais sur une base théorique différente (finesse de la couche ou faible gradient d'indice [36]).

Les approches 3D reposent sur les solutions de l'équation d'Helmholtz :

- équation intégrale de Lippmann-Schwinger, en général résolue de façon itérative.
- l'approximation de Born,
- la série de Born

Les approches 2D reposent sur un propagateur plan à plan, en général avec une hypothèse de finesse de chaque couche. On retrouve ici les méthodes **BPM**, **WPM** et leurs dérivées utilisées en MTD [215-217]. L'avantage est que sous la 1^e approximation de Born, les hypothèses doivent être vérifiées dans une fine section, et non plus sur l'objet global.

Dans tous les cas, l'idée repose sur un découpage en tranche d'une estimation de l'objet (voir FIG. 6.3). Le champ total obtenu pour la couche n devient l'onde d'illumination de la couche $n + 1$. Le modèle de propagation à travers l'objet permet de prendre en compte la déformation du front d'onde et/ou la diffraction causée par le plan précédent.

Intérêt et limites actuelles de la méthode BPM

Les méthodes **BPM** (beam propagation method) font partie des premières approches utilisées. Cette méthode, sous une forme améliorée, a été utilisée dans le cadre de l'ANR HORUS [119]. Introduites par Feit puis améliorée en 1988 [218] afin d'étudier les effets d'autofocalisation dans les milieux non linéaires, ces méthodes permettent de propager un faisceau de proche en proche, si l'on connaît la distribution d'indice du milieu. La propagation repose une fois de plus sur l'équation de Helmholtz scalaire. Pour une onde monochromatique, on introduit $A(x, y, z) = u(x, y, z)e^{-ik_0z}$ (une onde lentement variable u) dans l'équation de Helmholtz. En utilisant l'approximation $|\frac{\partial^2 u}{\partial z^2}| \ll |2k_0 \frac{\partial u}{\partial z}|$, on obtient une équation aux dérivées partielles parabolique :

$$\frac{\partial u}{\partial z} = \frac{-i}{2k_0} \left(\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} + (k^2 - k_0^2)u \right) \quad (6.3)$$

$$\frac{\partial u}{\partial z} = (\hat{D} + \hat{R})u \quad (6.4)$$

Au premier ordre en δn : $D = \frac{-i}{2k_0} \nabla_t^2$ l'opérateur différentiel modélisant la diffraction et $R = -ik_v \delta n(x, y)$ modélisant la réfraction. Ces opérateurs, a priori non commutables, peuvent être séparés en considérant un tranche infiniment fine (c'est à dire $\Delta z \rightarrow 0$, Formule de Baker-Campbell-Hausdorff [219]). L'application des opérateurs étant faite séparément (successivement), ces méthodes sont parfois dites à étapes séparées (*split-step*). La solution obtenue permet en effet de séparer l'étape de réfraction (dans l'espace image) et propagation (dans l'espace de Fourier) :

$$u(x, y, z + \Delta z) \propto F^{-1} \left\{ F\{u(x, y, z)\} \exp\left(-j \frac{k_x^2 + k_y^2}{2k} \Delta z\right) \right\} \times \exp(jk_v \Delta n \Delta z)$$

Les calculs de propagation peuvent être parallélisés pour chaque angle d'illumination, puisque les calculs sur chaque illumination sont indépendants (jusqu'à la fusion des reconstructions), la parallélisation étant surtout limitée à la mémoire du GPU. Les champs obtenus par BPM ont cependant une précision limitée, à cause de l'approximation de l'enveloppe lentement variable et de la séparation des opérateurs.

Ondes inclinées, BPM amélioré et WPM

Le problème le plus crucial concerne les erreurs commises avec des ondes très inclinées. Le modèle BPM a été amélioré pour en partie prendre en compte ces effets [36, 182, 218] : épaisseur modifiée (facteur $1/\cos\theta_i$) et effet sur la propagation (terme $2k_v$ remplacé par $k + k_z$) :

$$u(x, y, z + \Delta z) = F^{-1} \left\{ F\{u(x, y, z)\} \exp\left(-j \frac{k_x^2 + k_y^2}{k + k_z} dz\right) \right\} \times \exp\left(j \frac{k_v \Delta n \Delta z}{\cos\theta_i}\right) \quad (6.5)$$

où θ_i est l'angle de l'onde incidente.

Considérant les temps de calcul (fft+GPU) mentionnés au paragraphe 2.5, ce modèle de propagation possède l'avantage d'être potentiellement très rapide sur les machines actuelles, mais manque toujours de précision par rapport à d'autres méthodes, notamment dans le rendu des hautes fréquences [48]. La propagation y est assurée par un noyau de type spectre angulaire, effectué dans l'indice moyen de la tranche considéré. En réalité, l'indice varie transversalement et le terme de phase $\exp(-jkd_z\delta z)$ doit être calculé localement, sous la forme $\exp[-jn(x, z)k_0 \cos(\theta)\delta z]$. C'est le principe de la méthode WPM (wave propagation method) qui réalise une décomposition en onde plane puis une propagation de chaque composante dans le milieu inhomogène. Malheureusement, la fft est alors remplacée par un calcul intégral, ce qui rend cette méthode plus lente [216, 220], la complexité passant de $O(N \log N)$ à $O(N^2)$. Le potentiel de parallélisation GPU reste toutefois important. Signalons enfin que des modèles hybrides («HyPM») dérivés des méthodes BPM et WPM sont récemment apparus. Ils améliorent essentiellement les calculs pour les ondes d'illumination fortement inclinées tout en conservant une bonne efficacité de calcul [221].

Born Multicouches

Dans les modèles précédents, la réflexion n'est pas prise en compte, ce qui est problématique pour la tomographie 4π . Les approches multicouches utilisant la diffraction sous l'approximation de Born (MLB, multilayer Born) permettent de résoudre ce problème [47, 222].

Pour prendre en compte à la fois la diffusion multiple et les ondes rétrodiffusées, le champ complexe est calculé en appliquant séquentiellement l'approximation de Born à chaque couche d'épaisseur finie [47]. Lorsque ce modèle 3D est appliqué à des sections minces 2D, il convient de noter que la fonction de Green doit être modifiée par un facteur d'obliquité [36, 222]. Dans chaque tranche, l'algorithme se compose alors de 2 étapes :

- propagation du champ incident (champ total de la couche précédente) avec la méthode du spectre angulaire,
- calcul du champ diffusé selon l'approximation de Born, c'est-à-dire convolution entre la fonction de Green modifiée et le produit du champ incident par le potentiel.

Comme la méthode BPM, cette méthode est aussi potentiellement rapide, puisque ces calculs sont effectués avec des fft 2D.

Série de Born modifiée : modèles vectoriels

Le modèle direct à base d'un découpage en sections et de propagation de proche en proche, même amélioré, peut s'éloigner des solutions exactes lorsque les hypothèses de simplification (séparation des opérateurs, finesse des couches) sont mises en défaut [119]. En outre, les modèles basés sur des propagateurs, au moins dans leur forme standard, ne prennent pas en compte l'aspect vectoriel.

D'une façon plus générale, les effets les plus fondamentaux sont difficiles à modéliser : le calcul du champ électromagnétique doit être réalisé dans des géométries confinées, de dimensions inférieures à la longueur d'onde ou dans lesquels de la diffusion multiple peut apparaître. Un modèle complet 3D, non paraxial et vectoriel devient nécessaire. Parmi les modèles 3D, l'équation de Lippmann-Schwinger de l'électromagnétisme est une solution exacte de l'équation d'Helmholtz scalaire, et peut servir de modèle direct en MTD [223, 224], mais la résolution itérative du problème direct la rend coûteuse en temps de calcul.

D'autres possibilités existent : ainsi le calcul du champ diffracté par la série de Born (voir paragraphe 2.2.5 sur la diffusion multiple) apparaît naturellement lors de la résolution de l'équation de Lippmann-Schwinger. Il a donc été appliqué à la MTD [215]. Cependant, il a longtemps été limité aux objets à contraste d'indice limité ou de petites tailles, la série divergeant dans le cas contraire.

Récemment, ce modèle a été modifié afin de l'étendre aux objets de toutes tailles et fortement diffractants [225] et appliqué en MTD [48]. De plus, cette série de Born modifiée a ensuite été adaptée par Krüger en 2017[181], afin de résoudre les équations de Maxwell sans approximation, c'est à dire en traitant le terme $\nabla(\nabla \cdot u_t)$ habituellement négligé. À précision identique, le gain de vitesse par rapport aux méthodes FDTD est d'au moins 3 ordres de grandeurs, soulignant le potentiel dans les reconstructions numériques à partir d'un modèle décrivant complètement la diffraction (non paraxial, transmission/réflexion, vectoriel. . .) .

6.2.4 Méthodes exactes et l'apprentissage profond

Une alternative passe peut-être par les méthodes à base d'apprentissage profond (deep learning) actuellement en pleine expansion [226]. Récemment, Lim [227] a proposé une technique (*MaxwellNet*) permettant d'accélérer le processus en travaillant non pas directement sur les équations de Maxwell, mais sur le résidu de la fonction de coût [227, 228]. Ces réseaux ont également permis de reconstruire des données expérimentales avec des réseaux entraînés à partir d'images simulées [229]. La principale difficulté de ces méthodes est de constituer une (bonne) base d'entraînement, car cela nécessite une grande quantité de données et/ou des simulations très coûteuses en temps de calcul.

L'absence de modèle physique pose aussi questions sur l'interprétation / la compréhension des phénomènes fondamentaux intervenant dans la physique mise en jeu, mais aussi les limites et donc la généralisation de ce type d'algorithmes. . .

6.3 Améliorations expérimentales

Hors MTD 4π associée à des inversions avancées, qui s'attaque à l'amélioration de la résolution spatiale et à l'élargissement de la classe d'objets imageables, les progrès expérimentaux envisageables à court terme concernent la robustesse (bruit, stabilité) et la qualité de la mesure en général. D'autres pistes concernent la spécificité, la rapidité du dispositif et sa simplification.

Sensibilité ultime en phase. La mesure de phase est fondamentalement limitée par la stabilité du système et le rapport signal à bruit. Le bruit de phase est lié aux variations aléatoires d'indice entre les 2 bras provenant des vibrations, des fluctuations d'air, mais aussi du bruit électronique. À celui-ci s'ajoute les réflexions parasites, qui peuvent rendre délicates les mesures en réflexion.

Les fluctuations/vibrations peuvent être limitées par un des nombreux dispositifs d'interférométrie à chemin commun développés en holographie / imagerie de phase. Les dispositifs les plus courants utilisent un filtrage de l'illumination mais sont en général peu adaptables à la MTD, à cause du balayage tomographique.

Les techniques à base de décalage de phase (phase shifting) reposent en général sur un contrôle spatial (par SLM) du décalage de phase, par exemple en déphasant approximativement le spéculaire [230] dans l'espace de Fourier, ou dans l'espace direct en sélectionnant aléatoirement la moitié des pixels (technique FINCH [231]). Utilisables en lumière blanche et facilement implémentables, elles nécessitent cependant une prise multiple d'hogrammes. Un dispositif à base de MHM sera donc d'abord envisagé.

Enfin, la limite ultime est fixée par le bruit de grenaille (*shot noise*), manifestation de la statistique des photons au niveau du détecteur. Ce bruit peut encore être réduit par moyennage. Des mesures «ultime» au shot noise ont déjà été démontrées en holographie [24] et donc rapidement adaptables à notre cas.

Sensibilité ultime en amplitude. Une autre possibilité concerne la mesure minimale en amplitude, améliorable par une détection de type champ sombre ou haute dynamique. Le système expérimental peut être de type champ sombre «total» avec par exemple un balayage annulaire à ouverture numérique maximum, effectué à l'aide d'un condenseur de plus grand ouverture numérique que l'objectif de collection. Dans ce cas, la difficulté est d'effectuer la synthèse d'ouverture, notamment recalculer correctement les hologrammes entre eux : par définition le spéculaire est absent et le signal plus faible qu'en transmission. On peut noter que ces difficultés sont proches de celles rencontrées en réflexion, et que les techniques de recalage utilisées dans ce cas sont sans aucun doute transposables.

Alternativement, un champ sombre contrôlable peut être envisagé à l'aide d'un dispositif type SLM en absorption, permettant d'atténuer sélectivement le signal pixel par pixel et hologramme par hologramme, et donc de l'adapter dans tous les cas au signal pour effectuer des acquisitions hautes dynamiques ou champ sombre.

Multiplexage. Alors que les volumes de données sont amenés à augmenter en MTD 4π et dans le cadre de l'imagerie temps réel, des techniques de multiplexage basées sur le contrôle de la référence [76] permettraient d'augmenter significativement la vitesse.

Cependant, le démultiplexage rend souvent la mise en œuvre délicate, notamment pour un nombre élevé d'hologrammes multiplexés.

Spécificité. L'utilisation de sources multispectrales ou de détection hétérodyne permettrait de donner une certaine spécificité, notamment pour les mesures en absorption.

Dans le cadre des milieux présentant de la diffusion multiple, le système MTD polarimétrique pourrait être étendu au formalisme de Stockes-Mueller, afin de mesurer d'autres paramètres polarimétriques, comme la dépolarisation. Ce mode d'imagerie a déjà montré un intérêt en microscopie polarimétrique 2D sur des échantillons variés pour caractériser certaines pathologies (régénération de cellules du myocarde après un traitement par cellules souches, cartilage et arthrose, fibrose du foie . . .) [232].

On peut enfin signaler un intérêt pratique de l'apprentissage profond pour rendre de la spécificité à la MTD : des modèles de réseaux de neurones ont permis de prédire des images de fluorescence à partir d'images de phase ou d'autres techniques de microscopie sans marquage [233].

6.4 Conclusion générale : vers un système 3D sans marquage, rapide, isotrope et robuste ?

Les travaux auxquels j'ai contribué à l'IRIMAS sur la MTD ont montré tout l'intérêt de la technique dans des domaines très variés, de la biologie aux sciences des matériaux. La MTD est une alternative à la fluorescence, qui reste finalement raisonnablement exigeante en terme matériel, utilisant des sources peu chères et faciles à mettre en œuvre, des caméras standards peu sophistiquées et du matériel optique/mécanique «tiré de l'armoire du physicien». Les possibles avancées envisagées dans la partie projet, associées aux travaux décrits dans ce document, permettent aujourd'hui de disposer d'un ensemble de pièces qui restent «simplement» à assembler, aux détails techniques près ! Dans le cadre de la MTD en transmission, les modèles rapides à base de BPM amélioré constituent une avancée prenant en compte la diffusion multiple et la dégradation de l'image dans le volume de l'échantillon, pour un coût CPU contenu, au moins pour le problème direct. Ils permettent d'envisager une imagerie 3D applicable à une plus large gamme d'échantillons. Les techniques à base de MLB autorisent l'imagerie en réflexion, et donc l'utilisation en tomographie 4π , qui permet potentiellement d'atteindre une imagerie isotrope sans connaissances a priori, inversions avancées, ni système spécifique comme en tomographie iso.

Le dispositif expérimental développé à l'IRIMAS durant la thèse de A. Taddese [85, 234] apporte enfin les mesures polarimétriques : couplé d'abord aux modèles multicouches vectoriels, puis à terme aux modèles à base de série de Born modifiée et à la MTD 4π , l'ensemble permet d'envisager une imagerie reposant sur la solution complète des équations de Maxwell.

Le couplage avec les récentes techniques de multiplexage et la basse cohérence permettent donc d'envisager un système 3D sans marquage, rapide, isotrope et robuste.

- 3D-UDCS** 3D Uniform Distribution on a cap of Sphere. [68](#)
- 3D-UDHS** 3D Uniform Distribution on a Hemisphere. [68](#)
- ART** Algebraic reconstruction method. Méthode de reconstruction itérative utilisée notamment en tomodensitométrie. [124](#)
- BPM** Beam propagation method. Méthode de propagation approchée d'un champ complexe de proche en proche, dans un milieu d'indice variable. [115](#), [126](#), [127](#)
- CSI** Coherence scanning interferometer. [92](#)
- DMEM** milieu de Eagle modifié par Dulbecco. Milieux de culture cellulaire et tissulaire, plus riche en glucose, vitamines et acides aminés que le milieu Eagle de base. [58](#)
- DONALD** Direct optical nanoscopy with axially localized detection. Technique combinant SMLM et imagerie super critique plein champ. [9](#)
- FBP** Filtered backprojeciton (fr : rétroprojection filtrée). [19](#)
- FINCH** Fresnel incoherent correlation holography. Technique holographique auto référencée, à base de phase-stepping appliqué sur une moitié des pixels d'un SLM. [130](#)
- FPT** Fourier Ptychographie tomography (fr : Ptychographie de Fourier Tomographique). [41](#), [125](#), [126](#)
- MLB** Multi layer Born. Modèle direct multicouche utilisant l'approximation de Born dans une fine section de l'objet. [128](#)
- MTD** Microscopie tomographique diffractive. [10](#)
- OTF** Optical transfert function (FTO : fonction de transfert optique). [41](#)

- PAINT** Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography. [9](#)
- PALM** Photo-activated Localization Microscopy (microscopie par localisation photoactivée). [9](#)
- PCT** Phase contrast computerized tomography). [10](#)
- PSF** Point spread function (fr : RIO). [9](#)
- RIO** Réponse impulsionnelle optique (en : PSF). [10](#)
- SMLM** Single-molecules light microscopy. [9](#)
- STED** Stimulated emission depletion. [9](#)
- ToRI** Tomographie par rotation du vecteur illumination. [5](#), [38](#), [40](#)
- WPM** Wave propagation method. Méthode de propagation exacte d'un champ complexe dans un milieu inhomogène. [126](#), [128](#)

ANNEXE A

CURSUS

- 1999 DEA de physique, spécialité Lasers, molécules, rayonnement atmosphérique (LAMORA). Université de Lille-1 (AB)
- 1999-2002 Doctorat en 28e/30e section (allocataire MESR) : « **Propagation autoguidée de la lumière par non-linéarité thermique dans les cristaux liquides nématiques** », Mention très honorable avec les félicitations du jury. Université d'Artois.
- 2004-2007 Ingénieur d'étude, laboratoire MIPS. Université de Haute-Alsace.
- 2007- Ingénieur de recherche, MIPS-IRIMAS. Université de Haute-Alsace.

ANNEXE B

LISTE DE COLLABORATIONS

- Department of Mechanical Engineering, The University of Tsukuba. JJ Delaunay. 2010-2011.
- Centre Commun de Quantimétrie, Université de Lyon. Y.Tourneur, A. Beghin. 2010.
- Laboratoire H. Curien, Saint-Étienne. F. Momey. ANR HORUS (2019-2022). 2023- ?
- Laboratoire de Physique et Mécanique Textiles (LPMT). MJ Pac. 2012-2013.
- Laboratoire d'électronique quantique, Université Houari Boumediene. S. Ayadi. 2015- ?
- Institut de science des matériaux de Mulhouse (IS2M) : A. Spangenberg (Caractérisation de réseaux diffractifs 2D), O. Soppera (Tomo-Iso), L. Vonna (tomo miroir), L. Pieuchot, T. Petithory, K. Anselme (imagerie MTD de cellules cancéreuses sur des micropiliers). 2010- ?
- Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC), université de Strasbourg/CNRS/INSERM. ANR HORUS. M. Ruff, D. Hentsch. 2017- ?.
- Laboratoire de Gestion des risques et environnement. G. Trouvé. 2020- ?
- Institut Fresnel, université Aix-Marseille. ANR TARANIS. G. Maire. 2023- ? .
- Synchrotron Soleil (Ligne de lumière DISCO). F. Jamme. Développement d'un MTD UV. 2024- ?

ANNEXE C

ACTIVITÉS DE RECHERCHES ET ASSOCIÉES

Projets financés

- ANR JCJC OSIRIS : *Optical-Scanning Isotropic-Resolution Imaging System*. Porteur : B. Simon. 2011-2015.
- AAP projet innovant REMORA (IDEX Strasbourg). Porteur : M Ruff/O. Haeberlé. Ressources : 64k€ HT.
- AAP 2018 FCR. MIPPi4D (Matière Informée Programmable Pour l'Impression 4D). Porteur local (10%) : O. Haeberlé. 50k€ pour IRIMAS.
- Projet région (Fonds de Coopération pour la Recherche) MIRAGE : *Microscopie Innovante : Recherche et Application en Grand-Est*. Porteur local : O. Haeberlé. 9 unités grand-Est impliquées. 2019-2022. Ressources IRIMAS 190k€.
- ANR JCJC THTTM : *Microscopie Tomographique Thêta à Hétérodynage Temporel*. Porteur : N. Verrier. 2019-2022.
- ANR PRC HORUS, *Haute Résolution Optique pour les Spécimens Non-marqués*. Porteur : F. Momey. Porteur local : O. Haeberlé. Laboratoire Hubert Curien (Université de Saint- Etienne), IGBMC (Strasbourg) : 2019-2022. Ressources totales : 445k€.
- ANR PRC TARANIS : *Acquisitions et reconstructions tomographiques pour les systèmes d'imagerie nanoscopique avancés*. Porteur : G. Maire. 2023-. Institut Fresnel/Université Aix-Marseille. Ressources totales : 419k€.

Articles

Cette section recense les articles parus dans des journaux à comités de lecture, y compris ceux publiés durant ma thèse. Les conférences nationales/internationales (avec ou sans comité) sont trop nombreuses pour être citées ici. Cinq articles "étapes" sont indiquées en couleur, avec lien direct (accès libre).

1. Henninot, JF ; Debailleul, M ; Asquini, Rita ; d'Alessandro, A ; Warenghem, M ; « **(2D+ 1) Spatial optical solitons in dye doped liquid crystals** », *Synthetic metals*, 124-1, 9-13 (2001)
2. Henninot, JF ; Debailleul, M ; Derrien, F ; Abbate, G ; Warenghem, M ; « **Tunable non-locality of thermal non-linearity in dye doped nematic liquid crystal** », *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 375 1, 631-640 (2002)
3. Henninot JF ; Debailleul M, Derrien F ; M Warenghem ; « **In situ intensity profile measurements of spatial quasi-solitons in thick dye-doped liquid crystal samples** », *Journal of Optics A : Pure and Applied Optics*, 5-3, 250 (2003)
4. Henninot, JF ; Debailleul, M ; Derrien, F ; Warenghem, M ; « **Self-waveguiding in an isotropic channel induced in dye doped nematic liquid crystal and a bent self-waveguide** », *Journal of Optics A : Pure and Applied Optics*, 6-4, 315, (2004)
5. Debailleul M.; Simon B; Georges V; Haeberlé O; Lauer V «**Holographic microscopy and diffractive microtomography of transparent samples** », *Measurement Science and Technology*, 19-7, 74009 (2008)
6. B Simon, M Debailleul, V Georges, V Lauer, O Haeberlé « **Tomographic diffractive microscopy of transparent samples** », *The European Physical Journal- Applied Physics*, 44-1, 29-35 (2008)
7. Debailleul M; Georges V; Simon B; Morin R; Haeberlé O « **High-resolution three-dimensional tomographic diffractive microscopy of transparent**

- inorganic and biological samples** », *Optics letters*, 34-1, 79-81 (2009)
8. Simon, B ; Debailleul, M ; Beghin, A ; Tourneur, Y ; Haeberlé, O ; «**High-resolution tomographic diffractive microscopy of biological samples** », *Journal of Biophotonics*, 3-7, 462-467 (2010)
 9. Merdan S, Simon B, Debailleul M, Colicchio B, Georges V, Delaunay J-J , Haeberle O « **High resolution reflection tomographic diffractive microscopy** », *Journal of Modern Optics*, 57 9 740-745, (2010)
 10. Bailleul J, Simon B, Debailleul M, Liu, H, Haeberlé, O, « **GPU acceleration towards real-time image reconstruction in 3D tomographic diffractive microscopy** », *Real-Time Image and Video Processing* , 8437, 65-79 (2012)
 11. Liu, H; Bailleul, J; Simon, B; Debailleul, M; Colicchio, B; Haeberlé, O; «**Tomographic diffractive microscopy and multiview profilometry with flexible aberration correction** », *Applied optics*, 53 4, 748-755 (2014)
 12. Montgomery, P ; Leong-Hoi, A ; Anstötz, F ; Liu, Hui ; Simon, B ; Debailleul, M ; Haeberlé, O ; «**Overview of label-free far field optical nanoscopy techniques for nanometrology** », *Optical Micro-and Nanometrology V*, 9890, 110-120 (2016)
 13. Simon, B; Debailleul, M; Houkal, M; Ecoffet, C; Bailleul, J; Lambert, J; Spangenberg, A; Liu, H; Soppera, O; Haeberlé, O; «**Tomographic diffractive microscopy with isotropic resolution** », *Optica*, 4 4, 460-463 (2017)
 14. Bailleul, J ; Simon, Bertrand ; Debailleul, M ; Haeberlé, Olivier ; «**An Introduction to Tomographic Diffractive Microscopy : Toward High-Speed Quantitative Imaging Beyond the Abbe Limit** », *Micro-and Nanophotonic Technologies*, 425-442 (2017)
 15. Bailleul, J ; Simon, B ; Debailleul, M ; Foucault, L ; Verrier, N ; Haeberlé, O ; «**Tomographic diffractive microscopy : towards high-resolution 3-D real-time data acquisition, image reconstruction and display of unlabeled samples** », *Optics Communications*, 422, 28-37 (2018)
 16. Foucault, Ludovic ; Verrier, N ; Debailleul, M ; Simon, B ; Haeberlé, O ; «**Simplified tomographic diffractive microscopy for axisymmetric samples** », *OSA Continuum*, 2-,4 1039-1055 (2019)
 17. Foucault, L ; Verrier, N ; Debailleul, M ; Courbot, JB ; Colicchio, B ; Simon, B ; Vonna, L ; Haeberlé, O ; «**Versatile transmission / reflection tomographic diffractive microscopy approach** », *JOSA A*, 36 -11, C18-C27 (2019)
 18. Taddese, AM ; Verrier, N ; Debailleul, M ; Courbot, JB ; Haeberlé, O ; «**Optimizing sample illumination scanning in transmission tomographic diffractive microscopy** », *Applied Optics*, 60-6, 1694-1704 (2021)
 19. Taddese, AM ; Verrier, N ; Debailleul, M ; Courbot, JB ; Haeberlé, O ; «**Optimizing sample illumination scanning for reflection and 4Pi tomographic diffractive microscopy** », *Applied Optics*, 60-25, 7745-7753 (2021)

20. Denneulin, L ; Momey, F ; Brault, D ; Debailleul, M ; Taddese, AM ; Verrier, N ; Haeberlé, O ; « **GSURE criterion for unsupervised regularized reconstruction in tomographic diffractive microscopy** », *JOSA A*, 39-2,A52-A61 (2022)
21. Abbessi, R ; Verrier, N ; Taddese, AM ; Laroche, S ; Debailleul, M ; Lo, M ; Courbot, Jean-Baptiste ; Haeberlé, O ; « **Multimodal image reconstruction from tomographic diffraction microscopy data** », *Journal of Microscopy*, 288-3, 193-206 (2022)
22. Verrier, N ; Taddese, AM ; Abbessi, Riadh ; Debailleul, M ; Haeberlé, O ; « **3D differential interference contrast microscopy using polarisation-sensitive tomographic diffraction microscopy** », *Journal of Microscopy*, 289-2, 128-133 (2023)
23. Taddese, AM ; Lo, M ; Verrier, Nicolas ; Debailleul, M ; Haeberlé, O ; « **Jones tomographic diffractive microscopy with a polarized array sensor** », *Optics Express*, 31-5, 9034-9051 (2023)
24. Astratov, V et al. ; « **Roadmap on Label-Free Super-Resolution Imaging** », *Laser & Photonics Reviews*, 17-12 (2023)
25. Ayadi S, Debailleul M, Haeberlé O « **Behaviour and onset of low-dimensional chaos with a periodically varying loss in single-mode homogeneously broadened laser** », *Open Physics* 21-1 (2023)
26. Verrier, N ; Debailleul, M ; Haeberlé, O ; « **Recent Advances and Current Trends in Transmission Tomographic Diffraction Microscopy** », *Sensors*, 24-5, 1594 (2024)

Chapitre d'ouvrage

1. M. Debailleul, B. Colicchio, « **Imagerie microscopique 3D de phase - Méthode d'imagerie sans marquage** », Techniques de l'ingénieur (2018).Réf : P955 v1.
2. J. Bailleul, B. Simon, M. Debailleul, O. Haeberlé, « **An Introduction to Tomographic Diffractive Microscopy : Toward High-Speed Quantitative Imaging Beyond the Abbe Limit** », Micro- and Nanophotonic Technologies, [chapter 18](#). Wiley (2017)
3. N. Verrier, M. Debailleul, B. Simon, O. Haeberlé, **Microscopie Tomographique Diffractive en Transmission** », [Chapitre 5](#), Sciences - Imageries optiques non conventionnelles pour la biologie, ISTE - Wiley 2023. (ISBN : 9781789481327).

Thèses

1. Thèse avec un simple encadrement technique (pas d'encadrement officiel) sur la partie MTD :
 - Bertrand Simon, "**Application des techniques de déconvolution multinoyaux et de tomographie diffractive optique à l'amélioration de l'imagerie microscopique 2D et 3D**". Université de Haute-Alsace (2007)
 - Ludovic Foucault, "**Microscope tomographique diffractif : simplification des acquisitions et reconstructions numériques associées**". Université de Haute-Alsace. (2019)
2. 3 thèses officiellement encadrées et soutenues :
 - Hui Liu, "**Microscopie tomographique diffractive en réflexion et profilométrie multi-angles**", Université de Haute-Alsace (2014). Taux : .
 - Jonathan Bailleul, "**Microscopie tomographique en transmission isotrope**", Université de Haute-Alsace (2016).
 - Asemare Mengistie Taddese, "**High-resolution tomographic diffractive microscopy : sample scanning optimization and 3-D quantitative polarimetric imaging**", Université de Haute-Alsace (2022).
3. Deux thèses en cours (encadrement à 20%) :
 - Riadh Abbessi a pour sujet de thèse la microscopie hétérodyne 3D.
 - Carlos Chacon travaille sur la microscopie TDM 4π .

Stagiaires et personnel scientifique

Divers stages ont été encadrés, dont 8 stages de masters et 5 ingénieurs d'étude sur des contrats courts (3 contrats de 18 mois et 2 contrat de 12 mois).

ANNEXE F

ENSEIGNEMENTS ET DIFFUSION SCIENTIFIQUE

- Enseignement. J'effectue des missions d'enseignement en tant que vacataire, entre 50 et 100 heures par an depuis 2000 : TP physique (L1 MIAS/SM). Optoélectronique (DUT1), mécanique (DUT2), thermique (DUT1), programmation orientée objet (C++) (DUT2), TP d'électronique (DUT1), TP d'électrotechnique (DUT1), TP système numérique : VHDL/FPGA (DUT2), TP réseaux (DUT2).
- Organisation ou participation au comité scientifique de manifestations : PSIP (2007), Imvie5 (2009), MIFOBIO (2012), ERIS 2014-2015, QCAV2019.
- Invitation à des conférences/congrès. Invitation session plénière : SFO 2009, SOS 2022.
- Vulgarisation scientifique : sciences en fêtes (2004-2020), article « The conversation » (2023).
- TP-cours MIFOBIO : 2012 (non officiel), 2014 (Salle «fait-maison»), 2016 (TP officiel).

- ¹T. A. KLAR et S. W. HELL, « Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy », *Optics letters* **24**, 954-956 (1999).
- ²E. BETZIG, G. H. PATTERSON, R. SOUGRAT, O. W. LINDWASSER, S. OLENYCH, J. S. BONIFACINO, M. W. DAVIDSON, J. LIPPINCOTT-SCHWARTZ et H. F. HESS, « Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution », *science* **313**, 1642-1645 (2006).
- ³N. BOURG, C. MAYET, G. DUPUIS, T. BARROCA, P. BON, S. LÉCART, E. FORT et S. LÉVÊQUE-FORT, « Direct optical nanoscopy with axially localized detection », *Nature Photonics* **9**, 587-593 (2015).
- ⁴P. P. LAISSUE, R. A. ALGHAMDI, P. TOMANCAK, E. G. REYNAUD et H. SHROFF, « Assessing phototoxicity in live fluorescence imaging », *Nature methods* **14**, 657-661 (2017).
- ⁵D. DONG, X. HUANG, L. LI, H. MAO, Y. MO, G. ZHANG, Z. ZHANG, J. SHEN, W. LIU, Z. WU et al., « Super-resolution fluorescence-assisted diffraction computational tomography reveals the three-dimensional landscape of the cellular organelle interactome », *Light : Science & Applications* **9**, 1-15 (2020).
- ⁶S. POSPICH, F. MERINO et S. RAUNSER, « Structural Effects and Functional Implications of Phalloidin and Jasplakinolide Binding to Actin Filaments », *Structure (London, England : 1993)* **28**, 437-449.e5 (2020).
- ⁷J. B. PAWLEY, « Limitations on optical sectioning in live-cell confocal microscopy », *Scanning : The Journal of Scanning Microscopies* **24**, 241-246 (2002).
- ⁸O. HAEBERLÉ, F. BICHA, C. SIMLER, A. DIETERLEN, C. XU, B. COLICCHIO, S. JACQUEY et M.-P. GRAMAIN, « Identification of acquisition parameters from the point spread function of a fluorescence microscope », *Optics communications* **196**, 109-117 (2001).

- ⁹A. DIETERLEN, C. XU, O. HAEBERLE, N. HUEBER, R. MALFARA, B. COLICCHIO et S. JACQUEY, « Identification and restoration in 3D fluorescence microscopy », in [Sixth International Conference on Correlation Optics](#), t. 5477, sous la dir. d'O. V. ANGELSKY (International Society for Optics et Photonics, 2004), p. 105-113.
- ¹⁰B. COLICCHIO, « Déconvolution adaptative en microscopie tridimensionnelle de fluorescence », thèse de doct. (Université de Haute-Alsace, 2004).
- ¹¹J. M. COUPLAND et J. LOBERA, « Holography, tomography and 3D microscopy as linear filtering operations », [Measurement Science and Technology](#) **19**, 074012 (2008).
- ¹²T. E. GUREYEV, H. G. BROWN, H. M. QUINEY et L. J. ALLEN, « Unified fast reconstruction algorithm for conventional, phase-contrast, and diffraction tomography », [J. Opt. Soc. Am. A](#) **39**, C143-C155 (2022).
- ¹³J. GUO, *X-Rays in Nanoscience : Spectroscopy, Spectromicroscopy, and Scattering Techniques* (John Wiley & Sons, 2010).
- ¹⁴M. SLANEY, A. C. KAK et L. E. LARSEN, « Limitations of imaging with first-order diffraction tomography », *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques* **32**, 860-874 (1984).
- ¹⁵A. DEVANEY, « Inverse-scattering theory within the Rytov approximation », *Optics letters* **6**, 374-376 (1981).
- ¹⁶N. VERRIER, C. REMACHA, M. BRUNEL, D. LEBRUN et S. COËTMELLE, « Micropipe flow visualization using digital in-line holographic microscopy », [Opt. Express](#) **18**, 7807-7819 (2010).
- ¹⁷E. CUCHE, P. MARQUET et C. DEPEURSINGE, « Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms », *Applied optics* **38**, 6994-7001 (1999).
- ¹⁸P. de GROOT, « Holography : Just a fancy word for interferometry ? », [sous la dir. d'O. T. D. \(ONLINE\), DOI:10.1364/DH.2016.DM3I.1](#) (2016).
- ¹⁹S. BERTRAND, « Application des techniques de déconvolution multinoyaux et de tomographie diffractive optique à l'amélioration de l'imagerie microscopique 2D et 3D », thèse de doct. (Université de Haute-Alsace, 2007).
- ²⁰N. VERRIER et M. ATLAN, « Off-axis digital hologram reconstruction : some practical considerations », *Applied optics* **50**, H136-H146 (2011).
- ²¹R. N. BRACEWELL, *The Fourier transform and its applications*, 3^e éd. (McGraw-Hill international editions, 1986).
- ²²X. LIU, B.-Y. WANG et C.-S. GUO, « One-step Jones matrix polarization holography for extraction of spatially resolved Jones matrix of polarization-sensitive materials », *Optics letters* **39**, 6170-6173 (2014).
- ²³J. LEE, S. SHIN, H. HUGONNET et Y. PARK, « Spatially multiplexed dielectric tensor tomography », *Optics Letters* **47**, 6205-6208 (2022).

- ²⁴M. GROSS et M. ATLAN, « Digital holography with ultimate sensitivity », *Opt. Lett.* **32**, 909-911 (2007).
- ²⁵H. LIU, J. BAILLEUL, B. SIMON, M. DEBAILLEUL, B. COLICCHIO et O. HAEBERLÉ, « Tomographic diffractive microscopy and multiview profilometry with flexible aberration correction », *Applied optics* **53**, 748-755 (2014).
- ²⁶F. DUBOIS, M.-L. N. REQUENA, C. MINETTI, O. MONNOM et E. ISTASSE, « Partial spatial coherence effects in digital holographic microscopy with a laser source », *Applied optics* **43**, 1131-1139 (2004).
- ²⁷C. D. DEPEURSINGE, F. CHARRIERE, A. M. MARIAN, F. MONTFORT, T. COLOMB, J. KUHN, E. CUCHE, Y. EMERY, P. MARQUET et P. J. MAGISTRETTI, « Digital holographic microscopy applied to metrology », in *Optical Metrology in Production Engineering*, t. 5457 (SPIE, 2004), p. 504-512.
- ²⁸F. CHARRIÈRE, A. MARIAN, F. MONTFORT, J. KUEHN, T. COLOMB, E. CUCHE, P. MARQUET et C. DEPEURSINGE, « Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy », *Optics letters* **31**, 178-180 (2006).
- ²⁹P. KNIAZEWSKI, M. KUJAWINSKA, F. BERGHMANS, A. FERNANDEZ, A. GOUSSAROV et M. VAN UFFELEN, « Application of the microinterferometric tomography setup to the reliability tests of the fiber sensors exposed to cumulated gamma radiation », in *Nano-and Micro-Metrology*, t. 5858 (SPIE, 2005), p. 42-49.
- ³⁰G. N. VISHNYAKOV, G. G. LEVIN et C. S. ZAKARIAN, « Interferometric-computed microtomography of 3D phase objects », in *Three-Dimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing IV*, t. 2984, sous la dir. de C. J. COGSWELL, J.-A. CONCHELLO et T. WILSON (International Society for Optics et Photonics, 1997), p. 64-71.
- ³¹A. C. KAK et M. SLANEY, *Principles of computerized tomographic imaging* (IEEE press, 1988).
- ³²S. VERTU, M. OCHIAI, M. SHUZO, I. YAMADA, J.-J. DELAUNAY, O. HAEBERLÉ et Y. OKAMOTO, « Optical projection microtomography of transparent objects », in *European Conference on Biomedical Optics* (Optical Society of America, 2007), 6627-62.
- ³³J. A. SCHMALZ, G. SCHMALZ, T. E. GUREYEV et K. M. PAVLOV, « On the derivation of the Green's function for the Helmholtz equation using generalized functions », *American Journal of Physics* **78**, 181-186 (2010).
- ³⁴J. W. GOODMAN et S. C. GUSTAFSON, « Introduction to Fourier optics », *Optical Engineering* **35**, 1513-1513 (1996).
- ³⁵A. BAÑOS, *Dipole radiation in the presence of a conducting halfspace*, t. 9 (Pergamon, 1966).
- ³⁶Y. BAO et T. K. GAYLORD, « Clarification and unification of the obliquity factor in diffraction and scattering theories : discussion », *JOSA A* **34**, 1738-1745 (2017).
- ³⁷R. SU, J. COUPLAND, C. SHEPPARD et R. LEACH, « Scattering and three-dimensional imaging in surface topography measuring interference microscopy », *JOSA A* **38**, A27-A42 (2021).

- ³⁸A. S. MARATHAY, « Fourier transform of the Green's function for the Helmholtz equation », *JOSA* **65**, 964-965 (1975).
- ³⁹H. WEYL, « Ausbreitung elektromagnetischer Wellen über einem ebenen Leiter », *Annalen der Physik* **365**, 481-500 (1919).
- ⁴⁰E. WOLF, « Three-dimensional structure determination of semi-transparent objects from holographic data », *Optics Communications* **1**, 153-156 (1969).
- ⁴¹S. TRATTNER, M. FEIGIN, H. GREENSPAN et N. SOCHEN, « Validity criterion for the Born approximation convergence in microscopy imaging », *JOSA A* **26**, 1147-1156 (2009).
- ⁴²B. CHEN et J. J. STAMNES, « Validity of diffraction tomography based on the first Born and the first Rytov approximations », *Applied optics* **37**, 2996-3006 (1998).
- ⁴³K. KIM, H. YOON, M. DIEZ-SILVA, M. DAO, R. R. DASARI et Y. PARK, « High-resolution three-dimensional imaging of red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum and in situ hemozoin crystals using optical diffraction tomography », *Journal of biomedical optics* **19**, 011005 (2013).
- ⁴⁴G. MAIRE, F. DRSEK, J. GIRARD, H. GIOVANNINI, A. TALNEAU, D. KONAN, K. BELKEBIR, P. C. CHAUMET et A. SENTENAC, « Experimental demonstration of quantitative imaging beyond Abbe's limit with optical diffraction tomography », *Physical review letters* **102**, 213905 (2009).
- ⁴⁵T. ZHANG, Y. RUAN, G. MAIRE, D. SENTENAC, A. TALNEAU, K. BELKEBIR, P. CHAUMET et A. SENTENAC, « Full-polarized tomographic diffraction microscopy achieves a resolution about one-fourth of the wavelength », *Physical review letters* **111**, 243904 (2013).
- ⁴⁶S. FAN, S. SMITH-DRYDEN, G. LI et B. SALEH, « Iterative optical diffraction tomography for illumination scanning configuration », *Optics Express* **28**, 39904-39915 (2020).
- ⁴⁷M. CHEN, D. REN, H.-Y. LIU, S. CHOWDHURY et L. WALLER, « Multi-layer Born multiple-scattering model for 3D phase microscopy », *Optica* **7**, 394-403 (2020).
- ⁴⁸M. LEE, H. HUGONNET et Y. PARK, « Inverse problem solver for multiple light scattering using modified Born series », *Optica* **9**, 177-182 (2022).
- ⁴⁹K. UNGER, « Tomographie de diffraction sans mesure de phase en régime de diffusion multiple », thèse de doct. (Aix Marseille Université, Ecole doctorale N°352, 2020).
- ⁵⁰J. M. SOTO, J. A. RODRIGO et T. ALIEVA, « Label-free quantitative 3D tomographic imaging for partially coherent light microscopy », *Opt. Express* **25**, 15699-15712 (2017).
- ⁵¹A. J. DEVANEY, « A filtered backpropagation algorithm for diffraction tomography », *Ultrasonic imaging* **4**, 336-350 (1982).
- ⁵²S. PAN et A. KAK, « A study of reconstruction algorithms for diffraction tomography : Interpolation versus filtered-backpropagation », *IEEE Transactions on Acoustics, Speech, and Signal Processing* **31**, 1262-1275 (1983).

- ⁵³K. WICKER et R. HEINTZMANN, « Resolving a misconception about structured illumination », *Nature Photonics* **8**, 342-344 (2014).
- ⁵⁴A. T. VOULDIS, C. N. KECHRIBARIS, T. A. MANIATIS, K. S. NIKITA et N. K. UZUNOGLU, « Three-dimensional diffraction tomography using filtered backpropagation and multiple illumination planes », *IEEE transactions on instrumentation and measurement* **55**, 1975-1984 (2006).
- ⁵⁵S. VERTU, J. FLÜGGE, J.-J. DELAUNAY et O. HAEBERLÉ, « Improved and isotropic resolution in tomographic diffractive microscopy combining sample and illumination rotation », *Open Physics* **9**, 969-974 (2011).
- ⁵⁶A. KUŚ, M. DUDEK, B. KEMPER, M. KUJAWIŃSKA et A. VOLLMER, « Tomographic phase microscopy of living three-dimensional cell cultures », *Journal of biomedical optics* **19**, 046009 (2014).
- ⁵⁷M. K. KREYSING, T. KIESSLING, A. FRITSCH, C. DIETRICH, J. R. GUCK et J. A. KÄS, « The optical cell rotator », *Optics Express* **16**, 16984-16992 (2008).
- ⁵⁸F. MEROLA, P. MEMMOLO, L. MICCIO, R. SAVOIA, M. MUGNANO, A. FONTANA, G. D'IPPOLITO, A. SARDO, A. IOLASCON, A. GAMBALE et al., « Tomographic flow cytometry by digital holography », *Light : Science & Applications* **6**, e16241-e16241 (2017).
- ⁵⁹J. KOSTENCKA, T. KOZACKI, A. KUŚ et M. KUJAWIŃSKA, « Accurate approach to capillary-supported optical diffraction tomography », *Optics Express* **23**, 7908-7923 (2015).
- ⁶⁰R. DÄNDLIKER et K. WEISS, « Reconstruction of the three-dimensional refractive index from scattered waves », *Optics communications* **1**, 323-328 (1970).
- ⁶¹T. KIM, R. ZHOU, M. MIR, S. D. BABACAN, P. S. CARNEY, L. L. GODDARD et G. POPESCU, « White-light diffraction tomography of unlabelled live cells », *Nature Photonics* **8**, 256-263 (2014).
- ⁶²G. POPESCU, L. L. GODDARD, P. S. CARNEY, T. KIM, R. ZHOU, M. A. MIR et S. D. BABACAN, *White light diffraction tomography of unlabeled live cells*, US Patent 9,404,857, 2016.
- ⁶³E. ABBE, « Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung », *Archiv für mikroskopische Anatomie* **9**, 413-468 (1873).
- ⁶⁴V. LAUER, « New approach to optical diffraction tomography yielding a vector equation of diffraction tomography and a novel tomographic microscope », *Journal of microscopy* **205**, 165-176 (2002).
- ⁶⁵N. DESTOUCHES, C.-A. GUÉRIN, M. LEQUIME et H. GIOVANNINI, « Determination of the phase of the diffracted field in the optical domain : Application to the reconstruction of surface profiles », *Optics Communications* **198**, 233-239 (2001).
- ⁶⁶S. HEUKE, H. RIGNEAULT et A. SENTENAC, « 3D-coherent anti-Stokes Raman scattering Fourier ptychography tomography (CARS-FPT) », *Opt. Express* **29**, 4230-4239 (2021).

- ⁶⁷J. KOSTENCKA, T. KOZACKI, A. KUŚ, B. KEMPER et M. KUJAWIŃSKA, « Holographic tomography with scanning of illumination : space-domain reconstruction for spatially invariant accuracy », *Biomedical optics express* **7**, 4086-4101 (2016).
- ⁶⁸M. DEBAILLEUL, B. SIMON, V. GEORGES, O. HAEBERLÉ et V. LAUER, « Holographic microscopy and diffractive microtomography of transparent samples », *Measurement Science and Technology* **19**, 074009 (2008).
- ⁶⁹J. KOSTENCKA et T. KOZACKI, « Computational and experimental study on accuracy of off-axis reconstructions in optical diffraction tomography », *Optical Engineering* **54**, 024107-024107 (2015).
- ⁷⁰J. KOSTENCKA, T. KOZACKI, M. DUDEK et M. KUJAWIŃSKA, « Noise suppressed optical diffraction tomography with autofocus correction », *Optics express* **22**, 5731-5745 (2014).
- ⁷¹L. CORPORATION, *U3 datasheet, hardware-description*, [Online ; accessed 01-Oct-2020].
- ⁷²A. NEGREAN et H. D. MANSVELDER, « Optimal lens design and use in laser-scanning microscopy », *Biomedical optics express* **5**, 1588-1609 (2014).
- ⁷³*Infinity-Corrected Tube Lenses*, https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=5834, Accessed : 2024-02-10.
- ⁷⁴G. A. MILLS et I. YAMAGUCHI, « Effects of quantization in phase-shifting digital holography », *Applied Optics* **44**, 1216-1225 (2005).
- ⁷⁵V. BIANCO, P. MEMMOLO, M. LEO, S. MONTRESOR, C. DISTANTE, M. PATURZO, P. PICART, B. JAVIDI et P. FERRARO, « Strategies for reducing speckle noise in digital holography », *Light : Science & Applications* **7**, 48 (2018).
- ⁷⁶S. K. MIRSKY et N. T. SHAKED, « First experimental realization of six-pack holography and its application to dynamic synthetic aperture superresolution », *Optics express* **27**, 26708-26720 (2019).
- ⁷⁷H. LIU, « Microscopie tomographique diffractive et profilométrie multivue à haute résolution », thèse de doct. (Université de Haute-Alsace, 2014).
- ⁷⁸R. ABBESSI, N. VERRIER, A. M. TADDESE, S. LAROCHE, M. DEBAILLEUL, M. LO, J.-B. COURBOT et O. HAEBERLÉ, « Multimodal image reconstruction from tomographic diffraction microscopy data », *Journal of Microscopy* **288**, 193-206 (2022).
- ⁷⁹S. LAROCHE, « Reconstruction d'images de microscopie multimodale », mém. de mast. (Université de Haute-Alsace, 2021).
- ⁸⁰W. STÖBER, A. FINK et E. BOHN, « Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range », *Journal of colloid and interface science* **26**, 62-69 (1968).
- ⁸¹Z. HU et D. C. RIPPLE, « The use of index-matched beads in optical particle counters », *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology* **119**, 674 (2014).

- ⁸²P. NAGLIČ, Y. ZELINSKYI, B. LIKAR et M. BÜRMEIN, « Determination of refractive index, size, and solid content of monodisperse polystyrene microsphere suspensions for the characterization of optical phantoms », *Biomedical optics express* **11**, 1901-1918 (2020).
- ⁸³C. BOISSIÈRE, A. VAN DER LEE, A. EL MANSOURI, A. LARBOT et E. PROUZET, « A double step synthesis of mesoporous micrometric spherical MSU-X silica particles », *Chemical Communications*, 2047-2048 (1999).
- ⁸⁴F. GARCIA-SANTAMARIA, H. MIGUEZ, M. IBISATE, F. MESEGUER et C. LOPEZ, « Refractive index properties of calcined silica submicrometer spheres », *Langmuir* **18**, 1942-1944 (2002).
- ⁸⁵A. M. TADDESE, « High-Resolution Tomographic Diffractive Microscopy : Sample Scanning Optimization and 3-D Quantitative Polarimetric Imaging », thèse de doct. (Université de Haute-Alsace, 2022).
- ⁸⁶W. KRAUZE, A. KUŚ, M. ZIEMCZONOK, M. HAIMOWITZ, S. CHOWDHURY et M. KUJAWIŃSKA, « 3D scattering microphantom sample to assess quantitative accuracy in tomographic phase microscopy techniques », *Scientific Reports* **12**, 19586 (2022).
- ⁸⁷V. V. VOLKOV et Y. ZHU, « Deterministic phase unwrapping in the presence of noise », *Optics letters* **28**, 2156-2158 (2003).
- ⁸⁸J. BAILLEUL, « Microscopie tomographique en transmission isotrope », thèse de doct. (Université de Haute-Alsace, 2016).
- ⁸⁹J. BAILLEUL, B. SIMON, M. DEBAILLEUL, L. FOUCAULT, N. VERRIER et O. HAEBERLÉ, « Tomographic diffractive microscopy : towards high-resolution 3-D real-time data acquisition, image reconstruction and display of unlabeled samples », *Optics Communications* **422**, 28-37 (2018).
- ⁹⁰W. L. BRIGGS et V. E. HENSON, *The DFT : an owner's manual for the discrete Fourier transform* (SIAM, 1995).
- ⁹¹R. BARER, « Interference microscopy and mass determination », *Nature* **169**, 366-367 (1952).
- ⁹²S. AKNOUN, J. SAVATIER, P. BON, F. GALLAND, L. ABDELADIM, B. F. WATTELLIER et S. MONNERET, « Living cell dry mass measurement using quantitative phase imaging with quadriwave lateral shearing interferometry : an accuracy and sensitivity discussion », *Journal of Biomedical Optics* **20**, 126009 (2015).
- ⁹³P. WANG, R. BISTA, R. BHARGAVA, R. E. BRAND et Y. LIU, « Spatial-domain low-coherence quantitative phase microscopy for cancer diagnosis », *Optics letters* **35**, 2840-2842 (2010).
- ⁹⁴B. SIMON, M. DEBAILLEUL, A. BEGHIN, Y. TOURNEUR et O. HAEBERLÉ, « High-resolution tomographic diffractive microscopy of biological samples », *Journal of Biophotonics* **3**, 462-467 (2010).

- ⁹⁵Y. COTTE, F. TOY, P. JOURDAIN, N. PAVILLON, D. BOSS, P. MAGISTRETTI, P. MARQUET et C. DEPEURSINGE, « Marker-free phase nanoscopy », *Nature Photonics* **7**, 113-117 (2013).
- ⁹⁶K. KIM, J. YOON, S. SHIN, S. LEE, S.-A. YANG et Y. PARK, « Optical diffraction tomography techniques for the study of cell pathophysiology », *Journal of Biomedical Photonics & Engineering* **2** (2016).
- ⁹⁷Y. PARK, C. DEPEURSINGE et G. POPESCU, « Quantitative phase imaging in biomedicine », *Nature photonics* **12**, 578-589 (2018).
- ⁹⁸A. IBRAHIM, C. H. HAGE, A. SOUISSI, A. LERAY, L. HÉLIOT, S. SOUISSI et B. VANDENBUNDER, « Label-free microscopy and stress responses reveal the functional organization of *Pseudodiaptomus marinus* copepod myofibrils », *Journal of Structural Biology* **191**, 224-235 (2015).
- ⁹⁹H. MAKHLOUF, K. PERRONET, G. DUPUIS, S. LÉVÊQUE-FORT et A. DUBOIS, « Simultaneous optically sectioned fluorescence and optical coherence microscopy with full-field illumination », *Opt. Lett.* **37**, 1613-1615 (2012).
- ¹⁰⁰K. JANTAKEE, A. PRAPAN, S. CHAIWAREE, N. SUWANNASOM, W. KAEWPRAYOON, R. GEORGIEVA, Y. TRAGOOLPUA et H. BÄUMLER, « Fabrication and Characterization of Human Serum Albumin Particles Loaded with Non-Sericin Extract Obtained from Silk Cocoon as a Carrier System for Hydrophobic Substances », *Polymers* **13**, 334 (2021).
- ¹⁰¹B. SIMON, M. DEBAILLEUL, V. GEORGES, V. LAUER et O. HAEBERLÉ, « Tomographic diffractive microscopy of transparent samples », *The European Physical Journal-Applied Physics* **44**, 29-35 (2008).
- ¹⁰²M. RICHARD, C. DELÉAGE, M. BARTHÉLÉMY, Y. P. LIN, A. HAY, B. LINA et O. FERRARIS, « Impact of influenza A virus neuraminidase mutations on the stability, activity, and sensibility of the neuraminidase to neuraminidase inhibitors », *Journal of Clinical Virology* **41**, 20-24 (2008).
- ¹⁰³J. DUBOCHET, M. ADRIAN, J.-J. CHANG, J. LEPAULT et A. W. MCDOWALL, « Cryoelectron microscopy of vitrified specimens », in *Cryotechniques in Biological Electron Microscopy* (Springer, 1987), p. 114-131.
- ¹⁰⁴G. KARLSSON, « Thickness measurements of lacey carbon films », *Journal of microscopy* **203**, 326-328 (2001).
- ¹⁰⁵M. DEBAILLEUL, V. GEORGES, B. SIMON, R. MORIN et O. HAEBERLÉ, « High-resolution three-dimensional tomographic diffractive microscopy of transparent inorganic and biological samples », *Optics letters* **34**, 79-81 (2009).
- ¹⁰⁶Z. YAQOUB, W. CHOI, S. OH, N. LUE, Y. PARK, C. FANG-YEN, R. R. DASARI, K. BADIZADEGAN et M. S. FELD, « Improved phase sensitivity in spectral domain phase microscopy using line-field illumination and self phase-referencing », *Optics express* **17**, 10681-10687 (2009).

- ¹⁰⁷S. BENTZEN, « Evaluation of the spatial resolution of a CT scanner by direct analysis of the edge response function », *Medical physics* **10**, 579-581 (1983).
- ¹⁰⁸L. FOUCAULT, « Microscope tomographique diffractif : simplification des acquisitions et reconstructions numériques associées », thèse de doct. (Université de Haute Alsace-Mulhouse, 2019).
- ¹⁰⁹J. LI, Q. CHEN, J. ZHANG, Z. ZHANG, Y. ZHANG et C. ZUO, « Optical diffraction tomography microscopy with transport of intensity equation using a light-emitting diode array », *Optics and lasers in engineering* **95**, 26-34 (2017).
- ¹¹⁰H. VOGEL, « A better way to construct the sunflower head », *Mathematical biosciences* **44**, 179-189 (1979).
- ¹¹¹O. R. MUSIN et A. S. TARASOV, « The Tammes Problem for $N = 14$ », [Experimental Mathematics](#) **24**, 460-468 (2015).
- ¹¹²E. B. SAFF et A. B. KUIJLAARS, « Distributing many points on a sphere », *The mathematical intelligencer* **19**, 5-11 (1997).
- ¹¹³A. M. TADDESE, N. VERRIER, M. DEBAILLEUL, J.-B. COURBOT et O. HAEBERLÉ, « Optimizing sample illumination scanning in transmission tomographic diffractive microscopy », *Applied Optics* **60**, 1694-1704 (2021).
- ¹¹⁴A. M. TADDESE, N. VERRIER, M. DEBAILLEUL, J.-B. COURBOT et O. HAEBERLÉ, « Optimizing sample illumination scanning for reflection and 4π tomographic diffractive microscopy », *Applied Optics* **60**, 7745-7753 (2021).
- ¹¹⁵L. FOUCAULT, N. VERRIER, M. DEBAILLEUL, B. SIMON et O. HAEBERLÉ, « Simplified tomographic diffractive microscopy for axisymmetric samples », *OSA Continuum* **2**, 1039-1055 (2019).
- ¹¹⁶R. W. GERCHBERG, « A practical algorithm for the determination of phase from image and diffraction plane pictures », *Optik* **35**, 237-246 (1972).
- ¹¹⁷J. R. FIENUP, « Phase retrieval algorithms : a comparison », *Applied optics* **21**, 2758-2769 (1982).
- ¹¹⁸J. VÖRÖS, « The density and refractive index of adsorbing protein layers », *Biophysical journal* **87**, 553-561 (2004).
- ¹¹⁹L. DENNEULIN, F. MOMEY et D. BRAULT, « GSURE criterion for unsupervised regularized reconstruction in Tomographic Diffractive Microscopy », in [OSA Imaging and Applied Optics Congress 2021 \(3D, COSI, DH, ISA, pcAOP\)](#) (2021), DM5E.5.
- ¹²⁰F. SOULEZ et É. THIÉBAUT, « Les problèmes inverses pour la reconstruction d'image en holographie », *Imageries optiques non conventionnelles pour la biologie*, 71 (2023).
- ¹²¹Z. YANG, L. ZHANG, T. LIU, H. WANG, Z. TANG, H. ZHAO, L. YUAN, Z. ZHANG et X. LIU, « Alternating projection combined with fast gradient projection (FGP-AP) method for intensity-only measurement optical diffraction tomography in LED array microscopy », [Biomed. Opt. Express](#) **15**, 2524-2542 (2024).

BIBLIOGRAPHIE

- ¹²²M. MALEK, H. KHELFA, P. PICART, D. MOUNIER et C. POILÂNE, « Microtomography imaging of an isolated plant fiber : a digital holographic approach », *Applied optics* **55**, A111-A121 (2016).
- ¹²³B. SIMON, M. DEBAILLEUL, M. HOUKAL, C. ECOFFET, J. BAILLEUL, J. LAMBERT, A. SPANGENBERG, H. LIU, O. SOPPERA et O. HAEBERLÉ, « Tomographic diffractive microscopy with isotropic resolution », *Optica* **4**, 460-463 (2017).
- ¹²⁴Y.-C. LIN, B. VINOTH, X.-J. LAI, H.-Y. TU et C.-J. CHENG, « Integrated dual-mode tomography for unlabeled free-floating single cell imaging », in *Digital Holography and Three-Dimensional Imaging* (Optical Society of America, 2018), DW5F-3.
- ¹²⁵Y.-C. LIN et C.-J. CHENG, « Sectional imaging of spatially refractive index distribution using coaxial rotation digital holographic microtomography », *Journal of Optics* **16**, 065401 (2014).
- ¹²⁶M. SARMIS, « Microscopie tomographique diffractive en réflexion », mém. de mast. (Université de Haute-Alsace, 2009).
- ¹²⁷I. BEN NSIR, « Microscopie tomographique diffractive en transmission et en réflexion », mém. de mast. (Université de Haute-Alsace, 2010).
- ¹²⁸T. YAMAGUCHI, H. IWAI, M. MIWA et Y. YAMASHITA, « Low-coherent quantitative phase microscope for nanometer-scale measurement of living cells morphology », *Optics express* **16**, 12227-12238 (2008).
- ¹²⁹M. SARMIS, B. SIMON, M. DEBAILLEUL, B. COLICCHIO, V. GEORGES, J.-J. DELAUNAY et O. HAEBERLE, « High resolution reflection tomographic diffractive microscopy », *Journal of Modern Optics* **57**, 740-745 (2010).
- ¹³⁰K. BELKEBIR, P. C. CHAUMET et A. SENTENAC, « Influence of multiple scattering on three-dimensional imaging with optical diffraction tomography », *JOSA A* **23**, 586-595 (2006).
- ¹³¹K. W. SEO, Y. S. CHOI, E. S. SEO et S. J. LEE, « Aberration compensation for objective phase curvature in phase holographic microscopy », *Optics letters* **37**, 4976-4978 (2012).
- ¹³²A. STADELMAIER et J. H. MASSIG, « Compensation of lens aberrations in digital holography », *Optics letters* **25**, 1630-1632 (2000).
- ¹³³P. de GROOT, « Principles of interference microscopy for the measurement of surface topography », *Advances in Optics and Photonics* **7**, 1-65 (2015).
- ¹³⁴D. MALACARA, *Optical shop testing*, t. 59 (John Wiley & Sons, 2007).
- ¹³⁵G. BINNIG et H. ROHRER, « Scanning tunneling microscopy », *Surface Science* **126**, 236-244 (1983).
- ¹³⁶A. HARASAKI, J. SCHMIT et J. C. WYANT, « Improved vertical-scanning interferometry », *Applied optics* **39**, 2107-2115 (2000).

- ¹³⁷I. KASSAMAKOV, S. LECLER, A. NOLVI, A. LEONG-HOI, P. MONTGOMERY et E. HÆGGSTRÖM, « 3D super-resolution optical profiling using microsphere enhanced Mirau interferometry », *Scientific reports* **7**, 3683 (2017).
- ¹³⁸K. CREATH, « Calibration of numerical aperture effects in interferometric microscope objectives », *Appl. Opt.* **28**, 3333-3338 (1989).
- ¹³⁹C. SHEPPARD et K. LARKIN, « Effect of numerical aperture on interference fringe spacing », *Applied optics* **34**, 4731-4734 (1995).
- ¹⁴⁰J. GATES, « Fringe spacing in interference microscopes », *Journal of Scientific Instruments* **33**, 507 (1956).
- ¹⁴¹J. F. BIEGEN, « Calibration requirements for Mirau and Linnik microscope interferometers », *Appl. Opt.* **28**, 1972-1974 (1989).
- ¹⁴²G. SCHULZ et K.-E. ELSSNER, « Errors in phase-measurement interferometry with high numerical apertures », *Applied optics* **30**, 4500-4506 (1991).
- ¹⁴³P. J. de GROOT et X. C. de LEGA, « Fourier optics modeling of interference microscopes », *JOSA A* **37**, B1-B10 (2020).
- ¹⁴⁴P. de GROOT, X. C. de LEGA, R. SU et R. LEACH, « Does interferometry work? A critical look at the foundations of interferometric surface topography measurement », in *Applied Optical Metrology III*, t. 11102 (SPIE, 2019), p. 121-131.
- ¹⁴⁵P. LEHMANN, M. KÜNNE et T. PAHL, « Analysis of interference microscopy in the spatial frequency domain », *Journal of Physics : Photonics* **3**, 014006 (2021).
- ¹⁴⁶A. SENTENAC et J. MERTZ, « Unified description of three-dimensional optical diffraction microscopy : from transmission microscopy to optical coherence tomography : tutorial », *J. Opt. Soc. Am. A* **35**, 748-754 (2018).
- ¹⁴⁷P. J. DE GROOT, « The meaning and measure of vertical resolution in optical surface topography measurement », *Applied Sciences* **7**, 54 (2017).
- ¹⁴⁸*Spécification géométrique des produits (GPS) — État de surface : Surfacique — Partie 600 : Caractéristiques métrologiques pour les méthodes de mesure par topographie surfacique*, Standard (International Organization for Standardization, fév. 2019).
- ¹⁴⁹D. C. GHIGLIA et M. D. PRITT, « Two-dimensional phase unwrapping : theory, algorithms, and software », A Wiley Interscience Publication (1998).
- ¹⁵⁰R. M. GOLDSTEIN, H. A. ZEBKER et C. L. WERNER, « Satellite radar interferometry : Two-dimensional phase unwrapping », *Radio science* **23**, 713-720 (1988).
- ¹⁵¹U. SPAGNOLINI, « 2-D phase unwrapping and instantaneous frequency estimation », *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* **33**, 579-589 (1995).
- ¹⁵²J. QUIROGA et A. GONZÁLEZ-CANO, « Phase measuring algorithm for extraction of isochromatics of photoelastic fringe patterns », *Applied Optics* **36**, 8397-8402 (1997).
- ¹⁵³M. A. HERRÁEZ, D. R. BURTON, M. J. LALOR et M. A. GDEISAT, « Fast two-dimensional phase-unwrapping algorithm based on sorting by reliability following a noncontinuous path », *Applied optics* **41**, 7437-7444 (2002).

- ¹⁵⁴S. M.-H. SONG, S. NAPEL, N. J. PELC et G. H. GLOVER, « Phase unwrapping of MR phase images using Poisson equation », *IEEE Transactions on Image Processing* **4**, 667-676 (1995).
- ¹⁵⁵R. J. WOMBELL et J. A. DESANTO, « Reconstruction of rough-surface profiles with the Kirchhoff approximation », *J. Opt. Soc. Am. A* **8**, 1892-1897 (1991).
- ¹⁵⁶Y.-Y. CHENG et J. C. WYANT, « Two-wavelength phase shifting interferometry », *Applied optics* **23**, 4539-4543 (1984).
- ¹⁵⁷F. GAO, R. K. LEACH, J. PETZING et J. M. COUPLAND, « Surface measurement errors using commercial scanning white light interferometers », *Measurement Science and Technology* **19**, 015303 (2007).
- ¹⁵⁸J. KÜHN, T. COLOMB, F. MONTFORT, F. CHARRIÈRE, Y. EMERY, E. CUCHE, P. MARQUET et C. DEPEURSINGE, « Real-time dual-wavelength digital holographic microscopy with a single hologram acquisition », *Opt. Express* **15**, 7231-7242 (2007).
- ¹⁵⁹K. CREATH, « Step height measurement using two-wavelength phase-shifting interferometry », *Applied optics* **26**, 2810-2816 (1987).
- ¹⁶⁰R. LEACH, *Optical measurement of surface topography*, t. 8 (Springer, 2011).
- ¹⁶¹S. ARHAB, « Profilométrie optique par méthodes inverses de diffraction électromagnétique », thèse de doct. (Aix-Marseille, 2012).
- ¹⁶²E. MUDRY, P. C. CHAUMET, K. BELKEBIR, G. MAIRE et A. SENTENAC, « Mirror-assisted tomographic diffractive microscopy with isotropic resolution », *Opt. Lett.* **35**, 1857-1859 (2010).
- ¹⁶³L. FOUCAULT, N. VERRIER, M. DEBAILLEUL, J.-B. COURBOT, B. COLICCHIO, B. SIMON, L. VONNA et O. HAEBERLÉ, « Versatile transmission/reflection tomographic diffractive microscopy approach », *J. Opt. Soc. Am. A* **36**, C18-C27 (2019).
- ¹⁶⁴K. KIM, Z. YAQOUB, K. LEE, J. W. KANG, Y. CHOI, P. HOSSEINI, P. T. C. SO et Y. PARK, « Diffraction optical tomography using a quantitative phase imaging unit », *Opt. Lett.* **39**, 6935-6938 (2014).
- ¹⁶⁵*sid4bio : quantitative phase imaging camera*, [Online; accessed 24-Oct-2023].
- ¹⁶⁶S. VELGHE, J. PRIMOT, N. GUÉRINEAU, M. COHEN et B. WATTELLIER, « Wavefront reconstruction from multidirectional phase derivatives generated by multilateral shearing interferometers », *Optics letters* **30**, 245-247 (2005).
- ¹⁶⁷s. AKNOUN, « Analyse quantitative d'images de phase obtenues par interférométrie à décalage quadri-latéral. Applications en biologie », thèse de doct. (Université Aix-Marseille, 2014).
- ¹⁶⁸J. PRIMOT, « Three-wave lateral shearing interferometer », *Appl. Opt.* **32**, 6242-6249 (1993).
- ¹⁶⁹N. VERRIER, D. ALEXANDRE et M. GROSS, « Laser Doppler holographic microscopy in transmission : application to fish embryo imaging », *Opt. Express* **22**, 9368-9379 (2014).

- ¹⁷⁰G. BAFFOU, « Quantitative phase microscopy using quadriwave lateral shearing interferometry (QLSI) : principle, terminology, algorithm and grating shadow description », *Journal of Physics D: Applied Physics* **54**, 294002 (2021).
- ¹⁷¹P. PICART et M. MALEK, « Complex field recovering from in-line digital holography », *Opt. Lett.* **38**, 3230-3232 (2013).
- ¹⁷²P. BON, *Phimask*, <https://www.idylle-labs.com/phimask-by-selfi> (visité le 23/10/2023).
- ¹⁷³P. BON, « Imagerie microscopique de champs électromagnétiques par interférométrie à décalage quadri-latéral. Applications à la biologie », thèse de doct. (Université Aix-Marseille, 2011).
- ¹⁷⁴P. BON, G. MAUCORT, B. WATTELLIER et S. MONNERET, « Quadriwave lateral shearing interferometry for quantitative phase microscopy of living cells », *Optics express* **17**, 13080-13094 (2009).
- ¹⁷⁵Y. RUAN, P. BON, E. MUDRY, G. MAIRE, P. CHAUMET, H. GIOVANNINI, K. BELKEBIR, A. TALNEAU, B. WATTELLIER, S. MONNERET et al., « Tomographic diffractive microscopy with a wavefront sensor », *Optics letters* **37**, 1631-1633 (2012).
- ¹⁷⁶T. COLOMB, F. DÜRR, E. CUCHE, P. MARQUET, H. G. LIMBERGER, R.-P. SALATHÉ et C. DEPEURSINGE, « Polarization microscopy by use of digital holography : application to optical-fiber birefringence measurements », *Applied optics* **44**, 4461-4469 (2005).
- ¹⁷⁷Z. WANG, L. J. MILLET, M. U. GILLETTE et G. POPESCU, « Jones phase microscopy of transparent and anisotropic samples », *Opt. Lett.* **33**, 1270-1272 (2008).
- ¹⁷⁸Y. KIM, J. JEONG, J. JANG, M. W. KIM et Y. PARK, « Polarization holographic microscopy for extracting spatio-temporally resolved Jones matrix », *Opt. Express* **20**, 9948-9955 (2012).
- ¹⁷⁹J. DUBOISSET, P. FERRAND, A. BARONI, T. A. GRÜNEWALD, H. DICKO, O. GRAUBY, J. VIDAL-DUPIOL, D. SAULNIER, M. ROSENTHAL, M. BURGHAMMER et al., « Amorphous-to-crystal transition in the layer-by-layer growth of bivalve shell prisms », *Acta Biomaterialia* **142**, 194-207 (2022).
- ¹⁸⁰K. PARK, T. D. YANG, D. SEO, M. G. HYEON, T. KONG, B.-M. KIM, Y. CHOI, W. CHOI et Y. CHOI, « Jones Matrix Microscopy for Living Eukaryotic Cells », *ACS Photonics* **8**, 3042-3050 (2021).
- ¹⁸¹B. KRÜGER, T. BRENNER et A. KIENLE, « Solution of the inhomogeneous Maxwell's equations using a Born series », *Opt. Express* **25**, 25165-25182 (2017).
- ¹⁸²A. SABA, J. LIM, A. B. AYOUB, E. E. ANTOINE et D. PSALTIS, « Polarization-sensitive optical diffraction tomography », *Optica* **8**, 402-408 (2021).
- ¹⁸³S. MIHOUBI, P.-J. LAPRAY et L. BIGUÉ, « Survey of Demosaicking Methods for Polarization Filter Array Images », *Sensors* **18**, 10.3390/s18113688 (2018).
- ¹⁸⁴N. VERRIER, A. M. TADDESE, R. ABBESSI, M. DEBAILLEUL et O. HAEBERLÉ, « 3D differential interference contrast microscopy using polarisation-sensitive tomographic diffraction microscopy », *Journal of Microscopy* **289**, 128-133 (2023).

- ¹⁸⁵M. R. FOREMAN et P. TÖRÖK, « Computational methods in vectorial imaging », [Journal of Modern Optics](#) **58**, 339-364 (2011).
- ¹⁸⁶T. STANGNER, H. ZHANG, T. DAHLBERG, K. WIKLUND et M. ANDERSSON, « Step-by-step guide to reduce spatial coherence of laser light using a rotating ground glass diffuser », [Applied optics](#) **56**, 5427-5435 (2017).
- ¹⁸⁷T. H. NGUYEN, M. E. KANDEL, M. RUBESSA, M. B. WHEELER et G. POPESCU, « Gradient light interference microscopy for 3D imaging of unlabeled specimens », [Nature communications](#) **8**, 210 (2017).
- ¹⁸⁸O. HAEBERLÉ, « Haeberlé Olivier, "De la physique de l'émission photonique au traitement des images : contribution à l'amélioration de la résolution en microscopie optique", habilitation à diriger les recherches », thèse de doct. (Université de Haute-Alsace, 2004).
- ¹⁸⁹F. SIMONETTI, « Multiple scattering : The key to unravel the subwavelength world from the far-field pattern of a scattered wave », [Phys. Rev. E](#) **73**, 036619 (2006).
- ¹⁹⁰F.-C. CHEN et W. C. CHEW, « Experimental verification of super resolution in non-linear inverse scattering », [Applied Physics Letters](#) **72**, 3080-3082 (1998).
- ¹⁹¹J. GIRARD, G. MAIRE, H. GIOVANNINI, A. TALNEAU, K. BELKEBIR, P. C. CHAUMET et A. SENTENAC, « Nanometric resolution using far-field optical tomographic microscopy in the multiple scattering regime », [Phys. Rev. A](#) **82**, 061801 (2010).
- ¹⁹²M. BOFFETY, « Étude quantitative de la tomographie optique diffuse de luminescence. Application à la localisation de sources en imagerie moléculaire », thèse de doct. (Ecole Centrale Paris, 2010).
- ¹⁹³S. V. AERT, D. V. DYCK et A. J. den DEKKER, « Resolution of coherent and incoherent imaging systems reconsidered - Classical criteria and a statistical alternative », [Opt. Express](#) **14**, 3830-3839 (2006).
- ¹⁹⁴P. RÉFRÉGIER, *Noise theory and application to physics : from fluctuations to information* (Springer Science & Business Media, 2012).
- ¹⁹⁵A. SENTENAC, C.-A. GUÉRIN, P. C. CHAUMET, F. DRSEK, H. GIOVANNINI, N. BERTAUX et M. HOLSCHNEIDER, « Influence of multiple scattering on the resolution of an imaging system : a Cramér-Rao analysis », [Opt. Express](#) **15**, 1340-1347 (2007).
- ¹⁹⁶Y. SAAD et H. A. VAN DER VORST, « Iterative solution of linear systems in the 20th century », [Journal of Computational and Applied Mathematics](#) **123**, Numerical Analysis 2000. Vol. III: Linear Algebra, 1-33 (2000).
- ¹⁹⁷M. J. WILLEMINK et P. B. NOËL, « The evolution of image reconstruction for CT—from filtered back projection to artificial intelligence », [European radiology](#) **29**, 2185-2195 (2019).
- ¹⁹⁸G. PALTAUF, J. VIATOR, S. PRAHL et S. JACQUES, « Iterative reconstruction algorithm for optoacoustic imaging », [The Journal of the Acoustical Society of America](#) **112**, 1536-1544 (2002).

BIBLIOGRAPHIE

- ¹⁹⁹P. B. CRILLY, « A quantitative evaluation of various iterative deconvolution algorithms », *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement* **40**, 558-562 (1991).
- ²⁰⁰D. A. AGARD, Y. HIRAOKA et J. W. SEDAT, « Three-Dimensional Microscopy : Image Processing For High Resolution Subcellular Imaging », in [New Methods in Microscopy and Low Light Imaging](#), t. 1161, sous la dir. de J. E. WAMPLER (International Society for Optics et Photonics, 1989), p. 24-30.
- ²⁰¹P. A. JANSSON, R. H. HUNT et E. K. PLYLER, « Resolution enhancement of spectra », *JOSA* **60**, 596-599 (1970).
- ²⁰²S. KAWATA et Y. ICHIOKA, « Iterative image restoration for linearly degraded images. I. Basis », *JOSA* **70**, 762-768 (1980).
- ²⁰³P. C. CHAUMET, K. BELKEBIR et A. SENTENAC, « Three-dimensional subwavelength optical imaging using the coupled dipole method », [Phys. Rev. B](#) **69**, 245405 (2004).
- ²⁰⁴T. MANGEAT, S. LABOUESSE, M. ALLAIN, A. NEGASH, E. MARTIN, A. GUÉNOLE, R. POINCLOUX, C. ESTIBAL, A. BOUISSOU, S. CANTALOUBE et al., « Super-resolved live-cell imaging using random illumination microscopy », *Cell Reports Methods* **1** (2021).
- ²⁰⁵X. PAN, E. Y. SIDKY et M. VANNIER, « Why do commercial CT scanners still employ traditional, filtered back-projection for image reconstruction ? », *Inverse problems* **25**, 123009 (2009).
- ²⁰⁶P. M. VAN DEN BERG, « Chapter 1.3.3 - Nonlinear Scalar Inverse Scattering : Algorithms and Applications », in [Scattering](#), sous la dir. de R. PIKE et P. SABATIER (Academic Press, London, 2002), p. 142-161.
- ²⁰⁷G. ZHENG, C. SHEN, S. JIANG, P. SONG et C. YANG, « Concept, implementations and applications of Fourier ptychography », *Nature Reviews Physics* **3**, 207-223 (2021).
- ²⁰⁸L. TIAN et L. WALLER, « 3D intensity and phase imaging from light field measurements in an LED array microscope », [Optica](#) **2**, 104-111 (2015).
- ²⁰⁹J. S. JØRGENSEN, E. AMETOVA, G. BURCA, G. FARDELL, E. PAPOUTSELLIS, E. PASCA, K. THIELEMANS, M. TURNER, R. WARR, W. R. LIONHEART et al., « Core Imaging Library-Part I : a versatile Python framework for tomographic imaging », [Philosophical Transactions of the Royal Society A](#) **379**, 20200192 (2021).
- ²¹⁰N. GUTTMANN-BECK et A. BECK, *First-Order Methods in Optimization*, [Online ; accessed 20-Jan-2024].
- ²¹¹BIOMEDICAL-IMAGING-GROUP, *GlobalBioIm*, [Online ; accessed 20-Jan-2024].
- ²¹²M. K. AGARWWAL SAMEER, *Cres-solver*, [Online ; accessed 20-Jan-2024].
- ²¹³I. CVX RESEARCH et CALTECH, *TFOCS*, [Online ; accessed 20-Jan-2024].
- ²¹⁴P. MÜLLER, M. SCHÜRMAN et J. GUCK, « ODTbrain : a Python library for full-view, dense diffraction tomography », *BMC bioinformatics* **16**, 1-9 (2015).

- ²¹⁵U. S. KAMILOV, I. N. PAPADOPOULOS, M. H. SHOREH, A. GOY, C. VONESCH, M. UNSER et D. PSALTIS, « Optical Tomographic Image Reconstruction Based on Beam Propagation and Sparse Regularization », *IEEE Transactions on Computational Imaging* **2**, 59-70 (2016).
- ²¹⁶X. MA, W. XIAO et F. PAN, « Optical tomographic reconstruction based on multi-slice wave propagation method », *Opt. Express* **25**, 22595-22607 (2017).
- ²¹⁷S. CHOWDHURY, M. CHEN, R. ECKERT, D. REN, F. WU, N. REPINA et L. WALLER, « High-resolution 3D refractive index microscopy of multiple-scattering samples from intensity images », *Optica* **6**, 1211-1219 (2019).
- ²¹⁸M. FEIT et J. FLECK, « Beam nonparaxiality, filament formation, and beam breakup in the self-focusing of optical beams », *JOSA B* **5**, 633-640 (1988).
- ²¹⁹T.-C. POON et P. P. BANERJEE, *Contemporary optical image processing with MATLAB* (Elsevier, 2001).
- ²²⁰K.-H. BRENNER et W. SINGER, « Light propagation through microlenses : a new simulation method », *Appl. Opt.* **32**, 4984-4988 (1993).
- ²²¹S. MOSER, A. JESACHER et M. RITSCH-MARTE, « Efficient and accurate intensity diffraction tomography of multiple-scattering samples », *Opt. Express* **31**, 18274-18289 (2023).
- ²²²Z. TONG, X. REN, Z. ZHANG, B. WANG, Y. MIAO et G. MENG, « Three-dimensional refractive index microscopy based on the multi-layer propagation model with obliquity factor correction », *Optics and Lasers in Engineering* **174**, 107966 (2024).
- ²²³H.-Y. LIU, D. LIU, H. MANSOUR, P. T. BOUFONOS, L. WALLER et U. S. KAMILOV, « SEAGLE : Sparsity-driven image reconstruction under multiple scattering », *IEEE Transactions on Computational Imaging* **4**, 73-86 (2017).
- ²²⁴T.-A. PHAM, E. SOUBIES, A. GOY, J. LIM, F. SOULEZ, D. PSALTIS et M. UNSER, « Versatile reconstruction framework for diffraction tomography with intensity measurements and multiple scattering », *Opt. Express* **26**, 2749-2763 (2018).
- ²²⁵G. OSNABRUGGE, S. LEEDUMRONGWATTHANAKUN et I. M. VELLEKOOP, « A convergent Born series for solving the inhomogeneous Helmholtz equation in arbitrarily large media », *Journal of Computational Physics* **322**, 113-124 (2016).
- ²²⁶U. S. KAMILOV, I. N. PAPADOPOULOS, M. H. SHOREH, A. GOY, C. VONESCH, M. UNSER et D. PSALTIS, « Learning approach to optical tomography », *Optica* **2**, 517-522 (2015).
- ²²⁷J. LIM et D. PSALTIS, « MaxwellNet : Physics-driven deep neural network training based on Maxwell's equations », *Apl Photonics* **7** (2022).
- ²²⁸J. LIM, *MaxwellNet : Physics-driven deep neural network training based on Maxwell's equations*, [Online ; accessed 11-Oct-2020].
- ²²⁹Y. SUN, Z. XIA et U. S. KAMILOV, « Efficient and accurate inversion of multiple scattering with deep learning », *Opt. Express* **26**, 14678-14688 (2018).

BIBLIOGRAPHIE

- ²³⁰R. FIOKA, K. WICKER, R. HEINTZMANN et A. STEMMER, « Simplified approach to diffraction tomography in optical microscopy », *Opt. Express* **17**, 12407-12417 (2009).
- ²³¹J. ROSEN et G. BROOKER, *Advanced Optical Technologies* **1**, 151-169 (2012).
- ²³²S. KU, K. MAHATO et N. MAZUMDER, « Polarization-resolved Stokes-Mueller imaging : a review of technology and applications », *Lasers in medical science* **34**, 1283-1293 (2019).
- ²³³S.-M. GUO, L.-H. YEH, J. FOLKESSON, I. E. IVANOV, A. P. KRISHNAN, M. G. KEEFE, E. HASHEMI, D. SHIN, B. B. CHHUN, N. H. CHO, M. D. LEONETTI, M. H. HAN, T. J. NOWAKOWSKI et S. B. MEHTA, « Revealing architectural order with quantitative label-free imaging and deep learning », *eLife* **9**, sous la dir. de B. FORSTMANN, V. MALHOTRA et D. VAN VALEN, e55502 (2020).
- ²³⁴A. M. TADDESE, M. LO, N. VERRIER, M. DEBAILLEUL et O. HAEBERLÉ, « Jones tomographic diffractive microscopy with a polarized array sensor », *Opt. Express* **31**, 9034-9051 (2023).