Reihe Physik

Valter Drazic

Fonctions de transfert optique tridimensionnelles et critère de confocalité pour le microscope à balayage

Verlag Shaker

Fonctions de transfert optique tridimensionnelles et critère de confocalité pour le microscope à balayage

Dissertation
agrée
de

Valter Drazic
de Kali (Croatie)

pour l'obtention du grade universitaire de

Docteur-Ingénieur
de la faculté de génie mécanique de
l'Université de Karlsruhe (TH)

Date de la soutenance: le 28 avril 1993

Directeur de thèse: Prof. Dr. Ing. F. Mesch
Membres du jury : Prof. P. Meyrueis
Prof. P. Ambs

à Corine, Sophie et Jérémie.

Fonctions de transfert optique tridimensionnelles et critère de confocalité pour le microscope à balayage

DRAZIC Valter
Institut für Meß– und Regelungstechnik
Universität Karlsruhe

11 juin 1993

Reihe Physik

Valter Drazic

Fonctions de transfert optique tridimensionnelles et critère de confocalité pour le microscope à balayage

Verlag Shaker
Aachen 1993

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Drazic, Valter:
Fonctions de transfert optique tridimensionnelles et critère de confocalité pour le microscope à balayage / Valter Drazic. - Aachen : Shaker, 1993
(Reihe Physik)
Zugl.: Karlsruhe, Univ., Diss., 1993
ISBN 3-86111-603-0

Copyright Verlag Shaker 1993
Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Als Manuskript gedruckt. Printed in Germany

ISBN 3-86111-603-0

Verlag Dr. Chaled Shaker, Hubertusstr. 40, 52064 Aachen
Telefon: 0241 / 406351 - Telefax: 0241 / 406354

Table des matières

1 Introduction **5**

1.1 Historique 5

1.2 Applications 7

1.3 Analyse des images 8

1.4 Le microscope confocal à balayage 9

2 Formation d'images 3D **13**

2.1 Formation d'images avec une lentille mince 13

2.2 Diffraction 3D par une lentille parfaite 14

2.3 Coordonnées optiques généralisées 15

3 Formation d'images dans un MCBL **17**

3.1 L'intensité intégrée 18

3.2 Linéarité de la formation d'images 19

3.3 La FTO partiellement cohérente 20

3.4 La FTOPC–2D défocalisée avec une source ponctuelle 22

3.5 La fonction de transfert optique 3D 27

3.6 La FTO–3D cohérente du microscope confocal 34

4 Résolution et critère de confocalité **39**

4.1 Le critère de résolution de Sheppard 40

4.2 Critère de qualité d'un MCBL 41

4.3 Critère de confocalité 41

5 Etude du microscope à balayage fluorescent **47**

5.1 La FTO–3D fluorescente 48

5.2 Critère de confocalité 54

6 Discussion des hypothèses fondamentales **57**

6.1 La stationnarité spatiale 57
6.2 Validité de l'approche scalaire et paraxiale 60
6.3 Cas des surfaces rugueuses et des surfaces inclinées 61
6.3.1 Les surfaces inclinées 61
6.3.2 Les surfaces rugueuses et le problème du speckle 62

7 Contrôle visuel automatique **65**
7.1 Acquisition de l'image 67
7.1.1 Microscope quasi–confocal 68
7.1.2 Microscope de type I 69
7.1.3 Microscope de type I défocalisé 69
7.1.4 MCBL avec une grande source 70
7.1.5 Influence de la cohérence temporelle 71
7.1.6 conclusion 72
7.2 Traitement d'image et classification des défauts 73

8 Conclusions **79**

A Cohérence partielle **81**

B Dérivation de la FTO–3D du microscope de type I **85**

C Dérivation de la FTO–3D du microscope confocal **87**

D Calcul de la FTO-3D cohérente **91**

E Liste des symboles **93**
E.1 Coordonnées et variables 93
E.2 Facteurs et constantes 94
E.3 Opérateurs et fonctions 95

Liste des figures

1.1 Premier concept d'un microscope optique à balayage. 5
1.2 Microscope confocal à balayage par réflexion. 9
1.3 Modes d'utilisation du MCBL qui seront étudiés. 10

2.1 Formation d'images 3D. 13

3.1 Systèmes de coordonnées dans un MCBL. 18
3.2 FTO bidimensionnelle d'un microscope confocal. 22
3.3 FTO bidimensionnelle d'un microscope de type I. 23
3.4 Domaine d'intégration pour le calcul de la FTOPC. 25
3.5 FTOPC bidimensionnelles pour différentes tailles v_d du détecteur. 26
3.6 Bande passante tridimensionnelle maximale. 31
3.7 Domaine d'intégration réduit. 32
3.8 Exemples de FTO-3D. 33
3.9 Support de la FTO-3D du microscope de type I. 34
3.10 FTO-3D d'après Sheppard. 35
3.11 Support de la FTO-3D d'après Sheppard. 36

4.1 Résolution du MCBL pour différentes dimensions de la source et du détecteur. 42
4.2 Courbes de niveaux de la résolution longitudinale selon le critère de Sheppard. 43
4.3 FTO longitudinales pour une source ponctuelle et diverses configuration de détecteurs. 44

5.1 Microscope confocal à balayage fluorescent. 48
5.2 Domaine d'intégration de la FTO-3D du microscope confocal fluorescent. . 51
5.3 FTO-3D pour différentes dimensions de la source et du détecteur. 53
5.4 FTO-3D pour des dimensions extrêmes de la source ou du détecteur. . . . 54
5.5 Courbes de niveaux de la résolution de Sheppard longitudinale pour le microscope à balayage fluorescent. 55

6.1 Illustration de la variance spatiale axiale. 58

6.2 Définition d'un système de coordonnées. 58
6.3 Justification de l'invariance spatiale dans le microscope confocal. 60
6.4 Compensation de l'inclinaison locale d'une surface. 62

7.1 Objet à inspecter. 66
7.2 Système d'acquisition de l'image. 67
7.3 Microscope quasi–confocal, $v_s \sim 3.5$, $v_d \sim 35$. 68
7.4 Microscope de type I, $v_s \sim 3.5$, $v_d \rightarrow \infty$. 69
7.5 Microscope de type I défocalisé: $v_s \sim 3.5$, $v_d \rightarrow \infty$, $z_s \sim 1$mm. 70
7.6 MCBL avec $v_s \sim v_d$ grands. 71
7.7 Microscope de type I focalisé. La source est une diode laser. 72
7.8 Microscope à balayage avec $v_s \sim v_d$ et une DEL. 73
7.9 Histogramme typique d'une image de mélangeur. 74
7.10 Histogramme particulier de l'image étudiée. 75
7.11 Recherche de rayure sur la surface fonctionnelle. 76
7.12 Recherche de rayure sur la surface fonctionnelle. 77

A.1 Microscope à balayage de type I. 81
A.2 Microscope équivalent au type I. 82

C.1 Aire d'intégration pour la FTO–3D confocale. 88

Chapitre 1

Introduction

1.1 Historique

Le premier concept d'un microscope à balayage remonte au début des années cinquante aux travaux de Roberts et Young [1]. Leur microscope utilisait un tube cathodique comme source de lumière. Le réseau balayé à la surface du tube était projeté sur un objet à travers un objectif de microscope. La lumière transmise était ensuite concentrée sur un photo-détecteur au moyen d'un collecteur. Le signal résultant était directement affiché sur un moniteur (figure 1.1).

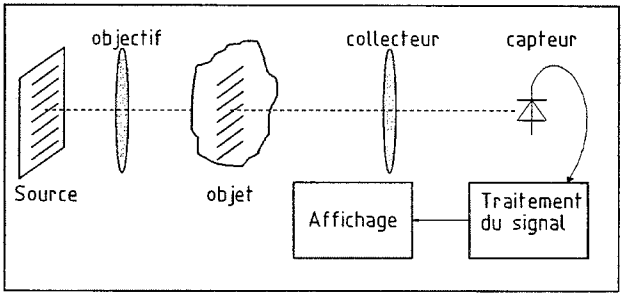

Figure 1.1: Premier concept d'un microscope optique à balayage.

Par rapport à un microscope conventionnel, le système à balayage présente plusieurs avantages:

- l'image est formée sur un moniteur ce qui rend son utilisation judicieuse lors de cours magistraux illustrés par des expériences.
- la taille du réseau peut être agrandie ou diminuée à volonté avec un zoom devant l'objectif de microscope ce qui évite de changer ce dernier pour modifier

le grandissement.

- la luminosité et le contraste de l'image sont très facilement contrôlables.

- il est possible de voir une image de l'objet même si ce dernier est éclairé en lumière IR ou UV.

- comme seule une petite région de l'objet est éclairée à la fois, il devrait y avoir un gain en résolution.

- l'image étant accessible sous forme de signaux électriques analogiques il est possible d'effectuer un dénombrement et un calibrage de particules et autres objets présents dans l'image.

Cinq ans plus tard, une courte communication présentait le premier système opérationnel [2]. Les images se formaient sur une plaque photographique à une cadence de 0.25 Hz et un exemple était présenté où le rapport signal sur bruit est amélioré par l'accumulation successive de seize images.
Les technologies des ordinateurs et de l'équipement vidéo se développèrent assez rapidement pour que le premier instrument commercial pouvant dénombrer et mesurer des spécimens microscopiques de manière autonome voit le jour au début des années soixante. Mis à part le gain en résolution, ces premiers instruments bénéficiaient de tous les avantages énumérés par Roberts et Young. Les premiers microscopes à balayage présentaient pourtant deux inconvénients majeurs qui conduisirent à l'élaboration de l'instrument étudié dans cette thèse:

- Il n'y avait au début des années soixante que deux types de sources lumineuses possibles: les tubes cathodiques et les sources thermiques. Ce n'est qu'avec l'apparition des premières sources intenses fiables de lumière cohérente avec le LASER He–Ne à partir de la seconde moitié des années soixante qu'il a été possible de surmonter le plus grand inconvénient des microscopes à balayage qui est le faible rapport signal sur bruit [3].

- La seconde amélioration surgit de problèmes rencontrés par les biologistes lors d'observations de cellules vivantes. Après plus de cent ans de recherche intense, la forme de beaucoup de cellules fondamentales était encore inconnue. Ceci provenait d'un problème technique qui n'avait pas encore trouvé de solution. Comment en effet observer un objet de faible contraste optique plongé dans un corps épais et translucide? Cela est tout à fait impossible en microscopie classique parce que la lumière diffusée par tout le volume du corps épais se superpose à l'image de l'objet étudié, la dégradant et l'obscurcissant. Pour résoudre ce problème, il est nécessaire de former une mince section *virtuelle* dans la masse du corps, cette section contenant l'objet à étudier. Il faut donc pouvoir distinguer la lumière diffusée par la section en cours d'examen de celle diffusée par les autres sections ainsi que par la surface du corps.

Plus cette distinction doit être prononcée et plus la fraction de lumière utile à la formation de l'image est faible d'où la nécessité de sources lumineuses intenses. Ainsi est né le microscope confocal à balayage laser (MCBL). Son principe est décrit pour la première fois par Minsky [4] mais ce n'est qu'en 1968 que fût construit le premier microscope confocal opérationnel [5] ayant une source thermique et le premier MCBL naquit un an plus tard [6]. C'est assez tardivement (1982) que le MCBL a été utilisé pour la première fois en mode fluorescent [7] bien que ce soit dans ce mode de fonctionnement que le MCBL atteind ses pleines potentialités. En mode fluorescent, la résolution du microscope confocal à balayage est jusqu'à quatre fois supérieure à celle du microscope conventionnel et c'est le seul cas connu où la limite mythique du pouvoir séparateur d'Abbe est battue en brèche.

1.2 Applications

La découverte du MCBL a été à l'origine d'un nouvel essor de la microscopie optique puisque désormais, il est possible d'obtenir des images d'un excellent contraste et avec un bon rapport signal sur bruit. La profondeur de champ étant réduite à quelques dizaines de nanomètres il est possible par balayage mécanique du spécimen d'obtenir des images exceptionnellement nettes et cela sur toute l'étendue de l'objet, aussi bien latéralement que longitudinalement. Depuis la commercialisation des premiers instruments, ceux–ci ne sont plus cantonnés à la médecine et à la biologie mais prennent aussi de l'importance dans le monde des laboratoires de recherche industriels. Parmi des applications pratiques telles que la mesure du profil d'une surface [8], la profilométrie tridimensionnelle [9], la mesure de distance [10], le contrôle de la qualité de diamants, la détection de contaminants sur des circuits semi–conducteurs [11] et la mesure très précise de structures linéaires de micro–circuits [12], l'inspection de circuits opto–électroniques est particulièrement intéressante. Dans le cas des diodes électroluminescentes par exemple, on peut très bien en observer la surface par réflexion dans un MCBL, mais il est également possible de former une image de la surface, avec le même microscope et avec la lumière propre de la diode. La conjonction des deux tests est unique puisqu'il n'est pas seulement possible de détecter les défauts du matériau constitutif, mais en plus, il est possible de visualiser directement leurs effets sur la lumière émise par la diode [13]. L'un des grands domaines d'application actuel est l'industrie microélectronique: alors que les structures géométriques des composants se réduisent de plus en plus, leur complexité, le nombre d'étapes de fabrication, la taille et le nombre de masques ne font qu'augmenter. Cette tendance ne semble pas devoir ralentir dans l'immédiat. Les méthodes de métrologie, de contrôle des processus et de qualité deviennent de plus en plus nécessaires. La taille des plus petites structures atteind maintenant la longueur d'onde de la lumière visible et la microscopie classique devient donc obsolète dans toutes ces tâches. Grâce au microscope confocal, il a toutefois été possible d'étendre le domaine d'application des méthodes de mesure et d'inspection optiques aux structures submicroniques et ces dernières années ont vu l'essor de quelques systèmes spécialement conçus pour l'industrie des composants en semi–conducteurs. On estimait entre trente et trente–cinq le nombre de MCBL en service en 1990 [14] et plus d'une centaine au début de 1992. Un autre phénomène est venu accélérer la mise en service d'un nombre toujours plus

grand de MCBL, c'est la tendance à remplacer les tâches de métrologie et de contrôle manuel par des processus entièrement robotisés. L'automatisation est alors très poussée et concerne aussi bien la prise en charge et la mesure que la prise de décision. Ce n'est qu'au prix d'une telle robotisation qu'il est possible de surmonter les limitations d'un opérateur humain.
C'est ainsi que le contrôle visuel automatique est devenu un des domaines d'application privilégiés du microscope confocal à balayage dans un certain type d'industrie.

1.3 Analyse des images

L'ensemble des données tridimensionnelles provenant de la partie opto-mécanique du microscope est généralement prise en charge par un système de traitement d'images qui fait partie intégrante du microscope. Cette partie calculatoire peut évidemment être utilisée pour des tâches de restauration et d'analyse d'images. A chaque étape du traitement il est nécessaire d'avoir une connaissance détaillée des caractéristiques de l'instrument. La restauration d'images avec réduction du bruit [15] ou l'emploi d'algorithmes de super-résolution [16] reposent sur une connaissance précise de la réponse impulsionnelle du système optique. L'analyse des images et les techniques de visualisation qui s'appuient sur la segmentation doivent tenir compte des propriétés optiques et la manière dont elles influencent la formation des images pour différents types d'objets [17]. Depuis la publication de la première étude sur la formation des images dans un microscope optique à balayage [18] en 1977, de nombreux auteurs se sont essayés à l'analyser de différentes manières. Mais c'est l'introduction historique de l'analyse des systèmes linéaires pour l'optique par Duffieux [19] (1946) en conjonction avec l'analyse fréquentielle de Hopkins [20, 21] (1955,1956) qui posèrent des bases plus rigoureuses pour la description théorique dans un système optique quelconque. L'idée d'analyser un système optique dans le domaine fréquentiel a été généralisée par Frieden [22] (1967) à l'imagerie tridimensionnelle ce qui lui permi de définir une fonction de transfert optique en trois dimensions pour l'optique (FTO–3D). Un certain consensus est né à la fin des années quatre–vingts pour reconnaître que la FTO–3D est le meilleur moyen d'analyse d'un microscope à balayage. L'avantage principal est qu'une description mathématique d'un microscope à balayage via le calcul de sa FTO–3D permet l'économie de plusieurs ordres de grandeurs dans les temps de calcul par rapport à une analyse qui repose sur l'évaluation de la réponse impulsionnelle. Le second avantage réside en la possibilité d'analyser les performances d'un dispositif sur des bases beaucoup moins subjectives. Cela peut être illustré par l'exemple de deux critères de résolution classiques en optique. Le premier, le critère de Rayleigh pour la résolution de deux points par un système optique est basé sur l'évaluation de la réponse impulsionnelle. Ce critère stipule que deux points sont résolus sur une image à condition qu'ils soient séparés par une chute d'intensité lumineuse suffisamment grande. Et bien que l'ampleur de cette chute d'intensité ne soit pas laissée à l'interprétation de tout–un–chacun, il est clair qu'il se trouvera couramment des personnes pour pouvoir distinguer deux points encore plus proches que ce que prévoit le critère de Rayleigh, selon la capacité variable qu'on a de distinguer deux sources d'intensité voisine. Le second, le critère d'Abbe, est basé sur la fonction de transfert d'un système optique et définit la résolution comme

la fréquence de coupure absolue de la fonction de transfert. Une telle définition n'est aucunement subjective puisqu'elle est basée sur des propriétés physiques: il est impossible à un système optique de transférer des informations au-delà de cette fréquence de coupure parce que les informations relatives aux fréquences spatiales supérieures ne se propagent qu'à une distance de quelques longueurs d'ondes et qu'il faudrait les détecter en champ proche, ce qui est hors du domaine de l'optique classique. L'évaluation pratique d'un système optique est également plus aisée si on observe les capacités de ce système à reproduire fidèlement un réseau linéaire que si on cherche à évaluer ses capacités à imager le mieux possible un objet ponctuel. Cela se comprend aisément puisqu'un objet ponctuel ne réfléchit ou ne transmet qu'une infime partie de la lumière incidente. Tout ceci revient donc à mesurer sa fonction de transfert plutôt que sa réponse impulsionnelle.

1.4 Le microscope confocal à balayage

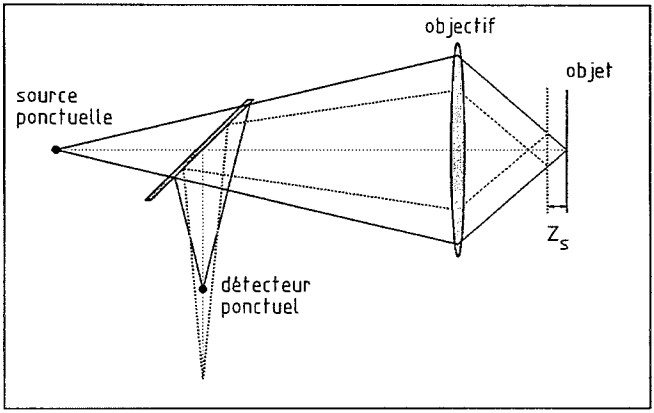

Figure 1.2: Microscope confocal à balayage par réflexion.

Dans un MCBL (figure 1.2) une source ponctuelle est focalisée sur un objet qui est mécaniquement mû par rapport à ce foyer et cela dans toutes les trois directions. La lumière réfléchie par la surface de l'objet est focalisée sur un détecteur ponctuel ou sur un détecteur placé juste derrière un très petit diaphragme. La lumière réfléchie par un plan de l'objet qui ne se trouve pas dans celui où est réalisée l'image de la source va se disperser sur une surface beaucoup plus grande dans le plan du détecteur et le signal qui sera généré sera donc beaucoup plus faible. La combinaison d'un microscope à balayage avec une source et un détecteur ponctuels permet donc la réalisation du sectionnement optique d'un objet. Cela signifie que seule une mince 'tranche' d'un objet volumique peut être imagée à la fois. Comme en pratique, les dimensions de la source et du détecteur sont toujours finies, il est évident d'après la figure 1.2 que cela aura au moins une influence

sur la finesse de la section réalisée, c'est–à–dire sur la résolution longitudinale du MCBL. En fait, ces dimensions jouent également un rôle sur la résolution latérale.

Le but de cette thèse est d'analyser l'influence de la source et du détecteur sur la résolution du MCBL et de définir des valeurs maximales pour leur taille qui soient encore compatibles avec les résolutions que l'on attend du système.

Parmis toutes les configurations possibles du MCBL telles qu'elles sont schématisées par la figure 1.3, nous nous interesserons exclusivement à:

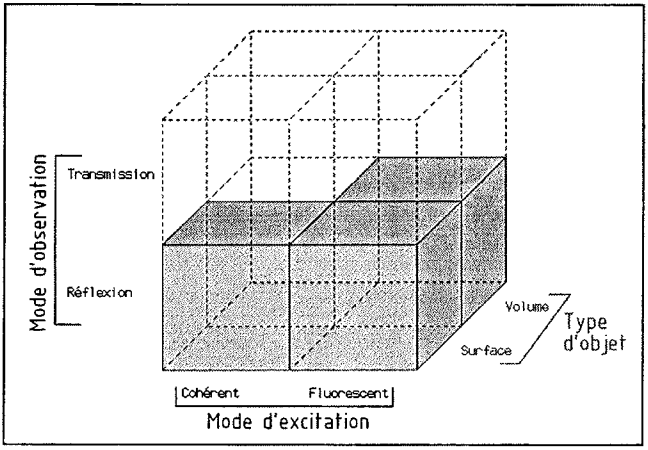

Figure 1.3: Modes d'utilisation du MCBL qui seront étudiés.

- un usage du MCBL en réflexion. Le mode par transmission n'est que rarement utilisé dans une tâche de contrôle visuel. Une exception connue est l'imagerie de semiconducteurs par transparence en lumière infra–rouge.
- Des **surfaces tridimensionnelles** plutôt que des objets de volume puisque les surfaces techniques sont dans l'immense majorité des cas réflectives.
- le mode cohérent. La fluorescence est utilisée plus spécialement en biologie.

Nous ferons cependant une exception pour étudier également un MCBL en mode fluorescent ce qui se justifie amplement du fait que c'est en biologie, et dans ce mode de fonctionnement que ces appareillages sont les plus répandus et les plus utilisés. Dans ce cas, tous les résultats seront bien évidemment valables pour des objets volumiques

généraux comme tout biologiste serait en droit d'attendre puisque le sectionnement optique et l'imagerie tridimensionnelle sont étroitement liés à leur domaine d'activité.

Dans le second chapitre de cette thèse, nous allons commencer par généraliser quelques principes fondamentaux de la formation d'images tridimensionnelles au cas de la lumière cohérente. Ces principes seront appliqués au MCBL dans le troisième chapitre où nous calculerons la FTO–3D. Le même type d'analyse se fera au sujet du MCBL fluorescent dans une cinquième partie. Le quatrième chapitre analysera l'influence d'une source et d'un détecteur de taille finie dans un MCBL. Les résultats de ces trois derniers chapitres ont été publiés en anglais [23, 24, 25, 26, 27]. Le calcul de la FTO–3D suppose réalisées un certain nombre d'hypothèses de base comme:

- la stationnarité spatiale du processus de formation d'image.
- un objet d'un type particulier.
- un calcul basé sur la théorie scalaire de la diffraction.
- l'approximation paraxiale.

Le bien fondé de ces hypothèses sera discuté dans la sixième partie. Un septième chapitre illustrera les capacités de sectionnement optique du MCBL et son interêt en contrôle visuel automatique par le cas pratique de la détection de défauts sur des objets à géométrie relativement complexe.

Chapitre 2

Principes fondamentaux de la formation d'images cohérentes tridimensionnelles

2.1 Formation d'images avec une lentille mince

La description de la formation d'images tridimensionnelles repose sur deux principes [22] qui sont la stationnarité et la superposition. Soit $\vec{r}_1(x_1, y_1, z_1)$ un point objet et $\vec{r}_s(x_s, y_s, z_s)$ le point image formé par une lentille mince (figure 2.1).

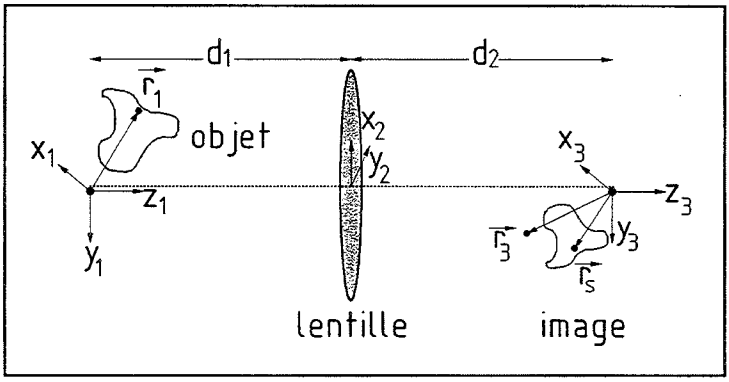

Figure 2.1: Formation d'images 3D.

Soit $h_1(\vec{r}_1, \vec{r}_3)$ l'amplitude lumineuse au voisinage d'un point $\vec{r}_3$ de l'image, due à une source ponctuelle cohérente en $\vec{r}_1$. Si le processus de la formation d'image est stationnaire:

$$h_1(\vec{r}_1, \vec{r}_3) = h_1(\vec{r}_3 - \vec{r}_s), \tag{2.1}$$

ce qui signifie que la réponse impulsionnelle tridimensionnelle (RI–3D) h_1 de la lentille (en anglais: Three-dimensional Point Spread Function ou 3D–PSF) demeure invariante quelque soit la position du point source $\vec{r}_1$. Cette condition de stationnarité sera discutée plus en détail ultérieurement.
La condition de superposition des ondes cohérentes impose que l'amplitude du champ en $\vec{r}_3$ soit la somme de toutes les ondes issues de l'objet et ramenées dans l'espace image par la lentille:

$$U_3(\vec{r}_3) = \int_V U_1(\vec{r}_1) h_1(\vec{r}_1, \vec{r}_3)\, d\vec{r}_1, \tag{2.2}$$

pour un objet–source continu confiné au volume V. Si les deux hypothèses fondamentales sont utilisées conjointement, l'amplitude en un point de l'espace image est donnée par:

$$U_3(\vec{r}_3) = \int_V U_1(\vec{r}_1) h_1(\vec{r}_3 - \vec{r}_s)\, d\vec{r}_1. \tag{2.3}$$

Le point image $\vec{r}_s$ est lié au point objet $\vec{r}_1$ par la relation de l'optique géométrique

$$\vec{r}_s = \mathcal{M}\vec{r}_1, \tag{2.4}$$

où $\mathcal{M}$ est la matrice diagonale des facteurs de grandissement

$$\mathcal{M} = \begin{pmatrix} -M_1 & 0 & 0 \\ 0 & -M_1 & 0 \\ 0 & 0 & M_1^2 \end{pmatrix}, \tag{2.5}$$

avec $M_1 = d_2/d_1$. L'expression finale de l'amplitude lumineuse en un point quelconque de l'espace image est donc

$$U_3(\vec{r}_3) = \int_V U_1(\vec{r}_1) h_1(\vec{r}_3 - \mathcal{M}\vec{r}_1)\, d\vec{r}_1, \tag{2.6}$$

ce qui équivaut au facteur $\mathcal{M}$ près, à la convolution de l'amplitude source avec la RI–3D de la lentille.

2.2 Diffraction tridimensionnelle par un instrument d'optique parfait

Cette RI–3D n'est rien d'autre que la figure de diffraction tridimensionnelle d'un instrument d'optique parfait. Une coupe de l'intensité lumineuse dans le plan image ne

révèlerait rien de moins que la figure de diffraction d'Airy. La RI-3D peut se déduire aisément de la théorie de formation des images exprimée en termes d'optique de Fourier [28]. Avant de donner l'expression de h_1, il est nécessaire de définir les notions de fonction pupillaire et de fonction pupillaire généralisée.

Définition 1 (Fonction pupillaire) *La fonction pupillaire d'une lentille est égale à l'unité pour tout rayon lumineux tombant sur la lentille. Elle est nulle si le rayon lumineux passe à coté et ne contribue pas à la formation de l'image.*

Pour la lentille mince de rayon a de la figure 2.1 la fonction pupillaire p_1 est égale à

$$p_1(x_2, y_2) = p_1(\vec{x}_2) = \begin{cases} 1 & \text{si} \quad x_2^2 + y_2^2 \leq a^2 \\ 0 & \text{sinon.} \end{cases} \tag{2.7}$$

Définition 2 (Fonction pupillaire généralisée) *Lorsque la lentille présente des aberrations, la fonction pupillaire comporte un terme de phase supplémentaire qui tient compte de la différence de chemin optique entre le front d'onde parfait et le front d'onde lumineux en présence d'aberrations.*

Comme sur la figure 2.1 le plan d'observation ne correspond pas avec le plan image et que de plus la lentille est parfaite, la fonction pupillaire généralisée comportera uniquement un déphasage dû au défaut de mise au point:

$$\mathcal{P}_1(x_2, y_2, z) = p_1(\vec{x}_2) \exp\left[-j\frac{kz}{2d_2^2}(x_2^2 + y_2^2)\right], \tag{2.8}$$

où z est la distance d'un plan d'observation très proche du plan image et k le nombre d'onde. La RI-3D est alors égale à la transformée de Fourier **bidimensionnelle** de la fonction pupillaire généralisée $\mathcal{P}$ [22]:

$$h_1(\vec{r}) = \int_{-\infty}^{+\infty} \mathcal{P}_1(\vec{x}_2, z) \exp\left(-j\frac{2\pi}{\lambda d_2}\vec{x}\vec{x}_2\right) d\vec{x}_2, \tag{2.9}$$

avec $\vec{r}(x, y, z) = (\vec{x}, z)$.

2.3 Coordonnées optiques généralisées

En règle générale toute description mathématique d'un système optique intègre des paramètres liés à la structure de l'appareillage. Dans le cas de la figure 2.1 par exemple, il est possible de définir deux classes de paramètres propres:

- une classe de paramètres physiques avec la longueur d'onde λ de la radiation utilisée qui apparaît par exemple dans l'équation (2.9).
- une classe de paramètres géométriques:a, d_1, d_2, z.

Ces paramètres sont autant de variables qui vont influencer les propriétés de la formation d'image et alourdir de leur présence la lecture des résultats finaux. De plus, leur rôle est en général bien connu. Afin de s'affranchir de ce problème et de donner une description et des résultats qui seront valables quelques soit la longueur d'onde utilisée et quelque soient les dimensions du montage, il est nécessaire de redéfinir les coordonnées qui seront utilisées par la suite. Les coordonnées optiques généralisées permettent de réaliser cela:

$$(\vec{v}_1, u_1) = \begin{pmatrix} v_{x1} \\ v_{y1} \\ u_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} k\sin(\alpha)x_1 \\ k\sin(\alpha)y_1 \\ k\sin^2(\alpha)z_1 \end{pmatrix}, \tag{2.10}$$

avec $k = 2\pi/\lambda$, $\sin(\alpha)$ étant l'ouverture numérique de l'objectif. Dans l'approximation paraxiale, $\sin(\alpha) = a/d_2$. Le même genre d'expression est également valable pour $(\vec{v}_3, u_3)$. La taille de l'objectif sera normalisée à l'unité:

$$\rho_2 = \frac{\sqrt{x_2^2 + y_2^2}}{a} = \sqrt{\xi_2^2 + \eta_2^2} \leq 1. \tag{2.11}$$

Avec de tels changements de coordonnées, la fonction pupillaire généralisée de l'équation (2.8) ainsi que la RI–3D (2.9) deviennent:

$$\mathcal{P}_1(\vec{\xi}_2, u) = p_1(\vec{\xi}_2)\exp[-ju(\xi_2^2 + \eta_2^2)/2] \tag{2.12}$$

$$h_1(\vec{v}, u) = a^2 \int_{-\infty}^{+\infty} \mathcal{P}_1(\vec{\xi}_2, u)\exp(-j\vec{v}\vec{\xi}_2)\, d\vec{\xi}_2. \tag{2.13}$$

Ainsi tout paramètre propre à la construction du système sera englobé dans u et v. Seul un terme en a^2 subsiste devant l'expression de h_1. Il faut cependant noter que tout terme constant apparaissant devant une intégrale disparaîtra par la suite de par la nécessité de normaliser toute fonction de transfert en optique.

Chapitre 3

Formation d'images dans un microscope confocal à balayage LASER par réflexion.

Les premières descriptions théoriques du microscope optique à balayage confocal supposaient toutes une source et un détecteur assez petits pour pouvoir être considérés comme ponctuels (figure 1.2). Il a pourtant été reconnu dès le départ que la taille du détecteur avait une influence primordiale sur la résolution longitudinale (le long de l'axe optique) de tels systèmes. En pratique, le détecteur devait aussi être assez grand pour améliorer le rapport signal sur bruit. Un détecteur trop petit intercepte en effet si peu de lumière que son bruit propre est souvent plus élevé que le signal utile généré. Quelques tentatives ont été faites pour tenir compte de l'influence de la taille du détecteur sur la formation de l'image [29, 30, 31]. L'objet choisi a malheureusement été restreint à un miroir plan ce qui ne donne pas vraiment d'information sur les propriétés du microscope relatives à ses capacités de former des images mais plutôt quelques indications sur son pouvoir à séparer deux plans très voisins, c'est–à–dire sur la force de son sectionnement optique. Cette restriction a en fait été imposée par la méthode d'analyse qui a été choisie, qui est celle de la fonction de transfert bidimensionnelle en présence d'un défaut de mise au point. Les expressions mathématiques obtenues ont alors été évaluées pour un objet latéralement homogène et par conséquence la fonction de transfert bidimensionnelle a été réduite au calcul d'une simple intensité intégrée [32] par le détecteur. L'idée qu'il était possible de généraliser les travaux de Frieden [22] sur les FTO–3D en lumière incohérente au cas de la lumière cohérente et du microscope confocal n'est apparue qu'en 1991 [33]. Mais la source et le détecteur étaient encore considérés comme étant ponctuels. Un autre point qui n'a jamais été discuté dans la littérature publiée au sujet du microscope confocal est l'influence de la taille de la source. Son influence sera étudiée conjointement avec celle du détecteur dans les sections suivantes et livrera des conclusions surprenantes sur les effets d'une source mal dimensionnée.

3.1 L'intensité intégrée

Pour décrire le microscope confocal nous utiliserons les coordonnées définies par la figure 3.1.

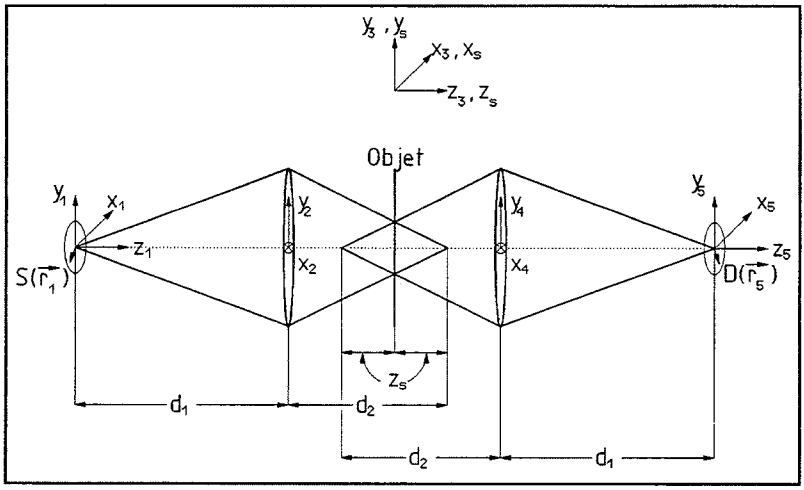

Figure 3.1: Systèmes de coordonnées dans un MCBL.

Par rapport à la figure 1.2, le chemin optique a été 'déplié' par souci de simplicité et la source ainsi que le détecteur sont supposés être de dimension finie. Ils sont définis par les fonctions S et D telles que:

$$\begin{aligned} S(\vec{r}_1) = S_2(\vec{x}_1)\delta(z_1) \quad \text{avec} \quad S_2(\vec{x}_1) &= \begin{cases} 1 & \text{pour} \quad x_1^2 + y_1^2 \leq R_s^2 \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \\ D(\vec{r}_5) = D_2(\vec{x}_5)\delta(z_5) \quad \text{avec} \quad D_2(\vec{x}_5) &= \begin{cases} 1 & \text{pour} \quad x_5^2 + y_5^2 \leq R_d^2 \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \end{aligned} \tag{3.1}$$

S est est l'amplitude lumineuse, ici normalisée, émise par la source, D est la sensibilité du détecteur, δ est l'impulsion de Dirac, R_s et R_d sont les rayons de la source et du détecteur respectivement. Par la suite, l'objet sera supposé être réfléchissant, c'est la raison pour laquelle il est modélisé comme étant infiniment mince sur la figure 3.1. Des coordonnées d'indice pair sont fixées aux lentilles pour pouvoir décrire leur fonction pupillaire. Un point quelconque de l'objet est repéré par le vecteur $\vec{r}_3$ du système de coordonnées qui lui est attaché. Celui indicé par un s permet de repérer le point $\vec{x}_s$ de l'objet en cours d'examen. Il peut arriver que le faisceau incident ne soit pas focalisé

sur la surface de l'objet, c'est pourquoi tous les calculs seront effectués pour une surface éloignée de z_s du plan de mise au point. L'objet peut évidemment être une surface qui s'ettend en trois dimensions pourvu que cette surface ne soit constituée que de plateaux. Tout plan incliné refléchirait en effet la lumière incidente hors de l'axe optique brisant la symétrie du système. L'influence de l'inclinaison sera étudiée dans un chapitre ultérieur. Une image tridimensionnelle complète de l'objet est obtenue si l'objet est ainsi balayé mécaniquement en trois dimensions, sous la tache focale projetée par l'objectif. Chaque point $\vec{r}_s$ ainsi balayé illumine tout le plan image (x_5, y_5) mais seuls les rayons tombant sur le détecteur contribuent au signal qui sera stocké dans la mémoire de masse d'un ordinateur et qui représentera un point de l'image. C'est pour cette raison qu'on parle d'intensité intégrée: le point image correspondant à un point $\vec{r}_s$ effectivement balayé est proportionnel à l'intensité intégrée par toute la surface du photodétecteur. C'est donc cette intensité intégrée qu'il faut tout d'abord calculer. Si le rôle de l'objet dans (2.6), c'est-à-dire U_1, est joué dans le cas de la figure 3.1 par l'émissivité S, il suffit d'appliquer la loi de la formation d'images 3D à la première lentille du schéma 3.1 pour obtenir l'amplitude du champ $U_3(\vec{r}_3)$ éclairant l'objet. Si ce dernier est caractérisé par une réflectivité $t(\vec{r}_3)$, l'amplitude réfléchie sera égale à $U_3(\vec{r}_3)t(\vec{r}_s - \vec{r}_3)$. Il suffit d'appliquer encore une fois la relation 2.6 à la deuxième lentille pour obtenir l'expression de l'amplitude au voisinage du plan du détecteur:

$$U_5(\vec{r}_5, \vec{r}_s) = \int_{-\infty}^{+\infty}\int_{-\infty}^{+\infty} h_1(\vec{r}_3 - \mathcal{M}\vec{r}_1)h_2(\vec{r}_3 - \mathcal{M}\vec{r}_5)S(\vec{r}_1)t(\vec{r}_s - \vec{r}_3)\, d\vec{r}_3 d\vec{r}_1. \tag{3.2}$$

L'intensité lumineuse intégrée est dès lors simplement égale à:

$$L(\vec{r}_s) = \int_{-\infty}^{+\infty} |U_5(\vec{r}_5, \vec{r}_s)|^2 D(\vec{r}_5)\, d\vec{r}_5. \tag{3.3}$$

3.2 Linéarité de la formation d'images

D'après la structure de l'équation 3.3 il est évident que le processus de formation d'images dans le cas général du MCBL n'est pas linéaire. Ceci est dû au fait que toute photodétection est forcément incohérente. En d'autres termes, le signal délivré est proportionnel à l'intensité lumineuse et non à son amplitude: les temps de réponse de l'électronique sont très nettement inférieurs à une période de vibration du champ lumineux. Or, dans le cas précédent, il est fait usage de lumière cohérente conjointement à un détecteur incohérent et il est donc impossible que le système soit linéaire vis-à-vis de l'objet. La seule manière de continuer l'évaluation du microscope confocal consiste à choisir un type très particulier d'objet, à savoir un objet faiblement diffractant. L'objet possédera aussi une structure particulière. Il sera supposé être constitué d'un réseau unidimensionnel avec une réflectivité variant de manière sinusoïdale. En cela nous suivons une règle énoncée par Dainty [34] qui stipule que si on cherche à montrer qu'un processus de formation d'image est linéaire, il suffit de prendre un objet qui possède une variation sinusoïdale d'une de ses propriétés. Si une quantité appropriée de l'image, telle que son

intensité, varie aussi de manière sinusoïdale, avec la même fréquence et une modulation différente, alors il est possible de définir une fonction de transfert linéaire pour ce système. La réflectance complexe de l'objet sera donc:

$$t(\vec{r}_s - \vec{r}_3) = \{1 + b\cos[2\pi\nu_x(x_s - x_3)]1(y_s - y_3)\}\delta(z_s - z_3). \tag{3.4}$$

Comme le MCBL ne présente pas d'aberrations optiques, sa FTO sera indépendante de l'orientation du réseau. Cette orientation est par conséquence choisie de manière à alléger les calculs: les lignes du réseau seront parallèles à l'axe y_3. $1(y_s - y_3)$ est la fonction qui associe l'unité à toute coordonnée $y_s - y_3$. L'objet est réfléchissant et n'est pas forcément situé dans le plan image de la source comme cela est stipulé par le terme de décalage $\delta(z_s - z_3)$. La lumière incidente sera modulée en phase et/ou en amplitude, b sera donc une constante complexe. ν_x est la fréquence du réseau.

3.3 La fonction de transfert optique partiellement cohérente

La manière la plus simple de continuer à développer l'expression (3.3) est d'y introduire le spectre de (3.4) mais en séparant bien les effets de la structure latérale de l'objet de ceux engendrés par un balayage longitudinal de l'objet. (3.4) sera donc réécrite en:

$$t(\vec{r}_s - \vec{r}_3) = t_2(\vec{x}_s - \vec{x}_3)\delta(z_s - z_3). \tag{3.5}$$

Il suffit à ce stade d'introduire le spectre de t_2, à savoir

$$t_2(\vec{x}_s - \vec{x}_3) = \int_{-\infty}^{+\infty} T_2(\vec{m})\exp[2\pi j\vec{m}(\vec{x}_s - \vec{x}_3)]\,d\vec{m}, \tag{3.6}$$

dans (3.3). $\vec{m} = (m_x, m_y)$ sont les fréquences spatiales de l'objet. L'intensité intégrée est alors:

$$L(\vec{r}_s) = \int_{-\infty}^{+\infty}\int_{-\infty}^{+\infty} \mathcal{C}(\vec{m};\vec{p};z_s)T_2(\vec{m})T_2^*(\vec{p})\exp[2\pi j\vec{x}_s(\vec{m} - \vec{p})]\,d\vec{m}d\vec{p}, \tag{3.7}$$

avec

$$\mathcal{C}(\vec{m};\vec{p};z_s) = \int_{-\infty}^{+\infty} c(\vec{m}, z_s, \vec{x}_5)c^*(\vec{p}, z_s, \vec{x}_5)D_2(\vec{x}_5)\,d\vec{x}_5, \tag{3.8}$$

et

$$\begin{aligned} c(\vec{m}, z_s, \vec{x}_5) &= \int_{-\infty}^{+\infty}\int_{-\infty}^{+\infty} h_1(\vec{x}_3 - M_1\vec{x}_1, z_s)h_2(\vec{x}_3 - M_1\vec{x}_5, z_s)S_2(\vec{x}_1) \\ &\times \exp(-2\pi j\vec{m}\vec{x}_3)\,d\vec{x}_1 d\vec{x}_3. \end{aligned} \tag{3.9}$$

L'astérisque désigne une valeur complexe conjuguée. $\vec{p} = (p_x, p_y)$ sont également des fréquences spatiales introduites par nécessité de distinguer les variables d'intégration de c et c^*. L'équation (3.7) est un résultat important, bien que déjà connu, parce qu'il a été possible de séparer les effets dus au système optique de ceux dus à l'objet. $\mathcal{C}$ est appelée 'Fonction de Transfert Optique Partiellement Cohérente (FTOPC)'. Cette expression sera justifiée par l'annexe A. Son expression en fonction de D_2 et S_2 est par contre nouvelle. S'il n'a pas été difficile de l'établir, il est légitime de se demander pourquoi d'autres auteurs ne l'ont pas fait. Ceci est dû au fait que la FTOPC est une fonction de cinq variables et il est illusoire de vouloir l'étudier ainsi, surtout si l'on se rappelle qu'elle dépend encore de deux paramètres qui sont les rayons de la source et du détecteur. C'est la raison pour laquelle $\mathcal{C}$ n'a jamais été utilisée pour étudier ce genre de système optique. Il est aussi intéressant de noter que la fonction c de l'équation (3.8) est également une fonction connue qui porte le nom de 'Fonction de Transfert Optique Cohérente (FTOC)'. Elle sera discutée dans une section ultérieure. Pour l'instant, nous nous proposons d'utiliser les propriétés hermitiennes de $\mathcal{C}$ ainsi que la forme spéciale de l'objet–test (3.4) pour simplifier la FTOPC. Introduisons le spectre de l'objet $T_2(\vec{m}) = \delta(m_y)[\delta(m_x) + b/2\delta(m_x - \nu_x) + b/2\delta(m_x + \nu_x)]$ ainsi que $T_2^*(\vec{p})$ dans (3.7). Le résultat est alors, en termes de coordonnées optiques généralisées:

$$\begin{aligned} L(\vec{v}_s, u_s) = \mathcal{C}(0;0;u_s) \quad &+ \left[\frac{b}{2}\mathcal{C}(\tilde{\nu}_x, 0; 0, 0; u_s) + \frac{b^*}{2}\mathcal{C}(0, 0; -\tilde{\nu}_x, 0; u_s)\right] \exp(jv_{xs}\tilde{\nu}_x) \\ &+ \left[\frac{b}{2}\mathcal{C}(-\tilde{\nu}_x, 0; 0, 0; u_s) + \frac{b^*}{2}\mathcal{C}(0, 0; \tilde{\nu}_x, 0; u_s)\right] \exp(-jv_{xs}\tilde{\nu}_x) \\ &+ \frac{|b|^2}{4}\cdots \end{aligned} \tag{3.10}$$

où $\tilde{\nu}_x$ est la fréquence spatiale, normalisée par la fréquence de coupure du microscope conventionnel:

$$\tilde{\nu}_x = \frac{\nu_x \lambda}{\sin(\alpha)}. \tag{3.11}$$

Nous avons supposé que l'objet–test était faiblement diffractant, donc tous les termes en $|b|^2$ seront négligés vis–à–vis des termes de premier ordre dans (3.10). Il est en plus facile de vérifier à l'aide de (3.8) et (3.9) que $\mathcal{C}$ a des propriétés hermitiennes:

$$\begin{aligned} \mathcal{C}(0, 0; \tilde{\nu}_x, 0; u_s) &= \mathcal{C}^*(\tilde{\nu}_x, 0; 0, 0; u_s) \\ \mathcal{C}(0, 0; -\tilde{\nu}_x, 0; u_s) &= \mathcal{C}(0, 0; \tilde{\nu}_x, 0; u_s), \end{aligned} \tag{3.12}$$

de telle sorte que (3.10) se réduit à

$$L(v_{xs}, v_{ys}, u_s) = \mathcal{C}(0;0;u_s) + 2\Re[b\ \mathcal{C}(\tilde{\nu}_x, 0; 0, 0; u_s)] \cos(v_{xs}\tilde{\nu}_x) 1(v_{ys}), \tag{3.13}$$

où $\Re$ représente la partie réelle. Suite à (3.13) on peut en déduire qu'avec l'hypothèse d'un objet faiblement diffractant, la formation d'images est un processus linéaire puisque

l'image est égale à un premier terme qui caractérise un objet réflectif et qui est constant pour chaque plan de l'objet; plus un terme sinusoïdal, de même fréquence spatiale que l'objet, mais de modulation différente.

3.4 La FTOPC–2D défocalisée avec une source ponctuelle

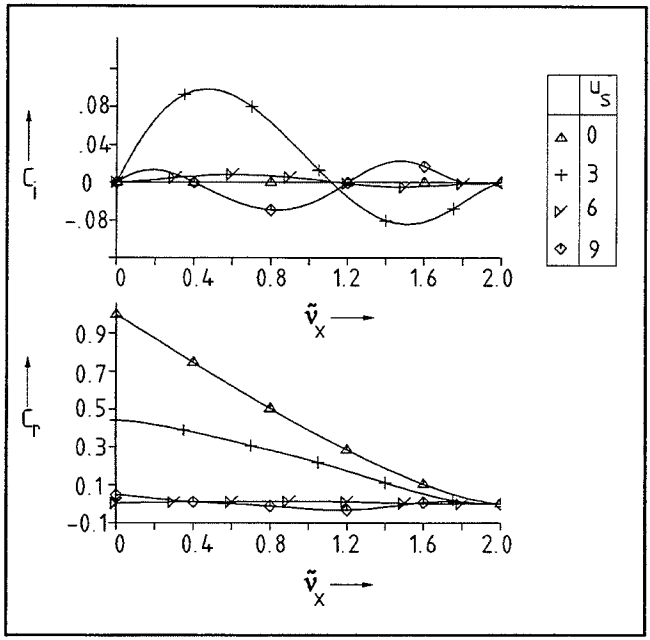

Figure 3.2: FTO bidimensionnelle d'un microscope confocal.

Le facteur multipliant la modulation, à savoir $\mathcal{C}(\tilde{\nu}_x, u_s)$, représente donc effectivement la fonction de transfert optique partiellement cohérente. Elle est bidimensionnelle puisqu'elle fait intervenir $\vec{\nu} = (\tilde{\nu}_x, \tilde{\nu}_y)$, avec $\tilde{\nu}_y = 0$; et défocalisée à cause du terme u_s qui est le défaut de mise au point. $\mathcal{C}$ est aussi une fonction de la taille du détecteur (eq. 3.8) et de la source (eq. 3.9) et sa forme est connue dans deux configurations typiques [35]:

1. Une source et un détecteur ponctuels. La FTO est illustrée par la figure 3.2, où C_r et C_i sont respectivement la partie réelle et la partie imaginaire de $\mathcal{C}$.

2. Une source ponctuelle et un détecteur très grand. Figure 3.3.

La première configuration est appelée Type II, ou microscope confocal, et la seconde Type I, ou microscope à balayage conventionnel [35].

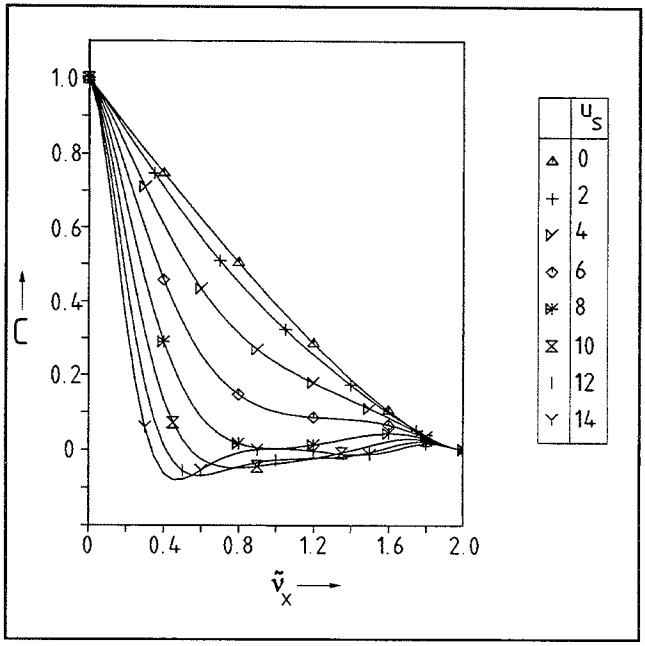

Figure 3.3: FTO bidimensionnelle d'un microscope de type I.

A ce stade, il est nécessaire de faire plusieurs remarques:

- La FTO bidimensionnelle du microscope conventionnnel à balayage laser est exactement la même que celle d'un microscope classique utilisé en lumière incohérente [20].
- Ses propriétés ont été étudiées par Stokseth [36] qui en donne également une approximation analytique simple qui permet un calcul très rapide de la FTO.
- Par opposition à la FTO du microscope de Type II, elle est purement réelle.
- On ne peut pas, dans un microscope de Type I, distinguer si un objet homogène est correctement mis-au-point. En effet, $\mathcal{C}(0, u_s) = 1$ quel que soit le degré de défocalisation u_s. Ceci n'est pas vrai pour le microscope confocal où $\mathcal{C}_r(0, u_s)$ chute très rapidement avec u_s, ce qui indique une prédisposition à un sectionnement optique important.

La question qu'il reste à aborder est celle de la forme générale de la FTOPC si la source et le détecteur sont de grandeur finie et non nulle. Avant la parution de [23], la question était encore ouverte. La dérivation de la FTOPC sera reproduite ci-dessous puisque les notations sont quelque peu différentes de celles utilisées en [23]. Nous nous bornerons pour commencer au cas où la source est ponctuelle et le détecteur quelconque. Cela signifie que $S_2(\vec{x}_1) = \delta(\vec{x}_1)$ dans (3.9). Introduisons successivement (2.12) dans (2.13) pour obtenir l'expression de h_1 et l'expression semblable pour h_2 qui seront utilisées dans (3.9), introduite à son tour dans (3.8). Si on intègre ensuite selon $\vec{x}_3$, en ce qui concerne c, et selon $\vec{x}'_3$ pour c^*, nous obtenons une expression simplifiée de la FTOPC:

$$\begin{aligned} \mathcal{C}(\tilde{\nu}_x, u_s) &= C^{te} \int_{-\infty}^{+\infty} \left\{ \int_{-\infty}^{+\infty} \mathcal{P}_1(\xi_4 - \tilde{\nu}_x, \eta_4, u_s) \mathcal{P}_2(\vec{\xi}_4, u_s) \exp(j\vec{v}_5\vec{\xi}_4)\, d\vec{\xi}_4 \right. \\ &\times \left. \int_{-\infty}^{+\infty} \mathcal{P}_1^*(\vec{\xi}'_4, u_s) \mathcal{P}_2^*(\vec{\xi}'_4, u_s) \exp(-j\vec{\xi}'_4\vec{v}_5)\, d\vec{\xi}'_4 \right\} D_2(\vec{v}_5)\, d\vec{v}_5, \end{aligned} \tag{3.14}$$

où $\vec{\xi}'_4 = (\xi'_4, \eta'_4)$ sont des variables d'intégration muettes.

$$\vec{v}_5 = \begin{pmatrix} v_{x5} \\ v_{y5} \end{pmatrix} = k \sin(\alpha) M_1 \begin{pmatrix} x_5 \\ y_5 \end{pmatrix}, \tag{3.15}$$

sont les coordonnées optiques normalisées dans le plan du détecteur. Grâce à la définition de la fonction pupillaire généralisée (2.8), l'expression (3.14) est évidemment nulle si les variables d'intégration (ξ_4, η_4) sont prises en dehors de la surface Σ commune aux cercles $p_1(\xi_4 - \tilde{\nu}_x, \eta_4)$ et $p_2(\xi_4, \eta_4)$ comme cela est illustré par la figure 3.4.

La raison d'être physique de Σ est facile à expliquer. En effet, si un réseau d'amplitude sinusoïdal est éclairé par un faisceau conique convergent, il donnera naissance à un faisceau conique réfléchi, assimilé à la diffraction d'ordre zéro, et à deux cônes symétriques d'ordre $+1$ et -1. Ce sont ces cônes diffractés d'ordre supérieur qui véhiculent l'information relative à la structure du réseau, ce qui revient à dire que seule la section utile Σ de ces cônes, au niveau du collecteur, de pupille p_2, contribue à imager le réseau. Sur la figure 3.4, p_2 est assimilée au collecteur et p_1 à la base du cône diffracté d'ordre $+1$. Celui d'ordre -1 lui est évidemment symétrique par rapport à η_4 et comme sa contribution est exactement la même, il suffit d'en considérer un seul et de multiplier les résultats par deux. Une autre conséquence est que plus le réseau est fin, et donc $\tilde{\nu}_x$ grand, et plus l'angle de diffraction des cônes d'ordre $+1$ et -1 augmente. Cela signifie qu'il existe une limite supérieure $\tilde{\nu}_{xMax}$, à partir de laquelle les cônes diffractés n'interceptent plus la pupille p_2 et il est donc impossible de former une image du réseau. On dit que ce dernier n'est pas résolu. D'après la figure 3.4, cette limite est:

$$\tilde{\nu}_{xMax} = 2, \tag{3.16}$$

ce qui donne comme résolution latérale absolue:

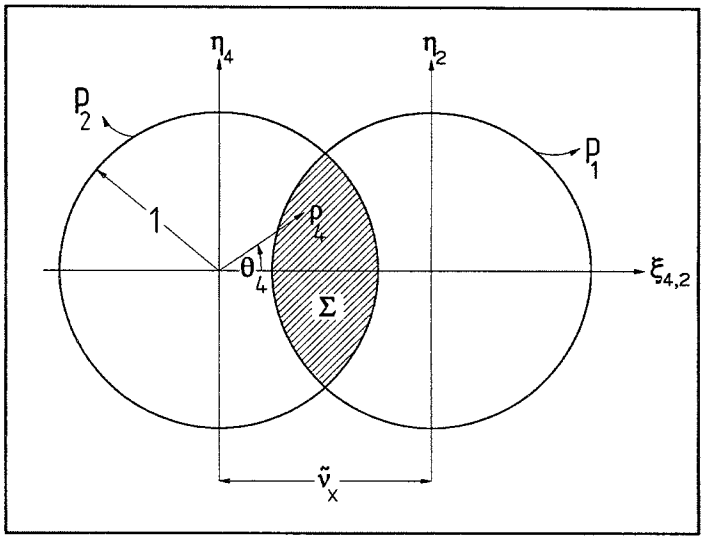

Figure 3.4: Domaine d'intégration pour le calcul de la FTOPC.

$$\boxed{\Delta x = \frac{1}{\nu_{xMax}} = \frac{\lambda}{2\sin(\alpha)},} \tag{3.17}$$

qui est la résolution d'Abbe, un résultat bien connu qui serait également valable pour Δy si le réseau était orienté dans une direction perpendiculaire à sa situation actuelle. Cette résolution représente une limite supérieure absolue qu'il n'est pas possible d'outrepasser en ajustant les tailles de la source ou du détecteur comme cela semble être admis par ailleurs. Il suffit maintenant de passer en coordonnées polaires pour que (3.14) devienne:

$$\boxed{\begin{aligned} C(\tilde{\nu}_x, u_s) &= C_1^{te} \exp(-ju_s\tilde{\nu}_x^2/2) \int_0^{v_d} \left[\iint_\Sigma \exp(-ju_s\rho_4^2) \exp[ju_s\rho_4\tilde{\nu}_x \cos(\theta_4)] \right. \\ &\times \left. J_0(v_5\rho_4)\rho_4\, d\rho_4 d\theta_4 \right] \times \left[\int_0^1 \exp(ju_s\rho_4'^2) J_0(v_5\rho_4')\rho_4'\, d\rho_4' \right] v_5\, dv_5, \end{aligned}} \tag{3.18}$$

où $v_d = k\sin(\alpha)M_1R_d$ est la taille en coordonnées optiques généralisées du détecteur, J_0 la fonction de Bessel de première espèce et d'ordre zéro [37]. Il est aisé d'intégrer (3.18) par rapport à v_5 [37]. L'expression analytique se complique et elle n'est pas reproduite ici mais elle est très utile pour accélérer le calcul numérique de C. La figure 3.5 représente la

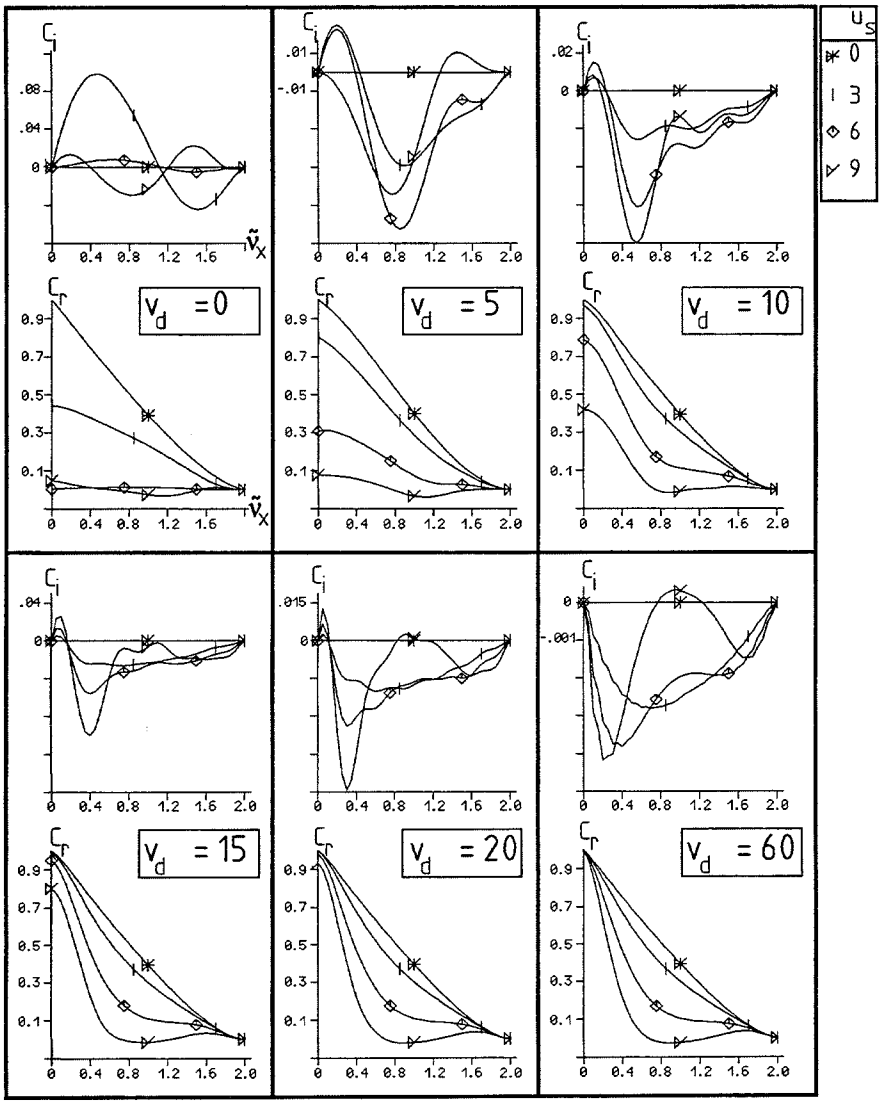

Figure 3.5: FTOPC bidimensionnelles pour différentes tailles v_d du détecteur.

FTOPC bidimensionnelle défocalisée pour différentes tailles du détecteur. C_i est sa partie imaginaire et C_r sa partie réelle. Pour le cas où le détecteur tend vers une valeur très faible ($v_d = 0$), la FTOPC est exactement la même que celle de la figure 3.2. C'est également vrai si le détecteur devient grand ($v_d = 60$): La partie réelle est identique à la FTOPC de la figure 3.3. La partie imaginaire devrait être identiquement nulle ce qui est presque le cas puisqu'elle est relativement petite et que pour des valeurs de v_d plus grandes, elle décroit encore. On constate que pour des tailles intermédiaires de v_d, la partie réelle passe du cas $v_d = 0$ au cas $v_d \to \infty$ de manière continuelle et que le sectionnement optique chute de manière importante dès $v_d \geq 5$.

3.5 La fonction de transfert optique 3D

Nous avons pu étudier le MCBL grâce à sa fonction de transfert défocalisée. Remarquons quand même qu'il est laborieux d'étudier ne serait-ce que l'influence de la taille du détecteur sur la qualité de la formation d'images, sans même évoquer le rôle de la source. Ceci est dû à deux facteurs principaux. D'une part les temps de calcul très longs pour évaluer précisemment une intégrale triple de fonctions oscillant rapidement (3.18), et d'autre part l'impossibilité de formuler un critère de qualité objectif pour apprécier la dégradation d'une image sous l'influence simultanée de v_s, v_d et u_s. Nous allons voir que les choses sont très différentes si le système est décrit par sa FTO–3D. Reprenons à cet effet l'expression (3.13) et cherchons à dériver le spectre tridimensionnel de l'image:

$$\begin{aligned} \mathcal{L}(\tilde{\nu}_x, \tilde{\nu}_y, \tilde{\mu}) &= \mathcal{F}_3\left[L(v_{xs}, v_{ys}, u_s)\right] && (3.19) \\ &= \delta(\tilde{\nu}_x)\delta(\tilde{\nu}_y)1(\tilde{\mu})\Lambda(0,\tilde{\mu}) + 2b\,\delta(\tilde{\nu}_y)\mathcal{F}_1\left[\cos(v_{xs}\tilde{\nu}_x)\right]1(\tilde{\mu})\Lambda(\tilde{\nu}_x,\tilde{\mu}), && (3.20) \end{aligned}$$

$\mathcal{F}_i$ est la transformée de Fourier i–dimensionnelle. $\mathcal{L}$ est donc la transformée 3D de l'intensité intégrée L. $\tilde{\mu}$ est la variable normalisée conjuguée de u_s et

$$\tilde{\mu} = \frac{\mu\lambda}{\sin^2(\alpha)}. \tag{3.21}$$

Λ est la transformée de Fourier de $\mathcal{C}$ selon u_s. Si l'on soustrait alors le terme spectral réflectif $\delta(\tilde{\nu}_x)\delta(\tilde{\nu}_y)1(\tilde{\mu})\Lambda(0,\tilde{\mu})$ du spectre de l'image, ce qui est simple vu que $\Lambda(0,\tilde{\mu})$ ne dépend que de l'optique et non de l'objet et que, on le verra par la suite, $\Lambda(0,\tilde{\mu})$ est facilement calculable, le résultat est que le spectre de l'image ainsi corrigée est égal à $\Lambda(\tilde{\nu}_x,\tilde{\mu})$ que multiplie la transformée de Fourier tridimensionnelle de l'objet. $\Lambda(\tilde{\nu}_x,\tilde{\mu})$ ne représente donc rien d'autre que la FTO–3D du système optique. Pour obtenir (3.20), il a été nécessaire de supposer b réel. La transformée de Fourier de la partie réelle de $\mathcal{C}$ est alors égale à la transformée Λ de $\mathcal{C}$ puisque Λ est réelle et paire en $\tilde{\mu}$. Mais cela sera précisé par la suite. Commençons donc par calculer $\mathcal{C}$ pour le cas général d'un MCBL ayant une source et un détecteur de dimensions respectives v_s et v_d. L'équation (3.8) s'écrit dans le cas d'un réseau sinusoïdal faiblement diffractif:

$$C(\tilde{\nu}_x, 0; 0, 0; u_s) = C(\tilde{\nu}_x, u_s) = \int_{-\infty}^{+\infty} c(\tilde{\nu}_x, u_s, \vec{v}_5) c^*(0, u_s, \vec{v}_5) D_2(\vec{v}_5)\, d\vec{v}_5. \tag{3.22}$$

On cherche tout d'abord à simplifier la fonction de transfert cohérente conjuguée:

$$\begin{aligned} c^*(0, u_s, \vec{v}_5) &= C_2^{te} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \left\{ \int_{-\infty}^{+\infty} S_2(\vec{v}_1') \exp(-j\vec{v}_1'\vec{\xi}_2')\, d\vec{v}_1' \right\} \\ &\times \left\{ \int_{-\infty}^{+\infty} \exp[j\vec{v}_3'(\vec{\xi}_2' + \vec{\xi}_4')]\, d\vec{v}_3' \right\} \\ &\times p_1(\vec{\xi}_2') p_2(\vec{\xi}_4') \exp\left[j\frac{u_s}{2}(||\vec{\xi}_2'||^2 + ||\vec{\xi}_4'||^2) \right] \\ &\times \exp(-j\vec{v}_5\vec{\xi}_4')\, d\vec{\xi}_2' d\vec{\xi}_4'. \end{aligned} \tag{3.23}$$

Les premières accolades englobent la transformée de Fourier bidimensionnelle de la source et le résultat est donc égal à $v_s J_1(v_s\rho_2')/\rho_2'$ où J_1 est la fonction de Bessel de première espèce d'ordre un. L'intégrale à l'intérieur de la seconde accolade est à une constante près $\delta(\vec{\xi}_2' + \vec{\xi}_4')$ ce qui signifie que nous pouvons intégrer facilement selon $\vec{\xi}_4'$ dans le reste de l'expression (3.23). Une fois que le tout est exprimé en coordonnées polaires (v_5, θ_5) ainsi que (ρ_2', θ_2') et intégré selon θ_2' de 0 à 2π, le résultat analytique final est:

$$c^*(0, u_s, v_5) = C_3^{te} \int_0^1 \exp(ju_s\rho_2'^2) J_1(v_s\rho_2') J_0(v_5\rho_2')\, d\rho_2', \tag{3.24}$$

ce qui est beaucoup plus simple que (3.23). Le sort de c est règlé de manière similaire:

$$\begin{aligned} c(\tilde{\nu}_x, u_s, \vec{v}_5) &= C_4^{te} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \left\{ \int_{-\infty}^{+\infty} S_2(\vec{v}_1) \exp(j\vec{v}_1\vec{\xi}_2)\, d\vec{v}_1 \right\} \\ &\times \left\{ \int_{-\infty}^{+\infty} \exp[-j\vec{v}_3(\vec{\xi}_2 + \vec{\xi}_4)] \exp(-jv_{x3}\tilde{\nu}_x)\, d\vec{v}_3 \right\} \\ &\times p_1(\vec{\xi}_2) p_2(\vec{\xi}_4) \exp\left[j\frac{u_s}{2}(||\vec{\xi}_2||^2 + ||\vec{\xi}_4||^2) \right] \\ &\times \exp(-j\vec{v}_5\vec{\xi}_4)\, d\vec{\xi}_2 d\vec{\xi}_4. \end{aligned} \tag{3.25}$$

La première accolade est semblable à celle de (3.23). La seconde a pour résultat $\delta(\xi_2 + \xi_4 + \tilde{\nu}_x, \eta_2 + \eta_4)$ et l'intégration selon $\vec{\xi}_4$ conduit à un résultat légèrement différent. Remarquons que la fonction pupillaire p_2 est une fonction de $\vec{\xi}_4$ et par conséquence, l'emploi de δ va conduire à $p_2(\xi_2 + \tilde{\nu}_x, \eta_2) p_1(\xi_2, \eta_2)$. Encore une fois, c n'est pas identiquement nul, seulement si le couple (ξ_2, η_2) est pris dans le domaine (Σ) de la figure 3.4:

$$\begin{aligned} c(\tilde{\nu}_x, u_s, v_5, \theta_5) &= C_5^{te} \iint_\Sigma \exp\left[-ju_s \left(\rho_2^2 + \frac{\tilde{\nu}_x^2}{2} + \rho_2\tilde{\nu}_x \cos\theta_2 \right) \right] \\ &\times \exp\{-jv_5[\rho_2 \cos(\theta_5 - \theta_2) + \tilde{\nu}_x \cos\theta_5]\} J_1(v_s\rho_2)\, d\rho_2 d\theta_2. \end{aligned} \tag{3.26}$$

Dans un second temps, introduisons (3.24) et (3.26) dans (3.8). Après intégration selon θ_5, la FTOPC défocalisée est:

$$\begin{aligned} C(\tilde{\nu}_x, u_s) &= C_6^{te} \int_0^{v_d} \left\{ \iint_\Sigma \exp\left[-ju_s\left(\rho_2^2 + \frac{\tilde{\nu}_x}{2} + \rho_2\tilde{\nu}_x\cos\theta_2\right)\right] J_1(v_s\rho_2) \right. \\ &\times \left. J_0(v_5\sqrt{\tilde{\nu}_x^2 + \rho_2^2 + 2\rho_2\tilde{\nu}_x\cos\theta_2})\, d\rho_2 d\theta_2 \right\} \\ &\times \left\{ \int_0^1 \exp(ju_s\rho_2'^2) J_0(v_5\rho_2') J_1(v_s\rho_2')\, d\rho_2' \right\} v_5\, dv_5. \end{aligned} \tag{3.27}$$

Conformément à l'équation (3.20), la FTO-3D est obtenue grâce à une transformée de Fourier selon u_s. Etant donné que toutes les expressions de (3.27) en u_s sont des termes de phase, la transformée de Fourier ne va pas alourdir les expressions, au contraire, puisque la transformée d'un terme de phase est une distribution de Dirac:

$$\Lambda(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} C(\tilde{\nu}_x, u_s) \exp(-ju_s\tilde{\mu})\, du_s \tag{3.28}$$

$$\begin{aligned} &= C_7^{te} \iint_\Sigma \left\{ \int_0^{v_d} J_1(v_s\rho_2) J_0(v_5\sqrt{\tilde{\nu}_x^2 + \rho_2^2 + 2\rho_2\tilde{\nu}_x\cos\theta_2}) \right. \\ &\times \left[\int_0^1 J_1(v_s\rho_2') J_0(v_5\rho_2')\, \delta\left[\rho_2'^2 - \left(\rho_2^2 + \frac{\tilde{\nu}_x^2}{2} + \tilde{\mu} + \rho_2\tilde{\nu}_x\cos\theta_2\right)\right] d\rho_2' \right] \\ &\times \left. v_5\, dv_5 \right\} d\rho_2 d\theta_2, \end{aligned} \tag{3.29}$$

où à nouveau, grâce à δ, l'intégrale entre crochets vaut analytiquement:

$$I_{\rho_2'} = \varepsilon \frac{J_1(v_s\alpha_1) J_0(v_5\alpha_1)}{2\alpha_1}, \tag{3.30}$$

avec

$$\alpha_1^2 = \rho_2^2 + \frac{\tilde{\nu}_x^2}{2} + \tilde{\mu} + \rho_2\tilde{\nu}_x\cos\theta_2 \tag{3.31}$$

et

$$\varepsilon = \begin{cases} 0.5 & \text{si} \quad \alpha_1 = 0 \quad \text{ou} \quad 1 \\ 0 & \text{si} \quad \alpha_1 > 1. \\ 1 & \text{si} \quad 0 < \alpha_1 < 1 \end{cases} \tag{3.32}$$

On aboutit alors à:

$$\begin{aligned}\Lambda(\tilde{\nu}_x,\tilde{\mu}) &= C_8^{te}\iint_\Sigma \frac{\varepsilon}{2}\frac{J_1(v_s\alpha_1)J_1(v_s\rho_2)}{\alpha_1}\\ &\times \left\{\int_0^{v_d} J_0(v_5\alpha_1)J_0(v_5\alpha_2)v_5\,dv_5\right\}d\rho_2 d\theta_2,\end{aligned} \tag{3.33}$$

avec

$$\alpha_2^2 = \tilde{\nu}_x^2 + \rho_2^2 + 2\rho_2\tilde{\nu}_x\cos\theta_2. \tag{3.34}$$

L'intégrale entre accolades possède une expression analytique [37] et vaut:

$$Y(v_d,\alpha_1,\alpha_2) = \begin{cases} \frac{v_d}{\alpha_1^2-\alpha_2^2}\left[\alpha_1 J_1(v_d\alpha_1)J_0(v_d\alpha_2) - \alpha_2 J_0(v_d\alpha_1)J_1(v_d\alpha_2)\right] & \text{si} \quad \alpha_1 \neq \alpha_2 \\ \frac{v_d^2}{2}\left[J_0^2(v_d\alpha_1) + J_1^2(v_d\alpha_1)\right] & \text{sinon.}\end{cases} \tag{3.35}$$

Avant d'aller encore plus loin, il convient d'analyser plus clairement le rôle de l'équation (3.32). Pour cela, plaçons nous dans un système de coordonnées cartésiennes de telle manière à ce que l'origine soit placée au centre du domaine d'intégration Σ de la figure 3.4:

$$\begin{aligned}\rho_2\cos\theta_2 &= \xi_2 &&= \xi - \tilde{\nu}_x/2,\\ \rho_2\sin\theta_2 &= \eta_2 &&= \eta.\end{aligned} \tag{3.36}$$

D'autre part, d'après la définition de ε, la FTO-3D est toujours identiquement nulle, quelles que soient les tailles respectives de la source et du détecteur, si $\alpha_1 > 1$. Cette condition est très importante étant donné quelle va encore restreindre le domaine d'intégration. En effet la condition $\alpha_1^2 \leq 1$ impose:

$$\xi^2 + \eta^2 \leq 1 - \left(\frac{\tilde{\nu}_x}{2}\right)^2 - \tilde{\mu}, \tag{3.37}$$

si

$$1 - \left(\frac{\tilde{\nu}_x}{2}\right)^2 - \tilde{\mu} \geq 0. \tag{3.38}$$

La dernière condition limite le domaine des fréquences spatiales transmises par le système au domaine ombré de la figure 3.6.

Ce domaine est bordé par deux paraboles d'équation $\tilde{\nu}_x = \pm 2\sqrt{1-|\tilde{\mu}|}$. Et nous pouvons reformuler le fait que la résolution latérale maximale soit de $\tilde{\nu}_x = 2$ au cas plus général du MCBL avec des tailles de source et de détecteur quelconques. Nouveau par contre, est le fait que la résolution longitudinale est limitée à $\tilde{\mu}_{Max}$ ce qui revient à:

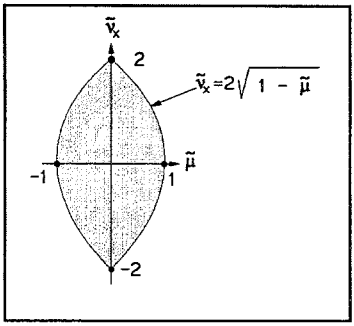

Figure 3.6: Bande passante tridimensionnelle maximale.

$$\boxed{\tilde{\mu}_{Max} = \frac{\mu_{Max}\lambda}{\sin^2(\alpha)} = 1 \Longleftrightarrow \Delta z = \frac{1}{\mu_{Max}} = \frac{\lambda}{\sin^2(\alpha)}.} \tag{3.39}$$

La condition (3.37) impose une restriction d'un tout autre ordre: Elle réduit le domaine d'intégration Σ au domaine Σ_2 de la figure 3.7 qui est le domaine commun aux deux pupilles comme cela a été montré précédemment, et au cercle défini par (3.37).

Finalement, dans le système de coordonnées cartésiennes centré sur Σ_2, l'expression de la fonction de transfert tridimensionnelle normalisée est:

$$\Omega(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}) = \frac{\Lambda(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu})}{\Lambda(0,0)} \tag{3.40}$$

$$\boxed{\Omega(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}) = \frac{\displaystyle\iint_{\Sigma_2} \varepsilon \frac{J_1(v_s\beta_0)J_1(v_s\beta_1)}{\beta_0\beta_1} Y(v_d, \beta_1, \beta_2)\, d\xi d\eta}{\pi v_d \displaystyle\int_0^1 J_1^2(v_s\rho)[J_0^2(v_d\rho) + J_1^2(v_d\rho)]\, \frac{d\rho}{\rho}}} \tag{3.41}$$

où

$$\beta_0^2 = \left(\xi - \frac{|\tilde{\nu}_x|}{2}\right)^2 + \eta^2, \tag{3.42}$$

$$\beta_1^2 = \xi^2 + \eta^2 + \left(\frac{\tilde{\nu}_x}{2}\right)^2 + |\tilde{\mu}|, \tag{3.43}$$

$$\beta_2^2 = \left(\xi + \frac{|\tilde{\nu}_x|}{2}\right)^2 + \eta^2, \tag{3.44}$$

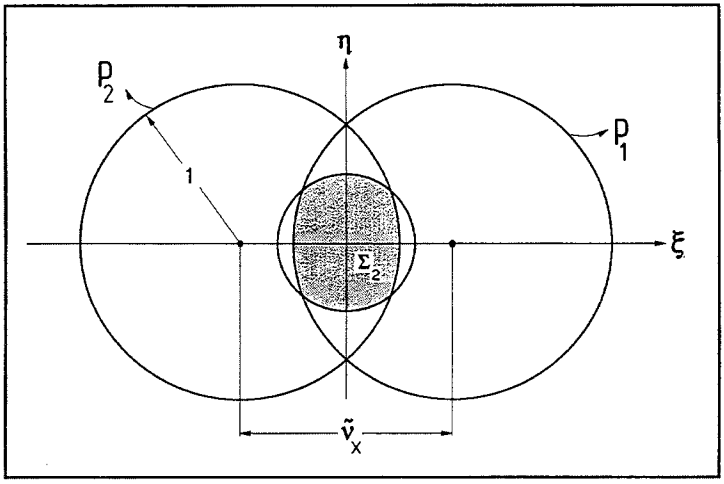

Figure 3.7: Domaine d'intégration réduit.

$$Y(v_d, \beta_1, \beta_2) = \begin{cases} \frac{v_d}{2}[J_0^2(v_d\beta_1) + J_1^2(v_d\beta_1)] & \text{si} \quad \beta_1 = \beta_2, \\ \\ \frac{1}{\tilde{\mu} - \xi\tilde{\nu}_x}[\beta_1 J_1(v_d\beta_1)J_0(v_d\beta_2) - \beta_2 J_0(v_d\beta 1)J_1(v_d\beta_2)] & \text{sinon,} \end{cases} \tag{3.45}$$

$$\varepsilon = \begin{cases} 0.5 & \text{si} \quad \beta_1 = 0 \quad \text{ou} \quad \beta_1 = 1, \\ 1 & \text{sinon.} \end{cases} \tag{3.46}$$

Il est nécessaire d'introduire les valeurs absolues de $\tilde{\mu}$ et $\tilde{\nu}_x$ ci–dessus pour que Ω soit aussi définie pour des valeurs négatives de ces variables. Ainsi que cela avait été annoncé, Ω est bien réelle et paire, ce qui justifie le passage de (3.13) à (3.20). Ce résultat peut paraître quelque peu complexe, l'équation (3.41) est pourtant simple et peut être évaluée très rapidement et précisément par simple intégration numérique. Par rapport à la FTOPC défocalisée (3.18), la FTO–3D présente trois avantages:

1. deux ordres d'intégration en moins et donc des temps de calcul très courts.
2. une bande passante limitée (figure 3.6). Dans le cas de la FTOPC défocalisée, u_s pouvait prendre n'importe quelle valeur réelle alors que $\tilde{\mu}$ est au pire confinée à l'intervalle $[-1, +1]$.
3. elle est purement réelle.

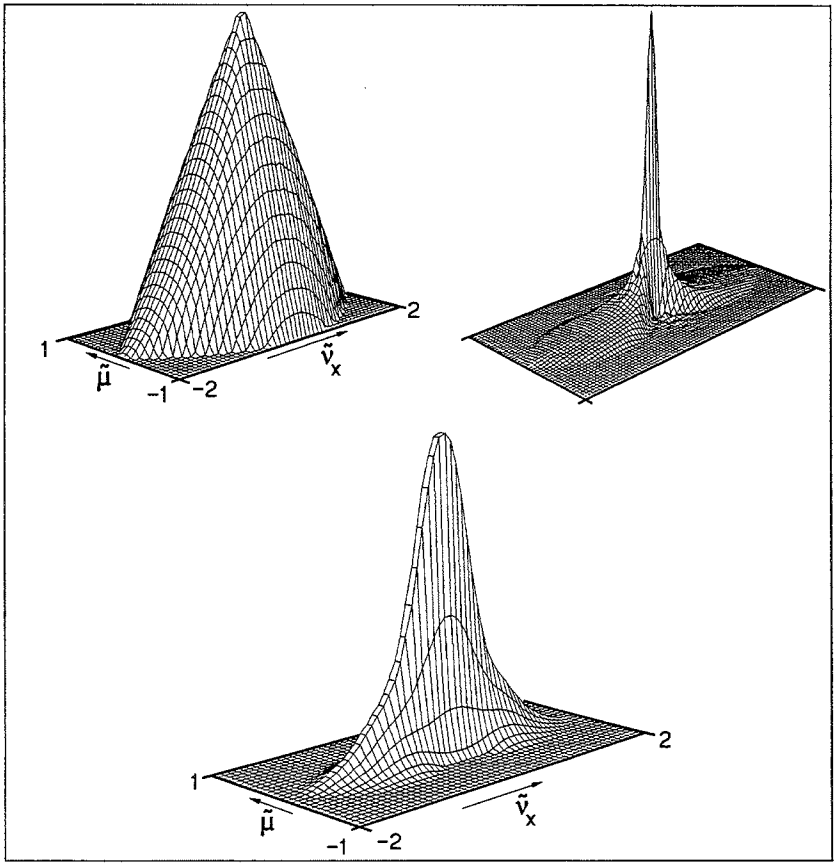

Figure 3.8: Exemples de FTO–3D.

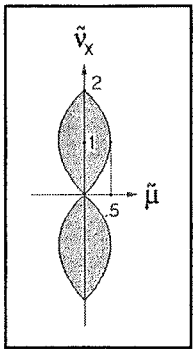

Figure 3.9: Support de la FTO–3D du microscope de type I.

Ces trois points sont vitaux pour notre analyse future. Le premier en particulier, si l'on a présent à l'esprit le fait que Ω est une fonction à deux variables $(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu})$ et deux paramètres (v_s, v_d). La figure 3.8 reproduit les FTO–3D pour trois configurations différentes. En haut à gauche se trouve la fonction de transfert pour un microscope purement confocal: $v_s = v_d = 0$. Sa FTO s'étend sur toute la superficie de la bande passante maximale de la figure 3.6. Cela signifie que c'est la configuration optimale en terme de contraste et de finesse d'image. La fonction de transfert en haut et à droite est celle d'un microscope à balayage conventionnel $(v_s = 0, v_d \rightarrow \infty)$. Le support de la fonction de transfert, autrement dit la bande passante, est représenté sur la figure 3.9.

Par rapport à la figure 3.6, il est évident que la surface de la bande maximale est beaucoup moins bien utilisée. Ce genre de microscope possède une résolution longitudinale faible, elle est au mieux égale à $\tilde{\mu}_{Max} = 0.5$, voir nulle aux basses fréquences. La forme de la FTO–3D du microscope à balayage de type I était déjà connue [38, 39] et elle est exactement la même que la FTO–3D d'un système incohérent [22]. Son expression peut être donnée de manière analytique car (3.41) se trouve réduite à:

$$\Omega_{\substack{v_s \rightarrow 0 \\ v_d \rightarrow \infty}}(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}) = \frac{1}{\pi|\tilde{\nu}_x|} \Re \sqrt{1 - \left(\frac{|\tilde{\mu}|}{|\tilde{\nu}_x|} + \frac{|\tilde{\nu}_x|}{2} \right)^2}. \tag{3.47}$$

La dérivation de ce résultat se trouve à l'annexe B. La troisième FTO-3D de la figure 3.8 est celle d'un système de paramètres $v_s = 4$ et $v_d = 10$.

3.6 La FTO–3D cohérente du microscope confocal

La fonction de transfert défocalisée est donnée par l'expression (3.22). Pour le cas du microscope confocal, $D_2(\vec{v}_5) = \delta(\vec{v}_5)$ et $S_2(\vec{v}_1) = \delta(\vec{v}_1)$, cette expression se réduit à:

$$C_{II}(\tilde{\nu}_x, u_s) = C_9^{te} c(\tilde{\nu}_x, u_s) c^*(0, u_s). \tag{3.48}$$

L'indice II distingue le microscope confocal, encore appelé ' microscope de type II '. La FTO-3D étant la transformée de Fourier longitudinale de (3.48):

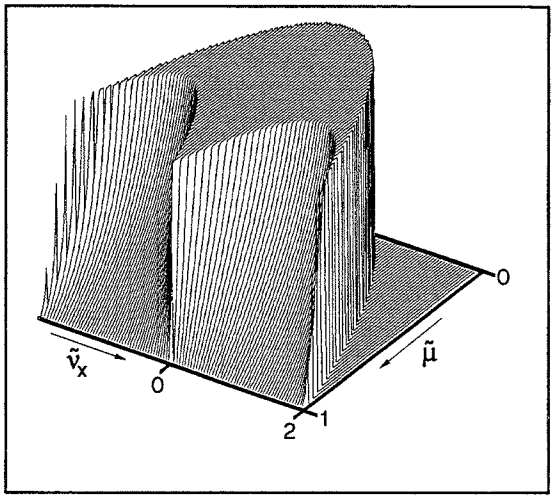

Figure 3.10: FTO-3D d'après Sheppard.

$$\Lambda_{II}(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}) = l(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}) \star l(0, \tilde{\mu}), \tag{3.49}$$

l est la transformée de Fourier de c et $\star$ est l'opération d'intercorrélation. Comme $l(0, \tilde{\mu}) = 1$ si $0 \leq \tilde{\mu} \leq 1$ et est nulle par ailleurs, la FTO-3D sera égale à:

$$\Lambda_{II}(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}) = \int_0^{1-\tilde{\mu}} l(\tilde{\nu}_x, m)\, dm, \tag{3.50}$$

m étant ici une variable muette. De manière analytique, nous obtenons la FTO-3D du microscope confocal. Le détail du calcul se trouve dans l'annexe C, et le résultat normalisé est:

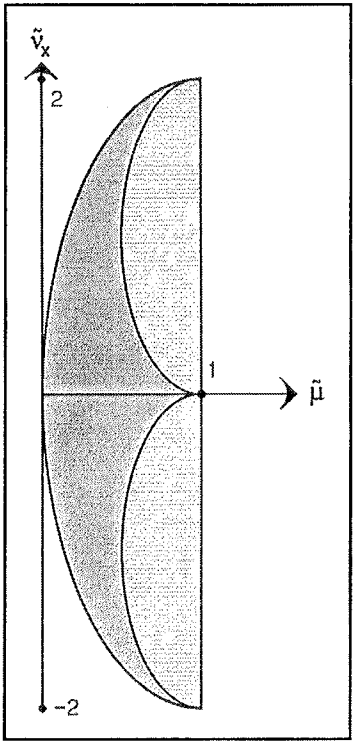

Figure 3.11: Support de la FTO-3D d'après Sheppard.

$$\Omega_{II}(\tilde{\nu}_x,\tilde{\mu}) = \begin{cases} S & \text{si} \quad 0 \leq S \leq T \\ 1+\frac{2}{\pi}\left[S\arctan\left(\frac{|\tilde{\mu}|}{R}\right)-\arccos\left(\frac{R}{|\tilde{\nu}_x|}\right)-\frac{R}{2}\right] & \text{si} \quad S > T \\ 0 & \text{sinon} \end{cases}$$

avec

$$\begin{aligned} R^2 &= \tilde{\nu}_x^2 S - \tilde{\mu}^2 \\ S &= 1-(\tilde{\nu}_x/2)^2 - |\tilde{\mu}| \\ T &= [1-(\tilde{\nu}_x/2)]^2. \end{aligned} \tag{3.51}$$

La forme de la FTO-3D a déjà été reproduite sur la figure 3.8. Cette forme est en totale contradiction avec celle obtenue par d'autres auteurs [33] et qui est reproduite sur la figure 3.10. La support de la FTO-3D d'après ces auteurs est reproduit sur la figure 3.11 et diffère totalement du support dérivé dans la section précédente (figure 3.6).

Ce fait n'est absolument pas surprenant puisque le professeur Sheppard définit une fonction de transfert cohérente qui décrit la formation d'une image cohérente sans tenir compte du rôle du détecteur. L'intensité intégrée peut en effet s'écrire, dans le cas confocal:

$$L(v_{xs},v_{ys},u_s) = \left|\int_{-\infty}^{+\infty}\int_{-\infty}^{+\infty} c(\tilde{\nu}_x,\tilde{\nu}_y,u_s)T_2(\tilde{\nu}_x,\tilde{\nu}_y)\exp[j(\tilde{\nu}_x v_{xs}+\tilde{\nu}_y v_{ys})]\,d\tilde{\nu}_x d\tilde{\nu}_y\right|^2, \tag{3.52}$$

ce qui est une manière un peu différente d'écrire (3.7), où le module au carré n'est pas développé en tant que complexe fois complexe conjugué. La structure de l'equation précédente suggère donc que $c(\tilde{\nu}_x,\tilde{\nu}_y,u_s)$ soit la fonction de transfert défocalisée entre l'objet T_2 et une distribution d'amplitude à l'endroit où est placé le détecteur ponctuel, c'est pour cela que c est nommée FTO-2D cohérente, bidimensionnelle et défocalisée. L'avantage de décrire le système par c, au lieu de $\mathcal{C}$, est qu'il n'est pas nécessaire de supposer une classe particulière d'objet pour linéariser (3.52). Les inconvénients sont que c ne possède pas de sens physique vis-à-vis de l'image et que même si elle en avait un, il se limiterait au cas du microscope confocal puisque l'expression de c ne peut intégrer l'existence d'une source et d'un détecteur de taille quelconque étant donné qu'il ne suffit plus de tenir compte de l'amplitude lumineuse en un point pour obtenir l'image, mais qu'il faut intégrer l'amplitude sur la surface de tout le détecteur. Dans notre cas, la FTOPC pour le microscope confocal est celle de l'équation (3.48). Nous pouvons montrer que c est égale à la FTO-2D défocalisée de Sheppard. En effet, sa transformée de Fourier l selon u_s est exactement identique à la FTO-3D cohérente représentée sur la figure 3.10. Le terme c^* de (3.48) tiens donc compte de la détection incohérente. L'annexe D démontre que $\omega(\tilde{\nu}_x,\tilde{\mu})$, la version normalisée de $l(\tilde{\nu}_x,\tilde{\mu})$, est exactement égale à la FTO-3D cohérente de Sheppard.

La forme de la FTO-3D du microscope confocal a été publiée pour la première fois dans la référence [23] et son expression analytique complète (3.51) dans [25]. L'expression générale en fonction de v_s et v_d (3.41) apparut dans [26].

Chapitre 4

Résolution et critère de confocalité

L'introduction évoquait le problème posé à toute personne désirant utiliser un MCBL au maximum de ses performances. La source devrait être d'une taille assez grande pour mettre en jeux un maximum de lumière, sans pour autant dégrader la résolution du système. Le détecteur doit également être de taille assez grande pour que le seul signal mesuré ne soit pas que son bruit thermique propre. Il ne devrait pas être trop grand pour ne pas diminuer la résolution et le sectionnement optique. Un compromis est donc nécessaire entre deux quantités qui varient de manière inverse l'une de l'autre. Dans ce chapitre, nous nous proposons de définir des tailles maximales pour la source et le détecteur, tailles qu'il sera donc interdit de dépasser sous peine de chute de résolution. Cette question de l'influence du détecteur sur la qualité de l'image préoccupa les spécialistes ces dernières années, bien qu'il n'y eut, hormis [23, 26], que trois publications consacrées à ce thème depuis 1987. L'intérêt est encore plus affirmé pour le MCBL utilisé en mode fluorescent puisqu'il y a pléthore de publications à ce sujet depuis 1990. Les intensités intégrées mises en jeux dans le cas fluorescent sont tellement faibles que l'usage d'un détecteur assez grand est pratiquement incontournable. Le cas du microscope fluorescent sera traité au chapitre suivant. La plupart des définitions qui seront données ici seront aussi valables pour le cas fluorescent.

Les premiers auteurs à s'intéresser à la taille du détecteur sont Wilson et Carlini [40, 41]. Ils ont considéré le cas d'un MCBL par réflexion avec une source ponctuelle et un détecteur de dimension v_d. Un miroir était translaté selon u_s sous le microscope et l'intensité intégrée avait alors une forme typique de fonction avec un maximum très prononcé à l'endroit $u_s = 0$. La largeur à mi–hauteur du maximum était alors supposé être la résolution longitudinale du microscope. Cette largeur augmente avec v_d. Wilson et Carlini trouvèrent que des valeurs de $v_d \leq 0.5$ influençaient très peu la largeur à mi hauteur et définirent donc cette valeur comme étant la taille maximale à tolérer pour conserver un sectionnement optique optimal. Cette approche souffre de plusieurs défauts graves:

- l'objet est un miroir et aucune information sur la variation relative de la résolution latérale n'est obtenue.
- le critère de la largeur à mi–hauteur est très subjectif et s'apparente au critère de Rayleigh pour la résolution de deux points, la différence étant que dans le cas

longitudinal, ce critère est transposé à la résolution de deux plans voisins.

- il suffit d'élever l'intensité intégrée normalisée à n'importe quelle puissance entière plus grande que l'unité pour que la largeur à mi–hauteur soit plus faible. On augmente donc ainsi la résolution de manière calculatoire ce qui prouve la grande subjectivité de ce critère.
- la source est supposée être ponctuelle.
- pour un système de faible résolution ($\sin(\alpha) = 0.5$, $M_1 = 0.05$, $\lambda = 633e - 9$), la taille critique est $R_d \leq 2\mu m$, ce qui est trop petit.

Dabbs et Glass sont les auteurs de la troisième publication consacrée à ce sujet [42]. Le problème de connaître la taille maximale autorisée pour v_d a été nommé pour la première fois ' critère de confocalité ' dans une publication de Mai 1992 [23]. Ce nom a également été retenu de manière indépendante par d'autres auteurs [43] dans un article publié en Juin de la même année. Le problème du critère de confocalité est étudié de manière systématique dans [23] et surtout [26] qui définit un critère de confocalité objectif et rigoureux, pour la source aussi bien que pour le détecteur, et cela pour la classe d'objets définie au chapitre trois.

4.1 Le critère de résolution de Sheppard

Avant de pouvoir parler de critère de confocalité, il est nécessaire de définir un critère de résolution mieux adapté que celui de Wilson et Carlini. Un tel critère a été défini par Sheppard [44] qui le nomme ' n–line resolution criterion ' en anglais ce qui n'est pas traduisible en français. Nous lui donnerons l'appellation de critère de résolution de Sheppard, ou critère de Sheppard.

Définition 3 (Critère de résolution de Sheppard) *Le résolution est l'intervalle minimum séparant deux éléments successifs d'un réseau linéaire, tel que la fréquence spatiale la plus petite du réseau, autre que le terme constant, apparaisse dans l'image.*

Pour montrer l'intérêt du critère de Sheppard, prenons l'exemple de la figure 3.3 et de la courbe $u_s = 14$. Comme nous avions supposé que l'objet était sinusoïdal de fréquence spatiale $\tilde{\nu}_x$, $\tilde{\nu}_x$ est de toute manière l'harmonique le plus petit d'une structure linéaire de même fréquence! Cette courbe franchit l'axe $C = 0$ pour $\tilde{\nu}_x \approx 0.34$ et elle est négative au–delà. Cela signifie qu'un réseau de fréquence 0.34 n'apparaît plus dans l'image et que pour des fréquences supérieures, le contraste est inversé et l'image n'est plus conforme à l'objet. D'après le critère de Sheppard, la résolution est de 0.34 unité optique. Cette définition a l'avantage d'être également opératoire, puisque c'est ainsi que l'on peut évaluer les performances de tout système optique: en analysant l'image d'un réseau de fréquence spatiale variable. Ce critère permet aussi de comparer tous les types de microscopes entre–eux ce que ne permettait pas celui de Rayleigh par exemple qui donne des résultats totalement faux selon le degré de cohérence des deux points [28].

4.2 Critère de qualité d'un MCBL

Pour évaluer l'influence de v_s et v_d sur la qualité du transfert d'image, il faut être en mesure de quantifier cette qualité.

Une quantification possible serait le volume de la FTO–3D. En effet, l'image sera d'autant meilleure que le nombre de fréquences spatiales transmises est important, et que le contraste avec lequel elles sont imagées est grand. Il est pourtant hors de question d'intégrer Ω selon $\tilde{\nu}_x$ et $\tilde{\mu}$! Une quantification plus simple serait l'aire du support de la FTO–3D. Cette mesure est analogue à la bande passante unidimensionnelle pour les signaux temporels [45]. La figure 4.1 représente les supports des FTO–3D pour plusieurs configurations du couple (v_s, v_d). Ces supports sont définis selon le critère de Sheppard par les premiers zéros de la FTO–3D. Par rapport à la quantification par le volume, la procédure calculatoire ne se trouve pas plus allégée: il est également très long de chercher tous les couples $(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu})$ qui annullent Ω, puis de calculer la surface enfermée par le lieu des racines, que de calculer le volume de Ω. Il est par contre très instructif d'observer sur la figure 4.1, que pour une taille v_s donnée, la résolution longitudinale, pour $\tilde{\nu}_x = 0$ diminue pour des valeurs croissantes de v_d. C'est également le cas pour v_d donné et v_s variable. La résolution axiale diminue en même temps que la surface délimitée par le lieu des racines de la FTO–3D. Nous retiendrons que la résolution longitudinale selon le critère de Sheppard est un critère de qualité pour un microscope à balayage. Afin de donner un énoncé plus rigoureux à ce critère de qualité, définissons l'ensemble suivant:

$$A_{\tilde{\mu}} = \{\tilde{\mu}_i \in [0,1] \mid \Omega(0, \tilde{\mu}_i) = 0\}. \tag{4.1}$$

La résolution longitudinale selon Sheppard est alors définie comme étant:

$$\tilde{\mu}_c = min A_{\tilde{\mu}}. \tag{4.2}$$

Règle 1 (Critère de qualité) *L'image est d'autant plus fidèle à l'objet dans un microscope à balayage laser que $\tilde{\mu}_c$ est élevé. $\tilde{\mu}_c$ est un indicateur de la qualité du microscope.*

Notons aussi que la résolution latérale pour $\tilde{\mu} = 0$ est toujours égale à $\tilde{\nu}_c = 2$ et ce paramètre ne varie donc pas avec l'aire du support comme c'est le cas pour $\tilde{\mu}_c$.

4.3 Critère de confocalité

La figure 4.2 représente les courbes de niveaux de la résolution longitudinale en fonction des dimensions v_s et v_d, ces dernières variant entre 0.2 et 20.0. Pratiquement, nous avons calculé les premières racines de $\Omega(0, \tilde{\mu})$ selon les définitions (4.1) et (4.2). La résolution

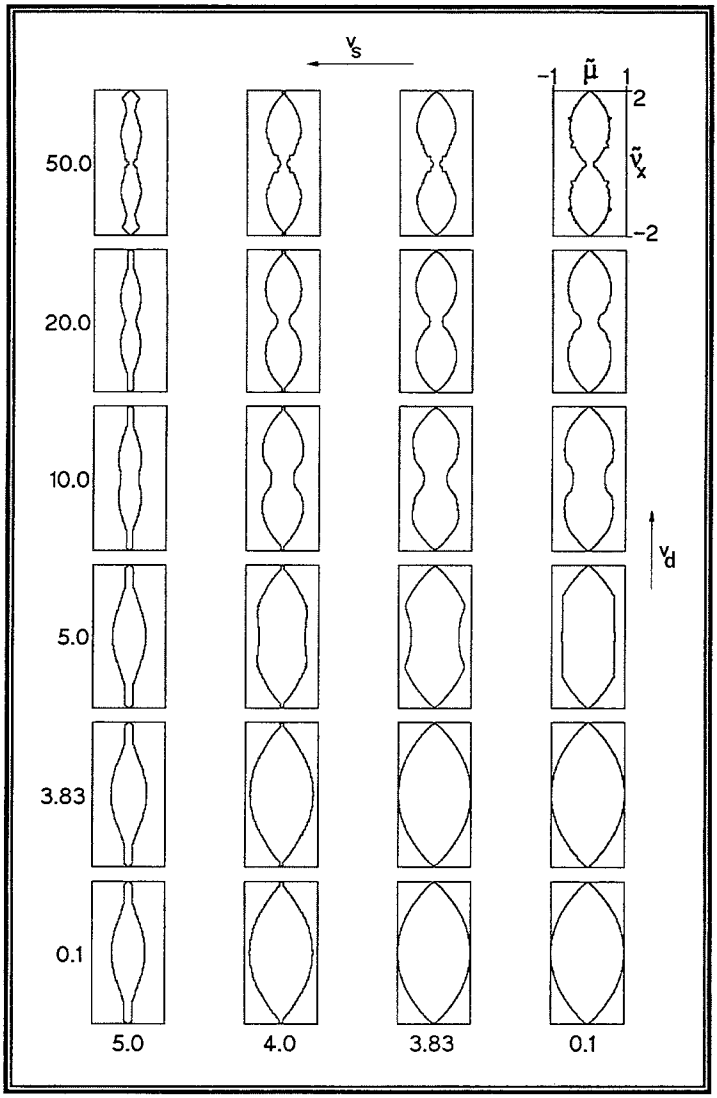

Figure 4.1: Résolution du MCBL pour différentes dimensions de la source et du détecteur.

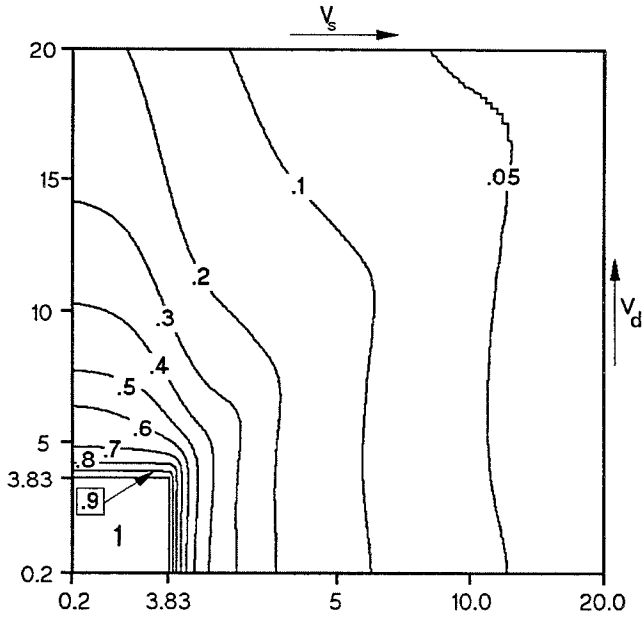

Figure 4.2: Courbes de niveaux de la résolution longitudinale selon le critère de Sheppard.

longitudinale ne dépasse pas $\tilde{\mu}_c = 1$ ce qui était prévu. Plus surprenant est le fait que cette résolution est constante et maximale jusqu'à $v_s = v_d = 3.83$.

Une autre conclusion peut être tirée du diagramme des courbes de niveaux de la résolution longitudinale: le gradient est plus prononcé selon v_s que selon v_d. Concrètement, pour le couple $(v_s = 5, v_d = 10)$ elle est de $\tilde{\mu}_c \approx 0.24$ alors que pour $(v_s = 10, v_d = 5)$ elle n'est plus que de $\tilde{\mu}_c \approx 0.13$.

La dernière remarque implique que la dimension de la source est une grandeur encore plus critique que celle du détecteur. Lors de la conception du microscope confocal à balayage, le dimensionnement de la source devrait être beaucoup plus soigné que cela n'est d'usage actuellement.

D'après ce que nous venons de voir, la résolution longitudinale est égale à la résolution maximale que nous pouvons espérer d'un microscope à balayage si $v_s \leq 3.83$ et $v_d \leq 3.83$. Ceci peut être retrouvé de manière analytique. Pour cela, considérons le cas de la résolution longitudinale puisque c'est elle qui impose une restriction à la fois à v_s et v_d.

La figure 4.3 reproduit $\Omega(0, \tilde{\mu}, v_s = 0, v_d)$ pour des valeurs (bien) choisie de v_d. Nous

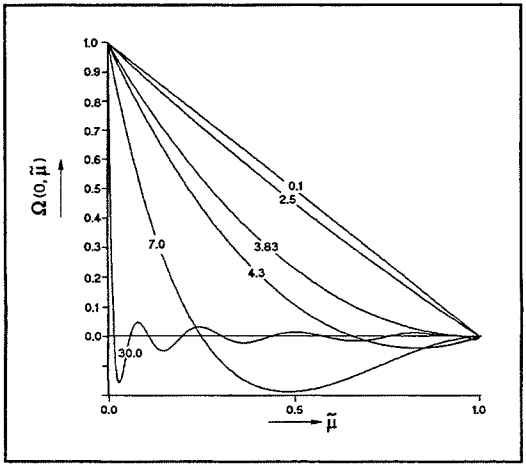

Figure 4.3: FTO longitudinales pour une source ponctuelle et diverses configuration de détecteurs.

constatons que $\tilde{\mu}_c = 1$ jusqu'à $v_d \approx 3.83$ et que au-delà, la bande passante se trouve réduite par l'apparition d'au moins une racine supplémentaire $\tilde{\mu}_i$ dans l'intervalle $]0, 1[$. La valeur limite de v_d à partir de laquelle la bande passante diminue a la particularité d'avoir une tangente horizontale au point $\tilde{\mu} = 1$ (figure 4.3). Definissons l'ensemble suivant:

$$A_v = \left\{ (v_{si}, v_{di}) | \left. \frac{\partial \Omega(0, \tilde{\mu}; v_{si}, v_{di})}{\partial \tilde{\mu}} \right|_{\tilde{\mu}=1} = 0 \right\}, \tag{4.3}$$

des couples de valeurs v_{si}, v_{di} qui admettent une tangente horizontale au point $\tilde{\mu} = 1$. Les tailles critiques maximales (v_{sc}, v_{dc}) au delà desquelles le microscope n'est plus confocal sont telles que:

$$\exists (v_{sc}, v_{dc}) \in A_v | \forall (v_{si}, v_{di}) \in A_v, v_{sc} \leq v_{si} \quad \text{and} \quad v_{dc} \leq v_{di}. \tag{4.4}$$

Le fait qu'un tel couple existe sera démontré ci-dessous mais il est mathématiquement difficile à démontrer qu'un autre élément de A_v diminue nécessairement $\tilde{\mu}_c$. Cela a néanmoins été vérifié numériquement. Pour démontrer l'existence du couple critique, posons $\tilde{\nu}_x = 0$ dans (3.41). La région d'intégration Σ_2 se réduit alors au disque de rayon $\sqrt{1 - \tilde{\mu}}$ et grâce à une symétrie radiale, il est possible d'intégrer selon l'angle dans un système de coordonnées polaires. La fonction de transfert longitudinale est donc:

$$\begin{aligned}\Omega(0,\tilde{\mu}) &= C_{10}^{te}\int_0^{\sqrt{1-\tilde{\mu}}}\Big\{J_1(v_s\sqrt{\rho^2+\tilde{\mu}})J_1(v_d\sqrt{\rho^2+\tilde{\mu}})J_1(v_s\rho)J_0(v_s\rho)\\ &- \frac{\rho}{\sqrt{\rho^2+\tilde{\mu}}}J_1(v_s\rho)J_1(v_d\rho)J_1(v_s\sqrt{\rho^2+\tilde{\mu}})J_0(v_s\sqrt{\rho^2+\tilde{\mu}})\Big\}\,d\rho. \qquad (4.5)\end{aligned}$$

En appliquant la règle de Leibniz pour la différentiation des intégrales à l'équation (4.5) [37], il est facile de montrer que les couples qui satisfont (4.3) sont tels que:

$$J_1(v_{si})J_1(v_{di}) = 0, \qquad (4.6)$$

ce sont donc les racines $j_{1,s}$ de la fonction de Bessel de première espèce et d'ordre un. J_1 possède un nombre infini de racines étant donné que c'est une fonction oscillante, mais comme d'après (4.4) nous cherchons la plus petite, c'est-à-dire $j_{1,1}$ nous en concluons qu'un microscope à balayage est confocal si:

$$v_{sc} \leq j_{1,1} \approx 3.83, \qquad (4.7)$$
$$v_{dc} \leq j_{1,1} \approx 3.83. \qquad (4.8)$$

Ceci est donc la signification mathématique du nombre 3.83 apparaissant déja au schéma 4.2. Ce nombre possède aussi une signification physique tout à fait remarquable: si la source est ponctuelle, la figure de diffraction dans le plan du détecteur est la figure de diffraction d'Airy qui est décrite par:

$$\left[2\,\frac{J_1(v_5)}{v_5}\right]^2. \qquad (4.9)$$

Cette figure de diffraction est bien connue, c'est un disque central entouré d'anneaux concentriques de minima et maxima d'intensité lumineuse, le disque central étant bordé d'une première frange noire d'un rayon de 3.83 unités optiques.

Règle 2 (Critère de confocalité) *Un microscope optique à balayage laser par réflexion est confocal si les dimensions, en unités optiques, de sa source et de son détecteur ne dépassent pas la taille du lobe central de la figure de diffraction d'un instrument d'optique parfait. A savoir* $v_s \leq j_{1,1}$ *et* $v_d \leq j_{1,1}$ *avec* $j_{1,1} \approx 3.83$.

Chapitre 5

Etude du microscope à balayage fluorescent

L'introduction évoquait le fait que c'est en mode fluorescent que le microscope confocal est le plus utilisé. Nous allons donc dériver dans ce chapitre la fonction de transfert optique tridimensionnelle du microscope à balayage fluorescent en fonction des dimensions de la source et du détecteur. A l'aide de cette FTO–3D, nous dériverons ensuite un critère de confocalité pour la source et pour le détecteur.
Il existe beaucoup de travaux concernant ce type de microscope. La manière de construire la FTO–3D pour le cas d'une source et d'un détecteur ponctuels est déjà décrite en 1989 [45]. Deux autres publications [46, 47] dérivent même la forme de la FTO–3D pour cette configuration alors que, rappelons–le, celle du MCBL cohérent n'est obtenue que trois ans plus tard [23, 26]. Les travaux de Kimura et Munakata [46] firent connaître la forme de la fonction de transfert à partir d'approximations d'une intégrale de superposition pour la diffraction. Nakamura et Kawata [47], par contre, calculent pour la première fois la forme analytique de la FTO–3D sans chercher à la simplifier. L'expression obtenue est une équation intégrale d'ordre neuf! Tout à fait intéressante est par contre la vérification expérimentale de la forme de la fonction de transfert: ils utilisèrent l'image 3D d'une cellule, obtenue par le sectionnement optique de trente–deux plans différents distants de $1\mu m$. Le spectre de Fourier de l'image correspond alors assez bien avec la FTO–3D calculée. C'est à cette même période que l'analyse est étendue au cas du microscope confocal fluorescent avec un détecteur de dimension finie. Basé sur un critère de résolution à mi–hauteur de l'intensité intégrée, l'équipe du professeur Brakenhoff exprima un premier critère de confocalité: le detecteur devait être tel que $v_d \leq 2$ [48]. Nous ne reviendrons plus sur la validité de ce genre de critère, cela a été largement discuté au quatrième chapitre. Dans une publication précédente, ils avaient déjà eu l'intuition, que nous allons confirmer ici, que v_d ne devait pas dépasser la valeur de 3.83 unités optiques [49]. A partir de 1989 et jusqu'à 1991, on compte quatre publications concernant le calcul de la FTO–3D pour le cas du détecteur non ponctuel. Les premiers a donner les formes des fonctions de transfert pour différentes valeur de v_d furent à nouveau Kimura et Munakata [50], qui fidèles à leur démarche précédente dérivent une forme approchée de cette fonction. Ils analysèrent également le cas d'un détecteur ayant la forme d'une fente [51]. Cette forme particulière

tolère un réglage moins précis du microscope et augmente la quantité de lumière détectée. Elle rompt néanmoins la symétrie du système qui ne réagit plus de la même manière pour deux structures perpendiculaires. L'équipe du professeur Nakamura [52] présente également les FTO–3D, calculées à partir d'une expression analytique exacte cette fois-ci, pour différentes valeurs de v_d. Enfin Gu et Sheppard [53] obtiennent une formule simplifiée de la FTO–3D qui accélère et améliore la précision des calculs, et le luxe n'est pas vain puisque l'expression simplifiée n'en est pas moins une intégrale d'ordre quatre! Dans la section qui suit, nous généraliserons l'étude au cas d'une source et d'un détecteur de dimensions finies. Les résultats sont publiés en anglais dans la référence [27].

5.1 La FTO–3D fluorescente

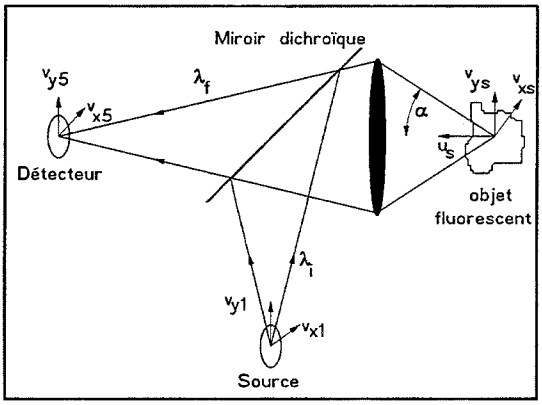

Figure 5.1: Microscope confocal à balayage fluorescent.

La figure 5.1 représente un microscope fluorescent confocal à balayage. La source de lumière, qui est toujours un laser, de longueur d'onde λ_i, est projetée au sein d'un objet qui est balayé mécaniquement en trois dimensions. Au point où le faisceau converge, l'intensité lumineuse est assez forte pour induire une fluorescence qui sera supposé être isotrope. Les radiations fluorescentes de longueur d'onde λ_f collectées par l'objectif sont refocalisées sur le détecteur à travers un miroir dichroïque qui sépare deux fréquences lumineuses différentes. La différence avec le cas du MCBL cohérent est que la lumière détectée est incohérente. Dans l'analyse qui suit nous supposerons que l'objet est volumique. Nous négligerons les diffusions multiples dans l'objet. Cette hypothèse est raisonable si le détecteur est assez petit pour sectionner assez finement l'objet. Nous négligerons l'absorption. La longueur d'onde fluorescente sera égale à celle de la lumière excitatrice: $\lambda_i = \lambda_f = \lambda$ et la fluorescence est supposée être proportionnelle à la distribution d'intensité du faisceau incident. L'objectif ne présentera pas d'aberrations optiques et

nous nous placerons dans l'approximation paraxiale pour la propagation de la lumière. La distribution d'intensité au voisinage du point $(\vec{v}_3, u_3)$ de l'objet est:

$$I_3(\vec{v}_3, u_3) = \left| \int_{-\infty}^{+\infty} S_2(\vec{v}_1) h_1(\vec{v}_3 - \vec{v}_1, u_3)\, d\vec{v}_1 \right|^2 . \tag{5.1}$$

Si $f(\vec{v}_3, u_3)$ est la distribution de substance fluorescente dans l'objet et $(\vec{v}_s, u_s)$ le point de l'objet examiné, l'intensité émise est:

$$I_s(\vec{v}_s, u_s; \vec{v}_3, u_3) = C_{11}^{te} I_3(\vec{v}_3, u_3) f(\vec{v}_s - \vec{v}_3, u_s - u_3). \tag{5.2}$$

La distribution d'intensité au voisinage du détecteur sera:

$$I_d(\vec{v}_s, u_s, \vec{v}_5) = C_{12}^{te} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} |h_2(\vec{v}_3 - \vec{v}_5, u_3)|^2 I_s(\vec{v}_s, u_s; \vec{v}_3, u_3)\, d\vec{v}_3 du_3. \tag{5.3}$$

L'intensité intégrée par le détecteur sera par conséquent:

$$\begin{aligned} L(\vec{v}_s, u_s) &= C_{13}^{te} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \left\{ \left| \int_{-\infty}^{+\infty} S_2(\vec{v}_1) h_1(\vec{v}_3 - \vec{v}_1, u_3)\, d\vec{v}_1 \right|^2 \right. \\ &\times \left. \int_{-\infty}^{+\infty} |h_2(\vec{v}_3 - \vec{v}_5, u_3)|^2 D_2(\vec{v}_5)\, d\vec{v}_5 \right\} \\ &\times f(\vec{v}_s - \vec{v}_3, u_s - u_3)\, d\vec{v}_3 du_3. \end{aligned} \tag{5.4}$$

L'expression (5.4) n'est rien d'autre que la convolution 3D de l'objet f avec la quantité:

$$|S_2(\vec{v}_s) \otimes_2 h_1(\vec{v}_s, u_s)|^2 \left[D_2(\vec{v}_s) \otimes_2 |h_2(\vec{v}_s, u_s)|^2 \right], \tag{5.5}$$

qui est donc la RI–3D du système optique. Le symbole $\otimes_2$ représente une convolution bidimensionnelle. Si la source est ponctuelle, on retrouve la RI–3D obtenue par Sheppard [53]. La fonction de transfert optique 3D du microscope est obtenue en effectuant la transformée de Fourier tridimensionnelle de l'expression (5.5):

$$\Omega_f(\tilde{\nu}_x, \tilde{\nu}_y, \tilde{\mu}) = C_{13}^{te} \left[\mathcal{F}_3 \left\{ |S_2(\vec{v}_s) \otimes_2 h_1(\vec{v}_s, u_s)|^2 \right\} \right] \otimes_3 \left[\mathcal{F}_2 \left\{ D_2(\vec{v}_s) \right\} \mathcal{F}_3 \left\{ |h_2(\vec{v}_s, u_s)|^2 \right\} \right]. \tag{5.6}$$

La transformée de Fourier de la sensibilité du détecteur est:

$$\mathcal{F}_2\{D_2(\vec{v}_s)\} = v_d \frac{J_1(\tilde{\nu} v_d)}{\tilde{\nu}} \tag{5.7}$$

avec $\tilde{\nu} = \sqrt{\tilde{\nu}_x^2 + \tilde{\nu}_y^2}$. Le facteur $\mathcal{F}_3\{|h_2(\vec{v}_s, u_s)|^2\}$ est l'expression bien connue de la fonction de transfert 3D incohérente d'une lentille idéale. Son expression a déjà été vue au chapitre trois (3.47) mais comme nous ne supposons pas encore que $\tilde{\nu}_y = 0$, elle s'exprime dans le cas général par:

$$\mathcal{F}_3\{|h(\vec{v}_s, u_s)|^2\} = \frac{1}{\tilde{\nu}}\sqrt{1 - \left(\frac{|\tilde{\mu}|}{\tilde{\nu}} + \frac{\tilde{\nu}}{2}\right)^2} \tag{5.8}$$

La première moitié de l'équation (5.6) est plus complexe et nécessite un traitement plus long. Posons:

$$U(\vec{v}_s, u_s) = S_2(\vec{v}_s) \otimes_2 h_1(\vec{v}_s, u_s) = \int_{-\infty}^{+\infty} S_2(\vec{v}_1) h_1(\vec{v}_s - \vec{v}_1, u_s)\, d\vec{v}_1, \tag{5.9}$$

où h_1 est donné par (2.13). Exprimé en coordonnées radiales normalisées (ρ_2, θ_2) de la pupille, (5.9) peut se réduire à:

$$U(\vec{v}_s, u_s) = \int_0^1 \exp\left(-j\frac{u_s}{2}\rho_2\right) J_0(\rho_2\sqrt{v_{xs}^2 + v_{ys}^2}) J_1(v_s\rho_2)\, d\rho_2 \tag{5.10}$$

Nommons Ω_1 la première moitié de (5.6). Ω_1 est donc la transformée de Fourier 3D du module au carré de (5.10), soit:

$$\begin{aligned}\Omega_1(\tilde{\nu}_x, \tilde{\nu}_y, \tilde{\mu}) &= \int_{-\infty}^{+\infty}\int_{-\infty}^{+\infty}\int_{-\infty}^{+\infty}\int_0^1\int_0^1 \exp\left[-j\frac{u_s}{2}(\rho_2^2 - \rho_2'^2)\right] J_0(\rho_2\sqrt{v_{xs}^2 + v_{ys}^2}) J_1(v_s\rho_2) \\ &\times J_0(\rho_2'\sqrt{v_{xs}^2 + v_{ys}^2}) J_1(v_s\rho_2')\, d\rho_2 d\rho_2' \\ &\times \exp(-ju_s\tilde{\mu}) \exp[-j(v_{xs}\tilde{\nu}_x + v_{ys}\tilde{\nu}_y)]\, dv_{xs} dv_{ys} du_s. \end{aligned} \tag{5.11}$$

La transformée de Fourier selon u_s conduisant à $\delta[\rho_2'^2 - (\rho_2^2 - 2\,|\tilde{\mu}|)]$, nous pouvons intégrer assez simplement suivant la variable conjuguée ρ_2'. Posons d'autre part le changement de variables suivant:

$$\begin{aligned}(v_{xs}, v_{ys}) &= (v\cos\theta, v\sin\theta) \\ (\tilde{\nu}_x, \tilde{\nu}_y) &= (\tilde{\nu}\cos\phi, \tilde{\nu}\sin\phi),\end{aligned} \tag{5.12}$$

nous obtenons après intégration suivant ϕ une expression un peu plus simple pour Ω_1:

$$\begin{aligned}\Omega_1(\tilde{\nu}_x, \tilde{\nu}_y, \tilde{\mu}) &= \int_{\sqrt{2|\tilde{\mu}|}}^1 \frac{J_1(v_s\sqrt{\rho_2^2 - 2|\tilde{\mu}|})}{\sqrt{\rho_2^2 - 2|\tilde{\mu}|}} J_1(v_s\rho_2) \\ &\times \left\{\int_0^{+\infty} J_0(v\sqrt{\rho_2^2 - 2|\tilde{\mu}|}) J_0(v\rho_2) J_0(v\tilde{\nu}) v\, dv\right\} d\rho_2.\end{aligned} \tag{5.13}$$

L'expression entre crochets admet une solution analytique [54]:

$$\frac{1}{\pi|\tilde{\nu}|\sqrt{\rho_2^2 - \left(\frac{\tilde{\nu}}{2} + \frac{|\tilde{\mu}|}{\tilde{\nu}}\right)^2}}, \tag{5.14}$$

qui permet, moyennant le changement de variable:

$$x^2 = \rho_2^2 - \left(\frac{\tilde{\nu}}{2} + \frac{|\tilde{\mu}|}{\tilde{\nu}}\right)^2, \tag{5.15}$$

d'obtenir:

$$\Omega_1(\tilde{\nu}_x, \tilde{\nu}_y, \tilde{\mu}) = \frac{1}{\tilde{\nu}} \int_0^{\sqrt{1-\left(\frac{\tilde{\nu}}{2}+\frac{|\tilde{\mu}|}{\tilde{\nu}}\right)^2}} \left\{ J_{inc}\left[v_s\sqrt{x^2 + \left(\frac{\tilde{\nu}}{2} + \frac{|\tilde{\mu}|}{\tilde{\nu}}\right)^2}\right] \times J_{inc}\left[v_s\sqrt{x^2 + \left(\frac{\tilde{\nu}}{2} - \frac{|\tilde{\mu}|}{\tilde{\nu}}\right)^2}\right] \right\} dx, \tag{5.16}$$

où $J_{inc}(v_s x) = J_1(v_s x)/x$. Si nous nommons Ω_2 le produit de (5.7) par (5.8), cette fonction existe seulement si les variables $\tilde{\nu}_x, \tilde{\nu}_y, \tilde{\mu}$ apartiennent au domaine de définition de l'expression (5.8). Un tel domaine est un volume qui peut être engendré sur la figure 5.2 par la surface Π_1 si cette dernière tourne autour de son axe de symétrie horizontal. De même, l'expression finale de Ω_1(5.16), existe si et seulement si la borne supérieure de l'intégrale existe. Ce qui signifie que Ω_1 existe seulement si nous prenons les variables $\tilde{\nu}_x, \tilde{\nu}_y, \tilde{\mu}$ à l'intérieur du volume qui vient d'être défini. Comme la fonction de transfert optique tridimensionnelle est égale à la convolution 3D de Ω_1 et Ω_2 (5.6), les variables muettes $\tilde{n}_x, \tilde{n}_y, \tilde{m}$ de la convolution seront prises dans le volume commun engendré par la révolution des surfaces Π_1 et Π_2 autour de leur axe de symmétrie.

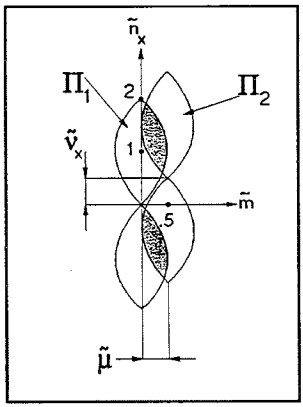

Figure 5.2: Domaine d'intégration de la FTO-3D du microscope confocal fluorescent.

Comme au chapitre trois, la construction du volume d'intégration a une incidence directe sur la résolution maximale du microscope. Si les deux surfaces de la figure 5.2

sont séparées de $\tilde{\nu}_x > 4$, $\tilde{\nu}_y > 4$ ou $\tilde{\mu} > 1$ il n'y a plus aucun recouvrement et la fonction de transfert est identiquement nulle. Nous en concluons que

$$\boxed{\tilde{\nu}_{xMax} = \tilde{\nu}_{yMax} = 4, \quad \tilde{\mu}_{Max} = 1.} \tag{5.17}$$

La bande passante latérale maximale est deux fois plus grande que celle du microscope confocal cohérent. C'est un des points forts du microscope confocal fluorescent qui est très utilisé en biologie, à cause de sa résolution exceptionnelle. La fonction de transfert optique tridimensionnelle du microscope confocal à balayage fluorescent est finalement égale à:

$$\begin{aligned}
\Omega_f(\tilde{\nu}_x, \tilde{\nu}_y, \tilde{\mu}) &= \iiint_V \frac{J_1(l_1 v_d)}{l_1^2} \sqrt{1 - \left(\frac{l_1}{2} + \frac{|\tilde{\mu} - \tilde{m}|}{l_1}\right)^2} \\
&\times \ \Omega_1(\tilde{n}_x, \tilde{n}_y, \tilde{m})\, d\tilde{n}_x d\tilde{n}_y d\tilde{m} && (5.18)\\
\textit{avec} & \\
\Omega_1(\tilde{n}_x, \tilde{n}_y, \tilde{m}) &= \int_0^{\sqrt{1-\beta^2}} \frac{J_1(v_s\sqrt{\rho^2+\alpha^2})}{l_2\sqrt{\rho^2+\alpha^2}} \frac{J_1(v_s\sqrt{\rho^2+\beta^2})}{\sqrt{\rho^2+\beta^2}}\, d\rho && (5.19)\\
\textit{et} & \\
l_1 &= \sqrt{(\tilde{\nu}_x - \tilde{n}_x)^2 + (\tilde{\nu}_y - \tilde{n}_y)^2} && (5.20)\\
l_2 &= \sqrt{\tilde{n}_x^2 + \tilde{n}_x^2} && (5.21)\\
\alpha &= \frac{l_2}{2} - \frac{|\tilde{m}|}{l_2} && (5.22)\\
\beta &= \frac{l_2}{2} + \frac{|\tilde{m}|}{l_2} && (5.23)
\end{aligned}$$

V est le volume d'intégration défini précédemment. La fonction de transfert fluorescente est beaucoup plus complexe à évaluer numériquement que la FTO-3D cohérente (3.41). Elle a l'avantage de pouvoir s'appliquer à une classe plus vaste d'objets. Ces derniers peuvent être des objets de volume et pas nécessairement faiblement diffractants comme pour le cas cohérent. Enfin, il n'a pas été nécessaire de linéariser quoi que ce soit, la formation d'image s'exprimant par une convolution 3D (5.4). Par rapport à la FTO-3D fluorescente pour des dimensions variables du détecteur, calculée par Sheppard [53], l'expression que nous avons obtenue, et qui elle est valable pour des tailles quelconques de la source et du détecteur, n'est ni plus complexe, ni plus longue à évaluer numériquement. Comme nous avons supposé que l'objectif était parfait, Ω_f possède une symétrie cylindrique et il suffira de calculer $\Omega_f(\tilde{\nu}_x, 0, \tilde{\mu})$ pour se faire une idée de la forme générale de la FTO–3D.

Ces formes sont illustrées par les figures 5.3 et 5.4. Le cas purement confocal, $v_s = v_d \approx 0$, correspond tout à fait à ce qui est déjà connu depuis 1989 [46, 47, 50, 52, 53]. Le cas

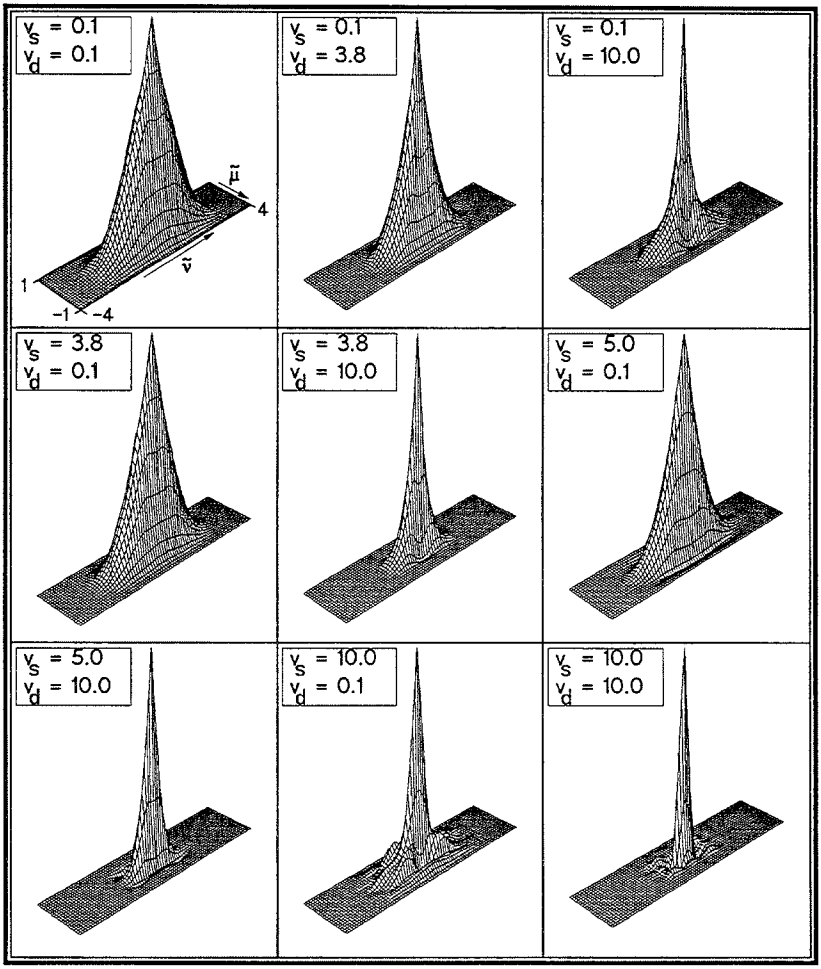

Figure 5.3: FTO–3D pour différentes dimensions de la source et du détecteur.

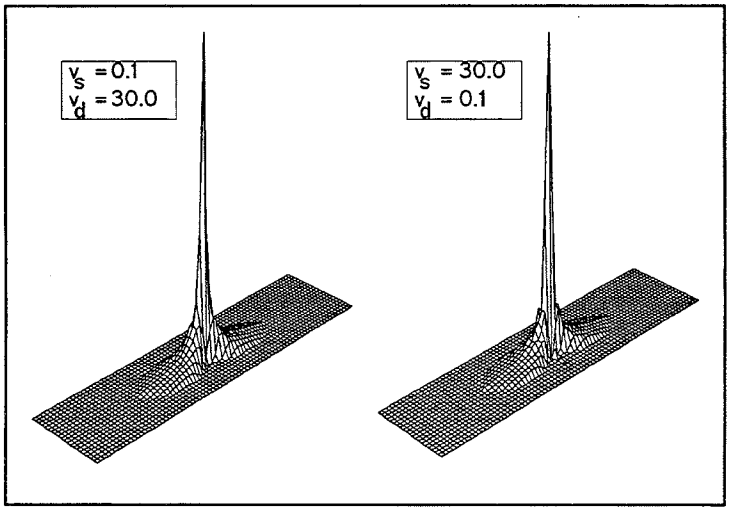

Figure 5.4: FTO–3D pour des dimensions extrêmes de la source ou du détecteur.

d'une source ponctuelle et d'un détecteur très grand est également conforme aux résultats précédents [50, 52]. Il est assez curieux de remarquer que les FTO–3D du microscope de type I et du microscope fluorescent sont identiques. Deux autres fonctions de transfert sont calculées pour le cas d'une source ponctuelle pour montrer les concordances avec d'autres travaux. Ce sont les cas $v_d = 3.8$ dont il faut comparer la FTO–3D avec celle tirée de [52], et $v_d = 10$ qui est à comparer à [50, 53]. Nous avons également calculé quelques fonctions de transfert pour des sources de dimensions non nulles. Tous ces cas sont également présenté sur les figures 5.3 et 5.4. Soulignons encore le fait que si v_s et v_d tendent tous deux à augmenter, la FTO–3D a tendance à devenir très étroite et à la limite, consiste en un pic à l'origine: cas $v_s = v_d = 10$; l'objet n'est plus imagé du tout.

5.2 Critère de confocalité

Nous allons suivre la même procédure qu'au chapitre quatre pour essayer de donner une valeur supérieure aux dimensions de la source et du détecteur. Pour cela, nous allons calculer, conformément au critère de résolution de Sheppard, les premiers zéros de la fonction de transfert longitudinale du microscope à balayage confocal. Si nous posons $\tilde{\nu}_x = \tilde{\nu}_y = 0$ dans le système d'équations (5.18) à (5.23), et si nous opérons le changement de variables $\tilde{n} = \sqrt{\tilde{n}_x^2 + \tilde{n}_y^2}$, avec $\tilde{n}_x = \tilde{n}\cos\vartheta$ et $\tilde{n}_y = \tilde{n}\sin\vartheta$, la FTO–3D se réduit à une forme qui est un peu plus conviviale pour un ordinateur:

$$\Omega_f(0,0,\tilde{\mu}) = \int_{-2}^{+2}\int_{\tilde{\mu}-\tilde{n}+\frac{\tilde{n}^2}{2}}^{\tilde{n}-\frac{\tilde{n}^2}{2}}\int_0^{\sqrt{1-\beta^2}} \frac{J_1(v_s\sqrt{\rho^2+\alpha^2})}{\sqrt{\rho^2+\alpha^2}}\frac{J_1(v_s\sqrt{\rho^2+\beta^2})}{\sqrt{\rho^2+\beta^2}}\,d\rho$$
$$\times \frac{J_1(\tilde{n}\,v_d)}{\tilde{n}^2}\sqrt{1-\left(\frac{\tilde{n}}{2}+\frac{|\tilde{\mu}-\tilde{m}|}{\tilde{n}}\right)^2}\,d\tilde{m}d\tilde{n}. \tag{5.24}$$

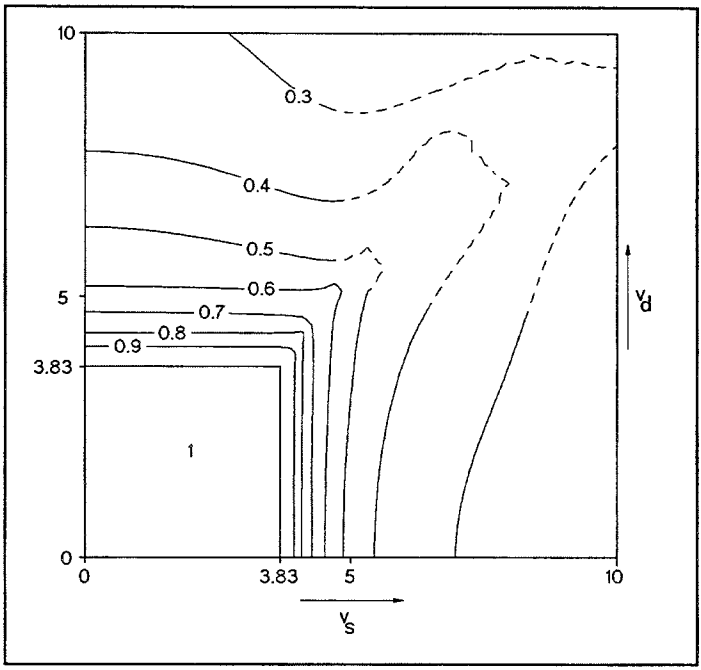

Figure 5.5: Courbes de niveaux de la résolution de Sheppard longitudinale pour le microscope à balayage fluorescent.

La figure 5.5 montre les courbes de niveaux de la résolution longitudinale pour des dimensions de la source et du détecteur allant jusqu'à dix. Les parties des courbes, dans la zone $v_s, v_d > 5$, sont hachurées. Cela provient du fait que le long de la diagonale, c'est-à-dire pour des valeurs voisines de v_s et v_d, la fonction de transfert possède une racine double: elle est tangente à l'axe $\Omega_f = 0$. Déterminer une position assez précise d'une racine double, étant donné la complexité de (5.24) est impossible et les données sont faussées. Ce domaine des courbes de niveaux est a prendre avec beaucoup de précautions et il a été

hachuré. Pour les valeurs plus faibles de v_s et v_d, les mêmes conclusions s'imposent qu'au chapitre précédent. D'une part, le gradient sur la figure 5.5 est plus fort dans la direction de v_s que dans celle de v_d, ce qui signifie que la résolution est plus influencée par la taille de la source que par celle du détecteur, et d'autre part:

Règle 3 (Critère de confocalité)
Un microscope optique fluorescent à balayage laser par réflexion est confocal si les dimensions, en unités optiques, de sa source et de son détecteur ne dépassent pas la taille du lobe central de la figure de diffraction d'un instrument d'optique parfait. A savoir $v_s \leq j_{1,1}$ *et* $v_d \leq j_{1,1}$ *avec* $j_{1,1} \approx 3.83$.

Chapitre 6

Discussion des hypothèses fondamentales

6.1 La stationnarité spatiale

Pour dériver l'intégrale de superposition (2.3) qui est la pierre angulaire de toute la théorie développée aux chapitres précédents, nous avons supposé la stationnarité spatiale de la formation d'images. Tout système linéaire est caractérisé par sa réponse impulsionnelle. Le microscope est caractérisé par sa RI–3D. La réponse impulsionnelle 3D est l'image tridimensionnelle d'un point–objet. Un système microscopique est invariant par translation du point source dans l'espace objet si le résultat en est une translation linéaire de la RI–3D dans l'espace image. En règle générale, un microscope ne possède pas cette particularité et la RI–3D est une fonction de la position du point source. La variance spatiale est traditionnellement séparée en variance radiale et variance axiale en microscopie [55]. La variance radiale dans l'image est une fonction de la distance radiale du point source par rapport à l'axe optique. Elle est principalement due à des aberrations de l'optique, telles que la courbure du champs, le coma et l'astigmatisme. Dans les objectifs de microscope actuels, ces aberrations sont bien maîtrisées ce qui permet de considérer que la stationnarité spatiale radiale est acquise. Pour les cas que nous avons étudiés, la question ne se pose de toute manière que pour des sources et des détecteurs de dimensions importantes. Comme nous nous sommes principalement intéressés à la définition d'un critère de confocalité et que les tailles résultantes v_s et v_d sont petites, nous pouvons considérer qu'il n'y a pas de points 'off-axis' qui participent à la formation de l'image et que par conséquent, la formation d'image est radialement stationnaire dans un MCBL. Le problème reste par contre entier dans les microscopes à balayage où ce n'est pas l'objet qui est translaté mécaniquement sous le microscope, mais où c'est le faisceau laser qui balaie la surface de l'objet puisque dans cette configuration les objectifs présentent encore des aberrations importantes pour des faisceaux qui sont inclinés par rapport à l'axe optique.

La variance axiale est le changement que subit la RI–3D dans une translation du point objet dans la direction de l'axe optique (figure 6.1).

Ce problème de variance axiale surgit dès que l'objet dont on veut former l'image

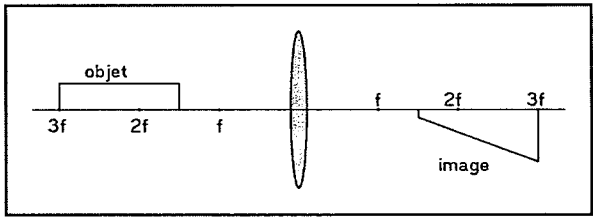

Figure 6.1: Illustration de la variance spatiale axiale.

possède une certaine épaisseur. Si par contre nous utilisons un microscope confocal, seule une mince coupe de l'objet est imagée à la fois et seule une petite partie de la lumière provenant d'autres sections de l'objet est intégrée par le détecteur. En fait, si la réponse impulsionnelle tridimensionnelle $h(x_i, y_i, z_i; x_o, y_o, z_o)$ (fig. 6.2) peut se mettre sous la forme $h(x_i - x_o, y_i - y_o, z_i - z_o)$, alors le système optique est spatialement invariant en trois dimensions. D'après [28] (eq. 5-30), la RI-3D d'une lentille se généralise au cas 3D:

$$\begin{aligned} h(x_i, y_i, \Delta_i; x_o, y_o, \Delta_o) &\approx \frac{1}{j\lambda\Delta_o\Delta_i}\int_{-\infty}^{+\infty}\int_{-\infty}^{+\infty} p(x,y)\exp\left[j\frac{k}{2}\left(\frac{1}{\Delta_o}+\frac{1}{\Delta_i}-\frac{1}{f}\right)||\vec{x}||^2\right] \\ &\times \exp\left\{-jk\left[\left(\frac{x_o}{\Delta_o}+\frac{x_i}{\Delta_i}\right)x+\left(\frac{y_o}{\Delta_o}+\frac{y_i}{\Delta_i}\right)y\right]\right\} dxdy. \end{aligned} \tag{6.1}$$

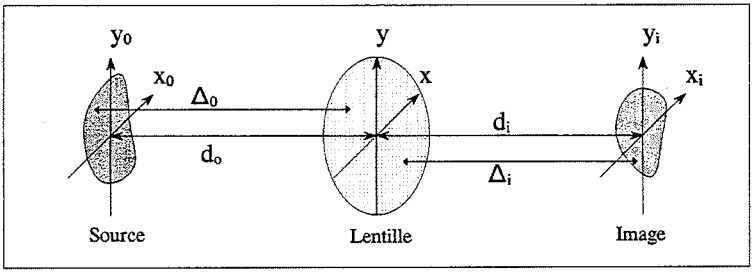

Figure 6.2: Définition d'un système de coordonnées.

La source est ici épaisse et la distance Δ_o d'un point de la source à la lentille sera mis sous la forme $\Delta_o = d_o + z_o$, où d_o est l'éloignement moyen de la source à la lentille et z_o la distance relative du point par rapport au plan moyen. Le plan conjugué de d_o est situé à une distance d_i derrière la lentille de sorte que la distribution d'amplitude dans l'image est également centrée autour d'un plan éloigné de d_i de la lentille, et $\Delta_i = d_i + z_i$. Les

distances d_o et d_i sont donc constantes. Dans l'expression de l'équation 6.1, nous pouvons donc substituer Δ_o et Δ_i:

$$\begin{aligned}\frac{1}{\Delta_o}+\frac{1}{\Delta_i}-\frac{1}{f} &= \frac{1}{d_o+z_o}+\frac{1}{d_i+z_i}-\frac{1}{f}\\ &= \frac{1}{d_o\left(1+\frac{z_o}{d_o}\right)}+\frac{1}{d_i\left(1+\frac{z_i}{d_i}\right)}-\frac{1}{f}.\end{aligned} \tag{6.2}$$

Si nous faisons l'hypothèse que la source est mince, c'est-à-dire que sa dimension transversale est petite par rapport à son éloignement moyen de la lentille, alors c'est vrai aussi pour son image et nous pouvons supposer que:

$$\frac{z_o}{d_o} \quad \text{et} \quad \frac{z_i}{d_i} \ll 1, \tag{6.3}$$

d'où nous déduisons que

$$\begin{aligned}\frac{1}{\Delta_o}+\frac{1}{\Delta_i}-\frac{1}{f} &\approx \underbrace{\frac{1}{d_o}+\frac{1}{d_i}-\frac{1}{f}}_{=0}-\frac{z_o}{d_o^2}-\frac{z_i}{d_i^2}\\ &\approx -\frac{1}{d_i^2}(z_i+M^2z_o),\end{aligned} \tag{6.4}$$

avec $M = d_i/d_o$, le grandissement du système. Toujours dans l'expression 6.1, avec les mêmes hypothèses, nous pouvons donner une approximation au premier ordre de l'autre terme de phase:

$$\left(\frac{x_o}{\Delta_o}+\frac{x_i}{\Delta_i}\right)x+\left(\frac{y_o}{\Delta_o}+\frac{y_i}{\Delta_i}\right)y \approx \frac{1}{d_i}\left[(x_i+Mx_o)x+(y_i+My_o)y\right]. \tag{6.5}$$

Si nous posons encore les changements de variables suivants:

$$\begin{aligned}x_o' &= -Mx_o\\ y_o' &= -My_o\\ z_o' &= -M^2z_o,\end{aligned} \tag{6.6}$$

la RI-3D peut se mettre sous la forme

$$\begin{aligned}h(x_i,y_i,z_i;x_o,y_o,z_o) &\approx \frac{1}{j\lambda d_i d_o}\int_{-\infty}^{+\infty}\int_{-\infty}^{+\infty} p(x,y)\exp\left[-j\frac{k}{2d_i^2}(z_i-z_o')||\vec{x}||^2\right]\\ &\times \exp\left\{-j\frac{k}{d_i}\left[(x_i-x_o')x+(y_i-y_o')y\right]\right\}dxdy\\ &\approx h(x_i-x_o',y_i-y_o',z_i-z_o').\end{aligned} \tag{6.7}$$

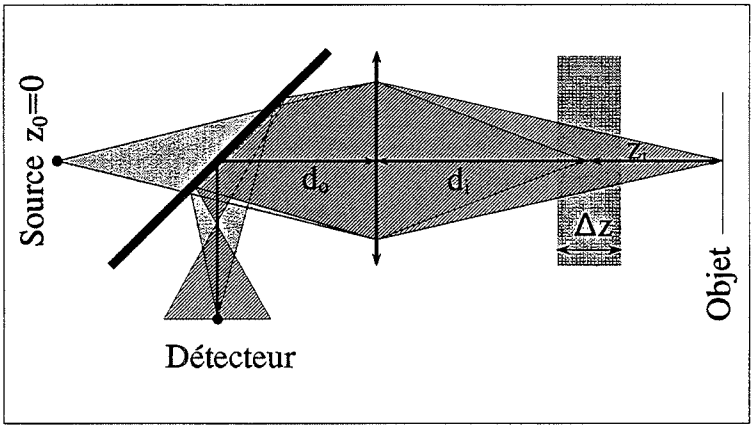

Figure 6.3: Justification de l'invariance spatiale dans le microscope confocal.

La RI-3D est donc spatialement invariante en trois dimensions, sous réserve de justifier les approximations 6.3. Or comme le montre la figure 6.3, c'est justement la principale propriété du microscope confocal que de former une image de l'objet, que si cet objet se trouve à l'intérieur d'une section Δz très mince, située au voisinage du plan confocal. Même si z_i devient assez grand pour que une des conditions 6.3 ne soit plus valable, seule cette mince bande est ' vue ' par le détecteur. Or z_i devient précisément grand lorsque nous calculons la transformée de Fourier longitudinale de la FTO-2D défocalisée pour obtenir la FTO-3D. La plus grande contribution à la transformée de Fourier provient d'une mince bande Δz, où la stationnarité spatiale 3D est valable puisqu'en pratique, $\Delta z \leq 10\mu m$, et $d_i \sim cm$, de sorte que $\Delta z/d_i \sim 10^{-3} \ll 1$.

En conclusion, le processus de la formation d'images 3D dans un microscope confocal, ou un microscope ayant des dimensions de source et de détecteur assez petits, est spatialement stationnaire si l'image est formée en déplaçant l'objet en trois dimensions.

6.2 Validité de l'approche scalaire et paraxiale

Le formation d'images a été décrite, dans les chapitres précédents, par la théorie scalaire de la diffraction dans l'approximation paraxiale, autrement dit, par ce que l'on nomme couramment l'optique de Fourier. Dans quelles mesures une telle approche est–elle justifiée? Surtout pour le cas de la microscopie, où les angles d'incidence peuvent approcher l'angle droit? Les deux problèmes peuvent être étudiés conjointement, mais nous sommes obligés de nous limiter au cas purement confocal avec $v_s = v_d = 0$ et à un objet réfléchissant homogène ($\tilde{\nu}_x = \tilde{\nu}_y = 0$). Dans ces conditions, l'intensité intégrée par le

détecteur est égale à la fonction de transfert 2D défocalisée et peut être dérivée à partir de (3.18) ou (3.27):

$$L(z_s) = \left[\frac{\sin(u_s/2)}{u_s/2}\right]^2 = \left\{\frac{\sin[k\sin^2(\alpha)z_s/2]}{k\sin^2(\alpha)z_s/2}\right\}^2. \tag{6.8}$$

D'autre part, le flux du champ électromagnétique au voisinage du foyer d'une lentille à été calculé et présenté par Wolf et ses co–auteurs dans quatre publications monumentales [56, 57, 58, 59]. Les résultats de leurs travaux ont été appliqués au système confocal [60], et le champ électrique intégré par le détecteur est:

$$L_v(z_s) = \left|\int_0^\alpha \frac{(1+\cos\theta)\sin\theta}{\sqrt{\cos\theta}} \exp(-2jkz_s\cos\theta)\, d\theta\right|^2. \tag{6.9}$$

L'expression précédente se simplifie pour de grandes valeurs de ka, k est le nombre d'onde et a le rayon de l'objectif, à:

$$L_v(z_s) = \left\{\frac{\sin[kz_s(1-\cos\alpha)]}{kz_s(1-\cos\alpha)}\right\}^2, \tag{6.10}$$

qui est un peu différente de l'expression (6.8). La différence entre $L(z_s)$ et $L_v(z_s)$ est au maximum égale à 20% comme le montre une récente publication [61], et cela jusqu'à de très grandes ouvertures numériques. Si en plus, au lieu de la forme classique de $u_s = k\sin^2(\alpha)z_s$ nous retenons pour u_s la forme corrigée $u_s = 4k\sin^2(\alpha/2)z_s = 2kz_s(1-\cos\alpha)$ qui fait coïncider artificiellement $L(z_s)$ et $L_v(z_s)$ pour le cas confocal, nous sommes sûrs que la théorie scalaire paraxiale est une excellente approximation pour la formation d'images dans un MCBL, du moins pour des tailles pas trop grandes de la source et du détecteur.

6.3 Cas des surfaces rugueuses et des surfaces inclinées

Deux des hypothèses de base que nous avons formulées excluaient les surfaces inclinées et rugueuses de l'analyse des FTO–3D du MCBL cohérent. Aucune hypothèse de ce genre n'est supposée pour le microscope fluorescent, il faut bien evidemment qu'il y ait un rayonnement fluorescent isotrope, ce qui est généralement le cas et ainsi, il y a toujours de la lumière qui atteind le détecteur. Ces hypothèses sont bien problématiques dans le cas cohérent car elles excluent la grande majorité des surfaces.

6.3.1 Les surfaces inclinées

Une surface inclinée réfléchit le faisceau incident hors de l'axe optique. La symétrie jouant un rôle primordial dans la description théorique du MCBL, il est impossible de décrire l'influence d'un plan incliné en dehors des cas les plus simples: source et détecteur

ponctuels, objet réfléchissant incliné mais homogène. Une solution instrumentale a été proposée pour compenser toute déviation du faisceau réfléchi [62].

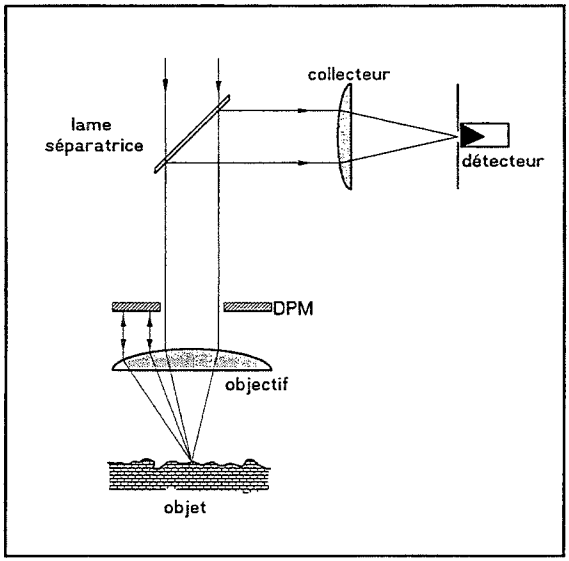

Figure 6.4: Compensation de l'inclinaison locale d'une surface.

Cette solution est illustrée sur la figure 6.4. Le faisceau qui est dévié hors de l'axe optique après réflexion par la surface est rétro–réfléchi par un miroir à conjugaison de phase (DPM est l'abréviation anglaise pour double pass mirror) et reprend exactement le même chemin que le faisceau incident après une nouvelle réflexion sur l'objet. Le miroir à conjugaison de phase doit être de forme annulaire.

6.3.2 Les surfaces rugueuses et le problème du speckle

La microtopologie des surfaces rugueuses peut engendrer au niveau du détecteur, une variation aléatoire de l'intensité lumineuse qui provient de l'interférence d'ondes qui sont diffusées par la surface. L'intensité lumineuse dans le plan du détecteur possède le forme caractéristique de grains de lumière, placés aléatoirement (speckle en anglais). La figure ainsi obtenue varie de manière aléatoire pour chaque nouveau point de la surface. Le signal enregistré est donc très fortement perturbé. Dans la pratique, trois cas peuvent se présenter.

1. Une surface d'une longueur de corrélation très supérieure aux dimensions de la tache focale du faisceau qui l'éclaire. C'est le cas des surfaces grossières dont la structure

est en principe nettement résolue par l'optique. Ces surfaces ne sont ni rugueuses ni diffusantes pour le microscope. En conséquence de quoi, il n'y a pas de formation de granularité laser. Ce phénomène peut être purement et simplement ignoré en microscopie confocale à très grande ouverture [63] où la tache focale projetée sur l'objet est très petite.

2. Si la longueur de corrélation de la surface est du même ordre de grandeur que le diamètre de la tache focale, l'amplitude de la lumière diffusée au niveau du détecteur possède une variation aléatoire de la phase et il apparaît un phénomène de granularité de l'intensité lumineuse. C'est le cas le plus problématique et la seule manière de s'affranchir des problèmes engendrés est d'élargir les dimensions de la tache focale au détriment de la résolution tridimensionnelle du système. On se retrouve alors dans le cas de figure suivant.

3. Si la longueur de corrélation de la surface est très inférieure aux dimensions de la tache focale, cette dernière englobe beaucoup de centre diffuseurs de la surface, ce qui signifie que la granularité de l'intensité lumineuse dans le plan du détecteur est beaucoup plus fine que dans le cas précédent. Il suffit alors de prendre un détecteur assez grand pour englober quelques dizaines de grains de lumière pour que l'intensité intégrée soit significative de la surface étudiée. L'intensité lumineuse est donc moyennée sur un nombre assez grand de grains de lumière pour que les variations aléatoires de phase soient plus ou moins éliminées. L'inclinaison de la surface pose alors moins de problèmes et il est inutile de la compenser: une telle surface rétro diffuse toujours une partie de la lumière incidente. Quelques études montrent que si les conditions précédentes sont réalisées, alors la courbe de réponse de l'intensité intégrée par un MCBL cohérent pour ce type de surfaces, est conforme à ce que prévoit la théorie pour une surface parfaitement réfléchissante [60, 64]!

Le précision avec laquelle nous pouvons mesurer la structure de l'objet dans ces deux derniers cas est limitée par le speckle. En supposant que la microstructure de la surface est petite par rapport à la taille de la tache focale, il est possible de déduire des incertitudes minimales sur les résolutions longitudinales et latérales, basées sur des résultats de l'optique statistique [65]:

$$\delta x \approx \frac{\lambda}{\sin\alpha} \quad \text{et} \quad \delta z \approx \frac{\lambda}{4\sin^2\alpha}, \tag{6.11}$$

valeurs qui sont proches des résolutions Δx et Δz du microscope confocal, qui ont été calculées au chapitre 3 pour une mire sinusoïdale réfléchissante:

$$\Delta x = \frac{\lambda}{2\sin\alpha} \quad \text{et} \quad \Delta z = \frac{\lambda}{\sin^2\alpha}. \tag{6.12}$$

Dans le cas où le speckle ne présente pas un contraste maximal, les expressions 6.11 doivent être multipliées par un facteur Γ qui est le contraste du speckle. Ces considérations nous seront utiles au chapitre suivant.

Chapitre 7

Adaptation du microscope à balayage au contrôle visuel automatique de surfaces

Dans ce chapitre, nous désirons montrer à l'aide d'un exemple concret, une application pratique du sectionnement optique du microscope à balayage: il s'agit de la détection de défauts sur une surface. Ce genre d'application nécessite trois étapes:

1. l'acquisition de l'image par un transducteur quelconque (une caméra CCD, un système de triangulation, un scanner laser etc.) et son stockage (bande magnétique, émulsion argentique, mémoire de masse d'ordinateur etc.). Cette acquisition peut être plus ou moins intelligente selon le degré de pré-traitement du signal par le transducteur lui-même ou par l'électronique analogique ou numérique qui précède le stockage de l'information. Cette première étape est la pierre angulaire de tout le processus, c'est elle qui va conditionner l'élégance ou la lourdeur de l'étape suivante, selon que l'information que l'on désire extraire de l'image est judicieusement mise en valeur ou non par le transducteur qui a été choisi.

2. le traitement numérique de l'image. Si la première étape livre des images correctement conditionnées, un des problèmes à ce stade est le traitement des données. Ce dernier doit s'effectuer assez rapidement étant donné qu'une image typique peut comporter un nombre impressionant d'éléments (pixels). Un autre problème est la définition d'un algorithme de traitement qui puisse conduire à une dernière étape:

3. la prise de décision: l'échantillon qui vient d'être inspecté est-il conforme aux spécifications ou possède-t-il des défauts? On peut éventuellement être intéressé par la nature du défaut et donc par une classification. Ceci implique souvent un processus itératif dans lequel la deuxième étape est reprise, par l'utilisation d'un deuxième algorithme, dans le cas où le premier ne conduit pas à la classification du défaut.

Ces trois étapes vont être décrites dans le cas de la recherche de défauts sur une surface en céramique. L'objet à étudier est illustré par la figure 7.1. Il s'agit d'un mélangeur de robineterie en céramique.

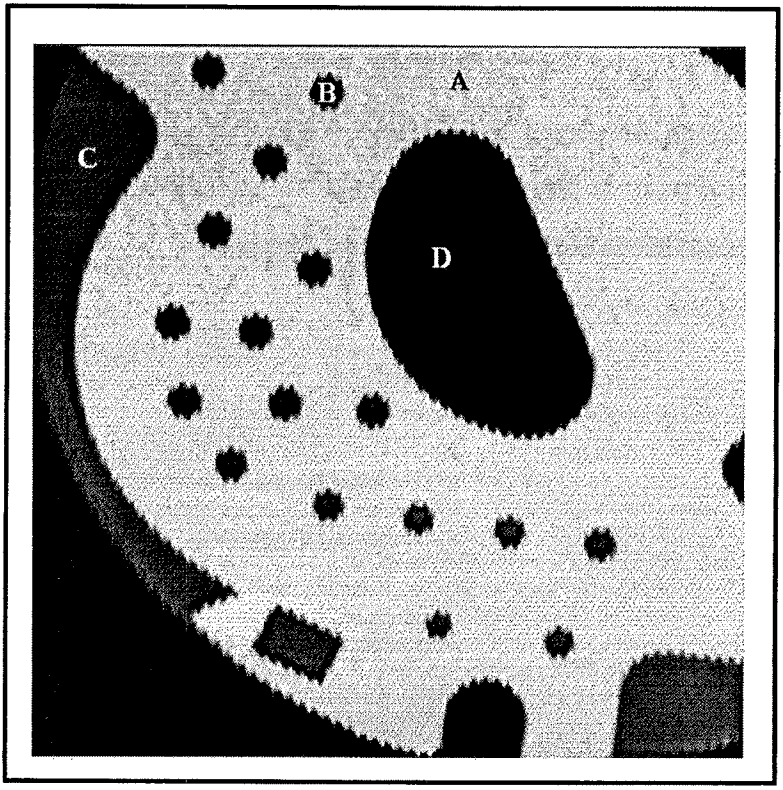

Figure 7.1: Objet à inspecter.

Ces mélangeurs remplissent leur office si deux pièces, ou joints, sont associées face contre face. La rotation d'un des deux joints peut amener l'eau à s'écouler à travers une ouverture, comme par exemple (D) sur la figure 7.1. Cette seule remarque conditionne tout le problème. L'ouverture (D) ne doit pas être ébréchée sans quoi le robinet peut goutter. Les deux surfaces doivent pivoter l'une sur l'autre, il faut donc prévoir des petites dépressions de surface qui puissent accepter un lubrifiant (B). Les deux surfaces en contact doivent supporter les agressions chimiques et thermiques, c'est pour cela qu'elle sont en céramique, mais aussi les agressions mécaniques au cas ou des particules se coinceraient entre les deux

parties. La surface de contact (A), que nous appelerons la surface fonctionnelle, et donc très dure et très finement polie. A part donc les bords ébréchés, la contamination de la surface fonctionnelle par des incrustations de matière étrangère, ou par des défauts de structure (rayures, failles, défaut de polissage ou de planéité) est extrèmement nuisible à la longévité de l'ensemble. (C) est une surface de maintient extérieure. Le but est donc de rechercher les défauts que nous avons évoqués sur la surface fonctionnelle, qui fait quelques centimètres carrés d'aire, et peut avoir une centaine de géométries différentes.
C'est par sa capacité à sectionner optiquement un objet, que le microscope à balayage permet déjà une excellente impression visuelle de l'objet de la figure 7.1: les quatre surfaces que nous venons de définir sont décalées de quelques dixièmes de millimètres les unes par rapport aux autres et une image prise avec une camera ne permet pas d'apprécier leur éloignement relatif. Cela va s'avérer important pour le traitement d'image et la recherche automatique de défauts.

7.1 Acquisition de l'image

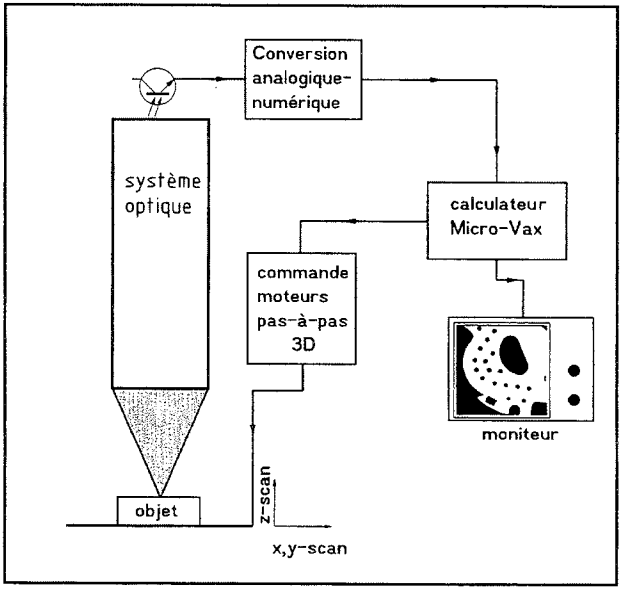

Figure 7.2: Système d'acquisition de l'image.

Un système optique de type microscope à balayage, confocal ou non, cohérent ou incohérent, délivre une intensité intégrée qui est numérisée sur 16 bits avant d'être stockée dans la mémoire centrale d'un micro–Vax. Une fois que la donnée est figée, l'ordinateur

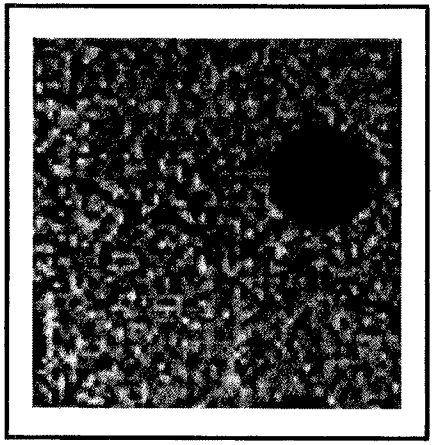

Figure 7.3: Microscope quasi–confocal, $v_s \sim 3.5$, $v_d \sim 35$.

fait exécuter une commande de déplacement des moteurs pas–à–pas pour amener un autre point de l'objet sous le microscope et un nouveau signal est numérisé (figure 7.2). Un moniteur permet d'afficher l'image finale et les résultats des traitements qui seront appliqués pour l'extraction d'informations. Nous allons maintenant utiliser divers types de microscopes à balayage pour obtenir une image avec un sectionnement optique suffisant, une résolution latérale adéquate et un rapport signal sur bruit assez bon pour distinguer et extraire les défauts de la surface fonctionnelle. Nous nous limiterons à la détection de rayures.

7.1.1 Microscope quasi–confocal

L'image 7.3 a été obtenue par un microscope à balayage où la dimension de la source est conforme au critère de confocalité: $v_s \sim 3.5 \leq 3.83$ et un détecteur de taille $v_d \sim 35$. La source utilisée est un laser He–Ne de grande cohérence temporelle. Sur cette image, nous constatons que le sectionnement optique est plus que suffisant puisque la dépression à lubrifiant ne contribue pas à l'image. Elle produit essentiellement des niveaux de gris très sombres qui caractérisent son éloignement important par rapport au plan confocal qui coïncide ici avec la surface fonctionnelle. Cette surface est par contre très mal rendue et la rayure qu'elle comporte est difficilement visible. Le très fort bruit de fond est dû au phénomène de speckle, puisque la surface possède une rugosité moyenne qui est du même ordre de grandeur que la résolution latérale du système qui est d'environ un micromètre. Nous nous trouvons dans le cas le plus défavorable cité au chapitre précédent.

7.1.2 Microscope de type I

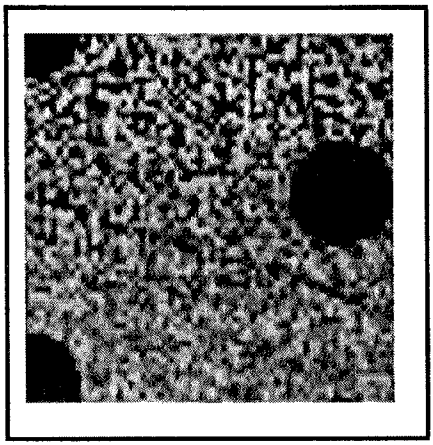

Figure 7.4: Microscope de type I, $v_s \sim 3.5$, $v_d \rightarrow \infty$.

L'image de la figure 7.4 a été obtenue avec le même microscope que celle de la figure 7.3, mais le petit diaphragme qui réduisait pratiquement la taille utile du détecteur qui se trouvait juste derrière, a été supprimé. Nous sommes donc en présence d'un microscope de type I, avec $v_s \sim 3.5$ et $v_d \rightarrow \infty$. Nous pouvons constater que le sectionnement optique a diminué puisque les dépressions renvoient un peu de lumière qui est détectée, ce qui se traduit par un fond d'un niveau de gris un peu plus clair que sur la figure 7.3. La rayure n'est pas plus visible que dans le cas quasi-confocal. On pouvait s'y attendre étant donné que la tache focale sur la surface est toujours d'une dimension voisine de la taille des centres diffuseurs. Les grains de speckle qui se forment au niveau du détecteur sont tellement grands et peu nombreux qu'on en intègre que quelques uns si on augmente la taille du détecteur. Ceci est donc insuffisant pour moyenner l'occurence aléatoire de la figure de speckle d'un point à l'autre de la surface. Ce n'est donc pas le sectionnement optique qui est critique dans les deux cas que nous venons de présenter, mais l'incertitude sur la résolution latérale limitée par le speckle. Nous avons cherché à diminuer cette incertitude en présence de speckle de trois manières: en augmentant la taille de la tache focale sur la surface, en agrandissant la source et en réduisant la cohérence temporelle de la source de lumière utilisée.

7.1.3 Microscope de type I défocalisé

La première idée qui vient lorsque l'on désire augmenter la taille de la tache de focalisation sur l'objet, est de défocaliser légèrement ce dernier. Il est donc hors de question d'employer un microscope confocal pour acquérir une image dans ce cas précis, étant donné

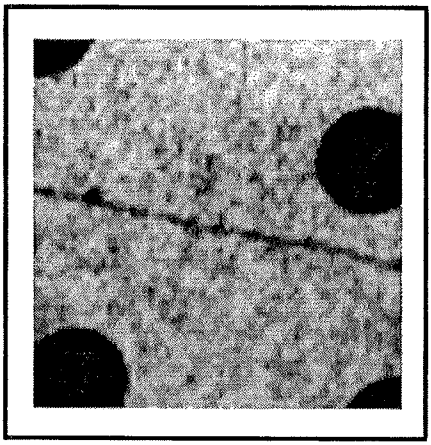

Figure 7.5: Microscope de type I défocalisé: $v_s \sim 3.5$, $v_d \rightarrow \infty$, $z_s \sim 1$mm.

la très faible profondeur de champ de ce dernier. L'image de la figure 7.5 montre ce qu'on obtient dans le cas du microscope de type I avec une défocalisation de un millimètre. Le sectionnement optique est toujours largement suffisant et la rayure devient assez visible pour que nous puissions envisager une détection automatique par un traitement d'image. L'amélioration provient du fait que la surface est éclairée sur une portion plus grande qui englobe plusieurs dizaines de centres diffuseurs. Bien que produisant toujours un granularité importante, le speckle est plus fin et le détecteur en intègre un plus grand nombre, ce qui permet de moyenner leur influence d'un point à l'autre de la surface. L'incertitude sur la résolution latérale a été diminuée. Même si la résolution latérale est plus faible du fait de la taille plus grande de l'éclairage sur la surface, elle est encore suffisante pour détecter la rayure.

7.1.4 Microscope à balayage avec une grande source

Un autre moyen d'augmenter le diamètre de l'éclairage sur l'objet, autre que la défocalisation, est d'augmenter la taille de la source. Le détecteur doit être d'une taille voisine de celle de la source pour obtenir un sectionnement optique assez grand. Hormis les avantages déjà exprimés dans le paragraphe précédent, ce procédé permet d'injecter plus de lumière dans le système, et donc d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit. La figure 7.6 montre l'image obtenue par un tel système. La rayure est parfaitement visible sur une surface fonctionnelle relativement uniforme. Le sectionnement optique est bien évidemment un peu plus réduit que dans les cas précédents, comme nous pouvons le constater par la présence de cercles concentriques de niveaux de gris croissants dans les dépressions.

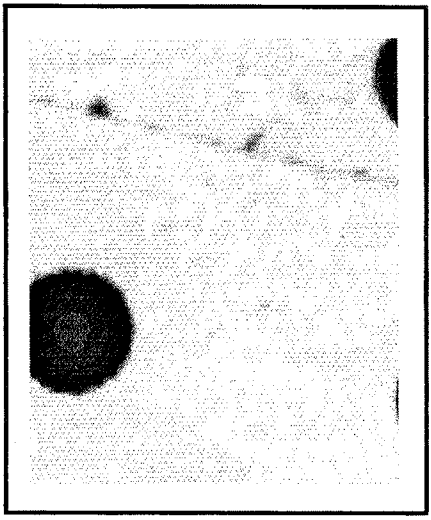

Figure 7.6: MCBL avec $v_s \sim v_d$ grands.

7.1.5 Influence de la cohérence temporelle

D'après [65], les incertitudes sur les résolutions latérales et axiales sont de l'ordre de:

$$\delta x \sim \Gamma \frac{\lambda}{\sin \alpha} \quad \text{et} \quad \delta z \sim \Gamma \frac{\lambda}{4 \sin^2 \alpha}, \tag{7.1}$$

où Γ est le contraste du speckle. Γ est relié à la rugosité moyenne σ_h de la surface et à la longueur de cohérence l_c de la lumière [66] par:

$$\Gamma^2 = \frac{1}{\sqrt{1 + \left(4 \frac{\sigma_h}{l_c}\right)^2}}. \tag{7.2}$$

Une réduction du contraste, et donc une diminution des incertitudes δx et δz, n'est possible que si la rugosité σ_h est plus grande que la cohérence temporelle l_c. Du moins, nous devrions obtenir une diminution des incertitudes en utilisant une source d'une cohérence temporelle plus petite que celle du laser He-Ne.

Ce fait est vérifié sur la figure 7.7 où nous avons employé le microscope de type I décrit dans ce chapitre, avec $v_s \sim 3.5$ et $v_d \to \infty$, avec comme source, une diode laser de cohérence temporelle assez faible. Par rapport à l'image de la figure 7.4, où la source est un laser He-Ne, la rayure est très nettement visible, et le résultat obtenu est assez

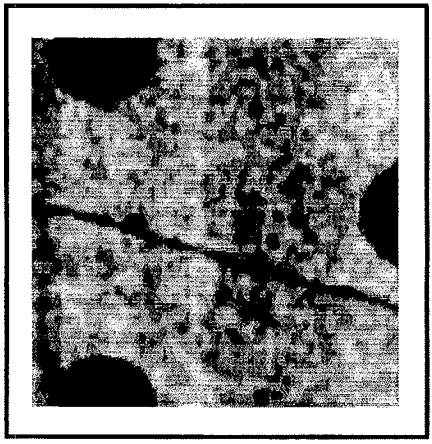

Figure 7.7: Microscope de type I focalisé. La source est une diode laser.

proche de l'image de la figure 7.5. L'image de la figure 7.8 est obtenue avec un microscope à balayage où $v_s \sim v_d$, (de tailles assez grandes), et une diode électroluminescente (DEL) de très faible cohérence temporelle. L'image doit donc être comparée à celle de la figure 7.6, où la source était un laser He-Ne. Une cohérence temporelle plus faible ne conduit pas, ici, à une meilleure image. Cela provient d'une intensité lumineuse couplée dans le système optique qui est plus faible que celle qui est autorisée par le faisceau très directif d'un laser à gaz.

7.1.6 Conclusion

Les trois méthodes proposées pour réduire les incertitudes dues au speckle sont effectives. Elles se traduisent toutes, à l'exception de celle qui consiste à diminuer la longueur de cohérence de la source, par une perte de résolution latérale et axiale. Mais étant donné que la résolution latérale Δx est limitée par l'incertitude δx, qui est du même ordre de grandeur, nous sommes amenés, en pratique, à faire un compromis entre le sectionnement optique et une l'incertitude sur la résolution latérale, les deux variant de manière inversement proportionnelle. Les meilleurs résultats sont obtenus avec une source d'une taille adaptée au détecteur, les deux étant suffisamment grands pour, d'une part, obtenir un éclairage qui englobe plusieurs dizaines de centres diffuseurs au niveau de la surface, et d'autre part, intégrer l'amplitude dans le plan du détecteur sur un nombre assez grand de grains de speckle. La source doit être assez puissante.

La rayure est pourtant déjà visible dans le microscope de type I défocalisé. Il est donc possible de la détecter par un algorithme de traitement d'image adapté. Nous nous proposons de définir un tel algorithme, qui s'appliquera à la détection de rayures et qui

s'appliquera avec succès à tous les cas étudiés ici, mis à part les images obtenues avec les MCBL de type I et II.

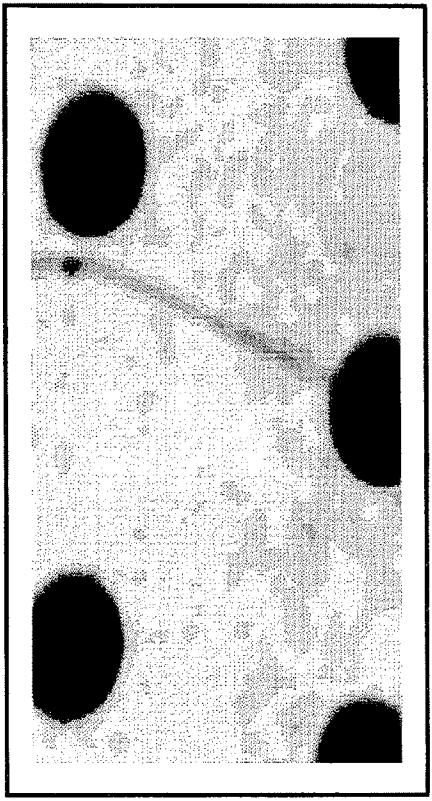

Figure 7.8: Microscope à balayage avec $v_s \sim v_d$ et une DEL.

7.2 Traitement d'image et classification des défauts

Le problème à résoudre ici est la segmentation de la surface fonctionnelle. La chose ne serait pas aisée pour un objet aussi complexe, dont la géométrie peut varier, si tout n'avait pas déjà été fait grâce au sectionnement optique du senseur. Si nous représentons le nombre total de pixels par niveau de gris, nous obtenons l'histogramme de l'image 7.1. Cet histogramme est reproduit par la figure 7.9.

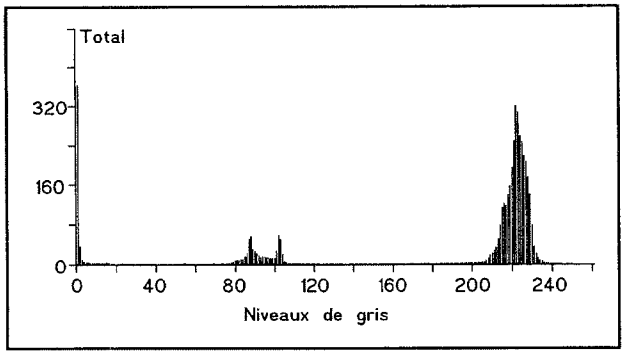

Figure 7.9: Histogramme typique d'une image de mélangeur.

Pour une géométrie donnée, cet histogramme a toujours la même forme, ici il est trimodal. Un premier mode est concentré près du niveau zéro et correspond à l'arrière plan de l'image, qui est noir, et aux trous: (D) sur l'image 7.1. Le deuxième mode correspond aux surfaces (C) et (B) et possède lui même deux pics. Le troisième enfin, correspond à tous les pixels de la surface fonctionnelle (A). Un histogramme type peut être défini pour toute géométrie de joint donnée, ce qui permet, par simple comptage de segmenter la surface (A) en ne retenant que les pixels qui lui appartiennent. Pour notre cas, nous pourrions retenir tous les pixels dont le niveau de gris associé est supérieur à 160. Cette valeur resterait la même pour tout échantillon de même géométrie. Etant donné que nous nous sommes limités à une petite portion de la surface du mélangeur, figure 7.11A, l'histogramme est différend et est reproduit sur la figure 7.10, mais cela n'enlève rien à la généralité de ce qui précède, à part le fait que le seuil de segmentation sera ici égal à 80. Une fois la segmentation réalisée, nous obtenons un masque binaire composé de l'image segmentée, où tous les pixels de niveau de gris non nul reçoivent la valeur maximale de 255. Les images de la figure 7.11 illustrent cette étape. L'image A est l'image originale, B est le masque binaire créé par la segmentation grâce à l'histogramme de la figure 7.10

Grâce au masque, nous pouvons ensuite normaliser les niveaux de gris de l'image à l'intervalle $\mu \pm k\sigma$, μ et σ sont la moyenne et l'écart des valeurs des niveaux de gris des pixels de la surface fonctionnelle. k est une valeur réelle qui doit être déterminée de manière expérimentale avec un grand nombre d'échantillons. L'image est enfin inversée et aboutit à C sur la figure 7.11. D est une image binaire de C. Il reste pourtant à trouver un algorithme pour distinguer la rayure des contours de la surface. Les contours peuvent être éliminés selectivement sans que cela dégrade un défaut de la surface structurelle. Pour cela il suffit de remarquer qu'un pixel appartient au contour si la valeur du niveau de gris qui lui est associée est maximale et égale à 255 (image C). Mais ceci est également vrai pour un défaut, comme c'est le cas pour les pixels de la rayure. Une autre particularité des pixels appartenant au contour, est qu'un groupe de tels pixels possède toujours au moins un pixel adjacent de couleur noire, donc de valeur 0. Pour éliminer les pixels appartenant

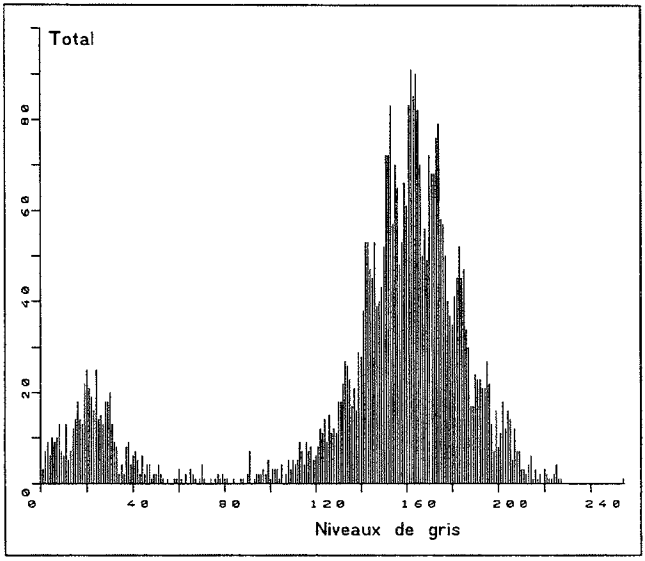

Figure 7.10: Histogramme particulier de l'image étudiée.

au contour nous procéderons de la manière suivante: une fenêtre de taille $n \times n$ balayera l'image, n sera un entier impair ($n = 3, 5, 7 \cdots$). Si l'élément central de cette fenêtre est blanc et si à l'intérieur de cette fenêtre, il existe au moins un pixel noir, alors le pixel central appartient au contour et la valeur de son niveaux de gris sera remplacée par la moyenne des niveaux de gris sur toute la fenêtre. Si le contour est ' épais ' de un pixel, une fenêtre de $n = 3$ suffit. Une taille de fenêtre plus grande est nécessaire pour un contour plus épais. Si l'image numérisée est définie par le tableau $\mathcal{I}$ de dimensions $N \times M$, elle sera décrite en chaque point par la valeur $\mathcal{I}(i,j)$ du tableau avec $1 \leq i \leq N$ et $1 \leq j \leq M$. Si n est la dimension de la fenêtre et si $p = (n-1)/2$, le filtre d'érosion non-linéaire que nous venons de définir est décrit par les opérations suivantes:

$$\begin{aligned} & \forall i,j | 1+p \leq i \leq N-p \quad \text{et} \quad 1+p \leq j \leq M-p \\ \text{si} \quad & \exists (k,l) \quad | \quad i-p \leq k \leq i+p, i-p \leq l \leq i+p \quad \text{et} \quad \mathcal{I}(k,l) = 0 \\ \text{et si} \quad & \mathcal{I}(i,j) = 255, \quad \text{alors} \quad \mathcal{I}(i,j) = \frac{1}{n^2} \sum_{m=i-p}^{i+p} \sum_{o=i-p}^{i+p} \mathcal{I}(m,o). \end{aligned} \tag{7.3}$$

L'image (E) de la figure 7.11 est obtenue après binarisation de (C), érodée par le filtre défini par le système de relations (7.3). Par rapport à (D), nous voyons que tous les

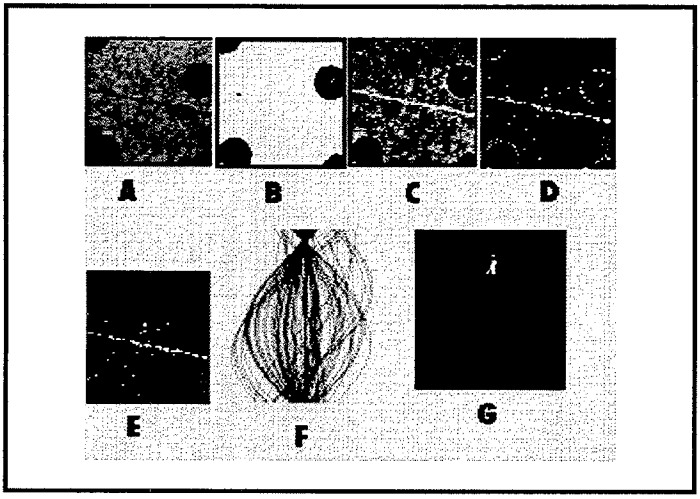

Figure 7.11: Recherche de rayure sur la surface fonctionnelle.

contours ont disparus. La taille de la fenêtre utilisée était de $n = 3$.
Le dernier point à prendre en compte est la prise de décision: l'image A de la figure 7.11 comporte-t-elle un défaut? La réponse étant bien évidemment oui, il suffit de contempler (E), quel algorithme allons nous utiliser pour décider si nous sommes en présence d'une rayure? Comment distinguer cette rayure du bruit voisin quand celui-ci est important? Pour cela nous partons de l'observation qu'un rayure possède toujours une partie rectiligne et que pour détecter cette partie rectiligne, il suffit de convoluer l'image (E) avec une droite. Cela revient a faire passer toutes les droites possibles par (E) et pour chaque droite, à compter le nombre de pixels 'allumés', ici blancs, quelle intercepte. Ce nombre est comptabilisé dans un tableau (F) d'entrée en abscisse, la distance moyenne de la droite par rapport à une origine dans l'image, en ordonnée, l'angle que fait le vecteur directeur de la droite avec l'horizontale. C'est quand la droite de convolution se superpose au mieux à la rayure que la fonction de convolution est maximale. Le processus que nous venons de décrire est connu par le nom de transformée de Hough. (F) est la transformée de Hough de (E). Pour décider si l'image comporte une rayure il suffit alors d'affecter un seuil, $\mu_f + 3\sigma_f$ par exemple, à (F) et de constater s'il y a des points, dans (F) qui sont au-dessus de ce seuil. Nous obtenons ainsi l'image (G). Nous constatons la présence d'un groupe de points qui démontre la présence d'une droite d'une inclinaison moyenne de 170 degrés dans l'image.

Ce procédé de détection s'est avéré être assez robuste vis-à-vis du bruit possible ou des contours, ce que nous avons vérifié avec les images de la figure 7.12 qui ont été obtenues par un microscope avec une source étendue et un détecteur adapté et un éclairage de

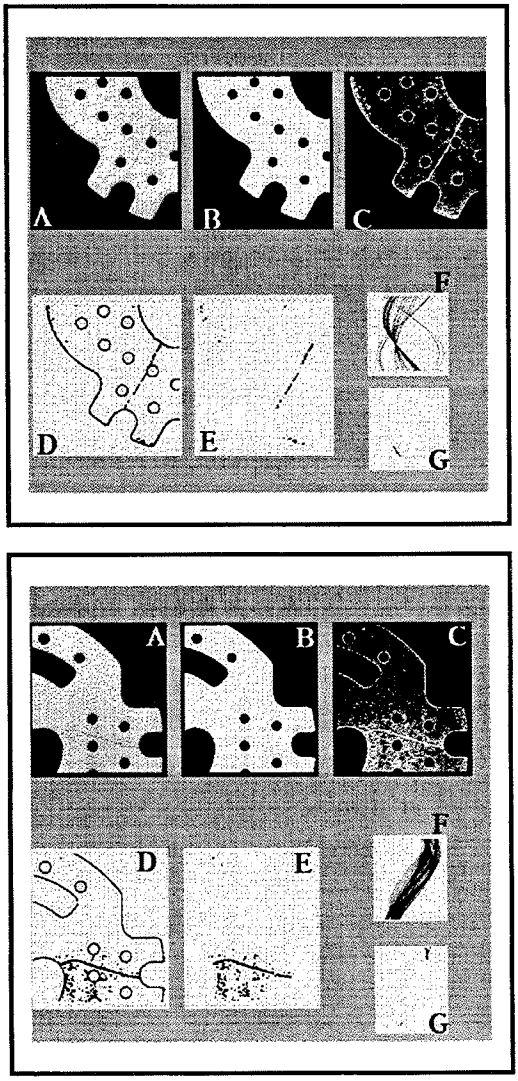

Figure 7.12: Recherche de rayure sur la surface fonctionnelle.

faible cohérence temporelle, une DEL en l'occurence. Insistons encore sur le fait que cette détection relativement simple n'a été possible que parce que nous avons été en mesure de segmenter l'image originale et que cette segmentation simple par histogramme était possible grâce à la propriété de sectionnement optique du senseur.

Chapitre 8

Conclusions

L'apport du travail que nous avons réalisé dans ces sept chapitres concernant la microscopie à balayage optique, peut se classer en trois catégories.

1. Il comble tout d'abord un manque au niveau de la théorie de la formation d'images tridimensionnelles dans un microscope confocal:

   - La fonction de transfert optique bidimensionnelle défocalisée pour des dimensions finies de détecteur(3.18), illustrée par la figure 3.5, crée la continuité qui manquait entre les cas connus d'un détecteur ponctuel et d'un détecteur infini.
   - La fonction de transfert optique tridimensionnelle, pour des dimensions données de la source et du détecteur, est définie (3.20) et calculée (3.41). Quelques formes de FTO–3D sont présentées par le figure 3.8.
   - Une fonction analytique simple de la FTO–3D du microscope confocal a été dérivée (3.51)
   - Par rapport à la théorie déjà exhaustive sur la fonction de transfert optique du microscope à balayage fluorescent, nous ajoutons la connaissance de l'influence de la source (5.18 à 5.23) sur la FTO–3D, les figures 5.3 et 5.4 illustrant cette influence.
   - Les courbes de niveaux des résolutions axiales en fonction des tailles de la source et du détecteur permettront de se faire une idée des performances d'un MCBL pour toutes les configurations possibles. (figures 4.2 et 5.5).

2. Quelques spécialistes pensaient, que la taille maximale tolérable pour le détecteur, qui conserve encore toutes les qualités confocales à un microscope à balayage, devait être égale à la taille du lobe central de la figure de diffraction d'un instrument parfait. Nous avons démontré ce fait et ajouté un critère de confocalité pour la source (règles 2 et 3).

3. Le résultat le plus surprenant, et la surprise provient du fait que nul ne l'avait encore prévu, est qu'à dimensions égales de la source et du détecteur, c'est la source qui dégrade le plus la qualité d'image dans un microscope à balayage.

Le septième chapitre illustre l'avantage qui résulte de l'emploi d'un instrument ayant une forte discrimination axiale de la lumière réfléchie par une surface.

Annexe A

Cohérence partielle dans le microscope à balayage laser

Soit le microscope à balayage de la figure suivante où le détecteur est assez grand pour intégrer toute l'intensité lumineuse arrivant dans son plan.

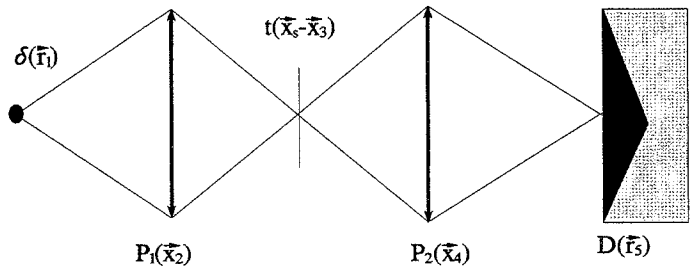

Figure A.1: Microscope à balayage de type I.

Pour simplifier, la source sera supposée ponctuelle et l'objet se trouvera toujours dans le plan confocal. La lentille p_2 joue alors uniquement le rôle de lentille de champ et elle peut être remplacée par un détecteur de même taille. Le système précédent est alors équivalent à celui de la figure A.2.

L'amplitude lumineuse quittant l'objet est $h_1(\vec{x}_3)t_2(\vec{x}_s - \vec{x}_3)$. L'amplitude dans le plan du détecteur est obtenue en propageant cette expression jusqu'à ce plan en utilisant l'intégrale de diffraction de Fraunhofer:

$$U_4(\vec{x}_s, \vec{x}_4) = \int_{-\infty}^{+\infty} h_1(\vec{x}_3)t_2(\vec{x}_s - \vec{x}_3) \exp\left(j\frac{k}{d_2}\vec{x}_4\vec{x}_3\right) d\vec{x}_3. \tag{A.1}$$

Le signal délivré est alors

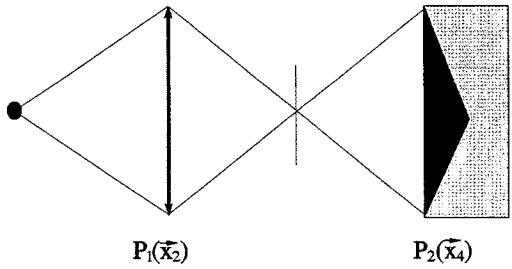

Figure A.2: Microscope équivalent au type I.

$$L(\vec{x}_s) = \int_{-\infty}^{+\infty}\int_{-\infty}^{+\infty} |U_4(\vec{x}_s, \vec{x}_4)p_2(\vec{x}_4)|^2 \, d\vec{x}_4 \tag{A.2}$$

soit

$$\begin{aligned} L(\vec{x}_s) &= \int_{-\infty}^{+\infty}\int_{-\infty}^{+\infty} h_1(\vec{x}_3)h_1^*(\vec{x}_3')t_2(\vec{x}_s - \vec{x}_3)t_2^*(\vec{x}_s - \vec{x}_3') \\ &\times \gamma(\vec{x}_3 - \vec{x}_3') \, d\vec{x}_3 d\vec{x}_3', \end{aligned} \tag{A.3}$$

où

$$\gamma(\vec{x}) = \int_{-\infty}^{+\infty} |p_2(\vec{x}_4)|^2 \exp\left(j\frac{k}{d_2}\vec{x}\vec{x}_4\right) \, d\vec{x}_4. \tag{A.4}$$

Considérons maintenant le cas du microscope par transmission où la lentille p_2 de la figure A.1 peut être d'une taille différente de celle de p_1. Nous pouvons alors étudier deux cas limites. Le premier cas est celui d'un détecteur p_2 infiniment grand, de telle sorte que p_2 est toujours égale à l'unité. D'après A.4, γ se réduit alors à une impulsion de Dirac et l'image (eq. A.3) s'écrit

$$\begin{aligned} L(\vec{x}_s) &= \int_{-\infty}^{+\infty} |h_1(\vec{x}_3)|^2 |t_2(\vec{x}_s - \vec{x}_3)|^2 \, d\vec{x}_3 \\ &= |h_1(\vec{x}_s)|^2 \otimes |t_2(\vec{x}_s)|^2. \end{aligned} \tag{A.5}$$

Ce qui signifie que la formation d'image est incohérente. Dans le second cas, p_2 tend vers une taille ponctuelle et l'image devient, toujours d'après A.3 et A.4:

$$L(\vec{x}_s) = |h_1(\vec{x}_s) \otimes t_2(\vec{x}_s)|^2 \tag{A.6}$$

et la formation d'image est incohérente. Nous pouvons également définir une fonction de cohérence mutuelle en considérant des objets ponctuels. L'image d'un objet ponctuel est donnée, d'après A.3, par

$$L(\vec{x}_s) = |h_1(\vec{x}_s)|^2 \gamma(\vec{0}). \tag{A.7}$$

Si l'objet est composé de deux points distants de 2Δ tels que:

$$t_2(\vec{x}_3) = \delta(y_3)\left[\delta(x_3 - \Delta) + \delta(x_3 + \Delta)\right], \tag{A.8}$$

l'équation A.3 devient, après normalisation:

$$\begin{aligned} L(x_s, 0) &= |h_1(x_s + \Delta, 0)|^2 + |h_1(x_s - \Delta, 0)|^2 \\ &+ 2\frac{\gamma(2\Delta, 0)}{\gamma(0,0)} \Re\left\{h_1(x_s + \Delta, 0) h_1^*(x_s - \Delta, 0)\right\}. \end{aligned} \tag{A.9}$$

Les deux premiers termes représentent l'image de chaque point séparé, tandis que le troisième représente un terme d'interférence qui est le produit croisé des amplitudes images des deux points. La force relative de cette interférence dépend du terme $\gamma(2\Delta, 0)$, c'est-à-dire de la taille de p_2. Dans le cas limite d'un détecteur infini, nous obtenons:

$$L(x_s, 0) = |h_1(x_s + \Delta, 0)|^2 + |h_1(x_s - \Delta, 0)|^2. \tag{A.10}$$

L'image est la somme des intensités émises par chaque point. La formation d'image est donc incohérente. Dans le cas où le détecteur devient petit:

$$L(x_s, 0) = |h_1(x_s + \Delta, 0) + h_1(x_s - \Delta, 0)|^2. \tag{A.11}$$

L'image est la somme des amplitudes émises par les deux points et la formation d'image est cohérente. Si p_2 possède une taille comprise entre ces deux limites, la formation d'image est partiellement cohérente. Nous venons donc de montrer, que la formation d'image dans le microscope à balayage de la figure A.1, qui correspond à un microscope où le détecteur $v_d \to \infty$, est partiellement cohérente. Pour le microscope confocal où $v_d \to 0$, l'image sera donnée, d'après les équations 3.2 et 3.2, par:

$$\begin{aligned} L(\vec{x}_s) &= \left| \int_{-\infty}^{+\infty} h_1(\vec{x}_3) h_2(\vec{x}_3) t_2(\vec{x}_s - \vec{x}_3)\, d\vec{x}_3 \right|^2 \\ &= |h_1(\vec{x}_s) h_2(\vec{x}_s) \otimes t_2(\vec{x}_s)|^2. \end{aligned} \tag{A.12}$$

La formation d'image sera donc cohérente.

Pour résumer ces résultats:

Un microscope à balayage laser forme des images partiellement cohérentes d'un objet. Dans le cas purement confocal, cette formation d'image sera cohérente. La taille v_d du détecteur fait varier le degré de cohérence spatiale et c'est pour cette raison que la fonction de transfert est nommée partiellement cohérente.

Annexe B

Dérivation de la FTO–3D du microscope de type I

Pour démontrer l'équation (3.47):

$$\Omega_I(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}) = \Omega_{\substack{v_s \to 0 \\ v_d \to \infty}}(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}), \tag{B.1}$$

il est plus commode de partir d'une expression normalisée de (3.33) que de (3.41) pour éviter des calculs de limites trop complexes. Exprimé dans le système de coordonnées de la figure 3.7, l'expression (3.33) pour la FTO–3D non normalisée est:

$$\begin{aligned} \Lambda(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}) &= C_8^{te} \iint_{\Sigma_2} \frac{J_1(v_s\beta_1)J_1(v_s\beta_0)}{\beta_0\beta_1} \\ &\times \left\{ \int_0^{v_d} J_0(v_5\beta_1)J_0(v_5\beta_2)v_5\, dv_5 \right\} d\xi d\eta. \end{aligned} \tag{B.2}$$

La constante ε n'a plus lieu d'être puisque sa présence a permis de réduire le domaine d'intégration de Σ à Σ_2. Ainsi:

$$\Lambda_I(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}) = \lim_{\substack{v_s \to 0 \\ v_d \to \infty}} \Lambda(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}), \tag{B.3}$$

$$\begin{aligned} &= C_8^{te} \iint_{\Sigma_2} \lim_{v_s \to 0} \left[\frac{J_1(v_s\beta_1)J_1(v_s\beta_0)}{\beta_0\beta_1} \right] \\ &\times \left\{ \int_0^{+\infty} J_0(v_5\beta_1)J_0(v_5\beta_2)v_5\, dv_5 \right\} d\xi d\eta. \end{aligned} \tag{B.4}$$

$$\text{or} \quad \lim_{v_s \to 0} \frac{J_1(v_s\beta_1)J_1(v_s\beta_0)}{\beta_0\beta_1} \longrightarrow \frac{v_s^2}{4}, \tag{B.5}$$

et l'expression entre crochets est:

$$\frac{\delta(\beta_1-\beta_2)}{\beta_1} = 2\delta(\beta_1^2-\beta_2^2) = 2\delta(\tilde{\mu}-\xi\tilde{\nu}_x). \tag{B.6}$$

Ainsi:

$$\Lambda_I(\tilde{\nu}_x,\tilde{\mu}) \longrightarrow C_8^{te}\frac{v_s^2}{2}\iint_{\Sigma_2}\delta(\tilde{\mu}-\xi\tilde{\nu}_x)\,d\xi d\eta. \tag{B.7}$$

Comme

$$\Lambda_I(0,0) \longrightarrow C_8^{te}\frac{v_s^2}{2}\int_0^1\int_0^{2\pi}\rho\,d\rho d\theta = C_8^{te}\frac{\pi v_s^2}{2}, \tag{B.8}$$

nous obtenons:

$$\Omega_I(\tilde{\nu}_x,\tilde{\mu}) = \frac{1}{\pi}\iint_{\Sigma_2}\delta(\tilde{\mu}-\xi\tilde{\nu}_x)\,d\xi d\eta, \tag{B.9}$$

$$= \frac{1}{\pi\tilde{\nu}_x}\int_0^{\sqrt{1-\tilde{\nu}_x^2/4}} d\eta \int_{\tilde{\nu}_x/2-\sqrt{1-\eta^2}}^{\sqrt{1-\eta^2}-\tilde{\nu}_x/2}\delta(\frac{\tilde{\mu}}{\tilde{\nu}_x}-\xi)\,d\xi. \tag{B.10}$$

L'intégrale sur $d\xi$ n'est pas nulle seulement si l'argument de la distribution de Dirac est pris dans l'intervalle d'intégration:

$$\frac{\tilde{\nu}_x}{2}-\sqrt{1-\eta^2} \le \frac{\tilde{\mu}}{\tilde{\nu}_x} \le \sqrt{1-\eta^2}-\frac{\tilde{\nu}_x}{2}, \tag{B.11}$$

cette double condition se résumant par:

$$\eta \le \sqrt{1-\left(\frac{\tilde{\mu}}{\tilde{\nu}_x}+\frac{\tilde{\nu}_x}{2}\right)} = \eta_{sup}, \tag{B.12}$$

et

$$\Omega_I(\tilde{\nu}_x,\tilde{\mu}) = \frac{1}{\pi\tilde{\nu}_x}\int_0^{\eta_{sup}} d\eta, \tag{B.13}$$

car

$$\eta_{sup} \le \sqrt{1-\left(\frac{\tilde{\nu}_x}{2}\right)^2}. \tag{B.14}$$

Finalement:

$$\boxed{\Omega_I(\tilde{\nu}_x,\tilde{\mu}) = \frac{1}{\pi\tilde{\nu}_x}\Re\left[\sqrt{1-\left(\frac{\tilde{\mu}}{\tilde{\nu}_x}+\frac{\tilde{\nu}_x}{2}\right)^2}\right].} \tag{B.15}$$

Annexe C

Dérivation de la FTO–3D du microscope confocal

Cette fois ci:

$$\Omega_{II}(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}) = \Omega_{\substack{v_s \to 0 \\ v_d \to 0}}(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}), \tag{C.1}$$

et en partant de l'expression de la FTO–3D non normalisée (B.4):

$$\begin{aligned} \Lambda_{II}(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}) &= \lim_{\substack{v_s \to 0 \\ v_d \to 0}} \Lambda(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}), && \text{(C.2)} \\ &= C_8^{te} \iint_{\Sigma_2} \lim_{v_s \to 0} \left[\frac{J_1(v_s\beta_1) J_1(v_s\beta_0)}{\beta_0 \beta_1} \right] \\ &\times \left\{ \int_0^{+\infty} J_0(v_5\beta_1) J_0(v_5\beta_2) \frac{\delta(v_5)}{v_5} v_5 \, dv_5 \right\} d\xi d\eta. && \text{(C.3)} \end{aligned}$$

La valeur de la limite précédente est donnée dans l'annexe A, l'expression entre crochets est égale à 1. Ainsi:

$$\Omega_{II}(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}) = \frac{1}{\pi} \iint_{\Sigma_2} d\xi d\eta. \tag{C.4}$$

A un facteur de normalisation près, la fonction de transfert optique tridimensionnelle du microscope confocal est égale à l'aire commune Σ_2 des pupilles p_1 et p_2 et du cercle de rayon $\sqrt{1 - \tilde{\nu}_x^2/4 - \tilde{\mu}}$, centré sur la région de recouvrement des deux pupilles. Comme l'aire est parfaitement symétrique dans le système de coordonnées ξ, η, il suffit de calculer l'aire du quadrant supérieur et de multiplier le résultat final par quatre.

Nous devons calculer l'aire hachurée de la figure C.1. Deux cas de figures se présentent alors. Si le disque qui est centré sur la région de recouvrement est entièrement contenu dans celle–ci, la surface totale est simplement égale à l'aire du disque. Donc, dans le cas où:

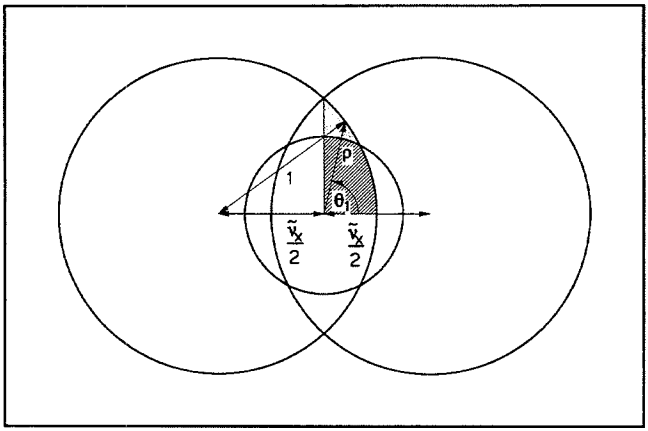

Figure C.1: Aire d'intégration pour la FTO–3D confocale.

$$\sqrt{1-\left(\frac{\tilde{\nu}_x}{2}\right)^2-\tilde{\mu}} \leq 1-\frac{\tilde{\nu}_x}{2}, \tag{C.5}$$

alors:

$$\Omega_{II}(\tilde{\nu}_x,\tilde{\mu}) = 1-\left(\frac{\tilde{\nu}_x}{2}\right)^2-\tilde{\mu}. \tag{C.6}$$

Si le disque déborde de la surface de recouvrement, il est plus simple d'évaluer l'aire hachurée en soustrayant l'aire pointillée de l'aire totale du quadrant. L'aire du quadrant vaut:

$$\mathcal{Q} = \frac{\arccos\left(\frac{\tilde{\nu}_x}{2}\right)-\left(\frac{\tilde{\nu}_x}{2}\right)\sqrt{1-\left(\frac{\tilde{\nu}_x}{2}\right)^2}}{2}. \tag{C.7}$$

Quant à l'aire pointillée, si l'on pose:

$$\rho_1 = \sqrt{1-\left(\frac{\tilde{\nu}_x}{2}\right)^2}, \tag{C.8}$$

$$\rho_2 = \sqrt{1-\left(\frac{\tilde{\nu}_x}{2}\right)^2-\tilde{\mu}}, \tag{C.9}$$

$$\theta_1 \;=\; \arccos\left[\frac{1-\rho^2-\left(\frac{\tilde{\nu}_x}{2}\right)^2}{\rho\tilde{\nu}_x}\right], \tag{C.10}$$

elle sera égale à:

$$\mathcal{A} = \int_{\rho_2}^{\rho_1} \rho\, d\rho \int_{\theta_1}^{\pi/2} d\theta = \frac{\pi\tilde{\mu}}{4} - \int_{\rho_2}^{\rho_1} \theta_1 \rho\, d\rho. \tag{C.11}$$

Le calcul jusqu'à une formule finale de cette aire est encore assez long mais ce n'est plus qu'une question de technique pour aboutir à:

$$\begin{aligned} 2\mathcal{A} = \frac{\pi\tilde{\mu}}{4} \;&-\; x\arccos\left(\frac{a-x}{\tilde{\nu}_x\sqrt{x}}\right)\Bigg|_{a-\tilde{\mu}}^{a} - \frac{1}{2}\sqrt{\tilde{\nu}_x^2 x-(a-x)^2}\Bigg|_{a-\tilde{\mu}}^{a} \\ &-\; \arcsin\left\{\left[1+\left(\frac{\tilde{\nu}_x}{2}\right)^2 - x\right]/\tilde{\nu}_x\right\}\Bigg|_{a-\tilde{\mu}}^{a}, \end{aligned} \tag{C.12}$$

$$\text{avec} \quad a \;=\; 1-\left(\frac{\tilde{\nu}_x}{2}\right)^2. \tag{C.13}$$

Il reste pour terminer à soustraire $\mathcal{A}$ de $\mathcal{Q}$ pour trouver que:

$$\boxed{\begin{aligned} \Omega_{II}(\tilde{\nu}_x,\tilde{\mu}) \;&=\; \begin{cases} S & \text{si} \quad 0 \le S \le T \\ 1+\frac{2}{\pi}\left[S\arctan\left(\frac{|\tilde{\mu}|}{R}\right) - \arccos\left(\frac{R}{|\tilde{\nu}_x|}\right) - \frac{R}{2}\right] & \text{si} \quad S > T \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \\ \text{avec} \\ R^2 \;&=\; \tilde{\nu}_x^2\, S - \tilde{\mu}^2 \\ S \;&=\; 1-(\tilde{\nu}_x/2)^2 - |\tilde{\mu}| \\ T \;&=\; [1-(\tilde{\nu}_x/2)]^2. \end{aligned} \quad \text{(C.14)}}$$

C. Q. F. D.

Annexe D

Calcul de la FTO-3D cohérente

Nous désirons démontrer ici que la fonction l de l'équation (3.49) est exactement la FTO–3D cohérente de Sheppard (figure 3.10). Comme l est la transformée de Fourier axiale de c, partons plus simplement de l'expression (3.26) où nous poserons que $v_5 = 0$ et $v_s \longrightarrow 0$ puisque nous sommes dans le cas confocal pur. Si nous nous plaçons dans le système de coordonnées du centre du domaine de superposition Σ de la figure 3.4:

$$c(\tilde{\nu}_x, u_s) = C^{te} \exp(j u_s \tilde{\nu}_x^2/2) \iint_\Sigma \exp(j u_s \rho^2) \rho \, d\rho d\theta. \tag{D.1}$$

Le transformée de Fourier selon u_s est donc:

$$l(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}) = C^{te} \iint_\Sigma \delta[\rho^2 - (\tilde{\mu} - \tilde{\nu}_x^2/4)]. \tag{D.2}$$

La constante devant les intégrales n'est pas forcément égale à celle de la formule juste au–dessus. L'expression précédente se décompose avantageusement en:

$$\begin{aligned} \frac{l(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu})}{C^{te}} &= \int_0^{1-\tilde{\nu}_x/2} \int_0^{\pi/2} \delta[\rho^2 - (\tilde{\mu} - \tilde{\nu}_x^2/4)] \rho \, d\rho d\theta \\ &+ \int_{1-\tilde{\nu}_x/2}^{\sqrt{1-\tilde{\nu}_x^2/4}} \int_{\theta_1}^{\pi/2} \delta[\rho^2 - (\tilde{\mu} - \tilde{\nu}_x^2/4)] \rho \, d\rho d\theta, \end{aligned} \tag{D.3}$$

où la fonction θ_1 est exactement la même que celle de l'annexe B. La première moitié de cette expression est une constante sur une surface donnée. Cette surface est celle qui est ombrée du gris le plus sombre sur la figure 3.11. Ce plateau est aussi visible sur la figure 3.10. La seconde moitié de la formule précédente est définie sur la surface plus claire de la figure 3.11. La FTO–3D cohérente normalisée ω s'obtient facilement à partir de (D.3):

$$\omega(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu}) = \begin{cases} 1 & \text{si} \quad \frac{\tilde{\nu}_x^2}{4} \leq \tilde{\mu} \leq 1 - \tilde{\nu}_x \left(1 - \frac{\tilde{\nu}_x}{2}\right) \\ \frac{2}{\pi} \arcsin\left(\frac{1-\tilde{\mu}}{\tilde{\nu}_x \sqrt{\tilde{\mu} - \tilde{\nu}_x^2/4}}\right) & \text{si} \quad 1 - \tilde{\nu}_x \left(1 - \frac{\tilde{\nu}_x}{2}\right) \leq \tilde{\mu} \leq 1. \end{cases} \tag{D.4}$$

Cette expression est la même que celle dérivée par Sheppard dans [33]. Pour tenir compte de l'effet produit par un détecteur incohérent dans la restitution de l'image, il est donc nécessaire de multiplier c et c^* pour obtenir la FTO partiellement cohérente, ou d'effectuer l'inter–corrélation de $l(\tilde{\nu}_x, \tilde{\mu})$ avec $l(0, \tilde{\mu})$.

Annexe E

Liste des symboles

E.1 Coordonnées et variables

$\vec{m}(m_x, m_y)$	fréquences spatiales.
$\tilde{n}_x, \tilde{n}_y, \tilde{m}$	variables d'intégration muettes analogues à $\tilde{\nu}_x, \tilde{\nu}_y, \tilde{\mu}$.
$\vec{p}(p_x, p_y)$	fréquences spatiales.
$\vec{r}_i(x_i, y_i, z_i)$	vecteur 3D dont l'origine est attachée à celle du plan i. $i = 1$ pour la source, 3 pour l'objet, s pour la position de balayage et 5 pour le détecteur.
v	norme du vecteur (v_{xs}, v_{ys}).
$(\vec{v}_i(v_{xi}, v_{yi}), u_i)$	vecteur correspondant à $\vec{r}_i$, en coordonnées optiques généralisées.
$\vec{v}'_i(v'_{xi}, v'_{yi})$	variables muettes conjuguées de $\vec{v}_i$.
$\vec{x}_i(x_i, y_i)$	vecteur du plan i.
$(x_{o,i}, y_{o,i}, z_{o,i})$	point objet, resp. image.
θ	arctan $\frac{v_{ys}}{v_{xs}}$.
$\mu, \tilde{\mu}$	fréquence spatiale axiale et axiale normalisée.
$\tilde{\nu}$	norme du vecteur (ν_x, ν_y).
(ν_x, ν_y)	fréquences spatiales de l'objet.
$\vec{\nu}(\tilde{\nu}_x, \tilde{\nu}_y)$	fréquences spatiales normalisées de l'objet.
(ξ, η)	coordonnées pupillaires d'origine, le centre de la région de superposition Σ.
$\vec{\xi}_i(\xi_i, \eta_i)$	coordonnées normalisées des pupilles: $i = 2, 4$.
$\vec{\xi}'_i(\xi'_i, \eta'_i)$	coordonnées normalisées muettes des pupilles: $i = 2, 4$.
(ρ_i, θ_i)	coordonnées polaires normalisées des pupilles: $i = 2, 4$.
(ρ'_i, θ'_i)	coordonnées polaires normalisées muettes des pupilles: $i = 2, 4$.
(ρ_5, θ_5)	coordonnées polaires du plan du détecteur.
ϕ	arctan $\frac{\tilde{\nu}_y}{\tilde{\nu}_x}$.

E.2 Facteurs et constantes

a	taille des lentilles.
b	modulation complexe de la mire.
C_i^{te}	$i^{ème}$ constante.
$d_{1,2}$	distance source ou détecteur-lentille (resp. objet lentille).
f	distance focale.
$j_{1,1}$	plus petite racine de J_1.
k	nombre d'onde.
l_c	longueur de cohérence de la lumière.
$\mathcal{M}$	Matrice diagonale des facteurs de grandissement 3D.
M	d_i/d_o, grandissement latéral.
M_1	d_2/d_1, grandissement latéral
R_s, R_d	rayon de la source et du détecteur.
v_s, v_d	taille de la source et du détecteur en coordonnées optiques.
$\sin\alpha$	ouverture numérique coté objet.
(v_{sc}, v_{dc})	$minA_v$.
(v_{si}, v_{di})	couple de tailles de détecteur et de source pour lequel il existe une tangente horizontale en $\tilde{\mu} = 1$.
$\delta x, \delta z$	incertitudes sur les résolutions latérales et axiales dues au speckle.
Δ_i, Δ_o	distance d'un point image (resp. objet) à la lentille.
Δx	résolution latérale.
Δz	résolution axiale.
Γ	contraste du speckle.
$\lambda, \lambda_i, \lambda_f$	resp. longueur d'onde, longueur d'onde d'excitation, et de fluorescence.
$\tilde{\mu}_c$	$minA_{\tilde{\mu}}$.
$\tilde{\mu}_i$	racine de la FTO axiale.
$\tilde{\mu}_{Max}$	fréquence de coupure axiale maximale.
$\tilde{\nu}_{xMax}$	fréquence de coupure latérale maximale.
σ_h	rugosité moyenne de la surface.

E.3 Opérateurs et fonctions

c	FTO-2D cohérente.
C_r, C_i	partie réelle et imaginaire de $\mathcal{C}$.
$\mathcal{C}$	FTO-2D défocalisée.
$\mathcal{C}_{II}$	FTO-2D défocalisée du microscope confocal.
D_2	sensibilité du détecteur.
f	distribution de substance fluorescente.
$\mathcal{F}_i$	transformée de Fourier i-dimensionnelle.
h_1, h_2	réponses impulsionnelles des lentilles.
I_i	intensité de la lumière dans le plan i.
$\mathcal{I}$	image digitalisée de taille $N \times M$.
J_i	fonction de Bessel de première espèce d'ordre i.
l	FTO-3D cohérente du microscope confocal.
L	intensité intégrée.
L_v	intensité intégrée, théorie vectorielle non paraxiale.
$\mathcal{L}$	spectre 3D de l'image.
$p_{2,4}(x_{2,4}, y_{2,4})$	fonctions pupillaires de l'objectif et du collecteur.
$\mathcal{P}(x_{2,4}, y_{2,4}, z)$	fonctions pupillaires généralisées.
$\Re$	opérateur partie réelle.
S	émissivité d'une source 3D.
S_2	émissivité d'une source 3D.
t	réflectivité 3D de l'objet.
t_2	réflectivité 2D de l'objet.
T_2	spectre 2D de la mire.
U_i	amplitude de la lumière au voisinage du plan i.
γ	fonction de cohérence mutuelle, définie par l'équation A. 4.
$\delta()$	fonction percusssionnelle de Dirac.
Λ	FTO-3D non normalisée.
Λ_I	FTO-3D non normalisée du microscope de type I.
Λ_{II}	FTO-3D non normalisée du microscope confocal.
ω	FTO-3D cohérente normalisée du microscope confocal.
Ω	FTO-3D normalisée.
Ω_f	FTO-3D du microscope fluorescent.
Ω_1	fonction définie par l'équation 5. 10.
Ω_I	FTO-3D normalisée du microscope de type I.
Ω_{II}	FTO-3D normalisée du microscope confocal.
$1()$	fonction qui vaut 1 quelque soit son argument.

Bibliographie

[1] J. Z. Young and F. Roberts. *Nature*, (167):231, 1951.

[2] P. O. B. Montgomery, F. Roberts, and W. A. Bonner. *Nature*, (117):1172, 1956.

[3] W. T. Welford. *Scanning Image Microscopy*, chapter Theory and principles of optical scanning microscopy, pages 165–182. Academic Press, 1980.

[4] M. Minsky. U. S. Patent 3013467, Dec. 1961.

[5] M. Petran, M. Hadravsky, and A. Boyde. The tandem scanning reflected light microscope. *J. Opt. Soc. Am. A*, 58:661–664, 1968.

[6] P. Davidovits and M. D. Egger. *Nature*, (223):831, 1969.

[7] I. J. Cox, C. J. R. Sheppard, and T. Wilson. Super–resolution by confocal fluorescence microscopy. *Optik*, (60):391–396, 1982.

[8] D. K. Hamilton and T. Wilson. Surface profile measurement using the confocal microscope. *J. Appl. Phys.*, (53):5320–5322, 1982.

[9] D. K. Hamilton and T. Wilson. Three–dimensional surface measurement using the confocal scanning microscope. *Appl. Physics B*, (27):211–213, 1982.

[10] T. R. Corle, J. T. Fanton, and G. S. Kino. Distance measurement by differential confocal optical ranging. *Appl. Optics*, 26(12):2416–2420, 1987.

[11] I. J. Cox. Scanning optical fluorescence microscopy. *J. Micros.*, 133:149–154, 1984.

[12] T. Wilson. Imaging properties and applications of scanning optical microscopes. *Appl. Phys.* , (22):119–128, 1980.

[13] C. Peremarti. Microscope optique balayage pour l'étude des composants optoélectroniques. *Appl. Optics*, 23(2):344–347, 1984.

[14] R. W. Wijnaendts van Resandt. *Confocal microscopy*, chapter 13, pages 339–360. Academic Press, 1990.

[15] M. Kempe, T. Damm, and U. Stamm. A novel method for the improvement of the spatial resolution of a laser scanning microscope. *Optik*, 89(4):159–165, 1992.

[16] M. Bertero, P. Brianzi, and E. R. Pike. Superresolution in confocal scanning microscopy. *Inverse Problems*, (3):195–212, 1987.

[17] H. T. M. Van der Voort and G. J. Brakenhoff. Three–dimensional visualisation methods for confocal microscopy. *J. Micros.* , 153:123–132, 1989.

[18] C. J. R. Sheppard and A. Choudhury. Image formation in the scanning microscope. *Optica Acta*, 24(10):1051–1073, 1977.

[19] P. M. Duffieux. L'intégrale de fourier et ses applications à l'optique. Publication privée, Besançon, 1946.

[20] H. H. Hopkins. The frequency response of a defocused optical system. *Proc. Roy. Soc.*, 231:91–103, 1955.

[21] H. H. Hopkins. The frequency response of optical systems. *Proc. Phys. Soc. B*, 69:562–576, 1956.

[22] B. R. Frieden. Optical transfer of the three–dimensional object. *J. Opt. Soc. Am.* , 57(1):56–66, 1967.

[23] V. Drazic. Dependence of two– and three–dimensional optical transfer functions on pinhole radius in a coherent confocal microscope. *J. Opt. Soc. Am. A*, 9(5):725–731, 1992.

[24] C. J. R. Sheppard and M. Gu. Dependence of two– and three–dimensional optical transfer functions on pinhole radius in a coherent confocal microscope – comments. *J. Opt. Soc. Am. A*, 10(3):533–534, 1993.

[25] V. Drazic. Dependence of two– and three–dimensional optical transfer functions on pinhole radius in a coherent confocal microscope – reply to comments. *J. Opt. Soc. Am. A*, 10(3):535–537, 1993.

[26] V. Drazic. Three–dimensional transfer function of coherent confocal microscopes with extended source and detector. *J. Mod. Opt.* , 39(8):1777–1790, 1992.

[27] V. Drazic. Three–dimensional transfer function analysis of a confocal fluorescence microscope with finite sized source and detector. *J. Mod. Opt.* , 39(8):En cours d'impression, 1993.

[28] J. W. Goodman. *Introduction to Fourier Optics.* Mac Graw–Hill, 1968.

[29] T. Wilson. The role of detector geometry in confocal imaging. *J. Micros.* , 155:133–144, 1990.

[30] T. Wilson and A. R. Carlini. Three–dimensional imaging in confocal systems with finite sized detectors. *J. Micros.* , 149:51–66, 1988.

[31] T. Wilson and A. R. Carlini. Size of the detector in confocal imaging systems. *Opt. Lett.* , 12(4):227–229, 1987.

[32] M. Born and E. Wolf. *Principles of Optics.* Pergamon Press, 1970.

[33] C. J. R. Sheppard, M. Gu, and X. Q. Mao. Three–dimensional coherent transfer function in a reflection–mode confocal scanning microscope. *Opt. Comm.* , 81(5):281–284, 1991.

[34] R. E. Burge and J. C. Dainty. Partially coherent image formation in the scanning transmission electron microscope (stem). *Optik*, 46(3):229–240, 1976.

[35] T. Wilson and C. J. R. Sheppard. *Theory and practice of scanning optical microscopy.* Academic Press, 1984.

[36] Per A. Stokseth. Properties of a defocused optical system. *J. Opt. Soc. Am.* , 59(10):1314–1321, 1969.

[37] G. A. Korn and T. M. Korn. *Mathematical handbook for scientists and engineers.* McGraw–Hill, 1968.

[38] N. Streibl. Three–dimensional imaging by a microscope. *J. Opt. Soc. Am. A*, 2(2):121–127, 1985.

[39] C. J. R. Sheppard and X. Q. Mao. Three–dimensional imaging in a microscope. *J. Opt. Soc. Am. A*, 6(9):1260–1269, 1989.

[40] T. Wilson and A. R. Carlini. Size of the detector in confocal imaging. *Opt. Let.* , 12(4):227–229, 1987.

[41] T. Wilson and A. R. Carlini. Three–dimensional imaging in confocal imaging systems with finite sized detectors. *J. Micros.* , 149(1):51–66, 1988.

[42] M. Glass and T. Dabbs. The experimental effect of detector size on confocal lateral resolution. *J. Micros.* , 165(2):153–158, 1991.

[43] T. Dabbs and M. Glass. Fiber–optic confocal microscope: Focon. *Appl. Opt.* , 31(16):3030–3035, 1992.

[44] C. J. R. Sheppard. Optical resolution and the spatial frequency cut–off. *Optik*, 66(4):311–315, 1984.

[45] B. Gröbler. Die 3–d–aperturen verschiedener mikroskoptypen als unmittelbare folge der zugehörigen übertragungsgleichungen. *Optik*, 83(4):139–144, 1989.

[46] S. Kimura and C. Munakata. Calculation of three–dimensional optical transfer function for a confocal scanning fluorescent microscope. *J. Opt. Soc. Am. A*, 6(7):1015–1019, 1989.

[47] O. Nakamura and S. Kawata. Three–dimensional transfer–function analysis of the tomographic capability of a confocal fluorescence microscope. *J. Opt. Soc. Am. A*, 7(3):522–526, 1990.

[48] H. T. M. van der Voort and G. J. Brakenhoff. 3–d image formation in high–aperture fluorescence microscopy: a numerical analysis. *J. Micros.* , 158(1):43–54, 1990.

[49] H. T. M. van der Voort, G. J. Brakenhoff, and G. C. A. M. Janssen. Determination of the 3–dimensional optical properties of a confocal scanning laser microscope. *Optik*, 78(2):48–53, 1988.

[50] S. Kimura and C. Munakata. Dependence of 3–d optical transfer functions on the pinhole radius in a fluorescent confocal optical microscope. *Appl. Opt.* , 29(20):3007–3011, 1989.

[51] S. Kimura and C. Munakata. Three–dimensional optical transfer function for the fluorescent scanning optical microscope with a slit. *Appl. Opt.* , 29(7):1004–1007, 1990.

[52] S. Kawata, R. Arimoto, and O. Nakamura. Three–dimensional optical transfer function analysis for a laser scan fluorescence microscope with an extended detector. *J. Opt. Soc. Am. A*, 8(1):171–175, 1991.

[53] M. Gu and C. J. R. Sheppard. Effects of a finite–sized detector on the otf of confocal fluorescent microscopy. *Optik*, 89(2):65–69, 1991.

[54] A. P. Prudnikov, Y. A. Brychkov, and O. I. Marichev. *Integrals and series: special functions*, volume 2. Gordon Breach Science Publishers, 1986.

[55] S. F. Gibson and F. Lanni. Experimental test of an analytical model of aberration in an oil–immersion objective lens used in three–dimensional light microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A*, 8(10):1601–1613, 1991.

[56] E. Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems i. an integral representation of the image field. *Proc. Roy. Soc.* , A243:349–357, 1959.

[57] B. Richards and E. Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems ii: Structure of the image fields in an aplanatic system. *Proc. Roy. Soc.* , A243:358–379, 1959.

[58] A. Boivin and E. Wolf. Electromagnetic field in the neighborhood of the focus of a coherent beam. *Phys. Rev. B*, 138(6), 1965.

[59] A. Boivin, J. Dow, and E. Wolf. Energy flow in the neighborhood of the focus of a coherent beam. *J. Opt. Soc. Am.* , 57(10):1171–1175, 1967.

[60] T. R. Corle, G. H. Chou, and G. S. Kino. Depth response of confocal optical microscopes. *Opt. Let.* , 11(12):770–772, 1986.

[61] R. Ho and Z. Shao. Axial resolution of confocal microscopes revisited. *Optik*, 88(4):147–154, 1991.

[62] K. Leonhardt, K. H. Rippert, and H. J. Tiziani. Optical methods of measuring rough surfaces. In *Surface measurement and characterisation*, volume 1009, 1988.

[63] Y. Fainman, E. Lenz, and J. Shamir. Optical profilometer: a new method for high sensitivity and wide dynamic range. *Appl. Opt.* , 21(17):3200–3208, 1982.

[64] T. Damm, M. Kempe, and U. Stamm. Optical distance measurement based on confocal imaging. *Optik*, 86(4):144–147, 1991.

[65] G. Häusler and J. M. Herrmann. Physical limits of 3d-sensing. In *SPIE Proc. CR46*, 1992.

[66] H. M. Pedersen. On the contrast of polychromatic speckle patterns and its dependence on the surface roughness. *Opt. Acta*, 22(1):15–24, 1975.

Curriculum Vitae

Valter Drazic
né le 12 avril 1963
à Zadar (Croatie)
nationalité française
marié, 2 enfants

Formation

1970-1971	Ecole primaire de Bischwiller (France)
1972-1974	Ecole primaire de Kali (Yougoslavie)
1975-1976	Ecole primaire de Bischwiller
1977-1983	Lycée de Bischwiller
juillet 1983	Baccalauréat série C
1983-1985	DEUG A, Université Louis Pasteur, Strasbourg
1985-1988	Ecole Nationale Supérieure de Physique de Strasbourg, option Optique
1988-1989	DEA des Systèmes Photoniques, Université Louis Pasteur

Expériences professionnelles

juillet 1986	Stage au Groupe de Recherche en Photonique Appliquée. Conception et fabrication d'un circuit électronique.
août-septembre 1986	Technicien chez Cordons et équipements. Câblage et test de cartes de communication digitales pour réseaux à fibres optiques.
juillet-août 1987	Stage à l'INSERM, faculté de médecine de Strasbourg. Logiciel de manipulation d'images.
février-juillet 1988	Stage de fin d'études, société XIAL, Strasbourg. Mesure d'épaisseur de films holographiques.
novembre 1988 - juillet 1989	Stage de DEA à l'Institut de Métrologie et de Régulation de l'Université de Karlsruhe. Contrôle visuel automatique.
depuis août 1989	Assistant universitaire à l'Institut Franco-Allemand pour les Applications de la Recherche, Université (TH) de Karlsruhe.

ISBN 3-86111-603-0