



**HAL**  
open science

# Formation et restauration d'images en microscopie à rayons X. Application à l'observation d'échantillons biologiques

Jean-Baptiste Sibarita

► **To cite this version:**

Jean-Baptiste Sibarita. Formation et restauration d'images en microscopie à rayons X. Application à l'observation d'échantillons biologiques. Modélisation et simulation. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 1996. Français. NNT: . tel-00345364

**HAL Id: tel-00345364**

**<https://theses.hal.science/tel-00345364>**

Submitted on 10 Dec 2008

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

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

# **THESE**

présentée par

**Jean-Baptiste SIBARITA**

pour obtenir le titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE Joseph FOURIER -  
GRENOBLE I

(Arrêtés ministériels du 5 Juillet 1984 et 30 Mars 1992)

**Spécialité : Physique**

---

**FORMATION ET RESTAURATION DES IMAGES EN  
MICROSCOPIE A RAYONS X &  
APPLICATION A L'OBSERVATION D'ECHANTILLONS  
BIOLOGIQUES**

---

Date de Soutenance : 22 Octobre 1996

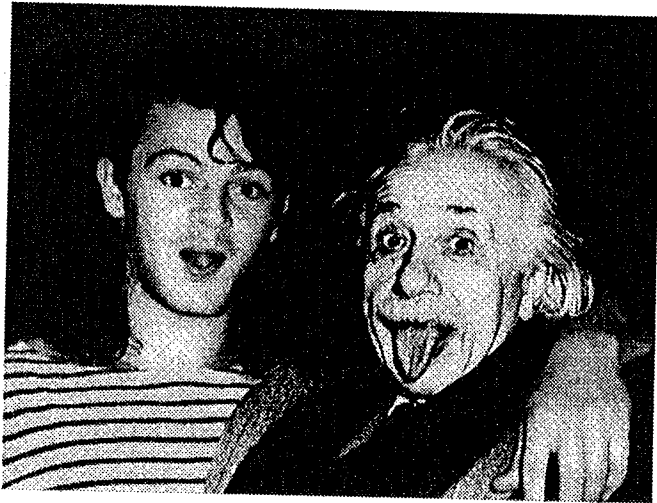
Composition du Jury :

Vallade Marcel	Président
Cazaux Jacques	Rapporteur
Jourlin Michel	Rapporteur
Chassery Jean-Marc	Examineur
Robert-Nicoud Michel	Examineur
Susini Jean	Examineur

Thèse préparée au sein du laboratoire INFODIS-TIMC - Institut IMAG - URA-CNRS  
en co-direction avec le laboratoire DyOGen  
Laboratoire d'accueil : ESRF



*« L'imagination est plus importante que le savoir.  
Le savoir est limité.  
L'imagination englobe le monde » (Albert Einstein)*



*... et l'image crée le lien entre l'imagination et le savoir*

*à mes parents  
à mon grand-père  
à Stéphane*



# Résumé

Technique récente, la microscopie à rayons X offre aujourd'hui une résolution spatiale supérieure à celle de la microscopie optique (20 nm contre 200 nm en microscopie optique confocal laser). Elle offre également un meilleur pouvoir de pénétration que la microscopie électronique (jusqu'à 10  $\mu\text{m}$  contre 1  $\mu\text{m}$  en microscopie électronique à moyenne et haute tension). Ainsi, la microscopie à rayons X mous (longueurs d'onde comprises entre 2,4 et 4,3 nanomètres) permet l'analyse à haute résolution en 2 ou 3 dimensions d'échantillons biologiques placés dans des conditions proches de leur milieu naturel (contrairement aux microscopes électroniques classiques qui imposent une préparation des échantillons).

Cependant, la réduction de la dose absorbée par l'échantillon nécessite des durées d'expositions aussi courtes que possible. Or, effectuer une acquisition avec peu de photons se fait au détriment du rapport signal sur bruit des images. Un de nos objectifs a été le développement d'outils pour l'amélioration et la restauration de ces images.

La première partie de nos travaux a consisté à déterminer la fonction de transfert du microscope à rayons X en transmission et à comparer les résultats obtenus avec le modèle théorique de la formation des images. Dans la seconde partie, nous avons complété les modèles existants liant le nombre de photons et le contraste, en prenant en compte le mode de formation des images dans le microscope. La troisième partie de ces travaux concerne le développement de techniques de traitement numérique des images dans le but d'améliorer et de restaurer des images obtenues par microscopie à rayons X avec de faibles temps d'exposition. Ces processus ont été appliqués à l'étude par microscopie à rayons X de différents types d'échantillons biologiques.

Ces travaux ont été réalisés au sein du laboratoire INFODIS/TIMC, en co-direction avec le laboratoire DyOGen et avec la collaboration du laboratoire de F.E. Röntgenphysik (Göttingen, Allemagne) et de l'ESRF (Grenoble).



# Abstract

X-ray microscopy offers a higher spatial resolution than optical microscopy (20 nm versus 200 nm for confocal laser microscopy), and provides a higher penetration power than electron microscopy (about 10  $\mu\text{m}$  versus 1  $\mu\text{m}$  in electron microscopy). Consequently, soft x-ray microscopy (wavelengths between 2.4 and 4.3 nm) allows 2D or 3D high resolution analysis of biological specimens in their native state, i.e. in an aqueous environment and without fixation.

However, in order to minimise the radiation dose applied on the sample, it is necessary to keep exposure time as short as possible. Unfortunately, acquiring images with few photons, leads to images with low signal to noise ratio. One of our objectives was to develop tools for image enhancement and image restoration, in order to compensate this low image quality.

The first part of our work was devoted to the determination of the transfer function of the x-ray microscope, and to the comparison of the results with the theoretical model of image formation. In the second part, we have modified existing models dealing with the relationship between the number of photons and the contrast by taking into account the image formation process in the microscope. The third part of this work concerns the development of specific numerical treatments for image enhancement and image restoration applied on x-ray microscopy images obtained with short exposure time. These procedures were applied to study various biological samples in x-ray microscopy.





# Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe INFODIS du laboratoire TIMC-IMAG de Grenoble.

Je tiens à remercier Monsieur Marcel VALLADE, Professeur à l'UJF, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse et pour ses remarques constructives.

Je remercie Monsieur Jacques CAZAUX, Professeur à l'Université de Reims, qui m'a fait le plaisir de juger mon travail, pour avoir accepté d'être rapporteur. Son expérience dans le domaine de la microscopie à rayons X fait que sa présence dans mon jury est un honneur pour moi.

J'adresse également mes vifs remerciements à Monsieur Michel JOURLIN, Professeur à l'Université de Lyon, pour s'être intéressé à mes travaux et pour avoir accepté la lourde charge d'être rapporteur de ma thèse, malgré la tourmente d'un déménagement.

Merci à Monsieur Jean SUSINI, Directeur de la ligne de lumière pour la microscopie à rayons X à l'ESRF, pour tout l'intérêt qu'il a porté à mes travaux et pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Ce travail a été dirigée par Monsieur Jean-Marc CHASSERY, Directeur de Recherche au CNRS. Je tiens à le remercier pour la confiance qu'il m'a accordé en m'accueillant dans son laboratoire, et pour m'avoir constamment soutenu au cours de ces trois années.

J'adresse toute ma reconnaissance à Monsieur Michel ROBERT-NICOUD, Professeur à l'UJF, pour m'avoir accepté au sein de son équipe en tant que Co-Directeur, pour avoir montré tant d'égard envers mes recherches, et pour m'avoir permis de devenir biologiste le temps de quelques manips.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Günter SCHMAHL, Professeur à l'Université de Göttingen en Allemagne et Directeur du laboratoire F.E. Röntgenphysik, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et m'avoir permis de réaliser cette passionnante collaboration. Merci également à l'A.P.A.P.E., pour avoir financé cet échange franco-allemand par l'intermédiaire du programme PROCOPE.

Ce programme d'échange à été réalisé avec Johannes LEHR, à qui j'adresse toute mon estime et ma sympathie, pour l'aide qu'il a su m'apporter, pour m'avoir inculqué les bonnes traditions allemandes..., et pour s'être si facilement adapté aux traditions françaises...

Je tiens également à remercier Gerd SCHNEIDER et Peter GUTTMANN, pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée lors des acquisitions réalisées sur le microscope à rayons X à BESSY, et pour leur gentillesse.

Je tiens à exprimer ma sympathie à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au sein de l'IAB pour l'aide qu'elles m'ont toujours prodiguée.

A Yves USSON, chargé de Recherche au CNRS, pour m'avoir fait bénéficier de son expérience dans les domaines de la microscopie et du traitement d'images.

A Guy BOURREL, Ingénieur de Recherche CNRS, qui domine parfaitement la situation lorsque l'une des nombreuses pannes du système survient et pour sa sympathie,

A Paulette SOUILLARD et Nicole BROCHIER, nos secrétaires indispensables, tant pour leur efficacité que pour leur joie de vivre,

A tous les membres du laboratoire DyOGen, pour m'avoir appris ce que je sais de la biologie, et plus particulièrement à Fabien MONGELARD pour s'être impliqué dans la préparation d'échantillons biologiques pour la microscopie à rayons X et Karine MONIER pour les longues et passionnantes discussions que nous avons eues.

Sans oublier tous mes collègues informaticiens et biologistes, Pascal JAILLON, William et Magali PUECH, Christèle PERRIN, Franck DAVOINE, Pascal BERTOLINO, Mahnu PROMAYON et Pascal BENISTAN pour l'ambiance de travail et de fête qu'ils font régner au sein de l'IAB, ainsi que tous les membres d'INFODIS, SIC et RFMQ que je n'ai pas cité.

Enfin, merci à Lolotte, pour m'avoir toujours épaulé efficacement, pour ton soutien moral, tes corrections et tes bon "petits" plats.

# Sommaire

<b>1. Introduction.....</b>	<b>11</b>
1.1 Introduction.....	11
1.2 Objectifs.....	13
1.3 Plan.....	14
<b>2. Généralités sur la microscopie à rayons X.....</b>	<b>17</b>
2.1 Historique de la microscopie à rayons X.....	17
2.2 Propriétés de la microscopie à rayons X.....	20
2.3 Interaction des rayons X mous avec la matière.....	21
<b>3. Le microscope à rayons X en transmission de Göttingen à BESSY</b>	<b>27</b>
3.1 L'instrumentation.....	28
3.1.1 L'E.S.R. (Electron Storage Ring) BESSY à Berlin.....	29
3.1.2 Zones de Fresnel.....	29
3.1.3 Principe de fonctionnement du microscope à rayons X.....	31
3.1.3.1 Schéma du TXM.....	31
3.1.3.2 Le condenseur.....	32
3.1.3.3 Formation de l'image à travers l'objectif.....	33
3.1.3.4 Numérisation de l'image.....	33
3.1.4 Spécificités du TXM de Göttingen à BESSY.....	34
3.1.4.1 Préparation des échantillons dans l'air.....	34
3.1.4.2 Le microscope optique photonique incorporé.....	35
3.1.4.3 Les supports spécifiques.....	36
3.2 Applications biologiques.....	37
3.2.1 Objets tests.....	37
3.2.2 Chromosomes polyténiques en milieux aqueux.....	38
3.2.2.1 Organisation des chromosomes polyténiques [Berkaloff 81].....	39
3.2.2.2 Observation au TXM de Göttingen à BESSY.....	42
3.2.3 Marquage sur hybridation in situ.....	47
3.2.4 Coupes sériées d'objets épais.....	49
3.3 Conclusion sur le TXM de Göttingen à BESSY.....	51
<b>4. Étude de la formation des images en microscopie à rayons X.....</b>	<b>53</b>
4.1 Préliminaires mathématiques.....	54
4.1.1 Systèmes linéaires et invariants par translation.....	54
4.1.1.1 La réponse impulsionnelle (PSF).....	55
4.1.1.2 La fonction de transfert.....	56
4.1.1.3 La fonction de ligne (LSF).....	57
4.1.1.4 La fonction de bord (ESF).....	59
4.1.2 Mathématiques de l'échantillonnage.....	61

4.2	Étude théorique de la formation des images par les zones de Fresnel.....	64
4.2.1	Théorie fondamentale de la diffraction .....	64
4.2.2	Formule de Fresnel-Kirchoff.....	67
4.2.3	Diffraction de Fraunhofer et de Fresnel .....	68
4.2.4	Les zones de Fresnel.....	70
4.2.4.1	Caractéristiques géométriques des zones de Fresnel .....	70
4.2.4.2	Amplitude d'une zone de Fresnel .....	73
4.2.4.3	Efficacité des zones de Fresnel en tenant compte de l'absorption.....	77
4.2.4.4	Figure de diffraction d'une zone de Fresnel .....	79
4.3	Étude expérimentale de la réponse impulsionnelle du microscope.....	87
4.3.1	Les différentes approches pour la mesure de la PSF .....	87
4.3.1.1	Détermination à partir d'une micro-bille.....	87
4.3.1.2	Détermination à partir d'un bord .....	88
4.3.1.3	Détermination à partir d'objets tests périodiques .....	89
4.3.2	Détermination de la PSF par interpolation .....	90
4.3.3	Étapes pour la détermination de la PSF du TXM.....	91
4.3.4	Résultats de la détermination expérimentale de la PSF du microscope ...	94
4.3.5	Mesure de l'anisotropie et de la symétrie.....	100
4.3.6	Détermination de la PSF 3D.....	108
4.4	Conclusion sur l'étude de la formation des images en microscopie à rayons X	113
<b>5.</b>	<b>Dommages occasionnés par les radiations.....</b>	<b>115</b>
5.1	Généralités sur les radiations .....	116
5.2	Dose et radiations .....	117
5.3	Prise en compte de la formation des images pour l'estimation des dommages	120
5.3.1	Prise en compte de l'échantillonnage.....	121
5.3.2	Prise en compte de la résolution.....	121
5.3.3	Prise en compte de l'efficacité des micro-zones de Fresnel.....	123
5.3.4	Application numérique à un problème concret en biologie.....	124
5.4	Observation directe des dommages sur échantillons biologiques .....	129
5.4.1	Échantillons non fixés .....	130
5.4.2	Échantillons fixés .....	132
5.4.3	Échantillons congelés .....	133
5.5	Synthèse sur l'effet des radiations.....	134
<b>6.</b>	<b>Amélioration des images et restauration .....</b>	<b>137</b>
6.1	Introduction générale sur le traitement numérique des images .....	137
6.2	Les outils pour le pré-traitement des images .....	138
6.2.1	Modification d'histogramme .....	139
6.2.1.1	Expansion de la dynamique .....	139
6.2.1.2	Egalisation d'histogramme .....	140
6.2.1.3	Spécification d'histogramme .....	141
6.2.2	Estimation du niveau bruit dans les images .....	142
6.2.3	Comparaison des images entre elles (SNR) .....	143
6.2.4	Séparation d'un noyau de convolution Gaussien .....	144
6.3	Correction de la non homogénéité du fond .....	146

---

6.3.1 Correction par balayage du condenseur .....	148
6.3.2 Correction par l'image d'un champ plat .....	149
6.3.3 Correction par interpolation .....	150
6.4 Amélioration du contraste par restauration .....	153
6.4.1 Généralités sur la restauration d'images .....	154
6.4.2 L'algorithme de Richardson-Lucy .....	156
6.4.2.1 Effets du niveau de bruit des images sur les résultats .....	159
6.4.2.2 Effets du choix de la PSF sur les résultats .....	163
6.4.3 Application à un problème concret de la biologie .....	166
6.5 Coopération restauration/filtrage dans domaine de Fourier pour le débruitage d'images .....	168
6.5.1 Déconvolution avec un noyau spécifique .....	169
6.5.2 Suppression de la texture dans le domaine de Fourier .....	173
6.5.3 Application itérative du processus restauration + filtrage .....	179
6.5.4 Conclusion sur le débruitage d'images .....	184
6.6 Reconstruction d'images à grande profondeur de champ .....	185
6.6.1 Détails de la méthode .....	186
6.6.2 Applications .....	187
6.6.2.1 Images acquise en réflexion .....	187
6.6.2.2 Images acquises en transmission .....	190
6.6.3 Conclusion .....	192
6.7 Synthèse sur le traitement d'images en microscopie à rayons X .....	192
<b>7. Conclusion et perspectives .....</b>	<b>195</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>197</b>
<b>Annexe A .....</b>	<b>207</b>

# Table des figures

1-1. Résolution des différentes techniques de microscopie.....	12
2-1. Sections efficaces du carbone.....	22
2-2. Facteurs de diffusion $f_1$ et $f_2$ pour l'or et le carbone .....	23
2-3. Coefficients d'absorption pour l'eau et la protéine .....	25
3-1. Photographie du microscope à rayons X de Göttingen à BESSY .....	28
3-2. Images des anneaux internes (gauche) et externes (droite) d'une MZP.....	30
3-3. Schéma du microscope en transmission de Göttingen à BESSY (TXM) .....	31
3-4. Images de cellules de Kupffer fixées.....	32
3-5. Schéma mécanique du microscope à rayons X de Göttingen à BESSY .....	34
3-6. Schéma des supports d'échantillons biologiques utilisés sur le TXM.....	36
3-7. Images de différents objets tests utilisés pour mesurer la résolution du TXM .....	38
3-8. Chromosomes polyténiques de glandes salivaires de chironomes .....	40
3-9. Schéma de l'ossature d'un chromosome polyténique.....	41
3-10. Région d'un chromosome polyténique de Chironomus Thummi non fixé.....	42
3-11. Détail des acquisitions réalisées pour effectuer le mosaïquage.....	43
3-12. Région de chromosome polyténique de Chironomus Thummi fixé.....	44-45
3-13. Région de chromosome polyténique de Chironomus vitrifiés .....	46-47
3-14. Hybridation in situ sur chromosome humain .....	48
3-15. Principe d'acquisition des coupes optiques d'un objet.....	49
3-16. Coupes optiques de lepthotrix réalisées sur le TXM.....	50
3-17. Coupes axiales reconstruites à partir des coupes optiques .....	51
4-1. Formation de l'image à travers une zone de Fresnel.....	54
4-2. Détermination de la fonction de ligne (LSF) d'un système LSI .....	58
4-3. Relation entre la fonction de ligne et la fonction de transfert d'un système LSI .....	58
4-4. Détermination de la fonction de bord (ESF) d'un système LSI.....	60
4-5. Relation entre l'ESF et la LSF d'un système LSI.....	60
4-6. Schématisation du processus d'échantillonnage .....	61
4-7. Schéma explicatif du théorème d'échantillonnage.....	62
4-8. Surface d'intégration pour démontrer le théorème de Kirchoff.....	65
4-9. Géométrie pour la formule de Fresnel-Kirchoff.....	67
4-10. Diffraction par une ouverture de Fraunhofer et de Fresnel .....	69
4-11. Géométrie pour distinguer les diffractions de Fresnel et de Fraunhofer .....	69
4-12. Zones de Fresnel.....	71
4-13. Géométrie pour calculer la contribution à l'amplitude d'une zone de Fresnel.....	75
4-14. Géométrie des zones de Fresnel avec ses ordres de diffraction .....	77
4-15. Géométrie pour la détermination de la PSF du système.....	80
4-16. Géométrie pour le calcul de l'OTF dans le cas de l'éclairage incohérent.....	81
4-17. OTF et PSF théoriques calculés pour MZP39.....	82
4-18. Evolution de $\Delta f$ , de la largeur du champ et du rapport $\Delta f/\delta$ en fonction de $dr_N$ .....	84
4-19. Détermination de la direction du bord et mesure de l'ESF.....	92

4-20. Exemples de détermination de l'ESF par interpolation.....	93
4-21. Résultats de la détermination expérimentale de la LSF par interpolation .....	94
4-22. Résultats de la détermination expérimentale de la PSF par interpolation .....	96
4-23. Galerie d'images d'un objet test acquises avec différents objectifs.....	99
4-24. Méthode utilisée pour la mesure de l'anisotropie horizontale du système.....	100
4-25. Méthode utilisée pour la détermination de l'anisotropie verticale du système ....	101
4-26. Détermination des points de mesure de l'anisotropie/symétrie pour MZP20 .....	101
4-27. Détermination des angles $\alpha_{h_i}$ et $\alpha_{v_i}$ pour le $i^{\text{ème}}$ point d'intersection.....	102
4-28. Résultats de la mesure de l'anisotropie horizontale de la LSF pour MZP20 .....	103
4-29. Résultats de la mesure de l'anisotropie verticale de la LSF pour MZP20.....	104
4-30. Résultats de la mesure de l'anisotropie horizontale de la LSF pour MZP39 .....	105
4-31. Résultats de la mesure de l'anisotropie verticale de la LSF pour MZP39.....	106
4-32. FWHM horizontales et verticales pour MZP20 et MZP39.....	107
4-33. Exemple de non symétrie de la PSF .....	108
4-34. Schéma explicatif pour la détermination de la PSF 3D du microscope.....	108
4-35. Résultats de l'extraction de la PSF 3D pour MZP20 .....	110
4-36. Résultats de l'extraction de la PSF 3D pour MZP39 .....	111
4-37. Coupe longitudinale de la PSF 3D du microscope à rayons X, pour MZP 20.....	112
4-38. Coupe longitudinale de la PSF 3D du microscope à rayons X, pour MZP 39.....	112
4-39. PSF expérimentale 3D d'un microscope laser à balayage.....	112
4-40. Evolution FWHM de la PSF en fonction de z .....	113
5-1. Modèle utilisé pour le calcul de la dose absorbée par un cube isolé .....	118
5-2. Évolution de $I_{max} - I$ en fonction de la taille et de l'environnement de l'objet.....	123
5-3. Schéma de l'organisation chromosomique.....	125
5-4. Dose minimale nécessaire à l'observation d'une structure isolée.....	128
5-5. Effets des radiations sur échantillons non fixés en milieu aqueux .....	131
5-6. Effets des radiations sur échantillons fixés en milieux aqueux .....	132
5-7. Région de chromosome polyténique vitrifiés .....	134
6-1. Masques pour la mesure de l'isotropie locale.....	142
6-2. Séparation d'un noyau de convolution Gaussien.....	145
6-3. Principe de convolution d'une image par une Gaussienne séparable.....	146
6-4. Image d'un champs plat et les profil d'intensités associés .....	147
6-5. Résultat de la correction du fond par balayage du condenseur .....	148
6-6. Résultat de la correction du fond par interpolation.....	152
6-7. Profils d'intensité du fond et de la solution de l'interpolation .....	153
6-8. Schéma-bloc modélisant le processus de dégradations d'images.....	155
6-9. Evolution des paramètres $\alpha$ et $\phi$ au cours de l'algorithme de Richardson-Lucy ....	160
6-10. Résultats de la restauration avec l'algorithme de Richardson-Lucy.....	161
6-11. Résultats de la restauration avec l'algorithme de Richardson-Lucy.....	163
6-12. Evolution des paramètres $\alpha$ et $\phi$ au cours de l'algorithme de Richardson-Lucy ..	164
6-13. Résultats de la restauration avec l'algorithme de Richardson-Lucy.....	165
6-14. Images d'hybridation in situ après correction du fond et restauration.....	167
6-15. Images analytiques utilisées pour illustrer le débruitage .....	170
6-16. Résultats de la restauration avec l'algorithme de Richardson-Lucy.....	172
6-17. Profils des spectres des images restaurées avant et après filtrage.....	174



---

6-18. Détermination des paramètres pour le filtrage dans le domaine de Fourier.....	175
6-19. Résultats du filtrage dans le domaine de Fourier .....	178
6-20. Résultats du processus itératif restauration + filtrage .....	184
6-21. Schéma explicatif pour l'acquisition d'une série de coupes optiques .....	186
6-22. Schéma pour le calcul d'images à grandes profondeurs de champ.....	187
6-23. Série de coupes optiques acquises en réflexion.....	189
6-24. Reconstruction à partir de la série de coupes optiques en réflexion.....	189
6-25. Coupes optiques réalisées sur le TXM de Göttingen à BESSY .....	191
6-26. Reconstruction à partir de la série de coupes optiques acquises au TXM.....	191

# 1. Introduction

## 1.1 Introduction

Depuis l'instant où, pour la première fois au XVI<sup>e</sup> siècle, l'image agrandie d'un objet a été observée au moyen d'une loupe, un nombre sans cesse croissant de techniques se sont développées pour l'observation de l'infiniment petit. Au cours des siècles, la microscopie s'est imposée comme un outil indispensable pour étudier les propriétés de la matière inerte et vivante. Récemment, avec le développement de nouveaux modes d'observations, il est devenu possible d'accéder à un niveau de perception de plus en plus fin, pour atteindre aujourd'hui l'échelle atomique.

Jusqu'au début du XX<sup>e</sup> siècle, la microscopie photonique optique a été l'unique et indispensable outil pour l'observation d'échantillons biologiques. Puis, l'explosion de la microscopie électronique dans les années 1940, permettant d'atteindre des résolutions cent fois supérieures à celles obtenues par la microscopie photonique, a permis aux chercheurs de progresser rapidement dans l'étude des ultrastructures. Cette technique de microscopie qui utilise un faisceau d'électron comme rayonnement s'est alors imposée depuis plusieurs dizaines d'années comme étant l'outil de référence pour l'observation à haute résolution de structures biologiques. Dans la course à la résolution, les microscopies dites de proximité ont vu le jour au début des années 1980 avec la microscopie à effet tunnel, puis la microscopie à force atomique, permettant d'atteindre une résolution atomique. Dans ce cas, une sonde est positionnée à quelques nanomètres

de la surface de l'échantillon puis déplacée à distance constante de manière à révéler la topographie de l'échantillon. Parallèlement, d'autres techniques de microscopie se sont développées, dans un objectif de complémentarité avec les techniques déjà existantes, et moins dans le but d'augmenter la résolution. Parmi elles, la microscopie acoustique, la microscopie ionique et microscopie à rayons X exploitent des sources variées de rayonnement qui interagissent différemment avec la matière, et permettent ainsi d'accéder à des informations différentes.

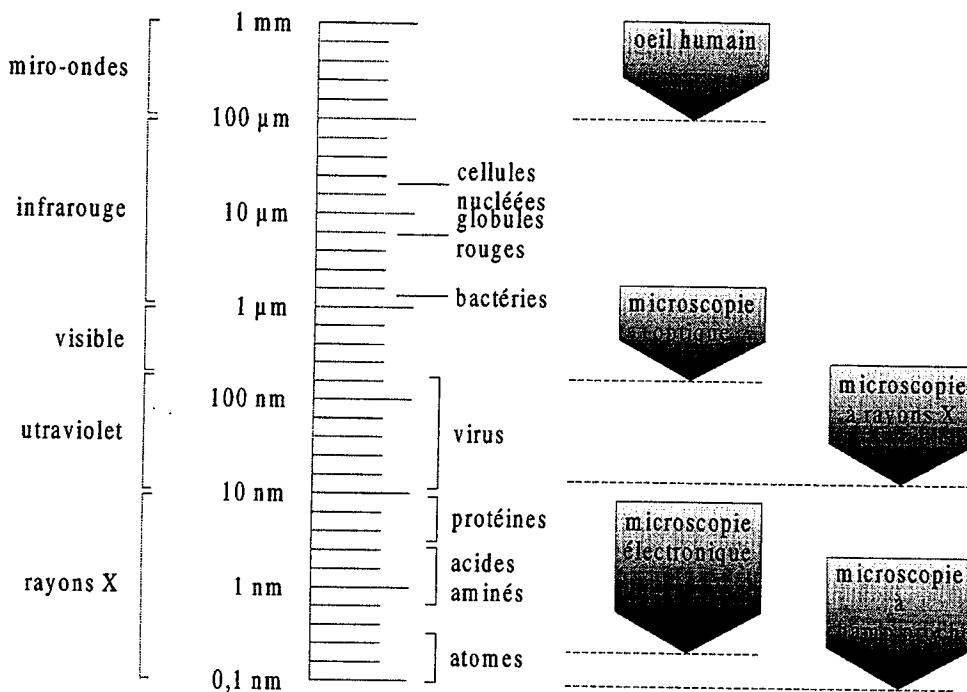


Figure 1-1. Résolution des différentes techniques de microscopie.

Chaque technique possède ses propres caractéristiques, ses avantages, ses inconvénients et ses limites. L'image obtenue dépend complètement de la nature du rayonnement, et de l'interaction de ce rayonnement avec la matière. L'interprétation des images fait donc appel à une connaissance précise des interactions entre la matière et le rayonnement. Cette phase d'interprétation des images microscopiques est de grande importance, car l'exactitude des conclusions sur la nature de l'objet en dépend.

La qualité des images et l'information qu'elles contiennent sont les principaux points qui caractérisent une technique donnée, et la phase finale d'analyse et d'interprétation en dépend beaucoup. L'utilisation d'outils pour le traitement d'images

comme étape intermédiaire entre le processus d'acquisition et la phase d'interprétation est une pratique de plus en plus courante. En effet, les progrès effectués dans ce domaine et dans celui de l'informatique, rendent l'utilisation de ces outils accessibles à tous. Ces outils sont de plus en plus présents dans le domaine de la microscopie, et il est du devoir de tout microscopiste de se tenir au courant de leurs évolutions. Quelques exemples peuvent être cités à ce sujet : il peut s'agir de rendre nette une image floue, d'améliorer le contraste d'une image, de filtrer du bruit ou encore de reconnaître et compter certains types de structures dans une préparation. Il devient indispensable qu'il y ait un contact permanent entre le biologiste qui veut étudier une préparation, le microscopiste qui va fournir un outil avec des caractéristiques et des contraintes, et enfin l'informaticien qui va traiter l'image et si besoin est, développer des outils spécifiques.

C'est précisément dans cette optique que se sont déroulés nos travaux, dont l'objectif était de développer des outils pour le traitement des images pour la microscopie à rayons X. Compte tenu de ces limitations de ce type de microscope, une étude au préalable du système optique a permis de développer des outils spécifiques de traitement d'images afin de pallier à ces contraintes. Notre objectif a été de fournir des images d'une qualité la meilleure possible afin de faciliter toute phase ultérieure d'interprétation ou de traitement automatique des données.

## 1.2 Objectifs

Les objectifs de nos travaux de thèse ont été de mesurer les diverses formes de dégradations agissant au niveau de la formation des images dans le but de pouvoir les corriger à l'aide de techniques numériques de traitement d'images. Ces dégradations peuvent être issues du processus même de formation des images ainsi qu'aux effets des radiations sur la structure de l'échantillon.

Les aspects que nous avons abordés dans ce mémoire sont, dans un premier lieu la correction de la non homogénéité du fond, qui gêne l'interprétation des images et rend impossible toute phase ultérieure de mesures quantitatives. Puis, nous nous sommes

intéressés à l'aspect restauration d'images dont le but est d'augmenter la résolution et le contraste des images. Ceci implique la détermination au préalable du mode de formation des images dans le microscope et la connaissance de la nature du bruit présent dans les images.

Enfin, tout comme la microscopie électronique, la microscopie à rayons X est une technique invasive, où les échantillons observés subissent des dommages irréversibles durant leur exposition au rayonnement X. Pour cette raison, nous sommes intéressés aux problèmes des dommages occasionnés par les radiations X sur les échantillons biologiques. Dans ce contexte, nous proposons une technique de restauration et de débruitage des images acquises avec de courts temps d'exposition, afin de réduire au maximum la dose absorbée par l'échantillon, tout en conservant une bonne qualité d'image.

## 1.3 Plan

Ce mémoire de thèse est articulé de la façon suivante :

Le chapitre 2 donne des généralités sur la microscopie à rayons X, en rappelant les équations qui décrivent le contraste dans les images.

Le chapitre 3 est consacré dans une première partie à la présentation du microscope à rayons X en transmission (TXM) de Göttingen, sur lequel nous avons effectué toutes les acquisitions. Dans une seconde partie, nous présentons et discutons des résultats de l'observation au TXM de préparations d'échantillons biologiques suivant différents protocoles.

Le chapitre 4, concerne l'étude de la fonction de transfert du microscope. En s'appuyant sur le modèle théorique de formation des images dans une lentille de Fresnel, nous proposons une méthode rapide, simple à implémenter et robuste au bruit pour la détermination expérimentale de cette fonction.

Le chapitre 5 présente une étude des effets des radiations X sur les échantillons biologiques. Nous proposons de calculer la dose minimale nécessaire à l'observation de structures isolées en se basant sur un modèle existant que nous avons complété par la prise en compte du phénomène de formation des images. Nous verrons que l'impact de cette prise en compte sur le calcul de la dose est loin d'être négligeable dans le cas d'observation de structures dont les dimensions sont proches de la limite de résolution du microscope.

Le chapitre 6 est consacré à l'amélioration et la restauration des images appliquées à la microscopie à rayons X. Dans ce chapitre, nous proposons un ensemble d'outils pour l'amélioration de la qualité des images, avec les objectifs suivants :

- corriger la non homogénéité du champ,
- augmenter le contraste et la résolution des images par des techniques de restauration, en prenant en compte le modèle de formation des images développé dans le chapitre 3,
- baisser le niveau de bruit des images à l'aide d'un filtrage adapté dans le domaine de Fourier combiné avec une étape de restauration.

Le chapitre 7 est une conclusion générale de l'ensemble des travaux présentés, en rappelant les raisons de nos choix et les motifs qui les ont orientés. C'est dans ce chapitre également que nous exposons les perspectives de ce travail de thèse.

Un travail bibliographique sur les différentes techniques de microscopie est présenté en annexe. Ce travail expose chaque technique sous forme de fiches, afin de faciliter la compréhension de leur principe de fonctionnement et leur comparaison.



## 2. Généralités sur la microscopie à rayons X

Alors que l'on vient de célébrer le centenaire de la découverte des rayons X par W.R. Röntgen, nombreuses sont les applications qui se sont développées autour de ce rayonnement. Parmi les plus récentes, la microscopie à rayons X fait actuellement partie des techniques en plein essor...

Dans ce chapitre, nous introduirons la microscopie à rayons X par son historique [Kirz 85], de manière à comprendre les raisons qui ont fait que cette technique n'est en plein essor que depuis quelques années. Puis, nous présenterons brièvement les points forts qui caractérisent la microscopie à rayons X. Enfin, nous terminerons ce chapitre par une présentation des interactions entre les rayons X mous et la matière, qui sont à l'origine du contraste dans les images, et nous conclurons.

### 2.1 Historique de la microscopie à rayons X

Dès l'annonce de la découverte des rayons X par W. Röntgen en 1895 [Röntgen 1895], les chercheurs ont souhaité utiliser ce rayonnement afin de construire un microscope à rayons X. Ce rayonnement capable de traverser la matière et dont la longueur d'onde est 10 fois plus petite que celle de la lumière semblait offrir une



nouvelle dimension à la microscopie : la possibilité d'observer des échantillons épais avec une meilleure résolution. Cependant, on s'aperçut très vite que les rayons X ne pouvaient être ni réfléchis ni réfractés comme la lumière visible. La première utilisation de ce rayonnement fût la micro-radiographie de contact, où un échantillon est placé au contact d'un film photographique et éclairé par un faisceau de rayons X. Le film, sensible aux rayons X, est alors plus ou moins impressionné en fonction de l'épaisseur et de la constitution de l'objet. L'observation du film au microscope photonique révèle ainsi la structure de l'objet. Cette technique, encore utilisée aujourd'hui pour son moindre coût, offrait pour la première fois une observation d'échantillons épais.

Lorsqu'en 1923, le physicien A. Compton montra qu'une surface parfaitement polie pouvait réfléchir les rayons X qui l'atteignent sous une incidence rasante, l'enthousiasme repris. C'est ainsi qu'en 1940, P. Kirkpatrick et son équipe décidèrent de construire le premier microscope à rayons X de l'histoire. Mais les précisions que nécessitaient les surfaces réfléchissantes étaient inaccessibles à l'époque et les résultats furent décevants. Les résolutions ne dépassaient pas celles atteintes par la microscopie photonique.

Avec la montée en force de la microscopie électronique dans les années 1940, les recherches sur la microscopie à rayons X furent délaissées. Tous les efforts se concentrèrent sur la microscopie électronique dont la résolution dépassa rapidement celle des microscopes photoniques.

Ce n'est qu'avec les progrès des nouvelles sources de rayons X, et notamment les sources de rayonnement synchrotron, que les études furent progressivement relancées. Ces dernières permettent d'obtenir des faisceaux de rayons X dont la brillance est plusieurs millions de fois supérieure à celles des tubes de rayons X. Les sources de rayons X à plasma et les lasers à rayons X permettent également de libérer, en une seule impulsion, suffisamment de photons X pour former une image en quelques nanosecondes.

Les détecteurs de rayons X ont également progressé. Les émulsions photographiques ont progressivement été remplacées par des résines photosensibles de résolution 100 fois supérieure et des détecteurs électroniques (CCD) ont été mis au point. Mais malgré tous ces progrès, l'impossibilité de focaliser les rayons X, frein majeur au développement de la microscopie à rayons X, subsistait.

Ce n'est qu'en 1960 qu'Albert Baez proposa d'utiliser les zones de Fresnel pour focaliser les rayons X. Ces zones sont constituées d'anneaux concentriques à alternance transparents et opaques et dont l'espacement diminue avec la distance au centre. Elles permettent de diffracter les rayons X incidents afin de les concentrer au même point focal. Une des propriétés de ces lentilles est d'offrir une résolution proportionnelle à la taille du dernier anneau. Ainsi, la micro-fabrication de ces lentilles est restée pendant longtemps une limitation à la résolution, et aujourd'hui encore de nombreux laboratoires concentrent leurs efforts sur ce sujet.

La première technique de micro-fabrication des zones de Fresnel ayant donné des résultats probants fut l'holographie. Cette méthode implantée par G. Schmahl et D. Rudolph de l'Université de Göttingen permettait d'enregistrer un hologramme avec la forme d'une zone de Fresnel dans une résine photosensible. Mais la limitation de cette méthode qui ne permettait pas de fabriquer d'anneaux de largeur inférieure à 50 nm restait insatisfaisante pour les chercheurs.

C'est au centre de recherche d'IBM de Yorktown Heights que les premières zones de Fresnel furent dessinées en utilisant la technique de micro-gravure par un faisceau d'électron. Ce principe de micro-fabrication reste encore aujourd'hui celui qui produit les meilleures zones de Fresnel, même s'il a beaucoup évolué depuis son apparition. Les zones sont gravées dans des matériaux comme l'or, le nickel ou le germanium et les anneaux les plus petits atteignent 20 nm de largeur. Des nouvelles techniques de fabrication basées sur le principe de pulvérisation sur un tore en rotation sont en cours de développement, et l'on espère ainsi pouvoir générer des zones de l'ordre de 10 nm de largeur.

Ce n'est qu'en 1974 que les premières images de microscopie à rayons X avec une résolution inférieure à 100 nm furent obtenues. Depuis ce temps, les microscopes à rayons X à haute résolution se sont développés avec des résolutions expérimentales atteignant aujourd'hui 20 à 30 nm. On distinguera deux techniques de microscopie, à savoir la microscopie à balayage et la microscopie à image directe. La première technique nécessite une source synchrotron comme source de lumière alors que la seconde peut être implantée sur une source à plasma ou une source laser.

Dans le cadre de nos travaux nous avons utilisé le microscope à rayons X à image directe de l'Université de Göttingen, avec qui nous avons établi une collaboration dans le cadre de ce travail. Nous détaillerons le microscope à rayons X en transmission (TXM) sur lequel nous avons effectué toutes nos acquisitions.

## 2.2 Propriétés de la microscopie à rayons X

La microscopie à rayons X offre aujourd'hui un pouvoir de résolution bien supérieur à celui de la microscopie photonique (20 nm contre 200 nm en microscopie optique confocale laser) et un pouvoir de pénétration plus élevé que la microscopie électronique (jusqu'à 10  $\mu\text{m}$  contre 1  $\mu\text{m}$ ). Le gros avantage est que la microscopie à rayons X « mous » (longueurs d'onde comprises entre 2,4 et 4,3 nanomètres) analyse avec une haute résolution des échantillons placés dans l'air ou dans l'eau, ce qui permet d'étudier les échantillons biologiques dans des conditions proches de leur état naturel (contrairement aux microscopes électroniques classiques qui imposent une préparation des échantillons). Enfin, pour une résolution donnée, les doses absorbées par les échantillons sont inférieures à celles occasionnées en microscopie électronique. Ceci vient du fait que dans la gamme de longueurs d'onde utilisée, les sections efficaces d'absorption sont d'un ordre de grandeur plus petits que les sections efficaces de diffusion des électrons dans l'intervalle d'énergie où la microscopie électronique est performante.

L'intervalle de longueurs d'onde compris entre l'absorption de la couche  $K$  de l'oxygène ( $\lambda = 2,34$  nm) et du carbone ( $\lambda = 4,38$  nm) est très intéressant car, dans cet intervalle de longueurs d'onde, les radiations sont très peu absorbées par l'eau mais très absorbées par la matière organique ce qui a pour effet d'engendrer un très bon contraste pour les spécimens hydratés.

En plus du contraste dû à l'absorption photoélectrique, le contraste de phase peut être utilisé en microscopie à rayons X, et ceci notamment dans les petites gammes de longueurs d'onde ( $\lambda = 0,3$  nm).

Cette gamme de longueurs d'onde (rayons X durs) ne fait pas l'objet de nos travaux, mais il est à noter qu'une ligne de lumière réservée à la microscopie à rayons X travaillant dans tout le spectre d'énergies, en partant des X mous jusqu'aux X durs, est en cours d'élaboration à l'ESRF [Susini 97]. Ces énergies permettront d'atteindre les couches  $K$  et  $L$  d'éléments plus lourds, de numéro atomique  $Z$  compris entre 10 (Néon) et 20 (Calcium), et ouvrent ainsi de nouvelles perspectives notamment pour la cartographie d'éléments chimiques. Cette technique d'imagerie déjà utilisée dans la gamme des rayons X mous [Zhang 94], [Buckley 95] utilise les zones spectrales de transitions électroniques d'un élément donné à étudier pour le localiser. Pour cela, il faut un système pouvant moduler facilement sa longueur d'onde incidente, et c'est une des principales applications de la microscopie à rayons X à balayage.

## 2.3 Interaction des rayons X mous avec la matière

Dans cette section, nous nous intéresserons aux relations régissant les interactions entre les rayons X mous et la matière, et plus particulièrement aux principaux mécanismes à l'origine du contraste. Cette phase nous permettra de mieux comprendre et interpréter les images issues de la microscopie à rayons X.

Lorsqu'un photon atteint une cible, divers types d'interactions sont possibles. Ces interactions sont l'absorption photoélectrique et la diffusion élastique et inélastique.

La section efficace  $\sigma$  (exprimé en barns : 1 barn =  $10^{-24}$  cm<sup>2</sup>) donne une mesure de ces différentes interactions. Elle exprime la probabilité surfacique qu'un photon interagisse avec sa cible.

Dans l'intervalle des X mous (énergies inférieures à 1 KeV) le phénomène d'absorption photoélectrique est l'interaction prédominante, comme cela est illustré sur la Figure 2-1. Par conséquent, la section efficace totale  $\sigma_T$  est égale à la section efficace d'absorption  $\sigma_{abs}$ , et est donné par la relation (2-4)

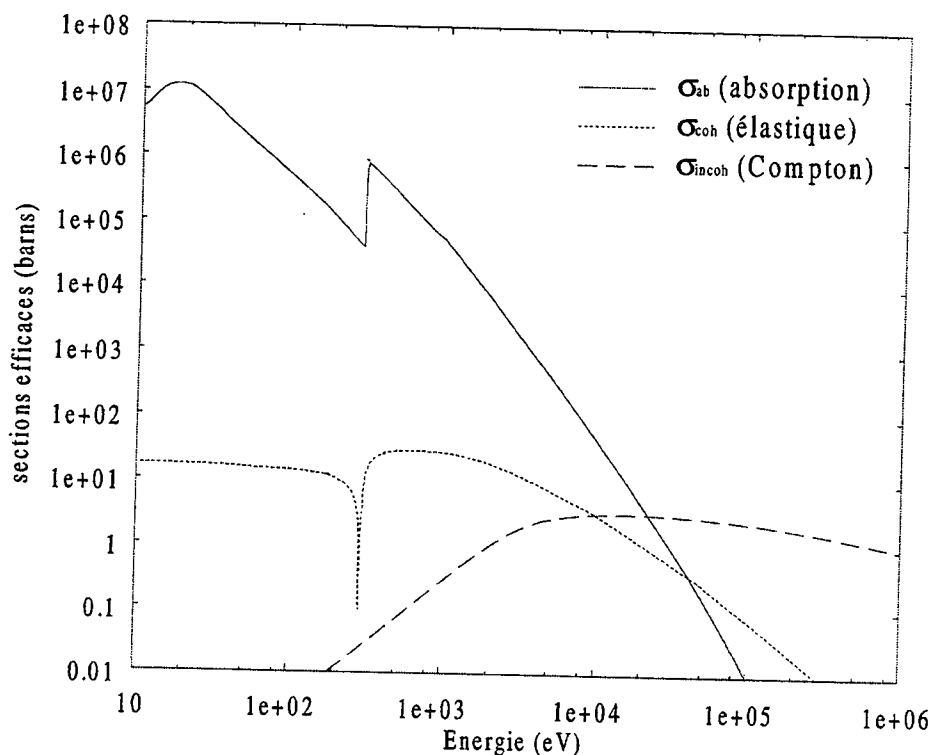


Figure 2-1: Sections efficaces du carbone. Dans la gamme d'énergie utilisée en microscopie à rayons X mous (énergies inférieures à 550 eV), l'absorption est l'interaction prédominante. Extrait de [Kirz 94].

Dans cette gamme d'énergie, il est conventionnel de décomposer l'indice de réfraction  $\tilde{n}$  du milieu traversé comme suit

$$\tilde{n} = 1 - \delta + i\beta \quad (2-1)$$

où

$$\delta = \frac{r_e \lambda^2}{2\pi} n_a f_1 \quad (2-2)$$

$$\beta = \frac{r_e \lambda^2}{2\pi} n_a f_2 \quad (2-3)$$

$f_1$  et  $f_2$  étant les facteurs de diffusion tabulés par Henke et al. [Henke 93] pour tous les éléments,  $r_e$  est le rayon classique de l'électron et  $n_a$  le nombre d'atomes par unité de volume du milieu considéré.

La section efficace totale peut s'écrire sous la forme

$$\sigma_T = \sigma_{\text{abs}} = 2\lambda r_e f_2 = \frac{4\pi}{n_a \lambda} \beta \quad (2-4)$$

Deux exemples pour  $f_1$  et  $f_2$  sont représentés sur la Figure 2-2.

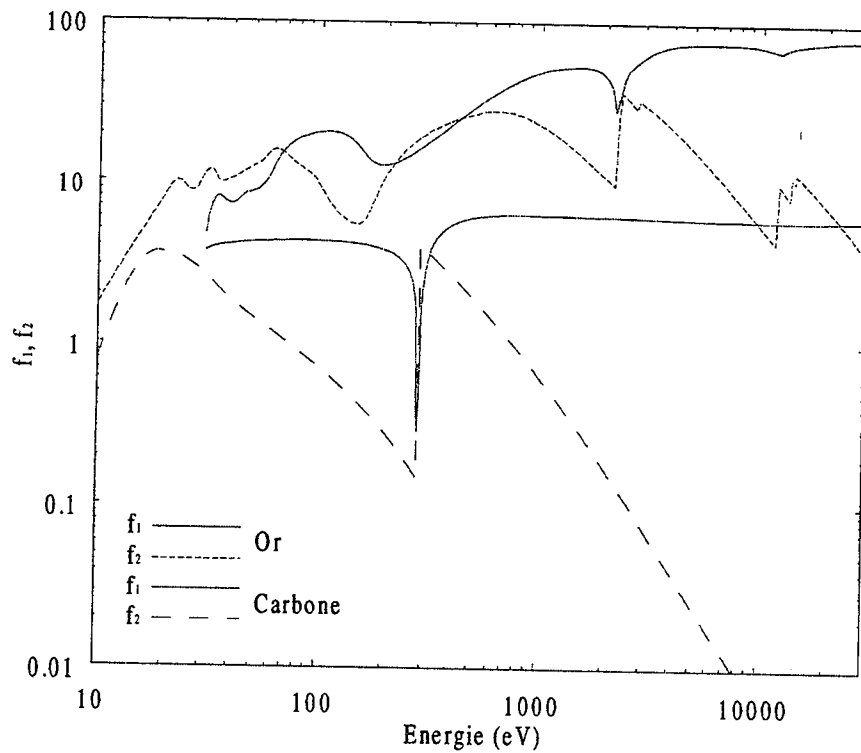


Figure 2-2. Facteurs de diffusion  $f_1$  et  $f_2$  pour l'or et le carbone. Courbes extraites des tables de Henke [Henke 93].

Ainsi, lorsqu'une onde d'amplitude  $U = U_0 \exp(-ik_0 r)$  traverse un milieu d'indice  $\tilde{n}$  et d'épaisseur  $t$ , elle se transforme en  $U = U_0 \exp(-i\tilde{n}k_0 t)$ , où  $U_0$  et  $k_0$  désignent respectivement l'amplitude de l'onde et le nombre d'onde. On obtient alors

$$U = U_0 \exp(-ik_0 t) \exp(i\delta k_0 t) \exp(-\beta k_0 t) \quad (2-5)$$

L'intensité  $I = |U|^2$  de l'onde résultante devient alors

$$I = I_0 \exp(-2\beta k_0 t) = I_0 \exp(-\mu t) \quad (2-6)$$

$\mu$  étant le coefficient d'absorption.

Son déphasage est

$$\varphi(t) = \delta k_0 t = \frac{2\pi}{\lambda} \delta t \quad (2-7)$$

L'étude de ces relations nous montre que le paramètre  $\beta$  décrit l'absorption des rayons X incidents par le milieu traversé (équation 2-5). Une conséquence de ce phénomène d'absorption photoélectrique est la génération d'électrons secondaires, à l'origine des dégradations de l'échantillon dues aux radiations incidentes.

Quand au paramètre  $1-\delta$ , il décrit l'indice de réfraction du milieu et est à l'origine du déphasage de l'onde (équation 2-7). Il est exploité lors de l'imagerie en contraste de phase.

La pénétration des rayons X dans la matière est un phénomène important pour bien comprendre le mécanisme de contraste des images acquises. Elle est exprimée par le coefficient d'absorption  $\mu$  (exprimé en  $\mu\text{m}^{-1}$ ) introduit dans l'équation (2-6), et que l'on peut développer sous la forme

$$\mu = \frac{4\pi}{\lambda} \beta = 2r_e \lambda n_a f_2 = n_a \sigma_T \quad (2-8)$$

Pour une molécule  $m$  quelconque, le nombre d'atomes par unité de volume  $n_a$  est  $\rho N_A / M$ , où  $N_A$  est le nombre d'Avogadro,  $M$  la masse molaire de la molécule et  $\rho$  sa densité. Les facteurs de diffusion  $f_1$  et  $f_2$  peuvent être approximés par

$$f_1^m = \sum_j n_j f_1^j \quad \text{et} \quad f_2^m = \sum_j n_j f_2^j \quad (2-9)$$

où  $n_j$  représente le nombre d'atomes  $j$  dans la molécule considérée.

Le facteur d'absorption est ainsi complètement caractérisé pour une molécule donnée. La Figure 2-3 illustre l'application de ce calcul pour l'eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\rho = 1 \text{ g/ml}$ ) et une protéine ( $\text{C}_{94}\text{H}_{139}\text{N}_{24}\text{O}_{31}\text{S}$ ,  $\rho = 1,35 \text{ g/ml}$ ). Au regard de cette figure, on voit très nettement que dans la région de 280 eV à 540 eV (longueurs d'ondes comprises entre 2,3 et 4,3 nm) les rayons X seront 6 à 10 fois plus absorbés par la protéine que par l'eau.

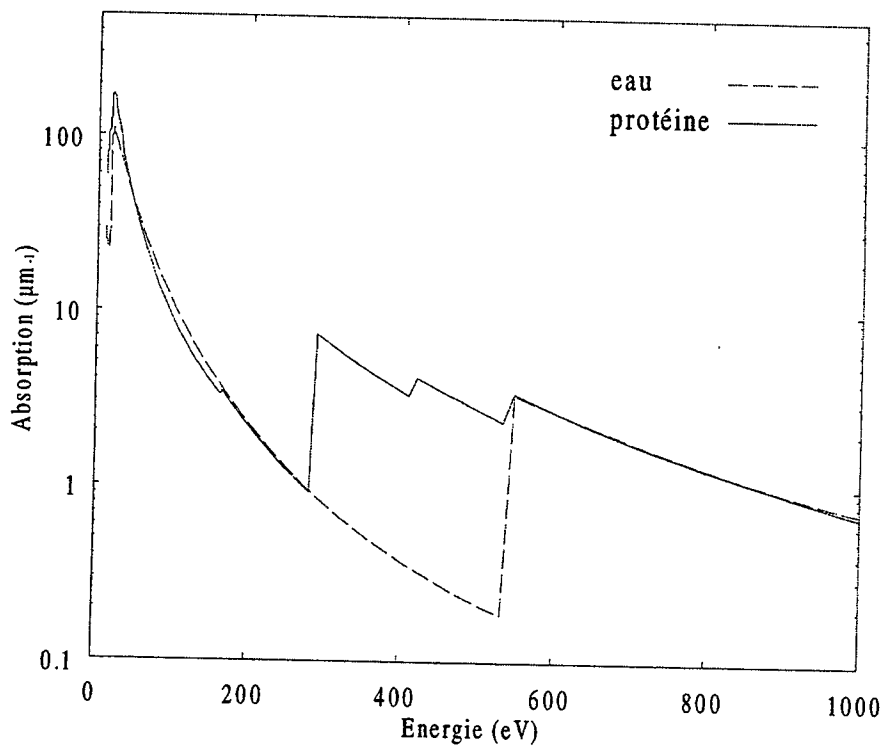


Figure 2-3. Coefficients d'absorption pour l'eau et la protéine.

Ainsi, les rayons X passant à travers un échantillon dans une région contenant de la matière organique seront beaucoup plus absorbés que dans une région contenant de l'eau. Ceci justifie la présence d'un très bon contraste naturel des échantillons biologiques dans leur milieu naturel, ce qui est un des très gros atouts offert par la microscopie à rayons X. Pour ces raisons, cette région spectrale, appelée *fenêtre d'eau*, est très utilisée en microscopie à rayons X.



Enfin, un dernier point important pour la caractérisation de la microscopie à rayons X est les dommages causés par les radiations X sur l'échantillon. Ils constituent une forme de limitation à l'observation d'objets biologiques. En effet, ces derniers sont très sensibles aux radiations et peuvent subir des modifications de structures irréversibles durant l'irradiation rendant ainsi toute reproductibilité des mesures impossible, et pouvant également être à l'origine d'artefacts. Le chapitre 5 est entièrement réservé à ce problème ; il présente une étude théorique des effets des radiations sur les échantillons ainsi que des exemples d'observation directe de ces effets.

Pour conclure ce chapitre, nous avons décrit les propriétés majeures qui caractérisent la microscopie à rayons X par l'intermédiaire des équations à l'origine du contraste dans les images. Nous avons vu que les interactions entre le rayonnement X "mou" et la matière donnent aux rayons X "mous" la particularité d'être à la fois très pénétrant, et également d'offrir un très bon contraste naturel entre l'eau et la matière organique. Par conséquent, la microscopie à rayons X s'avère être un outil approprié pour l'observation avec une haute résolution d'échantillons biologiques dans leur milieu aqueux naturel en deux ou trois dimensions. Enfin, la microscopie à rayons X est une microscopie invasive puisqu'elle engendre une dégradation de l'échantillon. Même si les dommages occasionnés par les rayons X restent inférieurs à ceux occasionnés par la microscopie électronique, ils demeurent un facteur limitatif pour l'investigation d'échantillons biologiques, particulièrement sensibles à ce phénomène. Le chapitre 5 traite uniquement ce sujet.

### 3. Le microscope à rayons X en transmission de Göttingen à BESSY

Depuis 1974, le laboratoire F.E Röntgenphysik de Göttingen est impliqué dans le développement d'un microscope à rayons X en transmission (TXM) [Niemann 74]. Implanté sur le site synchrotron de BESSY à Berlin depuis 1983, il a été un des premiers microscopes à rayons X permettant d'obtenir des images d'échantillons biologiques dans leur milieu naturel. Depuis sa première installation sur ce site [Rudolph 84], beaucoup de modifications ont été apportées à ce microscope afin qu'il puisse être utilisé en routine pour l'analyse d'échantillons biologiques. De plus, il permet depuis peu d'accéder à l'information tri-dimensionnelle par stéréoscopie ou tomographie [Lehr 96]. Ce TXM est utilisé en collaboration avec différents groupes de recherche travaillant dans des domaines d'applications aussi variés que la biologie, la biophysique, la recherche médicale, la chimie et l'étude des sols.

Dans ce chapitre, nous décrivons d'une part le TXM de Göttingen à BESSY. D'autre part, nous présenterons les applications biologiques sur lesquelles nous avons travaillé.

### 3.1 L'instrumentation

Le microscope à rayons X en transmission de Göttingen à BESSY est utilisé à la longueur d'onde de 2,4 nm, ce qui correspond à une énergie de 514 eV [Niemann 94]. Cette longueur d'onde est située dans la *fenêtre d'eau* entre le seuil d'absorption de l'oxygène et celui du carbone (Figure 2-3). Par conséquent, le rayonnement incident est absorbé 10 fois plus par le carbone (principal constituant de la matière organique) que par l'eau, ce qui permet d'obtenir des images avec un très bon contraste naturel. Ce microscope offre la possibilité d'observer des images d'échantillons biologiques dans leur milieu naturel avec une résolution bien supérieure à celle de la microscopie optique photonique. Dans la gamme de longueur d'ondes utilisée, les rayons X étant très absorbés par l'air, seule la partie contenant l'échantillon est placée à l'air, le reste du microscope étant sous vide.

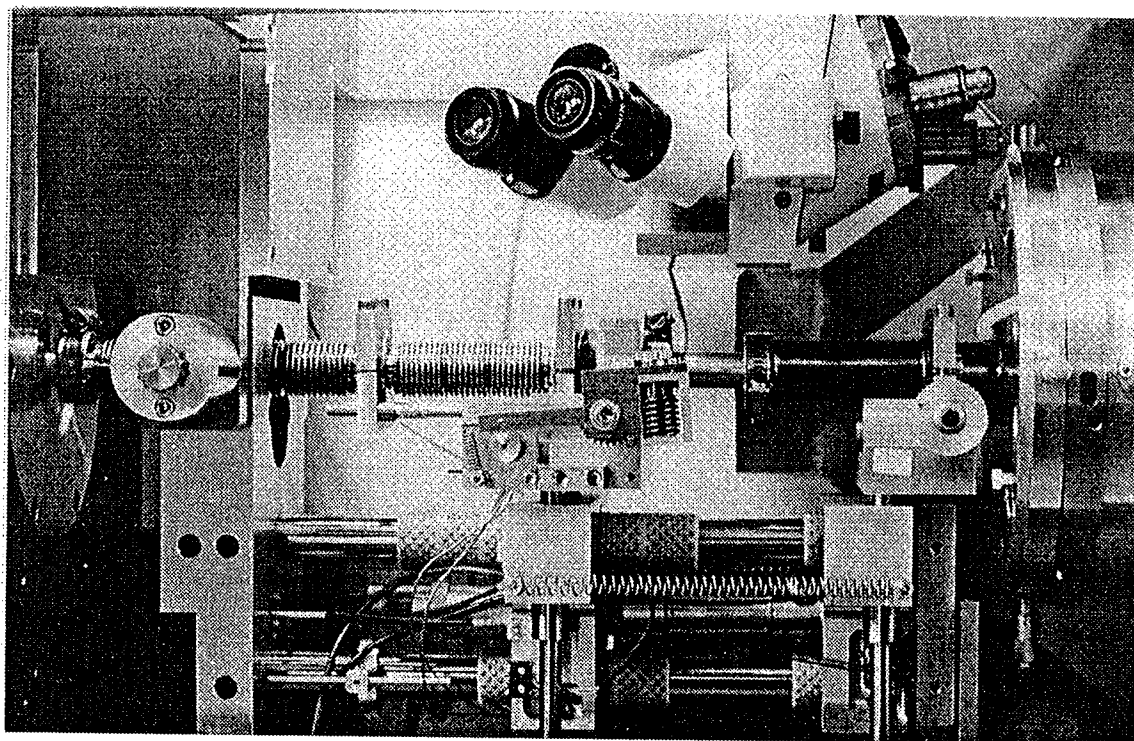


Figure 3-1. Photographie du microscope à rayons X de Göttingen à BESSY.

Cette section est une description complète du microscope sur lequel nous avons effectué toutes les acquisitions.

### 3.1.1 L'E.S.R. (Electron Storage Ring) BESSY à Berlin

L'E.S.R. BESSY situé à Berlin offre un faisceau d'électrons de 800 MeV et une longueur d'onde critique de 2 nm. La ligne de lumière pour la microscopie à rayons X est montée à la sortie d'un aimant de courbure ("bending magnet") et la brillance du faisceau est de  $2 \cdot 10^{13}$  photons  $\text{sec}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{mrad}^{-1}$ . La monochromaticité est de 0,1 % pour une énergie de 500 eV et un courant de 500 mA.

### 3.1.2 Zones de Fresnel

Dans le chapitre 2, nous avons vu que dans la gamme des rayons X "mous", l'interaction prédominante était l'absorption photoélectrique. Les rayons X ne peuvent par conséquent être ni réfléchis ni réfractés. Il est par conséquent impossible de les focaliser avec des lentilles classiques comme celles utilisées en microscopie photonique optique. De ce fait, on utilise des optiques de diffraction, principalement des zones de Fresnel, pour focaliser les rayons. Ces zones, dont le principe de fonctionnement est décrit en détail dans le chapitre 4, sont constituées d'anneaux concentriques transparents et opaques en alternance, et dont la largeur décroît avec la distance au centre. Par analogie avec la microscopie conventionnelle on utilise des zones de Fresnel condensatrices (KZP) jouant le rôle de condenseur et des micro-zones de Fresnel (MZP) jouant le rôle d'objectif.

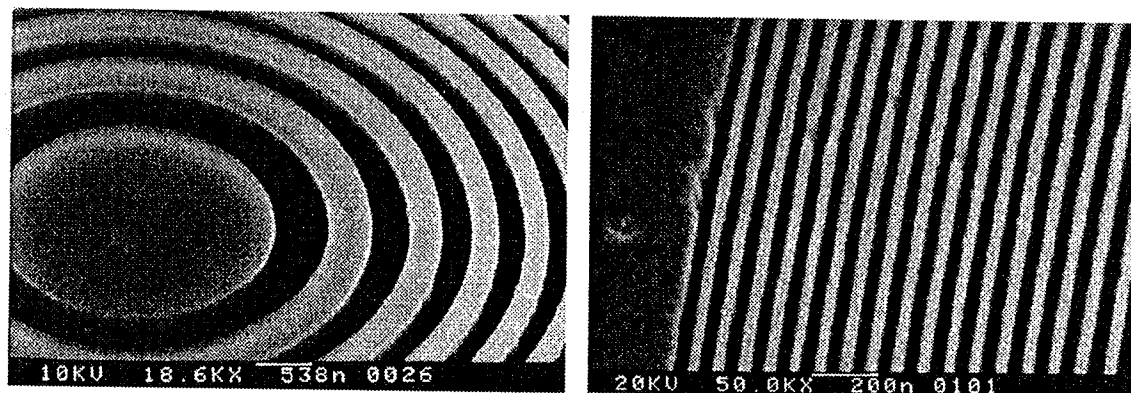


Figure 3-2. Images des anneaux internes (gauche) et externes (droite) d'une micro-zone de Fresnel obtenues au microscope électronique à balayage (SEM). La micro-fabrication a été réalisée par C. David au laboratoire de Göttingen.

Zone de Fresnel	Diamètre	Distance focale f à $\lambda = 2,4 \text{ nm}$	largeur du dernier anneau $dr_N$	Nombre d'anneaux N	Efficacité E (%)
KZP7	9 mm	201,42 mm	53,7 nm	41890	7 %
MZP39	68 $\mu\text{m}$	1,111 mm	39 nm	438	4,8 %
MZP29	57 $\mu\text{m}$	0,686 mm	29 nm	489	6,3 %
MZP20	55 $\mu\text{m}$	0,460 mm	20 nm	690	2,9 %

Tableau 3-1. Caractéristiques des zones de Fresnel utilisées sur le TXM à BESSY lors de nos acquisitions.

La micro-fabrication de ces zones représente un long et délicat travail dans lequel le laboratoire F.E. Röntgenphysik de Göttingen est impliqué depuis plusieurs années [Schmahl 84], [Thieme 94], [Kaulich 94], [Schneider 96]. Le tableau 2.1 donne une liste des CZP et MZP utilisés pour les acquisitions sur le TXM.

### 3.1.3 Principe de fonctionnement du microscope à rayons X

#### 3.1.3.1 Schéma du TXM

La Figure 3-3 montre le schéma du TXM de Göttingen à BESSY constitué d'une zone de Fresnel condensatrice et d'une micro-zone de Fresnel.

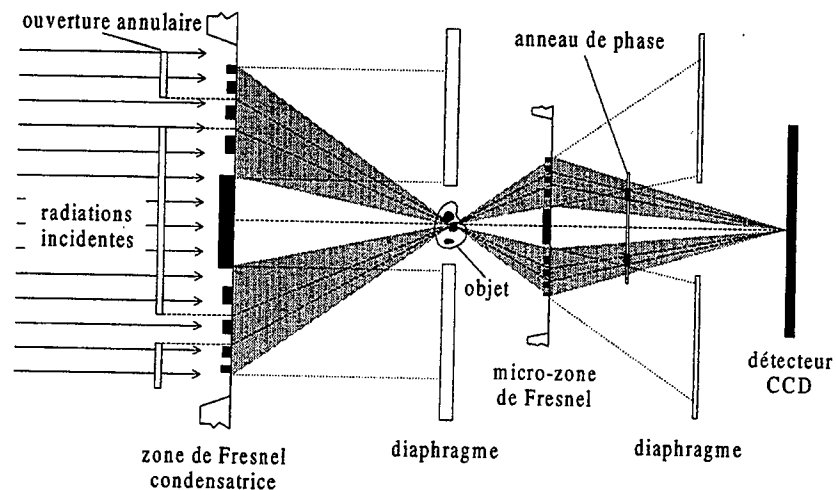


Figure 3-3. Schéma du microscope en transmission de Göttingen à BESSY (TXM). L'ouverture annulaire et l'anneau de phase permettent de configurer le TXM en mode contraste de phase.

Le microscope peut être configuré en mode contraste d'amplitude ou en mode contraste de phase. A titre d'exemple, une image acquise en contraste d'amplitude ainsi que l'image du même objet acquise en contraste de phase sont représentées sur la Figure 3-4.

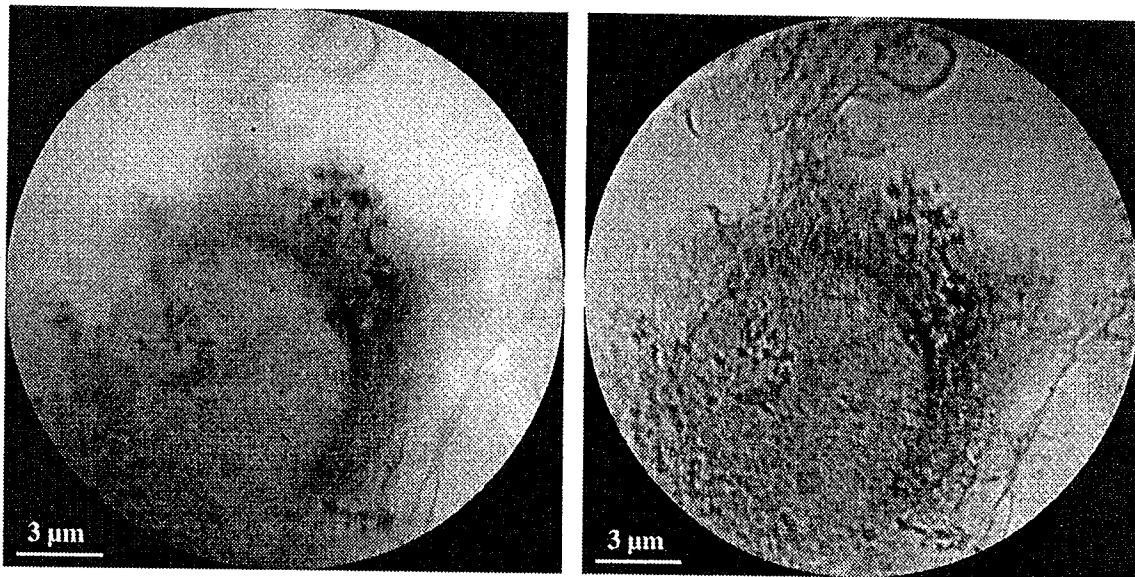


Figure 3-4. Images de cellules de Kupffer fixées, acquises en contraste d'amplitude (à gauche) et en contraste de phase (à droite). D'après [Schmahl 94].

### 3.1.3.2 Le condenseur

A la sortie de la ligne de lumière, les radiations en amont de la zone de Fresnel condensatrice sont polychromatiques. En combinaison avec le diaphragme situé au niveau de l'objet à imager, le condenseur agit comme un monochromateur. Ainsi, l'échantillon est éclairé par un faisceau de rayons X quasi monochromatique. A la longueur d'onde  $\lambda = 2,4$  nm, le condenseur forme une image de la source de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre. De manière à obtenir une illumination homogène du champ d'observation d'un diamètre de 20 à 30  $\mu\text{m}$ , le condenseur peut être mis en mouvement rapide par l'intermédiaire de 2 transducteurs piézo-électriques. L'image de la source dans le plan objet est ainsi déplacée avec le condenseur, ce qui engendre une illumination homogène de l'échantillon. La CZP la plus utilisée a été la KZP7 (Tableau 3-1). Elle est couplée à un stop central de 4 mm de diamètre, de manière à bloquer les radiations d'ordre 0. Ces radiations représente la fraction de rayonnement non diffractée par la lentille de Fresnel (voir chapitre 4 pour plus de détails sur le principe de fonctionnement des lentilles de Fresnel).

### 3.1.3.3 Formation de l'image à travers l'objectif

Les rayons X traversant l'objet passent à travers la micro-zone de Fresnel pour former une image agrandie. La taille d'un pixel de l'image acquise est ajustée pour un objectif donné en fonction du grandissement. Il est possible de visualiser une image de l'objet en temps réel avec une faible résolution par l'intermédiaire d'un écran fluorescent à micro-canaux. Autrefois utilisé pour pré-focaliser l'objet, cet écran est aujourd'hui utilisé seulement pour l'alignement des optiques. Un microscope optique photonique monté en amont de la préparation permet actuellement de pré-focaliser le microscope sur la région d'intérêt, sans irradier l'échantillon (voir section 3.1.4.2 pour plus de détails). Les radiations du premier ordre issues du condenseur sont diffractées par l'objet et les rayons diffractés sont focalisés par la MZP. Le diaphragme placé en amont du détecteur permet d'utiliser les radiations du premier ordre comme seules contributions à la formation de l'image. Les ordres supérieurs de diffraction généreront un fond superposé à l'image, dont la contribution sera d'autant plus faible que l'efficacité de la MZP sera grande. Les dernières MZP offrent des résolutions expérimentales de l'ordre de 30 nm.

### 3.1.3.4 Numérisation de l'image

Une caméra CCD refroidie à illumination inversée et balayage lent est placée dans le plan image du microscope, permettant ainsi la numérisation des images [Meyer-Ilse 93] [Wilhein 94]. L'efficacité quantique de la CCD (RQE) est de 60 % et le gain (DQE) de 13. Le balayage lent (40 kHz) réduit le bruit de lecture à quelques électrons. Le refroidissement de la caméra à  $-45^{\circ}\text{C}$  (réalisé par effet Peltier) permet de réduire considérablement la composante continue. La taille de la matrice est de  $1024 \times 1024$  pixels, chaque pixel ayant une dimension de  $24 \mu\text{m} \times 24 \mu\text{m}$ . L'acquisition est contrôlée directement par ordinateur sur lequel s'affiche l'image numérisée. Les images numérisées ont un format de  $1024 \times 1024$ , codées sur 16 bits, soit 65536 niveaux de gris. Les images, plus de 2 Méga octets par acquisition, sont stockées sur disque magnéto optique et archivées sur un disque compact.



### 3.1.4 Spécificités du TXM de Göttingen à BESSY

En près de 20 ans, le microscope à rayons X a considérablement évolué. Il peut désormais être utilisé en routine, et ceci grâce à de nombreuses modifications réalisées par l'équipe de Göttingen. Le schéma ci-dessous représente le schéma technique du TXM.

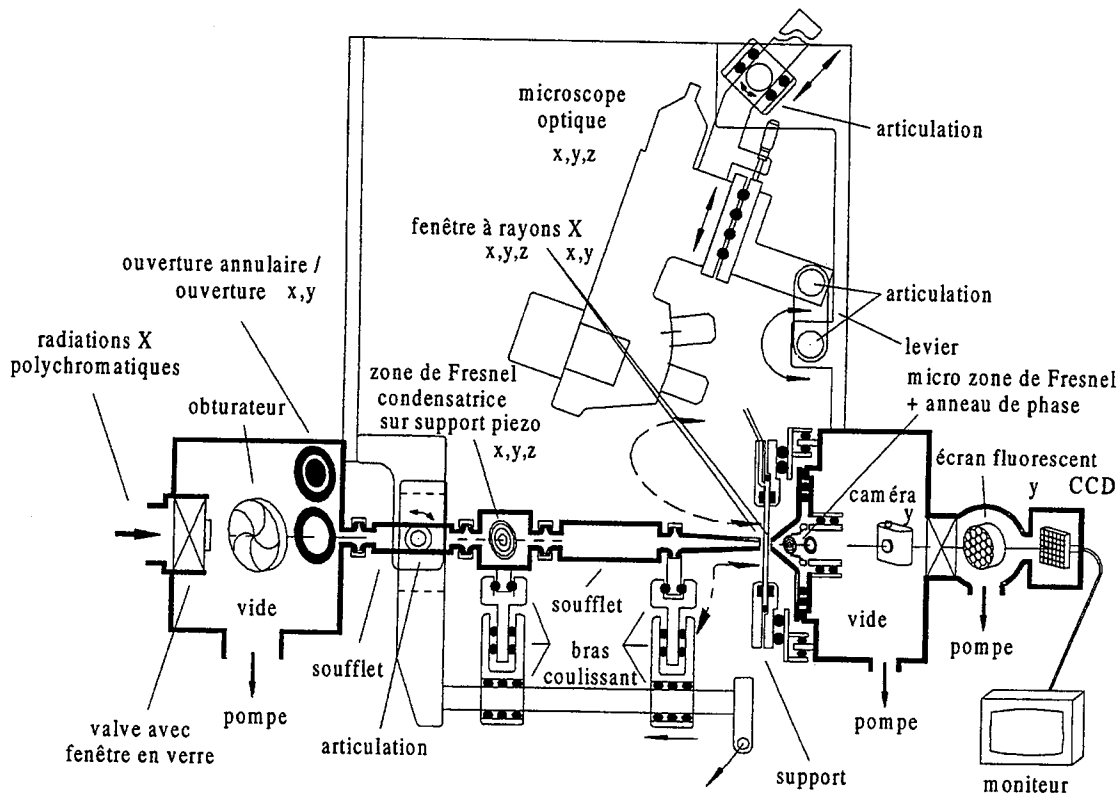


Figure 3-5. Schéma mécanique du microscope à rayons X de Göttingen à BESSY. De Niemann et al. [Niemann 94].

Les principaux points forts qui caractérisent ce microscope sont décrits dans les sections suivantes.

#### 3.1.4.1 Préparation des échantillons dans l'air

Un espace ajustable d'environ 0,5 mm est laissé à l'air pour permettre l'observation des échantillons à pression normale dans des conditions proches de leur état naturel.

La préparation n'étant pas en contact direct avec les fenêtres du condenseur et de l'objectif du microscope, mais placée à quelques 10  $\mu\text{m}$ , il est possible de déplacer le support de l'échantillon suivant les directions horizontales et verticales. Toute la lame peut être ainsi balayée comme en microscopie optique photonique classique.

Enfin, changer la préparation devient aussi simple et rapide qu'en microscopie optique photonique, et il n'y a pas besoin de faire le vide lors du changement de préparation. Le bras du condenseur, monté sur des cylindres pneumatiques, peut se baisser et ainsi laisser un espace suffisant à un utilisateur pour accéder à l'échantillon (voir Figure 3-5).

### 3.1.4.2 Le microscope optique photonique incorporé

Un des progrès dans la conception du microscope a été l'installation d'un microscope optique photonique (OM) en amont de la préparation. Il est en effet possible d'escamoter le bras du condenseur pour le remplacer par un microscope photonique à contraste interférentiel (voir Figure 3-5). La partie en aval de la préparation étant fixe, le microscope photonique est configuré en mode réflexion. Le rôle principal de ce microscope est de pré-focaliser l'objet avant d'acquérir une image au TXM. Ce système est crucial pour réduire au minimum les dommages sur l'échantillon. En effet, avant son implantation, les profondeurs de champ étant de l'ordre du micromètre, il était nécessaire d'acquérir une série d'images de l'échantillon pour ajuster la netteté avant de saisir l'image finale. Les radiations absorbées par l'échantillon étaient alors beaucoup plus élevées.

Un autre avantage apporté par l'installation d'un microscope photonique est de pouvoir ajuster la zone de l'échantillon à imager. Enfin, le microscope optique photonique permet d'ajuster avec suffisamment de précision l'épaisseur d'eau de la préparation. Cette épaisseur est mesurée en focalisant le microscope sur les membranes supérieures et inférieures de la préparation. L'épaisseur de liquide est alors égale au déplacement divisé par l'indice de réfraction du milieu.

### 3.1.4.3 Les supports spécifiques

Visualiser des échantillons biologiques à l'air lorsqu'on utilise des rayons X mous n'est pas chose facile. En effet, l'absorption des rayons X par la matière nécessite d'utiliser des matériaux non absorbants comme support, au risque d'atténuer le contraste de l'image. De plus, l'observation d'échantillons biologiques pose des contraintes importantes au niveau des supports si l'on veut pouvoir maintenir l'échantillon vivant pendant l'observation, ou faire pousser des cellules. C'est en cela que les supports spécifiques utilisés sur le TXM de Göttingen à BESSY relèvent d'une haute technologie [Schneider 92]. Le schéma de ces supports est représenté sur la Figure 3-6.

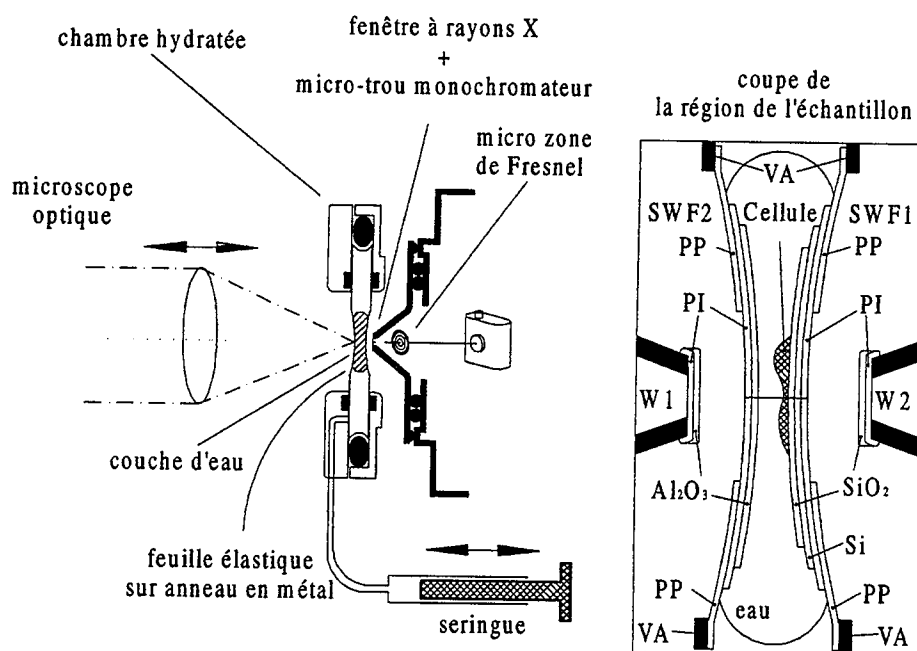


Figure 3-6. Schéma des supports d'échantillons biologiques utilisés sur le TXM de Göttingen à BESSY. Extrait de Niemann et al. [Niemann 94].

Ces supports sont formés de 2 feuilles de polypropylène SWF1 et SWF2 placées en sandwich. Ces feuilles ont une ouverture centrale et sont recouvertes d'une feuille de polyimide PI. Sur la face SWF1, la feuille PI est recouverte d'une couche de silicium Si et de SiO<sub>2</sub>. La couche intermédiaire de Si est utilisée afin de garder une surface plane même sous l'action des forces de tensions internes. La feuille SWF2 contient une couche d'Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, utilisée pour observer les échantillons au microscope optique en réflexion. La couche de SiO<sub>2</sub> est propice à la culture de cellules en milieu aqueux.

Lorsque l'échantillon est placé sur la feuille SWF1, on la recouvre avec la feuille de SWF2, ce qui permet de maintenir la préparation avec une épaisseur constante. La présence d'une couche intermédiaire de  $S_i$  permet également de limiter la diffusion de l'eau à travers la feuille de polyimide, et l'échantillon peut ainsi rester hydraté pendant plusieurs heures. L'épaisseur de l'eau peut être ajustée à quelques microns par succion à l'aide d'une seringue placée à l'extrémité du support (Figure 3-6).

## 3.2 Applications biologiques

Dans le cadre de nos travaux, nous avons utilisé ce microscope pour l'étude de la formation des images, mais également dans une perspective de recherche de nouvelles techniques de préparations d'échantillons biologiques qui exploiteraient pleinement les possibilités du microscope. Nous nous sommes principalement intéressés à l'observation en contraste naturel de chromosomes polyténiques de chironomes, car ils possèdent des structures qui n'ont encore jamais pu être observées dans un milieu aqueux à haute résolution. Puis, nous nous sommes également penchés sur l'étude des possibilités concernant le marquage spécifique de certaines structures.

Dans cette section, nous présenterons les observations que nous avons réalisées sur le TXM de Göttingen à BESSY. L'intérêt de cette section est tout d'abord de montrer la nature des informations contenues dans les images obtenues. Puis, pour chaque acquisition d'échantillons biologiques, nous détaillerons les protocoles de préparations.

Pour donner un ordre de grandeur des doses absorbées par les échantillons biologiques, nous spécifierons la durée d'exposition utilisée pour chaque acquisition (TE), ainsi que la durée totale d'exposition (DT).

### 3.2.1 Objets tests

Les objets tests sont utilisés pour mesurer la résolution du microscope. Ce sont des objets en germanium avec des structures de dimensions variables. La plupart de ces

objets sont dessinés à l'aide des techniques de micro-fabrication similaires à celles utilisées pour la fabrication des zones de Fresnel.

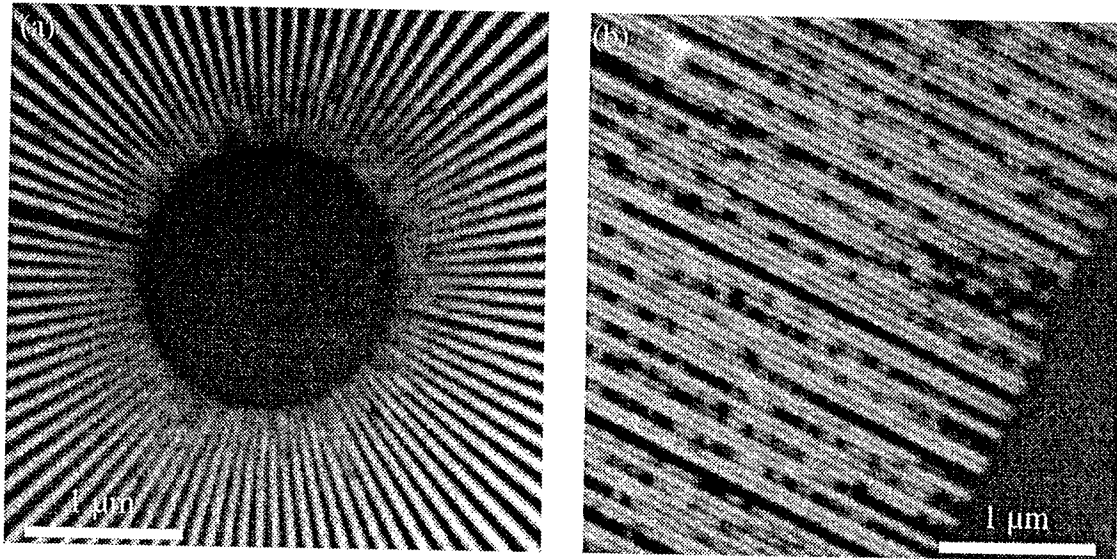


Figure 3-7. Images de différents objets tests utilisés pour mesurer la résolution du TXM. Ces objets ont été dessinés par T. Schliebe du laboratoire de Göttingen. (a) possède des structures internes de 24 nm, et (b) est constitué de structures de 30 nm.

Nous utiliserons ces images pour tester les algorithmes de restauration d'images, dont le but est d'augmenter le contraste et la résolution dans l'image en utilisant l'information issue du modèle de la formation des images.

### 3.2.2 Chromosomes polyténiques en milieux aqueux

Cette section est réservée à l'observation de chromosomes polyténiques en milieu aqueux au microscope à rayons X en transmission. L'intérêt d'observer de tels échantillons en microscopie à rayons X est que ces chromosomes permettent d'étudier les différents niveaux d'organisation de la chromatine : nucléofilaments, fibre épaisse de 30 nm, chromatide, chromomère, régions condensées et décondensées.

La structure des chromosomes polyténiques a été étudiée par microscopie électronique et microscopie photonique. Cette dernière technique de microscopie a permis en particulier de visualiser des chromatides individuelles orientées parallèlement à l'axe du chromosome dans les interbandes. Toutefois, le désavantage de la microscopie

électronique est qu'elle nécessite la fixation et la déshydratation des échantillons ou une décondensation ou encore un étalement des chromosomes dans des conditions de fortes ou faibles forces ioniques.

La microscopie à rayons X a permis d'observer des chromosomes polyténiques isolés sans fixation en milieu aqueux.

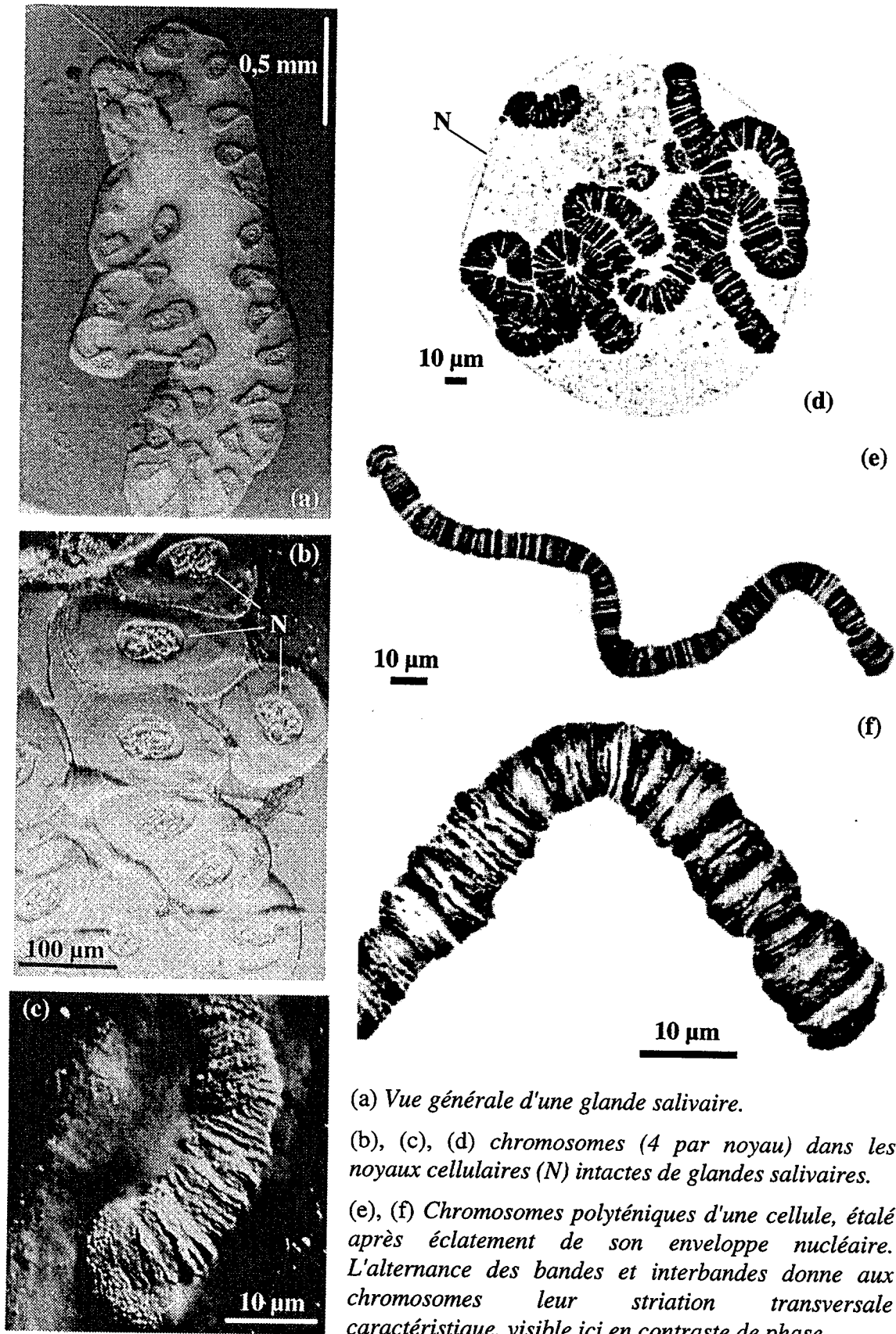
### 3.2.2.1 Organisation des chromosomes polyténiques [Berkaloff 81]

Les chromosomes polyténiques sont des chromosomes interphasiques en activité de transcription. Leurs dimensions les classent parmi les chromosomes géants (les plus grands mesurent jusqu'à 500  $\mu\text{m}$  de longueur et 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur). Ils sont largement répandus chez le groupe des diptères, où ils ont été découverts par Balbiani en 1881 chez le chironome.

Lors de son développement, la larve des diptères passe tout d'abord par une phase de multiplication cellulaire à la fin de laquelle le nombre total des cellules de l'individu est atteint ; puis, les cellules commencent leur croissance et se différencient. C'est pendant la phase de croissance que se produit la polyténisation des chromosomes. Durant cette phase, les chromatides issues des réplifications successives des chromosomes à l'intérieur des noyaux, restent intimement associées à leurs sœurs, l'ensemble formant un faisceau de nucléofilaments, d'où le nom de chromosomes polyténiques (plusieurs filaments).

Le degré de polyténisation varie d'un tissu à l'autre ; chez un même individu, c'est généralement dans les glandes salivaires qu'il est le plus élevé (Figure 3-8(a)).

La caractéristique structurale la plus apparente du chromosome polyténique est sa striation transversale, résultant de l'alternance apériodique de zones relativement denses, les bandes, séparées par des régions moins dense, les interbandes (Figure 3-8). La taille, la morphologie et la distribution des bandes sont spécifiques de chaque chromosome dont la topographie peut être ainsi cartographiée. Cette structure est une organisation chromomérique. Ce sont en effet les chromomères homologues des différentes chromatides, qui, juxtaposées, constituent les bandes, tandis que les segments interchromomériques donnent aux interbandes un aspect de fine striation longitudinale, expression de la polyténie (Figure 3-9).



(a) *Vue générale d'une glande salivaire.*

(b), (c), (d) *chromosomes (4 par noyau) dans les noyaux cellulaires (N) intacts de glandes salivaires.*

(e), (f) *Chromosomes polyténiques d'une cellule, étalé après éclatement de son enveloppe nucléaire. L'alternance des bandes et interbandes donne aux chromosomes leur striation transversale caractéristique, visible ici en contraste de phase.*

*Figure 3-8. Chromosomes polyténiques de glandes salivaires de chironomes [Robert-Nicoud 75].*

Il ne semble qu'il n'y ait pas d'association étroite des nucléofilaments dans les interbandes, l'attraction spécifique entre chromatides homologues ne se faisant qu'au niveau des chromomères.

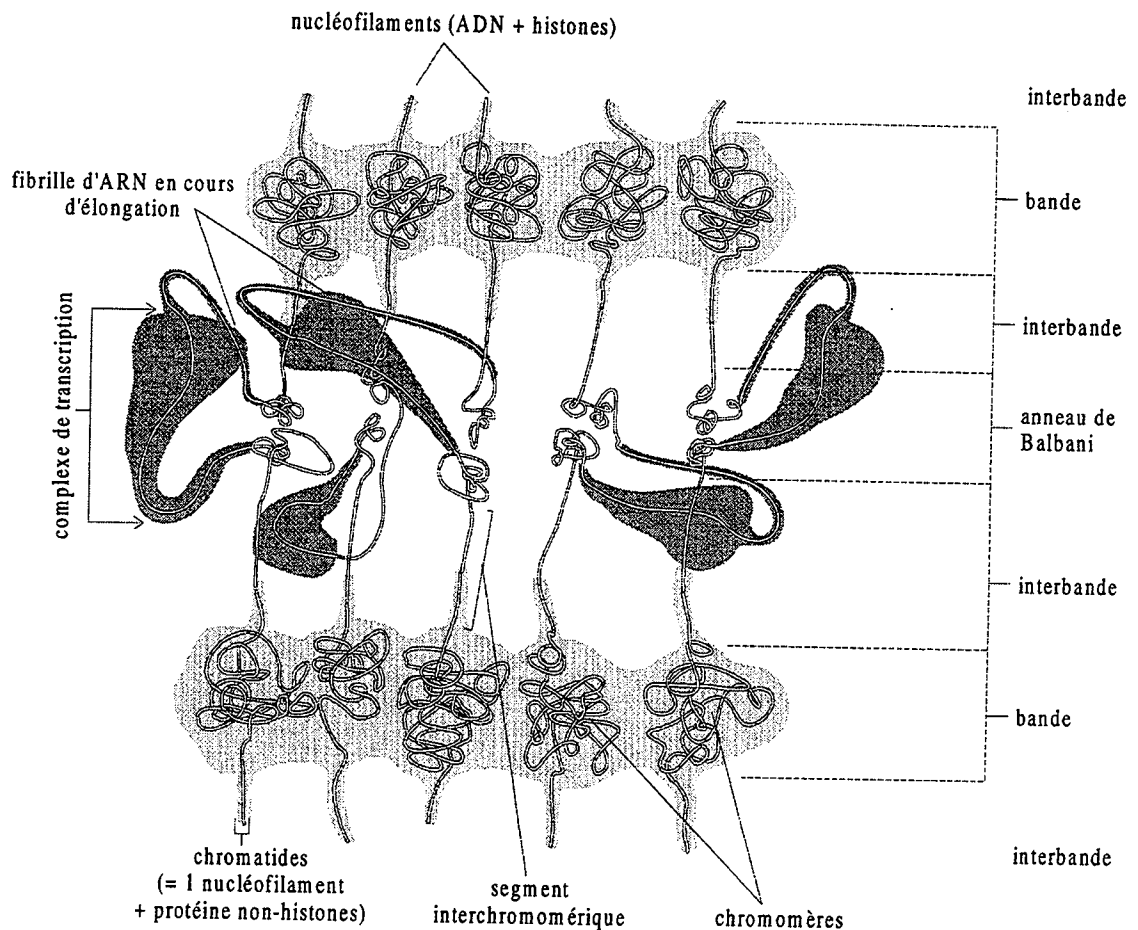


Figure 3-9. Schéma de l'ossature d'un chromosome polyténique

Le nucléofilament des chromomères est susceptible de se déployer en une boucle le long de laquelle se réalise alors la transcription. Ce processus, lorsqu'il se produit, affecte simultanément tous les chromomères d'une même bande ; il en résulte une dilatation de la bande et sa transformation en un nodule chromosomique, appelé "puff" par les anglo-saxons. Chez le chironome, quelques nodules, en des sites chromosomiques spécifiques, atteignent des dimensions considérables : ils se nomment alors anneaux de Balbiani.



### 3.2.2.2 Observation au TXM de Göttingen à BESSY

Les premières images de chromosomes géants polyténiques de *Chironomus Thummi* en microscopie à rayons X ont été obtenues en 1989 sur le TXM de Göttingen à BESSY [Guttman 90]. Il s'agissait de chromosomes fixés et déshydratés.

Les acquisitions réalisées dans le cadre de ce travail ont permis l'observation de chromosomes non fixés et fixés, en milieu aqueux ou à l'état congelé.

Les chromosomes observés ont été isolés à partir de glandes salivaires de chironomes *Thummi*, selon la méthode décrite par Robert-Nicoud et al. [Robert-Nicoud 84].

#### 3.2.2.2.1 Chromosomes non fixés

La Figure 3-10 représente un chromosome de chironome isolé en milieu aqueux, sans fixation ni déshydratation.

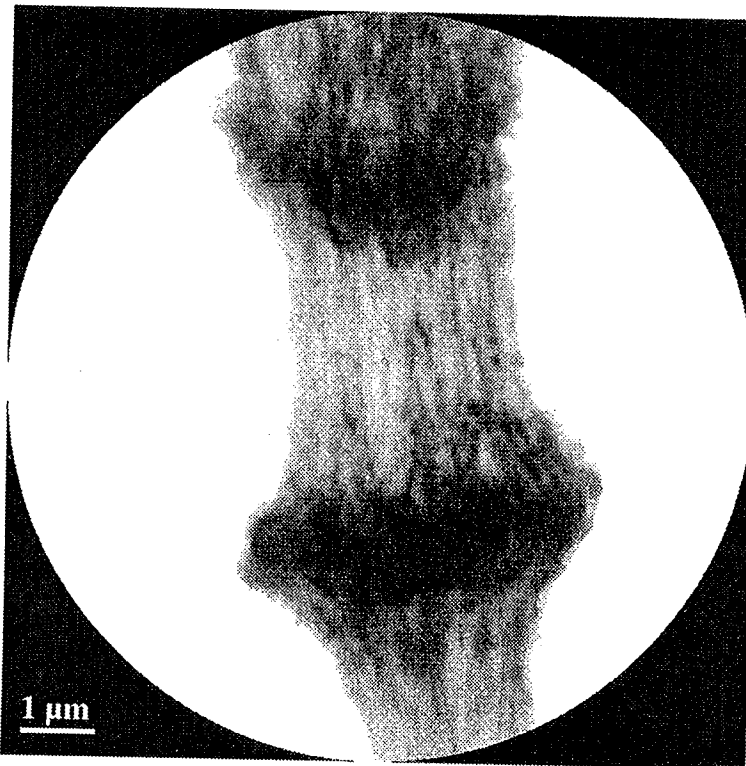


Figure 3-10. Image d'une région d'un chromosome polyténique de *Chironomus Thummi* non fixé en milieu aqueux, observé en contraste naturel.  $TE=1$  s,  $DT=1,3$  s.

On observe clairement sur cette image les bandes et interbandes. Les nucléofilaments constituant les interbandes et orientés parallèlement à l'axe du chromosome sont également clairement discernables. La largeur moyenne de ces nucléofilaments, mesurée sur l'image, est de l'ordre de 50 nm.

Les temps d'exposition utilisés pour l'acquisition de ces images doivent rester très inférieurs à la seconde. Pour des temps d'exposition plus élevés, on observe des modifications de la structure du chromosome, qui se traduisent par une perte de matériel (voir section 4.2 concernant l'effet des radiations sur les chromosomes). Ce phénomène rend difficile l'acquisition d'une série d'image d'une même région d'un chromosome.

Nos observations ont montré que les chromosomes fixés sont plus résistants aux radiations.

#### 3.2.2.2.2 Chromosomes fixés

Le chromosome présenté sur la Figure 3-12 a été fixé dans du glutaraldéhyde à 2% pendant 15 minutes, puis rincée dans du PBS. Dans ces conditions, l'acquisition d'une série d'images d'un même chromosome est possible, ce qui nous a permis de réaliser la reconstruction d'un chromosome sur une longueur d'environ 100  $\mu\text{m}$ , par mosaïquage.

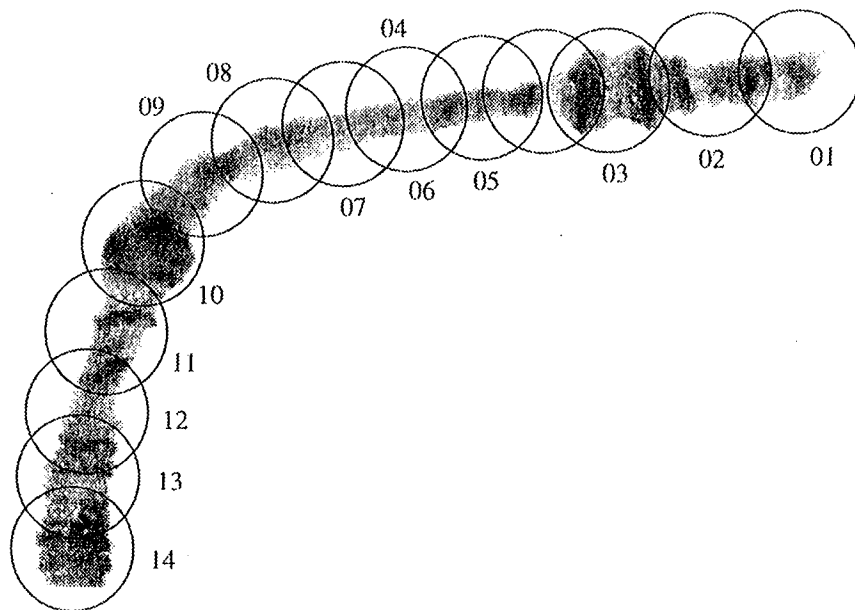
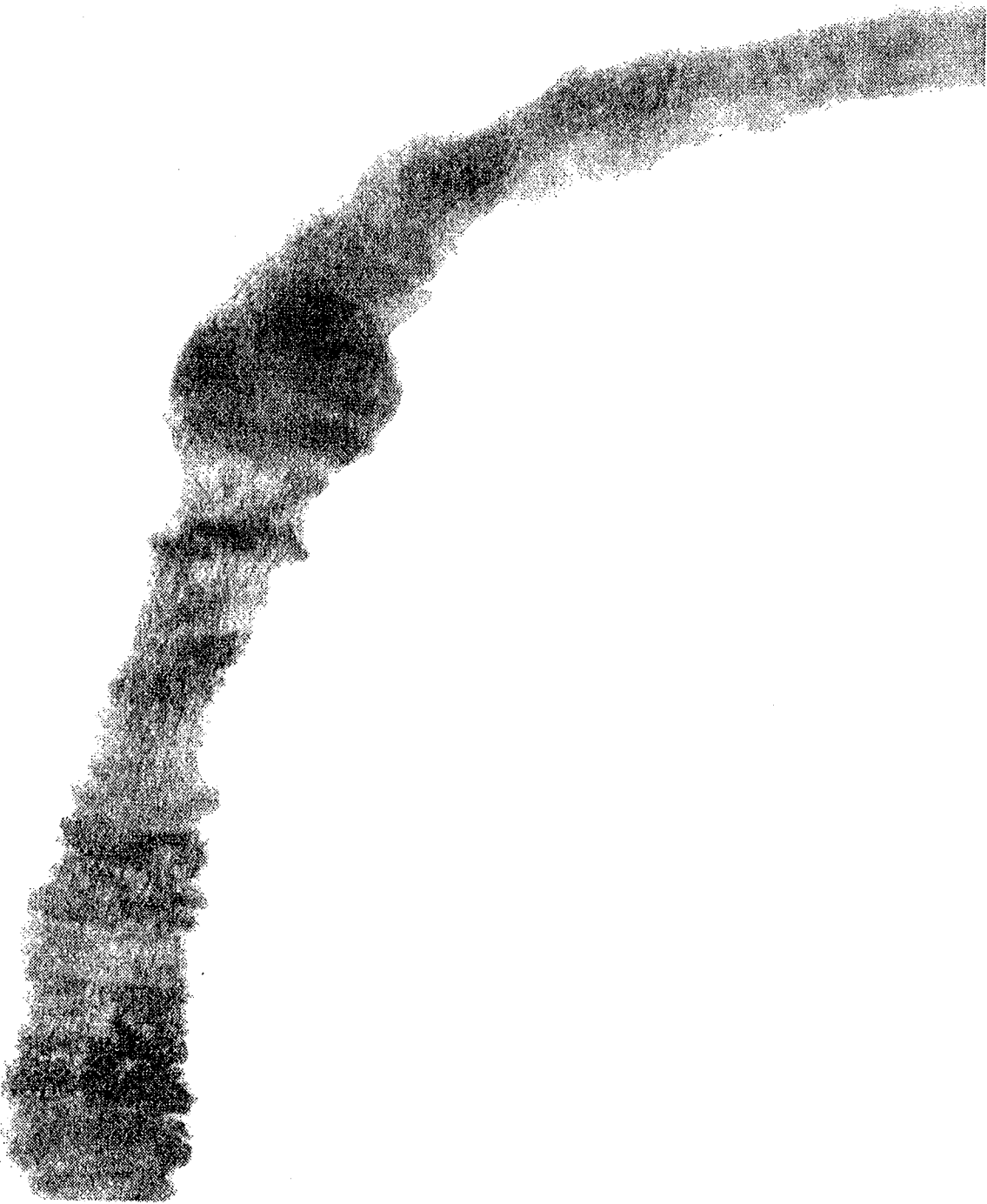
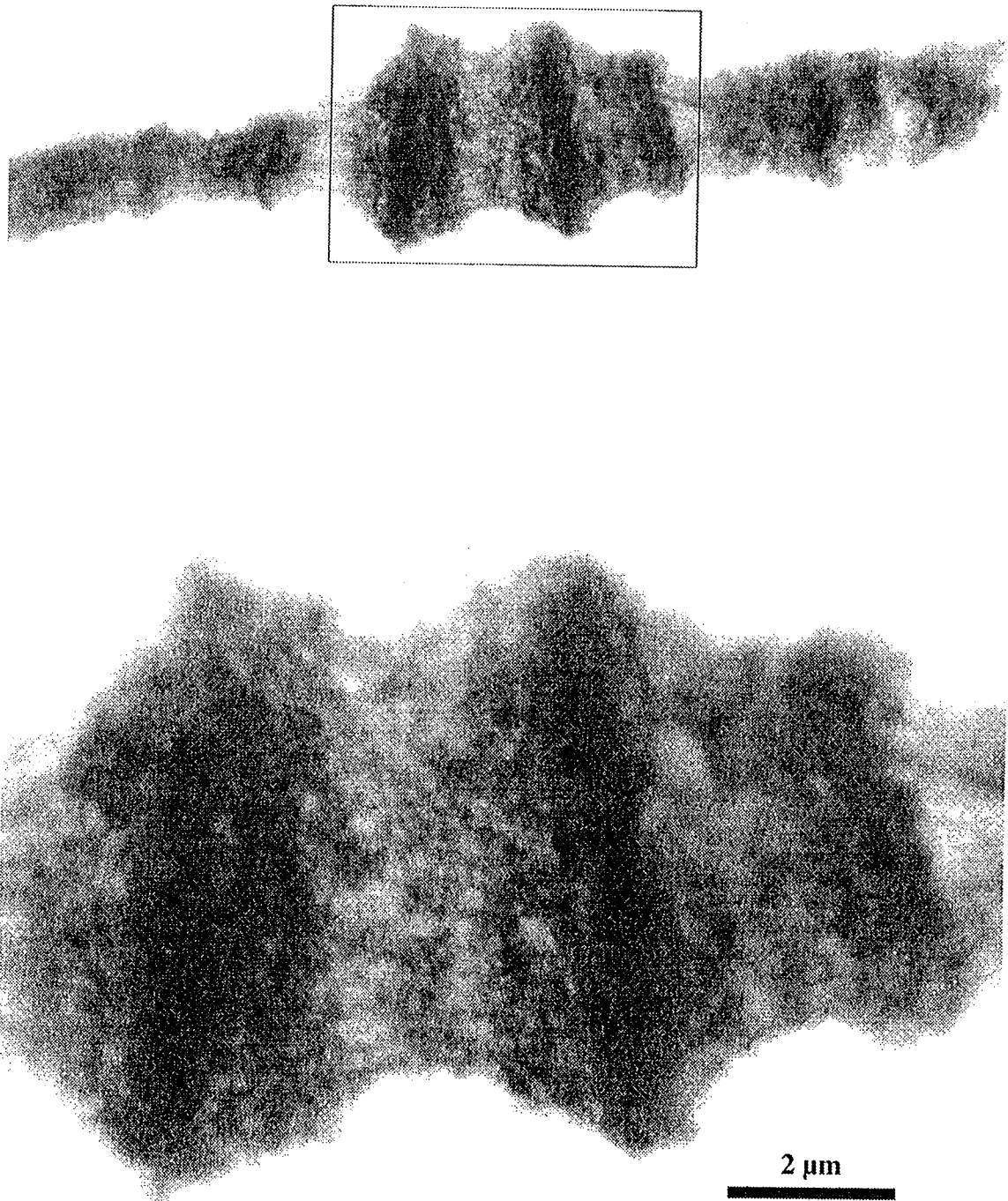


Figure 3-11. Détail des acquisitions réalisées pour effectuer le mosaïquage de la région chromosomique de la Figure 3-13.

5  $\mu$ m





*Figure 3-12. Image d'une région de chromosome polyténique de Chironomus Thummi fixé en milieu aqueux, observé en contraste naturel, avec grossissement d'une région contenant des bandes. L'image reconstruite a été obtenue à partir de 13 acquisitions successives. Sa taille est de 5000 x 3500 pixels, et la taille d'un pixel de 13,4 nanomètres.*

Le temps d'exposition pour chaque acquisition a été de 0,2 seconde, et le champ d'observation a été choisi de façon à ce qu'il y ait un recouvrement entre les images successives (Figure 3-11).

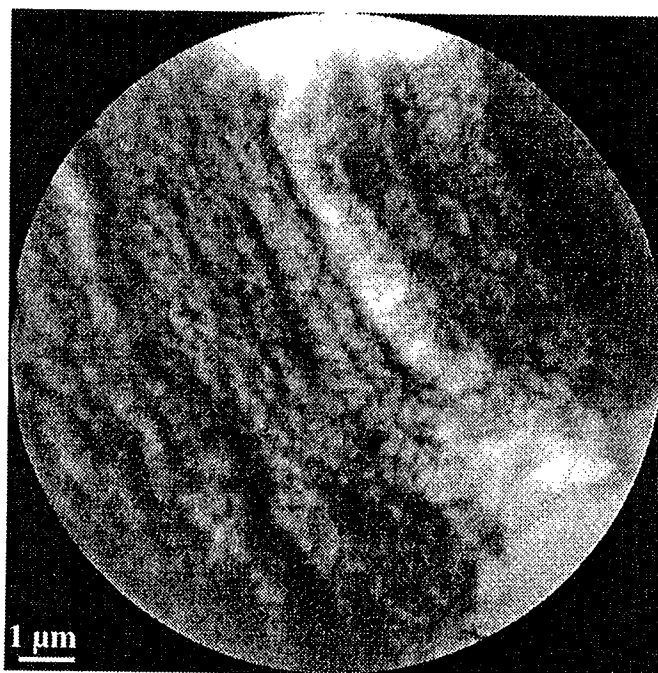
La Figure 3-12 montre la région du chromosome qui a été reconstruite, ainsi qu'un agrandissement d'une région contenant quelques bandes.

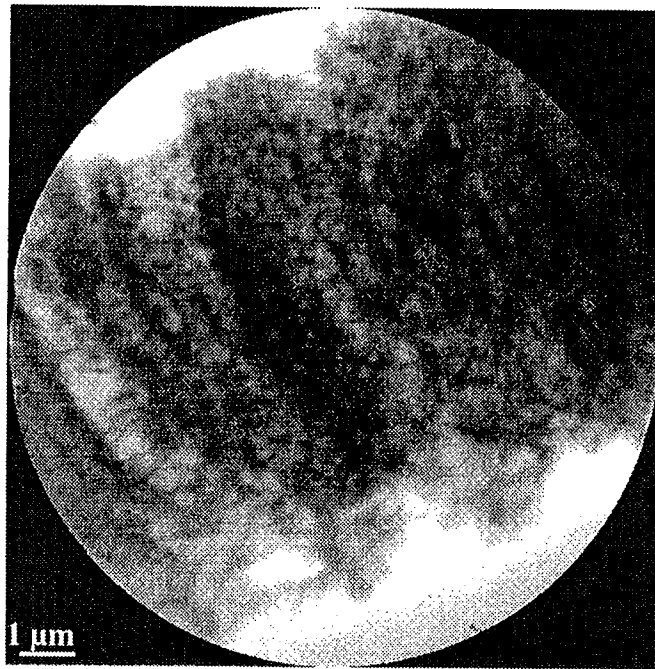
La comparaison avec l'image obtenue sans fixation montre la diminution du contraste, qui pourrait être le résultat d'artefacts de fixation dus à la formation de liaisons croisées par le fixateur.

Un autre moyen de limiter les dommages provoqués par le rayonnement X est d'utiliser des échantillons vitrifiés par congélation rapide.

#### 3.2.2.2.3 Chromosomes vitrifiés

L'observation de chromosomes vitrifiés non fixés a permis d'obtenir des images de haute qualité (Figure 3-13) et montre que la structure des chromosomes restait stable durant plusieurs minutes d'exposition au rayonnement.





*Figure 3-13. Image d'une région de chromosome polyténique de Chironomus Thummi en milieu aqueux, vitrifié dans de l'azote liquide, observé en contraste naturel.*

Les plus petites structures observées ont une dimension de 40 à 50 nm de largeur.

La vitrification des échantillons apparaît comme la seule technique permettant l'observation 3D d'échantillons biologiques en microscopie à rayons X.

### 3.2.3 Marquage sur hybridation in situ

L'hybridation in situ (HIS) permet la localisation et la visualisation, dans la cellule, d'acides nucléiques ADN ou ARN [Trachuk 91].

Cette technique utilise des sondes, séquences particulières d'ADN le plus souvent, qui ont la faculté de s'associer, de s'hybrider, avec les séquences d'acides nucléiques complémentaires présentes dans la cellule. Ces sondes peuvent être, après hybridation, détectées à l'aide d'anticorps fluorescents pour la microscopie optique photonique, ou couplées à l'or pour la microscopie électronique ou à rayons X.

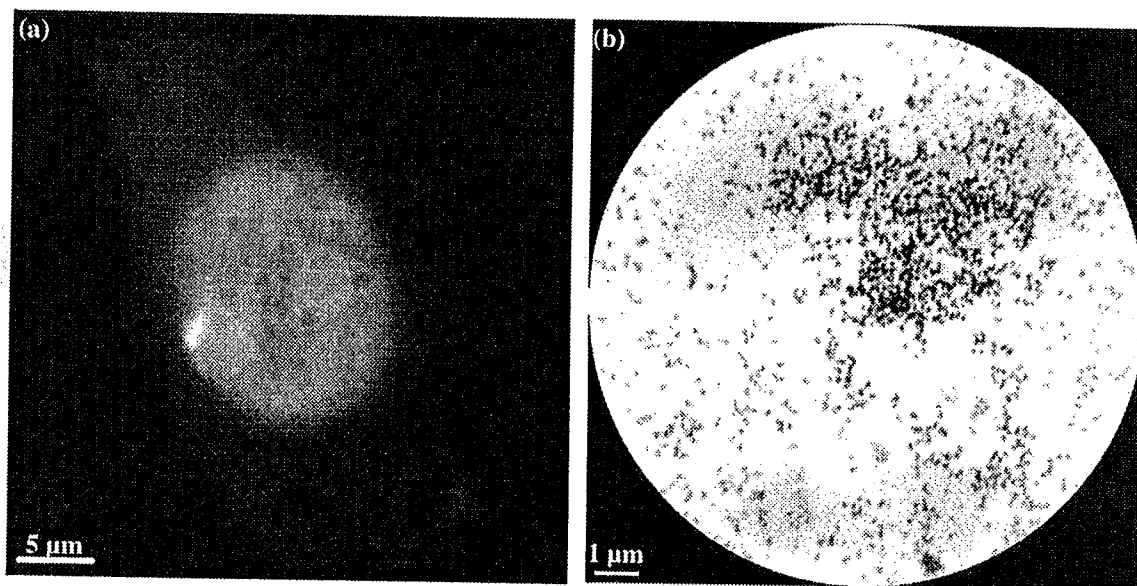


Figure 3-14. Hybridation *in situ* sur chromosome humain. Observation (a) en fluorescence en microscopie optique photonique et (b) en transmission au TXM de Göttingen a BESSY.

L'HIS réalisée ici, permet la visualisation d'un ARN dans le noyau d'une cellule de fibroblaste de souris femelle. La sonde utilisée est modifiée chimiquement par greffe de molécules de biotine. Elle est ensuite détectée par des anticorps couplés à des billes d'or de 5 nm de diamètre. La taille des billes d'or est augmentée par dépôt d'argent métallique à partir d'argent ionisé en solution [Burry 92].

Chez la souris femelle et chez la femme, les molécules de cet ARN appelées Xist, sont essentiellement présentes dans le noyau des cellules où elles sont associées à l'un des chromosomes X. On pense que l'interaction de ces molécules avec la molécule d'ADN du chromosome X joue un rôle dans le phénomène génétique essentiel chez les mammifères, appelé inactivation du chromosome X [Moulton 96].

Les études en microscopie optique photonique ne permettent pas d'atteindre des niveaux de résolution informatifs sur ces interactions ADN/ARN. La microscopie à rayons X devrait à terme permettre de mieux préciser la localisation des différentes molécules impliquées. La nature des interactions pourraient être étudiée, et certains modèles proposés dans la littérature pourraient être testés. Les expériences d'HIS sont en

pratique très proches de celles réalisées pour la microscopie photonique, et les expériences déjà réalisées pour la microscopie optique photonique devraient être renouvelées en espérant de nouvelles informations.

### 3.2.4 Coupes sériées d'objets épais

La microscopie à rayons X permet d'observer des échantillons pouvant atteindre jusqu'à  $10\ \mu\text{m}$  d'épaisseur. La série d'images de la Figure 3-16 représente une série focale de 16 images, obtenues en déplaçant l'objet suivant l'axe optique (voir Figure 3-15-a pour le principe d'acquisition). Chaque coupe optique est espacée de  $1\ \mu\text{m}$  suivant l'axe optique, soit une profondeur totale de  $15\ \mu\text{m}$ . Les images successives laissent apparaître plusieurs plans bien distincts. La Figure 3-17 représente des coupes suivant le plan  $(y, z)$ , reconstruites à partir de la série de coupes optiques de la Figure 3-16 (voir Figure 3-15-b pour le principe de reconstruction).

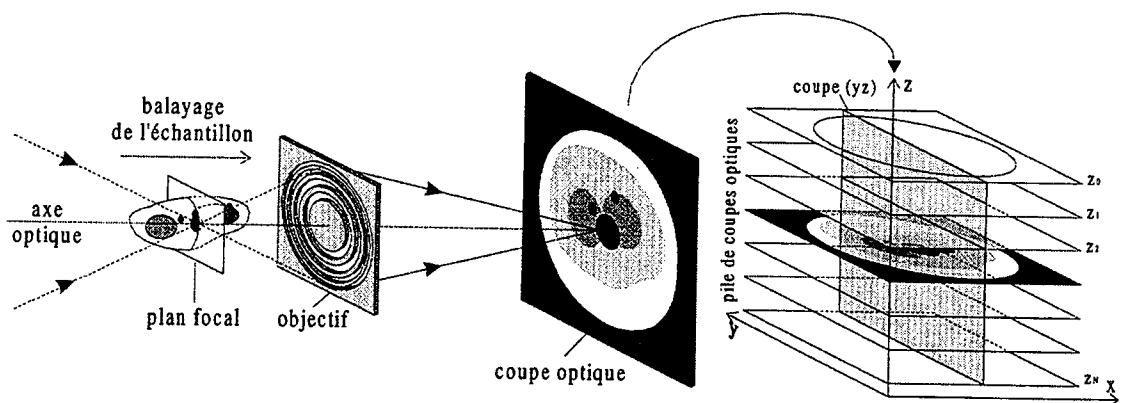


Figure 3-15. (a) Principe d'acquisition des coupes optiques d'un objet. (b) Extraction d'une coupe axiale à partir d'une série de coupes optiques.

On s'aperçoit qu'aucune structure n'est visible dans ce plan. Ce phénomène est lié à la grande profondeur de champ offerte par les optiques actuelles, qui est très supérieure à la résolution latérale du microscope. Ainsi, il se pose le problème de l'observation d'objets plus épais que la profondeur de champ du microscope. Dans ce cas précis, même des techniques classiques de reconstruction par projection, telles que la tomographie, ne peuvent résoudre ce problème car il faut prendre en compte les contributions tri-dimensionnelles de la réponse impulsionnelle du microscope.



Dans la section 6.6, nous présentons une technique rapide pour la reconstruction d'une image d'échantillon épais à partir de coupes optiques, sans prise en compte du mode de formation des images dans le microscope.

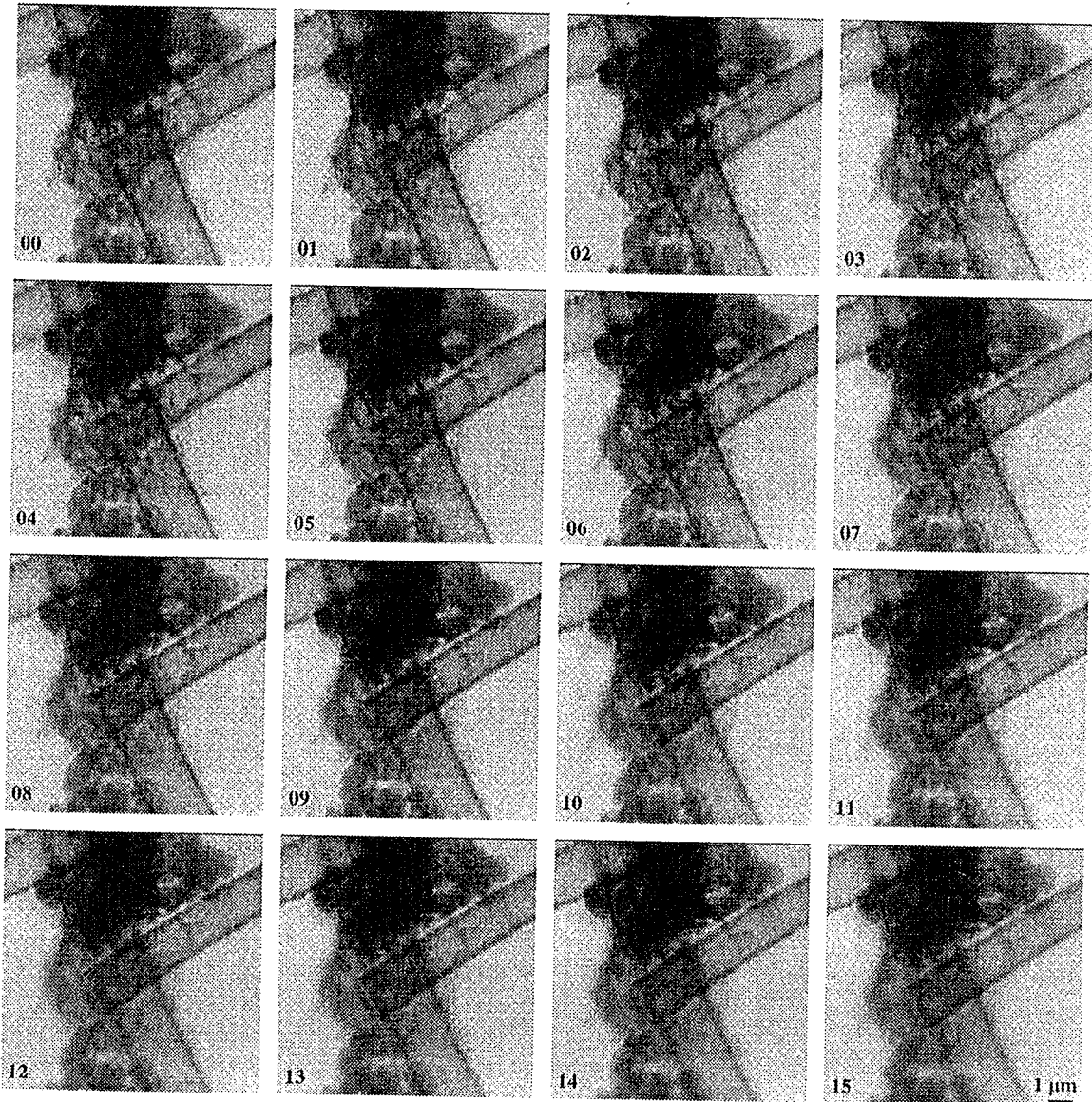


Figure 3-16. Coupes optiques de leptomeres réalisées sur le TXM de Göttingen à BESSY. Chaque image est aux dimensions (512 x 512).  $\Delta z = 1\mu\text{m}$ , soit une profondeur totale de 15  $\mu\text{m}$ .

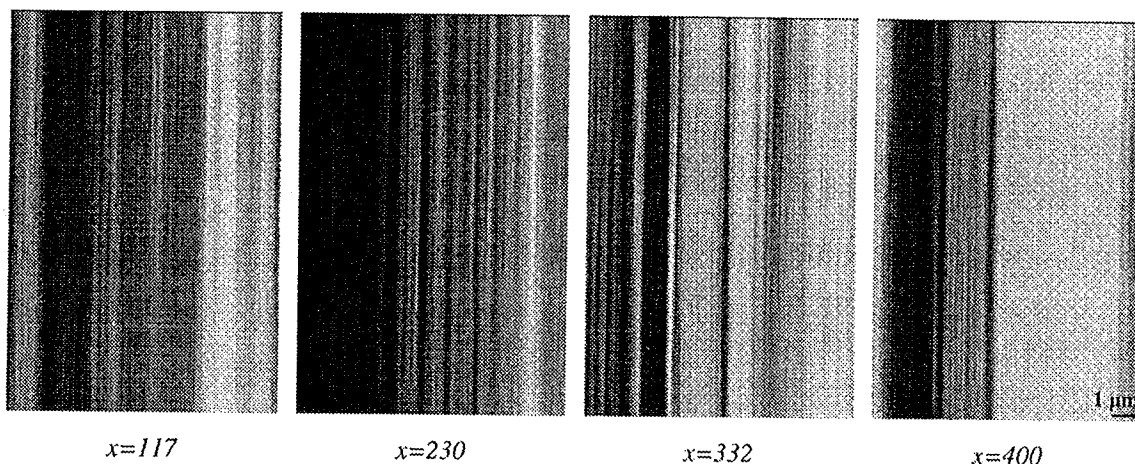


Figure 3-17. Coupes axiales suivant le plan  $(y, z)$  reconstruites à partir des coupes optiques de la Figure 3-16. Les plans intermédiaires sont obtenus par interpolation linéaire.

### 3.3 Conclusion sur le TXM de Göttingen à BESSY

Dans ce chapitre, nous avons d'une part observé la structure des chromosomes polyténiques de *Chironomes Thummi*, non fixés et fixés, en milieu aqueux ou congelés. Nous avons vu qu'il était possible, moyennant de faibles temps d'exposition, d'observer ces chromosomes sans aucune fixation ni déshydratation. Une fixation en milieu aqueux nous a permis d'effectuer la reconstruction d'une région chromosomique sur une longueur de 500  $\mu\text{m}$ . Enfin, la vitrification des échantillons a rendu possible plusieurs acquisitions d'une même région chromosomique, sans modification apparente des structures du chromosome pendant les expositions successives. Nous avons ainsi pu observer des fibres de chromatine d'une quarantaine de nanomètres d'épaisseur.

D'autre part, nous avons étudié un marquage spécifique de structures chromosomiques à l'intérieur d'un noyau à l'aide de billes d'or. Ces travaux ont été réalisés dans la perspective d'étendre l'utilisation de marqueurs spécifiques en microscopie à rayons X.

Toutes les acquisitions ont été réalisées sur microscope à rayons X de Göttingen à BESSY, que nous avons décrit dans la première section de ce chapitre. Elle nous ont permis de confirmer l'intérêt de la microscopie à rayons X pour l'étude d'échantillons biologiques en milieu aqueux.

## 4. Étude de la formation des images en microscopie à rayons X

Focaliser les rayons X est resté pendant des années le frein majeur du développement de la microscopie à rayons X. Dessinées il y a maintenant plus d'un siècle par Lord Rayleigh, les zones de Fresnel n'ont été appliquées à la microscopie à rayons X que depuis une vingtaine d'années pour des raisons purement technologiques. Ces optiques de diffraction formées d'anneaux circulaires concentriques ont la propriété de focaliser les rayons X et la particularité d'offrir une résolution proportionnelle à la taille du dernier anneau.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons au processus de formation des images à travers une zone de Fresnel (Figure 4-1). Dans une première partie, nous donnerons des généralités mathématiques dont le but est d'introduire toutes les grandeurs nécessaires à la description du système optique. Puis, nous enchaînerons par une description théorique du principe de fonctionnement des zones de Fresnel. Enfin, nous proposerons une méthode expérimentale pour une mesure directe de la réponse du microscope à rayons X. Nous appliquerons cette modélisation à la mesure de l'anisotropie, de la symétrie et de la réponse impulsionnelle 3D du microscope.

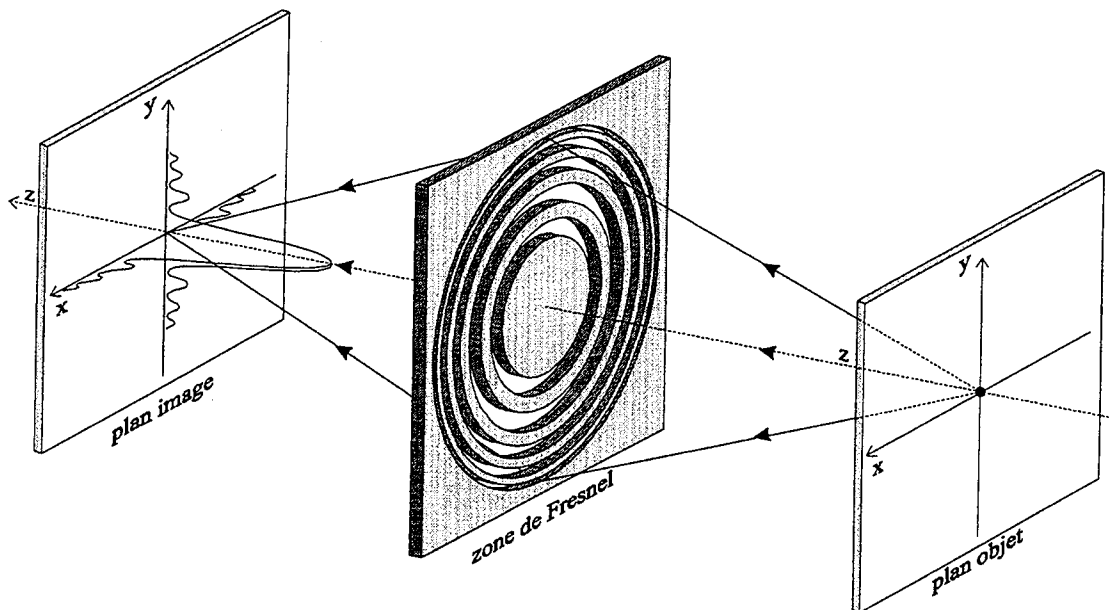


Figure 4-1. Formation de l'image à travers une zone de Fresnel.

## 4.1 Préliminaires mathématiques

Dans cette partie, nous introduirons de manière rigoureuse les grandeurs mathématiques nécessaires à la caractérisation d'un système optique, ainsi que quelques notions sur l'échantillonnage. Cette phase a pour but de définir les fonctions comme la réponse impulsionnelle (PSF) et la fonction de transfert optique (OTF), mais également d'introduire des variables intermédiaires telles que la fonction de ligne (LSF) ou la fonction de bord (ESF) d'un système [Gaskill 78]. Quand à la description mathématique de l'échantillonnage, elle est nécessaire pour l'ajustement des optiques du microscope.

### 4.1.1 Systèmes linéaires et invariants par translation

Soit un système bi-dimensionnel caractérisé par un opérateur  $S\{\}$ , une entrée  $f(x,y)$  et une sortie  $g(x,y)$  liées au système. On a la relation

$$S\{f(x,y)\} = g(x,y) \quad (4-1)$$

Un tel système est dit linéaire s'il vérifie la relation

$$S\{A_1 f_1(x, y) + A_2 f_2(x, y)\} = A_1 g_1(x, y) + A_2 g_2(x, y) \quad (4-2)$$

où  $A_1$  et  $A_2$  sont des constantes arbitraires.

De même, le système  $S\{\}$  est dit invariant par translation s'il vérifie :

$$S\{f(x - x_0, y - y_0)\} = g(x - x_0, y - y_0) \quad (4-3)$$

où  $x_0$  et  $y_0$  sont des constantes.

Pour la suite, on dénotera l'opérateur  $\mathcal{L}\{\}$  pour caractériser un système linéaire et invariant par translation (LSI, de l'anglais : *Linear and Shift Invariant*). Cette propriété s'applique à de nombreux systèmes réels et notamment en microscopie. Comme nous aurons l'occasion de le voir, elle simplifie énormément les traitements pour de nombreuses applications.

#### 4.1.1.1 La réponse impulsionnelle (PSF)

Si  $\mathcal{L}\{\}$  décrit un système LSI, alors la réponse impulsionnelle de ce système est définie par

$$h(x, y) = \mathcal{L}\{\delta(x, y)\} \quad (4-4)$$

où  $\delta(x, y)$  est la "fonction" de dirac bi-dimensionnelle.  $h(x, y)$  est la réponse du système à une impulsion appliquée à l'entrée du système.

L'invariance par translation du système permet de donner la valeur de la réponse du système en un point  $(x_0, y_0)$ , qui n'est en fait qu'une version tradatée de  $h(x, y)$ , soit :

$$\mathcal{L}\{\delta(x - x_0, y - y_0)\} = h(x - x_0, y - y_0) \quad (4-5)$$

En imagerie,  $h(x - x_0, y - y_0)$  définit la distribution d'intensité dans le plan image lorsque l'objet est un point lumineux idéal situé en  $(x_0, y_0)$ . Dans ce cas, la réponse impulsionnelle est appelée fonction de point du système, ou plus couramment PSF (de l'anglais, *Point Spread Function*).

Ainsi, soit  $f(x, y)$  un signal d'entrée quelconque, la sortie du système LSI est donnée par

$$g(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} h(x - x', y - y') f(x', y') dx' dy' \quad (4-6)$$

Cette relation est une opération de convolution, qu'il est commun de noter

$$g(x, y) = h(x, y) \otimes f(x, y) \quad (4-7)$$

et qui peut être décrite comme une superposition de réponses impulsionnelles pondérées et translattées. L'opérateur  $\otimes$  dénote la convolution.

Dans le cas d'un système d'imagerie, considérons un objet  $o(x, y)$  comme la composition de points, chacun émettant des vibrations indépendantes les unes des autres. L'image  $i(x, y)$  de cet objet à travers le système optique est alors une superposition de PSF positionnées et pondérées en fonction de la position et de l'intensité de l'objet. Cette situation est observée dans le cas de l'*éclairage incohérent*, c'est à dire qu'il n'existe aucune relation entre les phases des trains d'onde émis par deux voisins. Alors, l'image est obtenue par sommation des contributions ponctuelles de l'objet, d'où la relation de convolution

$$i(x, y) = h(x, y) \otimes o(x, y) \quad (4-8)$$

La réponse impulsionnelle caractérise entièrement un système LSI et il est donc souvent nécessaire de la calculer ou de la mesurer. La mesure équivalente dans le domaine de Fourier est la fonction de transfert qui est la transformée de Fourier de la PSF. Dans la pratique, la mesure directe de la PSF n'est pas toujours possible. D'autres mesures, plus facile à effectuer permettent de déterminer indirectement la PSF du système. La suite de ce chapitre est consacrée à la présentation de ces grandeurs.

#### 4.1.1.2 La fonction de transfert

La fonction de transfert  $H(u, v)$  est définie par :

$$H(u, v) = \mathcal{F}\{h(x, y)\} \quad (4-9)$$

où  $\mathcal{F}$  décrit la transformée de Fourier 2D.

D'après le théorème de convolution, la sortie d'un système LSI est donnée par la relation

$$G(u, v) = F(u, v)H(u, v) \quad (4-10)$$

La fonction de transfert optique exprime la réponse du système dans le domaine fréquentiel. Cette grandeur, même si elle est l'équivalente de la PSF, est la plus utilisée pour caractériser un système LSI. En optique, cette grandeur est appelée OTF (de l'anglais, *Optical Transfert Function*).

Cette grandeur est malheureusement difficile à mesurer directement, et son étude théorique n'est souvent pas suffisante. Dans la majorité des cas, son évaluation expérimentale est nécessaire, ne serait ce que pour la comparer avec la théorie.

#### 4.1.1.3 La fonction de ligne (LSF)

Soit  $f(x,y)$  une "fonction" définie par

$$f(x,y) = \delta(x), \quad \forall y \quad (4-11)$$

L'image de  $f(x,y)$  à la sortie d'un système LSI est appelée fonction de ligne (LSF, de l'anglais *Line Spread Function*). Elle est obtenue par convolution entre la fonction connue  $f(x,y)$  et la PSF du système, inconnue et que l'on cherche à déterminer, soit

$$\begin{aligned} \mathcal{L}\{\delta(x)\} &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} h(x', y') \delta(x - x') dx' dy' \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} h(x, y') dy' \end{aligned} \quad (4-12)$$

Il apparaît alors que la LSF ne dépend que de la variable  $x$ , et peut se définir par

$$\mathcal{L}\{\delta(x)\} = l_x(x) \quad (4-13)$$

Une autre propriété de la LSF est que sa transformée de Fourier  $L_x$  ne dépend également que d'une direction. En effet, on a

$$L_x(u) = \mathcal{F}\{l_x(x)\} = H(u, 0) \quad (4-14)$$

Ainsi, la transformée de Fourier de la fonction de ligne  $l_x$  est égale à la fonction de transfert suivant l'axe  $u$ .



La généralisation suivant une direction (quelconque s'obtient par un raisonnement analogue. Soit  $x'$  la nouvelle direction obtenue par rotation de l'axe  $x$  d'un angle  $\theta$ , alors

$$l_{\theta}(x') = \mathcal{L}\{\delta_{\theta}(x')\} = \int_{-\infty}^{\infty} h_{\theta}(x', \alpha) d\alpha \quad (4-15)$$

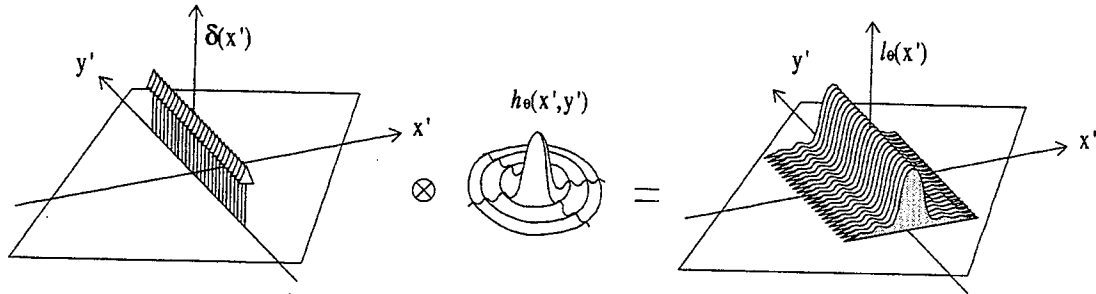


Figure 4-2. Détermination de la fonction de ligne (LSF) d'un système LSI

De même, pour la fonction de transfert on a

$$L_{\theta}(u) = \mathcal{F}\{l_{\theta}(x')\} = H_{\theta}(u', 0) \quad (4-16)$$

avec  $u'$  l'axe des fréquences correspondant à  $x'$ .

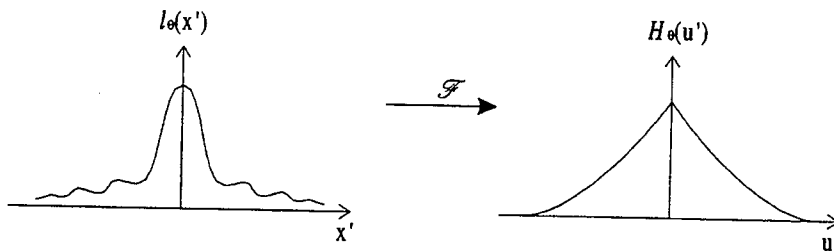


Figure 4-3. Relation entre la fonction de ligne et la fonction de transfert d'un système LSI

Cette propriété est fondamentale, car il devient possible de caractériser le système par un objet mono-dimensionnel. La mesure de la fonction de ligne suivant toutes les directions de l'espace permet de déterminer les profils associés de la fonction de transfert. De plus, si la réponse impulsionnelle du système est à symétrie circulaire, il en est de même pour la fonction de transfert. Une seule mesure du profil est alors suffisante pour caractériser complètement le système. Dans ce cas de figure, la LSF

$l_\theta(x')$  du système peut, à une constante de normalisation près, être approximée à un profil de la PSF  $h_x(x')$ , soit

$$h_x(x') \cong Kl_\theta(x') \quad (4-17)$$

Dans la pratique, la constante de normalisation n'est pas un problème puisqu'il suffit de normaliser la PSF à la fin des mesures.

#### 4.1.1.4 La fonction de bord (ESF)

Dans le cadre de l'imagerie, il est plus simple de localiser l'image d'une ligne que celle d'un point isolé. Mais trouver un "objet ligne" reste difficile, et il est plus facile de recourir à un modèle de type bord.

Supposons  $f(x,y)$ , définie par :

$$f(x,y) = m_\theta(x') \quad (4-18)$$

où  $m_\theta(x')$  est la fonction saut (fonction de Heavyside) orientée suivant une direction (et caractérisée par

$$\begin{cases} m_\theta(x') = 0 & \text{pour } x' < 0 \\ m_\theta(x') = 1 & \text{pour } x' \geq 0 \end{cases}$$

L'image  $e_\theta(x')$  de la fonction  $f(x,y)$ , appelée fonction de bord (ESF, de l'anglais *Edge Spread Function*), est définie par

$$e_\theta(x') = \mathcal{L}\{m_\theta(x')\} = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} h_\theta(\alpha, \beta) m_\theta(x' - \alpha) d\alpha d\beta \quad (4-19)$$

Or, d'après la relation (4-15), on a

$$\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} h_\theta(\alpha, \beta) m_\theta(x' - \alpha) d\alpha d\beta = \int_{-\infty}^{\infty} \left[ \int_{-\infty}^{\infty} h_\theta(\alpha, \beta) d\beta \right] m_\theta(x' - \alpha) d\alpha = \int_{-\infty}^{\infty} l_\theta(\alpha) m_\theta(x' - \alpha) d\alpha \quad (4-20)$$

d'où

$$e_\theta(x') = l_\theta(x') \otimes m_\theta(x') \quad (4-21)$$

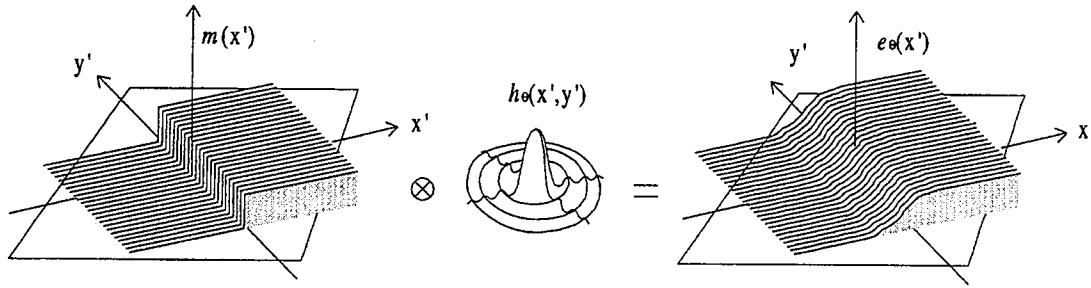


Figure 4-4. Détermination de la fonction de bord (ESF) d'un système LSI

L'ESF est donc obtenue par convolution entre la fonction marche  $m_\theta(x')$  et la fonction de ligne  $l_\theta(x)$ .

La forme de la fonction marche permet de simplifier l'équation de convolution, avec

$$e_\theta(x') = \int_{-\infty}^{\infty} l_\theta(\alpha) m_\theta(x' - \alpha) d\alpha = \int_{-\infty}^{x'} l_\theta(\alpha) d\alpha \quad (4-22)$$

d'où

$$l_\theta(x') = \frac{d}{dx'} e_\theta(x') \quad (4-23)$$

La LSF est donc obtenue par dérivation suivant la direction  $x'$  de la mesure de l'ESF. La mesure de la fonction de transfert suivant l'axe  $u'$  associée à  $x'$  est alors obtenue par la relation (4-16).

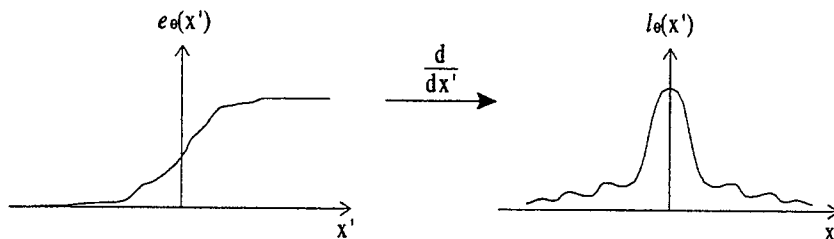


Figure 4-5. Relation entre la fonction de bord (ESF) et la fonction de ligne (LSF) d'un système LSI

Il est évident que là encore, le nombre de mesures nécessaires à la caractérisation complète du système dépend de la symétrie du système, et que dans le cas simple d'un système à symétrie circulaire, une seule mesure d'un bord est suffisante.

On peut également souligner que dans le cas particulier d'un système à symétrie circulaire, la PSF peut être approximée à la LSF. Ce cas particulier est alors très simplificateur, puisqu'il nous permet ainsi d'obtenir directement une évaluation de la PSF à partir de l'ESF, sans avoir recours au calcul intermédiaire de la fonction de transfert.

La mesure de la réponse impulsionnelle du système optique par l'intermédiaire de l'ESF est, dans le cadre de la microscopie à rayons X, l'une des méthodes les plus faciles à mettre en œuvre expérimentalement, car elle ne nécessite seulement de trouver un bord "parfait" à observer, ce qui reste plus simple que les autres grandeurs introduites dans cette partie. C'est d'ailleurs pour cette technique que nous avons opté.

### 4.1.2 Mathématiques de l'échantillonnage

L'obtention d'une image numérique passe par une étape d'échantillonnage. Cette phase consiste à discrétiser une image continue de manière à en obtenir une image discrète. La première étape consiste à échantillonner spatialement l'image au niveau du détecteur. Puis, chaque pixel constituant cette image discrète est quantifié sur un nombre fini de bits, pour former l'image numérique.

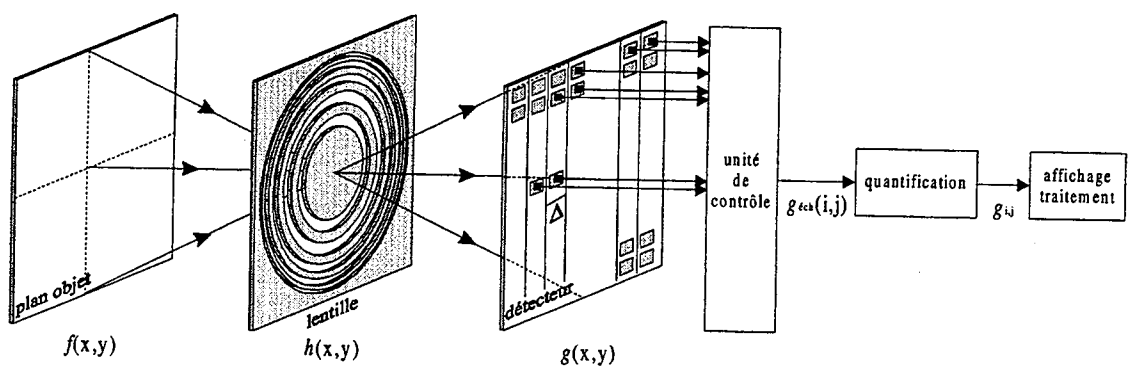


Figure 4-6. Schématisation du processus d'échantillonnage

Pour plus de facilité lors des explications suivantes, nous ne considérerons que le cas mono-dimensionnel. L'extension en deux dimensions est immédiate [Jain 89].

Le processus d'échantillonnage s'explique relativement aisément dans le cas de signaux à bande passante limitée  $B$ . En une dimension, de tels signaux vérifient la condition suivante

$$H(u) = 0, \text{ pour } |u| \geq B$$

La limite de diffraction de tout système optique nous assure que cette condition est toujours vérifiée en microscopie.

Une propriété de la transformée de Fourier implique qu'échantillonner un signal continu à la fréquence  $\Delta$  dans le domaine spatial revient à périodiser le signal fréquentiel avec un pas de  $1/\Delta$  (Figure 4-7).

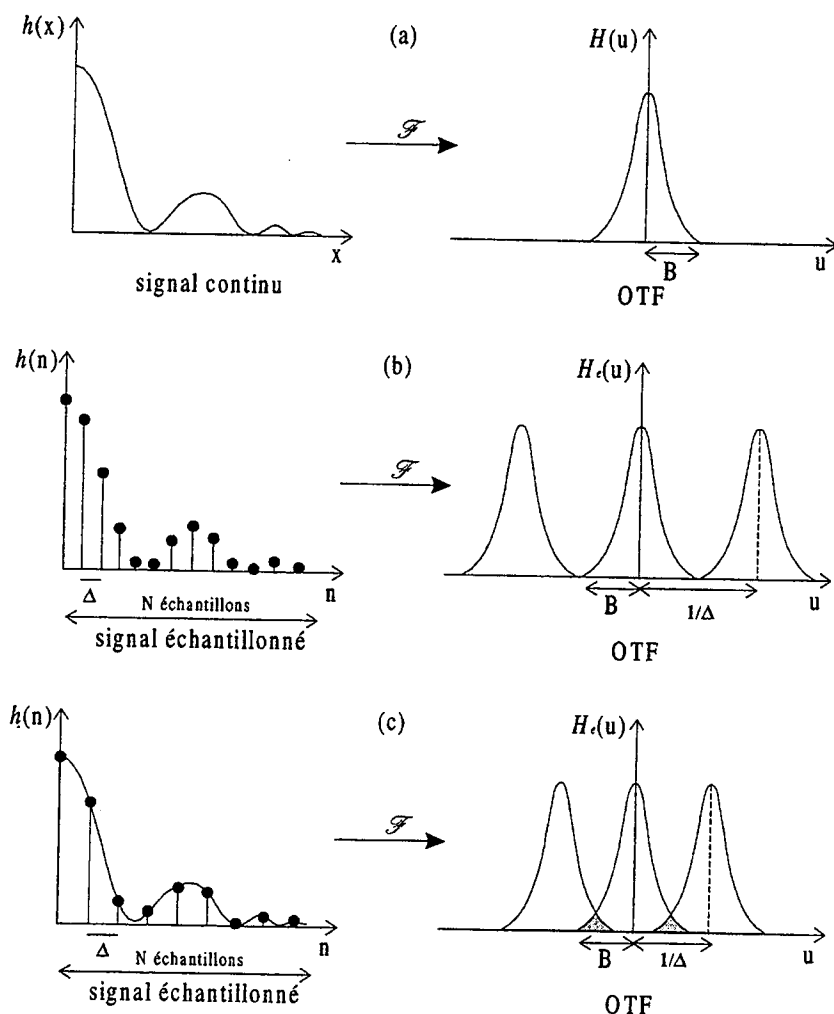


Figure 4-7. Schéma explicatif du théorème d'échantillonnage. (b) cas de l'échantillonnage de Shannon. (c) sous-échantillonnage avec réplication du spectre.

Pour ce qui concerne la phase de reconstruction, il est important de connaître les contraintes au niveau de l'échantillonnage qui permettront de reconstruire l'image initiale continue à partir de son image discrète. Or, l'unicité de la transformée de Fourier implique que si le spectre de Fourier de l'image initiale peut être déterminé à partir du spectre de l'image discrète, alors la reconstruction est possible au moyen d'une interpolation. Par conséquent, cette condition implique avant tout qu'il n'y ait pas réplification des spectres, et donc que le théorème général de l'échantillonnage soit vérifié. Ce théorème qui représente une limite physique de l'échantillonnage est le **théorème de Shannon-Whittaker** : *un signal continu et à bande passante limitée B peut être reconstruit à partir du signal échantillonné obtenu par un échantillonnage régulier à une période  $\Delta$  définie par*

$$\Delta \leq \frac{1}{2B} \quad (4-24)$$

où  $B$  est couramment appelée la fréquence de coupure du système.

Echantillonner avec une fréquence supérieure engendre un sur-échantillonnage et donc une redondance de l'information, qui n'est pas nécessaire sauf si on désire exploiter l'information contenue dans le flou. Inversement, échantillonner avec une fréquence inférieure entraîne un sous-échantillonnage qui se traduit par une réplification du spectre et donc une perte d'information. Il peut alors se produire la création de pseudo-fréquences appelée "aliasing" [Rosenfeld 82].

La prise en compte de l'échantillonnage est un critère important à ne pas négliger lors de la configuration du système optique, et ceci de manière à obtenir un échantillonnage optimal au niveau du détecteur. Pour cela, il faudra prendre en compte des paramètres tels que la fréquence de coupure de l'objectif utilisé, le grandissement et la taille d'un pixel de la caméra CCD. La fréquence de coupure d'un système optique est liée aux variables plus générales que sont la PSF et l'OTF, et qui peuvent être déterminées soit de manière théorique soit expérimentalement. La suite de ce chapitre concerne l'étude théorique, puis expérimentale de la fonction de transfert du microscope à rayons X en transmission du laboratoire de Göttingen à BESSY.

## 4.2 Étude théorique de la formation des images par les zones de Fresnel

Dans cette partie, nous développerons les équations pour la description du principe de formation des images par une zone de Fresnel utilisée en microscopie à rayons X pour focaliser les rayons X. Nous développerons les équations générales de la diffraction de manière à comprendre le fonctionnement de ces lentilles à l'aide d'approximations successives sur la géométrie du problème. Des références à ce sujet peuvent se trouver dans [Hecht 80], [Fowles 89], [Bruhat 92] et [Born 93].

### 4.2.1 Théorie fondamentale de la diffraction

Soient  $U$  et  $V$  deux fonctions scalaires vérifiant les conditions de continuité et d'intégrabilité. Soit  $\mathcal{V}$  un volume délimité par une surface  $\mathcal{A}$ .

Considérons le *théorème général de divergence* donné par la relation

$$\iint \mathbf{F} \cdot \mathbf{n} d\mathcal{A} = \iiint (\nabla \cdot \mathbf{F}) d\mathcal{V} \quad (4-25)$$

où  $\nabla$  représente la divergence, et  $\mathbf{n}$  le vecteur normal à la surface d'intégration.

En posant 
$$\mathbf{F} = U \nabla V - V \nabla U$$

et en utilisant l'égalité

$$\nabla \cdot (U \nabla V) = U \nabla^2 V + (\nabla U) \cdot (\nabla V) \quad (4-26)$$

on arrive au *théorème de Green*

$$\iint (V \text{grad}_n U - U \text{grad}_n V) d\mathcal{A} = \iiint (V \nabla^2 U - U \nabla^2 V) d\mathcal{V} \quad (4-27)$$

où l'intégrale de gauche s'étend sur une surface fermée  $\mathcal{A}$ , et l'intégrale de droite s'étend sur le volume  $\mathcal{V}$  compris à l'intérieur de cette surface. "grad<sub>n</sub>" signifie que l'on ne prend en compte que la composante du gradient normale à la surface d'intégration.

En particulier, si  $U$  et  $V$  sont des fonctions d'onde, elles vérifient les équations générales des ondes

$$\nabla^2 U = k^2 \frac{\partial^2 U}{\partial t^2} \quad \text{et} \quad \nabla^2 V = k^2 \frac{\partial^2 V}{\partial t^2} \quad (4-28)$$

l'équation (4-26) s'écrit alors

$$\iint (V \text{grad}_n U - U \text{grad}_n V) d\mathcal{A} = \iiint \left( V k^2 \frac{\partial^2 U}{\partial t^2} - U k^2 \frac{\partial^2 V}{\partial t^2} \right) d\mathcal{V} \quad (4-29)$$

Si de plus elles ont toutes les deux une variation en fonction du temps de la forme  $e^{\pm i\omega t}$ , en posant par exemple  $U = U_0(r)e^{i\omega t}$  et  $V = V_0(r)e^{i\omega t}$ , on peut développer le terme entre parenthèses de l'intégrale volumique :

$$\begin{aligned} V k^2 \frac{\partial^2 U}{\partial t^2} - U k^2 \frac{\partial^2 V}{\partial t^2} &= V_0(r)e^{i\omega t} k^2 U_0(r) \frac{\partial^2 e^{i\omega t}}{\partial t^2} - U_0(r)e^{i\omega t} k^2 V_0(r) \frac{\partial^2 e^{i\omega t}}{\partial t^2} \\ &= -\omega^2 V_0(r)e^{2i\omega t} k^2 U_0(r) + \omega^2 U_0(r)e^{2i\omega t} k^2 V_0(r) = 0 \end{aligned}$$

Le théorème de Green est alors réduit à

$$\iint (V \text{grad}_n U - U \text{grad}_n V) d\mathcal{A} = 0 \quad (4-30)$$

Supposons maintenant que  $V$  est une fonction d'onde sphérique convergente au point  $P$  ( $r=0$ )

$$V = V_0 \frac{e^{i(kr+\omega t)}}{r} \quad (4-31)$$

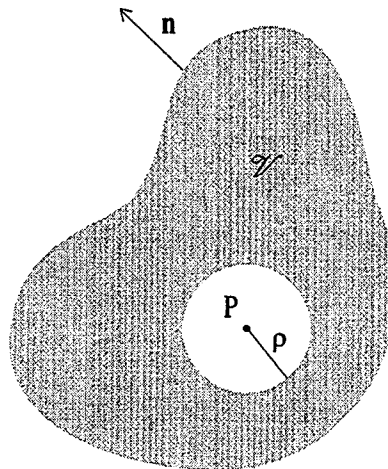


Figure 4-8. Surface d'intégration pour démontrer le théorème de Kirchoff



On choisit P tel qu'il soit à l'intérieur du volume  $\mathcal{V}$  délimité par la surface d'intégration  $\mathcal{A}$ . Sachant que V devient infini au point P, il faut extraire ce point de l'intégrale. Pour cela, on soustrait de l'intégrale une petite sphère de rayon  $\rho$  centrée sur P, comme ceci est indiqué Figure 4-8. Sur cette sphère, on a  $r = \rho$  et  $\text{grad}_n = -\partial/\partial r$ . Par conséquent, on peut écrire

$$\iint \left( \frac{e^{ikr}}{r} \text{grad}_n U - U \text{grad}_n \frac{e^{ikr}}{r} \right) d\mathcal{A} - \iint_{r=\rho} \left( \frac{e^{ikr}}{r} \frac{\partial U}{\partial r} - U \frac{\partial}{\partial r} \frac{e^{ikr}}{r} \right) \rho^2 d\Omega = 0 \quad (4-32)$$

où  $d\Omega$  est l'angle solide sur la sphère centrée au point P, et  $\rho^2 d\Omega$  est l'élément de surface correspondant.

La seconde intégrale peut se développer sous la forme

$$\begin{aligned} & \iint_{r=\rho} \left\{ \frac{e^{ikr}}{r} \frac{\partial U}{\partial r} - U \left( \frac{ikre^{ikr} - e^{ikr}}{r^2} \right) \right\} \rho^2 d\Omega \\ &= \iint_{r=\rho} \left\{ \frac{e^{ikr}}{r^2} \left( r \frac{\partial U}{\partial r} - U(ikr - 1) \right) \right\} \rho^2 d\Omega \\ &= \iint e^{ik\rho} \left( \rho \frac{\partial U}{\partial \rho} - U(ik\rho - 1) \right) d\Omega \xrightarrow{\rho \rightarrow 0} \iint U_P d\Omega = 4\pi U_P \end{aligned}$$

avec  $U_P = U(r = 0)$

L'équation (4-32) devient donc

$$U_P = \frac{1}{4\pi} \iint \left( \frac{e^{ikr}}{r} \text{grad}_n U - U \text{grad}_n \frac{e^{ikr}}{r} \right) d\mathcal{A} \quad (4-33)$$

Cette intégrale est connue sous le nom *d'intégrale de Kirchoff*. Elle donne la valeur d'une fonction d'onde en tout point *intérieur* d'une surface fermée arbitraire  $\mathcal{A}$  en fonction de la valeur de la fonction d'onde *sur* la surface.

En diffraction,  $U_P$  est l'amplitude de la fonction d'onde au point P. C'est un scalaire ; le module au carré de  $U_P$  représente l'intensité au point P.

## 4.2.2 Formule de Fresnel-Kirchoff

Appliquons maintenant l'intégrale de Kirchoff au problème général de la diffraction. La diffraction est produite par une ouverture quelconque à l'intérieur d'une paroi opaque. Cette paroi sépare la source S du point d'observation P (Figure 4-9).

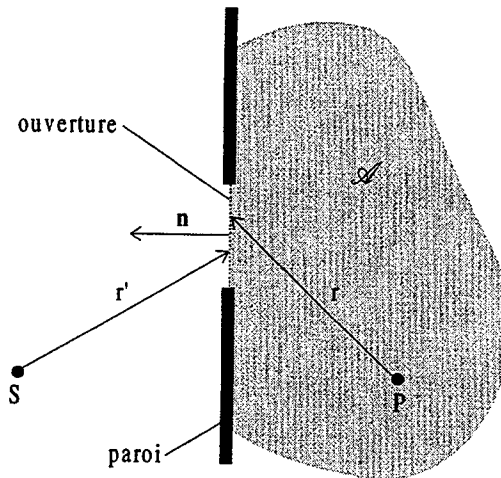


Figure 4-9. Géométrie pour la formule de Fresnel-Kirchoff.

Le but est de déterminer l'amplitude au point P. On applique l'intégrale de Kirchoff, en choisissant une surface d'intégration  $\mathcal{S}$  qui englobe le point P et une partie de l'ouverture comme indiquée sur la Figure 4-9.

Auparavant, on introduira deux suppositions :

1- La fonction d'onde  $U$  et son gradient n'ont qu'une contribution négligeable dans l'intégrale excepté à l'ouverture.

2- A l'ouverture,  $U$  et  $\text{grad } U$  ont respectivement les mêmes valeurs que sans la présence des parois séparatrices.

Si  $r'$  représente la distance d'un point de l'ouverture à la source S, la fonction d'onde à l'ouverture est donnée par

$$U = U_0 \frac{e^{i(kr' - \omega t)}}{r'} \quad (4-34)$$

ce qui caractérise une onde sphérique monochromatique issue de S. L'intégrale de Kirchoff devient alors

$$U_P = \frac{U_0 e^{-i\omega t}}{4\pi} \iint \left( \frac{e^{ikr}}{r} \text{grad}_n \frac{e^{ikr'}}{r'} - \frac{e^{ikr'}}{r'} \text{grad}_n \frac{e^{ikr}}{r} \right) d\mathcal{A} \quad (4-35)$$

où l'intégrale est effectuée uniquement sur l'ouverture.

On a les relations suivantes

$$\text{grad}_n \frac{e^{ikr}}{r} = \cos(\mathbf{n}, \mathbf{r}) \frac{\partial}{\partial r} \frac{e^{ikr}}{r} = \cos(n, r) \left( \frac{ike^{ikr}}{r} - \frac{e^{ikr}}{r^2} \right) \quad (4-36)$$

$$\text{grad}_n \frac{e^{ikr'}}{r'} = \cos(\mathbf{n}, \mathbf{r}') \frac{\partial}{\partial r'} \frac{e^{ikr'}}{r'} = \cos(n, r') \left( \frac{ike^{ikr'}}{r'} - \frac{e^{ikr'}}{r'^2} \right) \quad (4-37)$$

or, comme  $r$  et  $r'$  sont très grands devant la longueur d'onde  $\lambda$  et utilisant la relation  $k = 2\pi/\lambda$ , on a

$$\begin{aligned} \frac{1}{r} \ll \frac{1}{\lambda} &\Rightarrow \frac{1}{r} \ll k \Rightarrow \frac{1}{kr} \ll 1 \\ \frac{1}{r'} \ll \frac{1}{\lambda} &\Rightarrow \frac{1}{r'} \ll k \Rightarrow \frac{1}{kr'} \ll 1 \end{aligned}$$

on peut donc négliger les second termes dans les équations (4-36) et (4-37). Par conséquent, l'équation (III-35) devient

$$U_P = -\frac{ikU_0 e^{-i\omega t}}{4\pi} \iint \frac{e^{ik(r+r')}}{rr'} [\cos(n, r) - \cos(n, r')] d\mathcal{A} \quad (4-38)$$

Cette intégrale est connue sous le nom d'*intégrale de Fresnel-Kirchoff*.

### 4.2.3 Diffraction de Fraunhofer et de Fresnel

Il faut distinguer deux cas différents, à savoir la *diffraction de Fresnel* et la *diffraction de Fraunhofer*. Qualitativement, on parle de la *diffraction de Fraunhofer* quand les ondes incidentes et diffractées sont planes. Ceci est vérifié quand les distances source-ouverture et observation-ouverture sont relativement grandes de telle sorte que le

rayon de courbure du front d'onde des ondes incidentes et diffractées soient négligeables (Figure 4-10(a)).

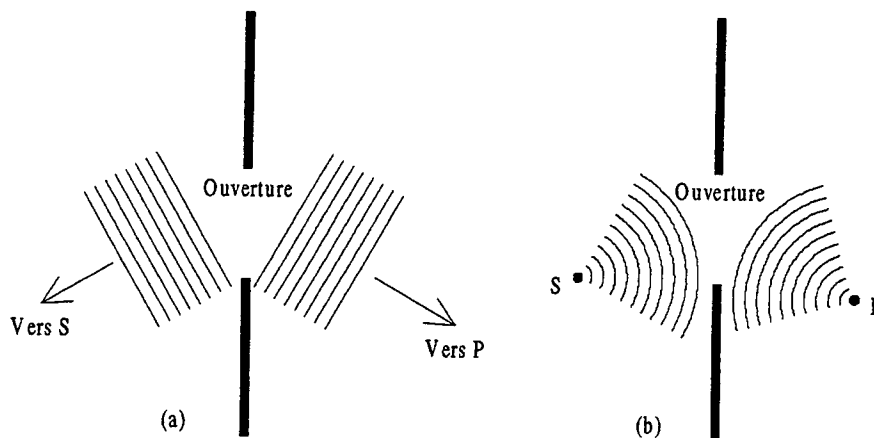


Figure 4-10. Diffraction par une ouverture. (a) de Fraunhofer, (b) de Fresnel

Si par contre la source ou le point d'observation est assez près de la source de telle sorte que le rayon de courbure du front d'onde soit significatif, on est dans le cas de la *diffraction de Fresnel* (Figure 4-10(b)). Même s'il n'y a pas de différence fondamentale entre les 2 cas de diffraction, on peut faire ressortir un critère quantitatif permettant de les distinguer. Pour cela considérons la Figure 4-11 qui présente la géométrie générale du problème de diffraction.

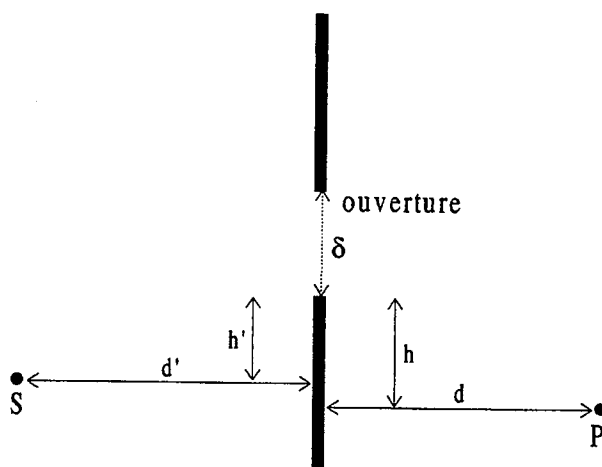


Figure 4-11. Géométrie pour distinguer les diffractions de Fresnel et de Fraunhofer

La variation  $\Delta$  du trajet optique  $r + r'$  d'une extrémité à l'autre de l'ouverture est donnée par

$$\begin{aligned}\Delta &= \sqrt{d'^2 + (h' + \delta)^2} + \sqrt{d^2 + (h + \delta)^2} - \sqrt{d'^2 + h'^2} - \sqrt{d^2 + h^2} \\ &= d' \sqrt{1 + \frac{(h' + \delta)^2}{d'^2}} + d \sqrt{1 + \frac{(h + \delta)^2}{d^2}} - d' \sqrt{1 + \frac{h'^2}{d'^2}} - d \sqrt{1 + \frac{h^2}{d^2}}\end{aligned}$$

En supposant que les distances  $d$  et  $d'$  sont grandes devant les hauteurs  $(h + \delta)$  et  $(h' + \delta)$ , et en effectuant un développement limité au premier ordre on obtient

$$\Delta = \left( \frac{h'}{d'} + \frac{h}{d} \right) \delta + \frac{1}{2} \left( \frac{1}{d'} + \frac{1}{d} \right) \delta^2 + \dots \quad (4-39)$$

Le terme quadratique dans la relation ci-dessus représente précisément une mesure du rayon de courbure du front d'onde. L'onde sera alors approximée comme plane sur l'ouverture si ce terme est négligeable devant la longueur de l'onde de la lumière incidente, donc si

$$\frac{1}{2} \left( \frac{1}{d'} + \frac{1}{d} \right) \delta^2 \ll \lambda \quad (4-40)$$

Ceci est le critère pour la diffraction de Fraunhofer. Si cette condition n'est pas vérifiée, le rayon de courbure du front d'onde est alors non négligeable et on est dans le cas de la diffraction de Fresnel. C'est cette dernière situation qui nous intéresse et que nous allons étudier plus en détail dans le cas précis des zones de Fresnel utilisées en microscopie X.

## 4.2.4 Les zones de Fresnel

Les zones de Fresnel forment un réseau circulaire constitué d'anneaux concentriques à alternance transparents et opaques et dont l'espacement diminue avec la distance au centre. Les ondes diffractées, lorsqu'elles traversent les anneaux transparents, convergent toutes au même point focal.

### 4.2.4.1 Caractéristiques géométriques des zones de Fresnel

Considérons les zones de Fresnel dans un plan éclairé par une source (Figure 4-12). Soit P le point d'observation tel que SP soit orthogonal au plan contenant les zones de Fresnel.

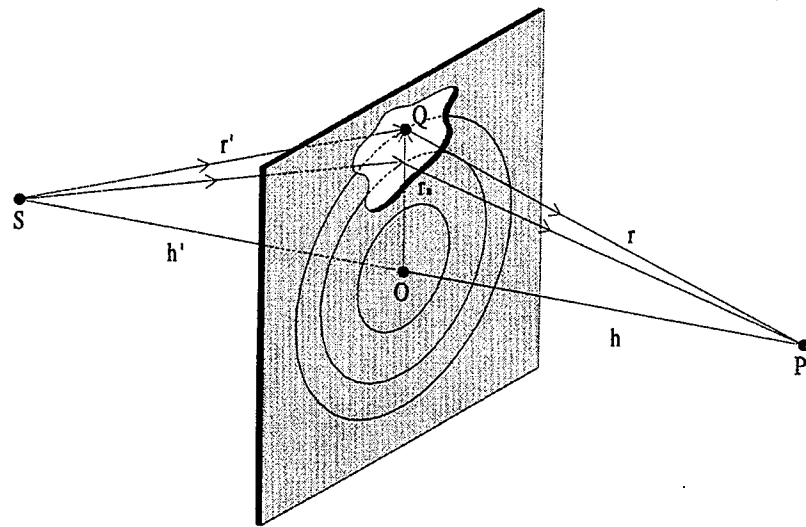


Figure 4-12. Zones de Fresnel

La distance  $SQP = r' + r$  s'exprime en fonction de  $r_n$  ( $r_n$  étant le rayon de la  $n^{\text{ème}}$  zone) par la relation

$$r + r' = (h^2 + r_n^2)^{1/2} + (h'^2 + r_n^2)^{1/2} \quad (4-41)$$

On se base sur le principe que d'une zone à l'autre la phase de l'onde issue de la source S doit subir un changement de phase de  $\pi$  sur le trajet SQP, ce qui équivaut à une variation de chemin optique d'une demi longueur d'onde  $\lambda/2$ .

En effectuant un développement limité en  $h/r_n$  de  $r + r'$ , la relation (4-41) devient

$$r + r' = h + h' + \frac{1}{2} r_n^2 \left( \frac{1}{h} + \frac{1}{h'} \right) + \dots \quad (4-42)$$

En ajoutant la condition sur la variation du chemin optique de  $\lambda/2$  qui s'exprime par

$$r + r' = h + h' + n \frac{\lambda}{2} \quad (4-43)$$

on en déduit logiquement les relations

$$r_1 = \sqrt{\lambda f}, \quad r_2 = \sqrt{2\lambda f}, \quad \dots, \quad r_n = \sqrt{n\lambda f} \quad (4-44)$$

avec

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{h} + \frac{1}{h'} \quad (4-45)$$

où  $r_1$  est le rayon de la première zone, et  $f$  la distance focale au premier ordre donnée par

$$f = \frac{r_1^2}{\lambda} \quad (4-46)$$

Le grandissement  $G$  est donné par le rapport

$$G = \frac{h}{h'} \quad (4-47)$$

Comme une zone de Fresnel est une forme de grille de diffraction, on s'attend à ce qu'il y ait des distances focales d'ordre supérieures. Ces ordres supérieurs sont obtenus lorsque les trajets optiques entre deux zones consécutives diffèrent de  $m\lambda/2$ , soit

$$r_n = \sqrt{mn\lambda f_m} \quad (4-48)$$

où  $f_m$  est le foyer au  $m^{\text{ème}}$  ordre, avec

$$f_m = f / m \quad (4-49)$$

Or, pour que  $f_m$  corresponde à un foyer, il faut que les interférences soient constructives, et donc que  $m$  soit impair. Par conséquent, une zone de Fresnel possède une infinité de foyers optiques, positifs et négatifs, avec  $m = \pm 1, \pm 3, \pm 5, \dots$  Il existe également des radiations non diffractées qui correspondent à  $m = 0$ . La Figure 4-14 représente le schéma d'une zone de Fresnel et des ordres de diffractions.

Soit  $N$  le nombre de zones, la largeur de la dernière zone  $dr_N$  définie comme la différence entre  $r_N$  et  $r_{N-1}$  est donnée par

$$dr_N = r_N - r_{N-1} = \sqrt{N\lambda f} - \sqrt{(N-1)\lambda f} \quad (4-50)$$

Pour un grand nombre de zones (en général  $N \geq 100$ ), un développement limité au premier ordre en  $1/N$  de l'équation (4-49) donne la relation

$$dr_N = \frac{r_N}{2N} \quad (4-51)$$

De plus, si  $r_{n+1}$  et  $r_n$  sont respectivement les rayons externes et internes de la  $n+1$ ème zone, son aire est donnée par

$$\text{Aire} = \pi r_{n+1}^2 - \pi r_n^2 = \pi \lambda f = \pi r_1^2 \quad (4-52)$$

Les zones ont par conséquent toutes des aires égales.

Enfin, une onde focalisée au foyer du  $m^{\text{ème}}$  ordre est diffractée à travers un petit angle  $\alpha_m$ , donné par la relation

$$\alpha_m \cong \sin \alpha_m \cong \tan \alpha_m = r_N / f_m \quad (4-53)$$

La quantité  $\sin \alpha_m$  définit l'ouverture numérique (NA) associée au  $m^{\text{ème}}$  ordre de diffraction de la zone de Fresnel. Elle peut se définir en fonction des paramètres géométriques de la micro-zone de Fresnel, par

$$\text{NA} = \sin \alpha_m = \frac{m\lambda}{2dr_N} \quad (4-54)$$

Les faibles valeurs de NA des lentilles utilisées actuellement, font de la microscopie à rayons X est une microscopie à grande profondeur de champ.

#### 4.2.4.2 Amplitude d'une zone de Fresnel

L'amplitude au point P peut être évaluée en termes de contributions individuelles provenant des différentes zones de Fresnel. Comme d'une zone à l'autre on a exactement une variation de phase de  $\pi$ , et donc des contributions en opposition de phases, la somme de toutes les contributions à l'amplitude  $|U_P|$  peut s'exprimer de la manière suivante

$$|U_P| = |U_1| - |U_2| + |U_3| - \dots - (-1)^{N+1} |U_N| = \sum_{j=1}^N (-1)^{j+1} |U_j| \quad (4-55)$$



Une première approche superficielle consiste à noter que comme l'aire de chaque zone est la même (équation 4-52), les contributions s'annulent deux à deux, et la contribution totale est alors égale à  $U_1$  si  $N$  est impaire et 0 si  $N$  est paire. Mais si l'on veut détailler chaque contribution et ne pas se contenter de cette approche superficielle, il est nécessaire de repartir de l'intégrale de Fresnel-Kirchoff (équation 4-38) en la réécrivant sous la forme

$$U_p = A_0 \iint \frac{e^{ik(r+r')}}{rr'} K(r, r') d\mathcal{A} \quad (4-56)$$

avec

$$K(r, r') = -\frac{i}{2\lambda} (\cos(n, r) - \cos(n, r')) \quad (4-57)$$

et

$$A_0 = U_0 e^{-i\alpha t} \quad (4-58)$$

$K(r, r')$  est appelé *le facteur d'inclinaison*.

Sachant que les distances  $h$  et  $h'$  sont grandes devant le diamètre de la lentille, le facteur d'inclinaison ne varie qu'infinitement peu d'une zone à l'autre, de telle sorte que l'on peut le sortir de l'intégrale. Il en est de même pour le dénominateur  $rr'$  que l'on peut approximer à  $hh'$  et sortir également de l'intégrale. En utilisant le développement (4-54), l'intégrale (4-56) peut se décomposer par

$$U_j = \frac{A_0}{hh'} K_j \iint e^{ik(r+r')} d\mathcal{A}_j \quad (4-59)$$

où  $K_j$  et  $\mathcal{A}_j$  représentent respectivement le facteur d'inclinaison et l'aire de la  $j^{\text{ème}}$  zone.

Considérons maintenant le schéma donné Figure 4-13. L'élément de surface  $d\mathcal{A}_j$  sur la  $j^{\text{ème}}$  zone vaut

$$d\mathcal{A}_j = \rho d\rho d\psi \quad (4-60)$$

avec  $\rho$  variant de  $r_{j-1}$  à  $r_j$  et  $\psi$  de 0 à  $2\pi$ .

Soit  $s$  le chemin optique d'un rayon lumineux

$$s = r + r' \tag{4-61}$$

Par un développement limité analogue à celui utilisé pour trouver la relation (4-42) on obtient la variation du chemin optique  $ds$  :

$$ds = \rho d\rho \left( \frac{1}{h} + \frac{1}{h'} \right) \tag{4-62}$$

En appliquant les changements de variables des équations (4-60) à (4-62), l'intégrale (4-59) devient

$$U_j = \frac{A_0}{h + h'} K_j \int_0^{2\pi} d\psi \int_{h+h'+(j-1)\lambda/2}^{h+h'+j\lambda/2} e^{iks} ds \tag{4-63}$$

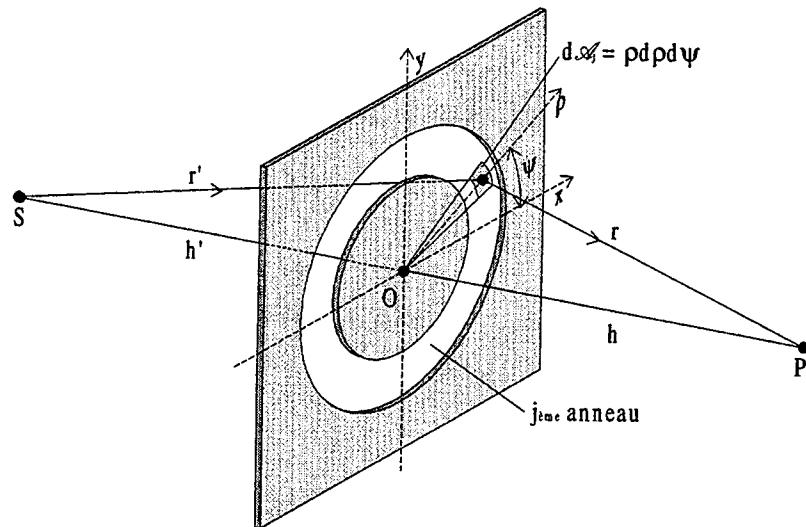


Figure 4-13. Géométrie pour calculer la contribution à l'amplitude d'une zone de Fresnel

Le développement de l'intégrale (4-63) nous donne la contribution à l'amplitude de la  $j^{\text{ème}}$  zone :

$$U_j = 2i\lambda \frac{A_0 e^{ik(h+h')}}{h + h'} (-1)^{j+1} K_j \tag{4-64}$$

L'amplitude totale au point P étant égale à la somme de toutes les contributions individuelles  $U_j$ , soit :

$$U_P = 2i\lambda \frac{A_0 e^{ik(h+h')}}{h+h'} \sum_{j=1}^N (-1)^{j+1} K_j \quad (4-65)$$

On retombe sur une série de la forme de celle développée dans l'équation (4-55), où l'étude de la série  $U_P$  se réduit à l'étude de la série

$$\sum_{j=1}^N (-1)^{j+1} K_j \quad (4-66)$$

En regardant la forme du facteur d'inclinaison  $K_j$  (équation 4-57) et la figure de diffraction (Figure 4-13), on voit que les valeurs de  $K_j$  décroissent très doucement d'une zone à l'autre dans le sens croissant des  $j$ . En réécrivant la série (4-66) sous la forme

$$\sum_{j=1}^N (-1)^{j+1} K_j = \frac{K_1}{2} + \left( \frac{K_1}{2} - K_2 + \frac{K_3}{2} \right) + \left( \frac{K_3}{2} - K_4 + \frac{K_5}{2} \right) + \dots \quad (4-67)$$

et en supposant que la décroissance du facteur d'inclinaison est très faible, la valeur de chaque  $K_j$  est approximativement égale à la valeur moyenne des  $K$  adjacents, et les termes entre parenthèses sont quasiment nuls. Par conséquent, pour  $N$  grand, l'amplitude résultante devient donc égale à  $|U_1|/2$  soit

$$U_P = \frac{A_0 e^{ik(h+h')}}{h+h'} \quad (4-68)$$

avec  $K_1 = -i/\lambda$ , ce qui représente également l'amplitude au point  $P$  issue de la source  $S$  sans aucune séparation.

On voit alors que tout se passe comme si il n'y avait pas d'écran entre la source et le point d'observation. Cette propriété est rassurante car dans notre raisonnement on a uniquement procédé à un découpage fictif du plan en anneaux concentriques.

On remarque également que si on couvre toutes les zones sauf la première, on a  $U_P = U_1$  et l'intensité au point  $P$  donnée par  $I = |U_P|^2$  est alors 4 fois plus grande que dans le cas précédent. Si enfin on obstrue une zone sur deux, l'amplitude devient alors

$$|U_P| = |U_1| + |U_3| + |U_5| + \dots \quad (4-69)$$

qui est considérablement supérieur à l'amplitude observée sans ouverture, et agit ainsi comme une lentille le fait avec la lumière du visible en focalisant les rayons au foyer  $f$ .

C'est ce principe qui est utilisé dans la pratique pour focaliser les rayons X, où les zones de Fresnel sont construites à alternances transparentes et opaques comme c'est illustré sur la figure ci dessous

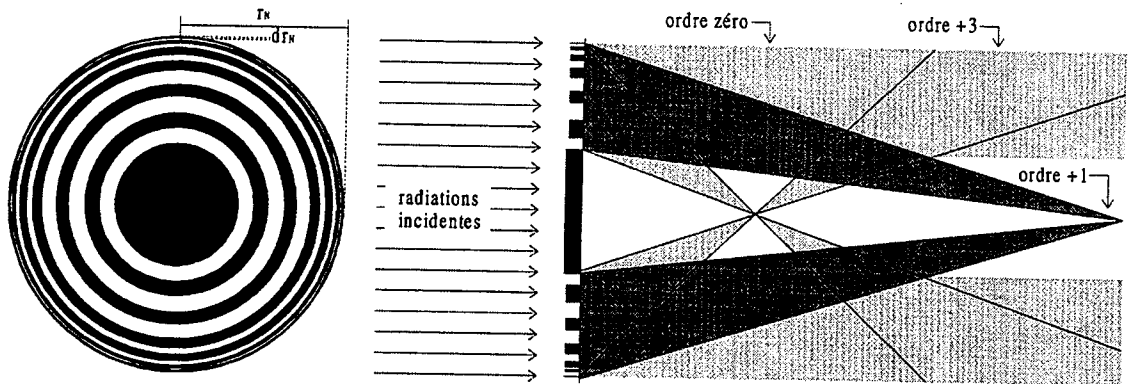


Figure 4-14. Géométrie des zones de Fresnel utilisées pour focaliser les rayons X, avec ses ordres de diffraction.

Mais le problème des rayons X, c'est qu'ils sont très pénétrants, et qu'il faut alors tenir compte de l'absorption dans le métal utilisé pour fabriquer les parties opaques des zones de Fresnel. C'est l'objet de la section suivante.

#### 4.2.4.3 Efficacité des zones de Fresnel en tenant compte de l'absorption

Dans les gammes de longueurs d'onde de l'ultra violet lointain et des rayons X, tous les matériaux deviennent absorbant, et la partie réelle de l'indice de réfraction  $\hat{n}$  approche la valeur de 1. On ne peut donc plus se contenter de considérer les zones de Fresnel comme des zones cylindriques à alternances transparentes et opaques avec un déphasage de  $\pi$  entre deux zones. Il faut en plus tenir compte du matériau utilisé et de son indice de réfraction [Kirz 74] que l'on peut écrire sous la forme  $\hat{n} = n_r - i\beta$ , ou encore

$$\hat{n} = 1 - \delta - i\beta \quad (4-70)$$

où  $\delta$  est la déviation par rapport à 1 de la partie réelle de l'indice de réfraction caractérisant le déphasage et  $\beta$  sa partie imaginaire caractérisant l'absorption du

matériau (voir la section 2.3 pour plus de détails sur l'interaction entre les rayons X et la matière).

Considérons les anneaux constituant les zones de Fresnel par paires. Le chemin optique d'une paire à l'autre varie d'une longueur d'onde  $\lambda$  (et la phase de  $2\pi$ ). Par convention, décidons de laisser la première zone ouverte et la seconde recouverte d'une épaisseur  $t$  du matériaux d'indice de réfraction  $\hat{n}$ . Ce matériaux atténue l'amplitude d'un facteur  $e^{-2\pi\beta t/\lambda}$ , et entraîne un retard de phase de  $\phi = 2\pi t\delta/\lambda$  par rapport à la zone ouverte.

La contribution à l'amplitude pour la première paire d'anneaux est obtenue en sommant les contributions de chaque anneau. Un raisonnement identique à celui fait pour déterminer la contribution à l'amplitude d'un anneau peut être utilisé pour résoudre notre problème. Tout comme nous avons utilisé le chemin optique  $s$  comme variable d'intégration (voir équation 4-61), un calcul analogue peut être effectué en prenant cette fois le déphasage  $\theta$  comme nouvelle variable d'intégration. Ce choix de travailler sur la phase va faciliter notre étude notamment lors du passage dans la zone de réfraction. Ainsi on arrive de la même manière à déterminer l'amplitude issue de la zone ouverte, soit

$$U_1 = \frac{C}{2\pi} \int_0^\pi e^{i\theta} d\theta = \frac{iC}{\pi} \quad (4-71)$$

où  $C^2 = I_{inc}$  est le flux incident sur la paire de zones.

De même, l'amplitude issue de la zone opaque est

$$U_2 = \frac{C}{2\pi} e^{-2\pi\delta/\lambda} \int_\pi^{2\pi} e^{i(\theta-\phi)} d\theta = -\frac{iC}{\pi} e^{-2\pi\delta/\lambda} e^{-i\phi} \quad (4-72)$$

L'intensité totale résultante due à la première paire de zones est donc

$$I_1 = |U_1 + U_2|^2 = \frac{C^2}{\pi^2} (1 + e^{-4\pi\delta/\lambda} - 2e^{-2\pi\delta/\lambda} \cos \phi) \quad (4-73)$$

Si on définit le paramètre  $\eta$  comme le rapport

$$\eta = \frac{\beta}{\delta} \quad (4-74)$$

alors l'équation (4-73) devient

$$I_1 = \frac{C^2}{\pi^2} (1 + e^{-2\eta\varphi} - 2e^{-\eta\varphi} \cos\varphi) \quad (4-75)$$

Les contributions aux ordres supérieurs de diffraction peuvent simplement être déterminés, et sont donnés par

$$\begin{cases} I_m = \frac{C^2}{m^2 \pi^2} (1 + e^{-2\eta\varphi} - 2e^{-\eta\varphi} \cos\varphi) & \text{pour } m = \pm 1, \pm 3, \pm 5, \dots \\ 0 & \text{pour } m = \pm 2, \pm 4, \pm 6, \dots \end{cases} \quad (4-76)$$

Par conséquent, en ne considérant que l'absorption du matériau dans les zones opaques ( $\eta \rightarrow \infty$ ), c'est le cas des zones de Fresnel classiques, les deux exponentielles disparaissent et l'efficacité au premier ordre de diffraction est de  $1/\pi^2$ , soit 10,1%. Elle n'est plus que de 1,1 % au 3<sup>ème</sup> ordre et de 0,6 % au 5<sup>ème</sup> ordre.

Si par contre l'absorption est ignorée ( $\eta = 0$  et  $\varphi = \pi$ ), c'est le cas des zones de Rayleigh-Wood, l'efficacité devient  $4/\pi^2$ , soit 40,4%. En pratique, l'absorption ne peut pas être ignorée, mais on peut trouver des matériaux avec  $\eta \approx 0,2$  et dont l'épaisseur  $t$  est ajustée de manière à obtenir un déphasage de  $\pi$  à la longueur d'onde  $\lambda$  utilisée ( $t = \lambda / 2\delta$ ), ce qui entraîne une efficacité théorique de l'ordre de 20%.

#### 4.2.4.4 Figure de diffraction d'une zone de Fresnel

L'image d'un point à travers une zone de Fresnel est une figure de diffraction décrite par la réponse impulsionnelle (PSF) de cette lentille. Michette et al. [Michette 86] ont démontré à partir de l'intégrale de Fresnel-Kirchoff donné par l'équation (4-38), que pour un nombre d'anneaux supérieur à 100, la PSF d'une zone de Fresnel correspond à celle d'une lentille classique utilisée en microscopie optique photonique en illumination incohérente, avec des paramètres physiques du microscope à rayons X.

Considérons la géométrie de la Figure 4-15. La réponse impulsionnelle d'une lentille en éclairage incohérent peut être obtenue par une analyse fréquentielle de l'intégrale de convolution [Goodman 68].

$$H(u, v) = \frac{\iint P\left(\xi + \frac{\lambda d_o u}{2}, \eta + \frac{\lambda d_o v}{2}\right) P\left(\xi - \frac{\lambda d_o u}{2}, \eta - \frac{\lambda d_o v}{2}\right) d\xi d\eta}{\iint P(\xi, \eta) d\xi d\eta} \quad (4-77)$$

où  $d_o$  et  $d_i$  sont respectivement les distances objet-lentille et lentille-image.  $P(x, y)$  est la fonction pupillaire définie comme

$$P(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{pour } (x, y) \text{ dans la pupille} \\ 0 & \text{ailleurs} \end{cases}$$

L'expression de  $H$  a une interprétation géométrique relativement simple. En effet, le numérateur représente l'aire de la partie commune de deux fonctions pupillaires centrées en deux points symétriques l'un de l'autre (voir Figure 4-16). Le dénominateur normalise cette aire par l'aire totale de la pupille. Par conséquent, l'étude de  $H$  revient à étudier

$$H(u, v) = \frac{\text{aire de la partie commune}}{\text{aire totale}} \quad (4-78)$$

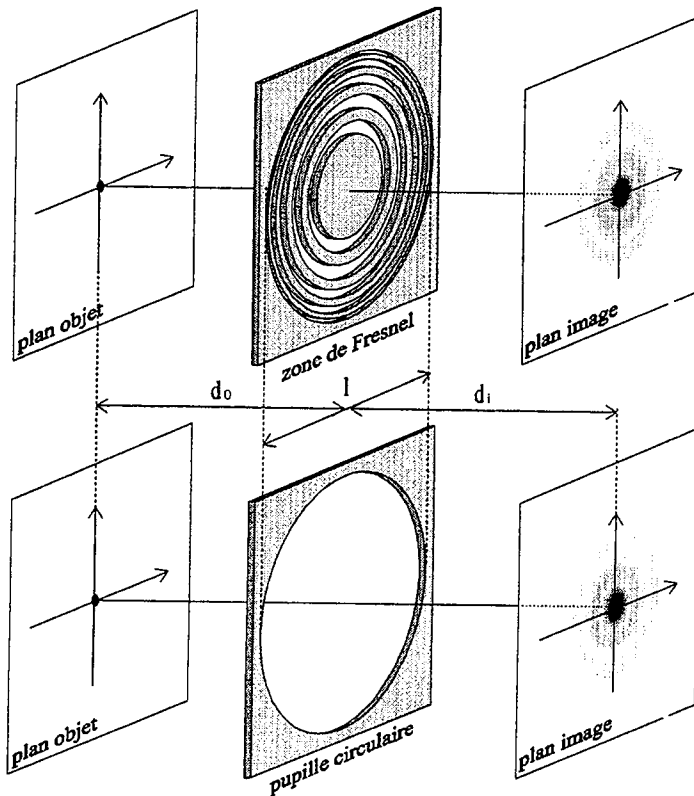


Figure 4-15. Géométrie pour la détermination de la PSF du système

Dans le cas qui nous intéresse et avec l'approximation d'une lentille circulaire, il suffit de calculer l'intersection entre deux cercles de diamètres égaux au diamètre de la zone de Fresnel, comme c'est illustré sur la Figure 4-16.

La résolution de ce problème géométrique nous donne la fonction de transfert optique du système dans le cas de l'éclairage incohérent, soit

$$H(\rho) = \begin{cases} \frac{2}{\pi} \left[ \text{Arccos} \left( \frac{\rho}{\rho_0} \right) - \frac{\rho}{\rho_0} \sqrt{1 - \left( \frac{\rho}{\rho_0} \right)^2} \right] & \rho \leq \rho_0 \\ 0 & \text{ailleurs} \end{cases} \quad (4-79)$$

avec  $\rho = \sqrt{u^2 + v^2}$  la fréquence radiale

et 
$$\rho_0 = \frac{1}{\lambda d_0} \quad (4-80)$$

la fréquence de coupure du système optique.

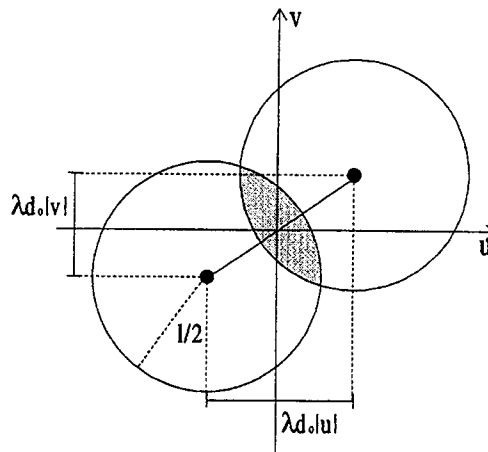


Figure 4-16. Géométrie pour le calcul de l'OTF dans le cas de l'éclairage incohérent

La Figure 4-17 représente la fonction de transfert optique et sa réponse impulsionnelle associée, calculées pour la micro-zone de Fresnel MZP39. Cette figure de diffraction est connue sous le nom de figure d'Airy.

On peut noter que la formulation analytique de la fonction de transfert  $H$ , qui on le rappelle caractérise entièrement un système linéaire et invariant par translation, ne dépend que des paramètres géométriques de la lentille.



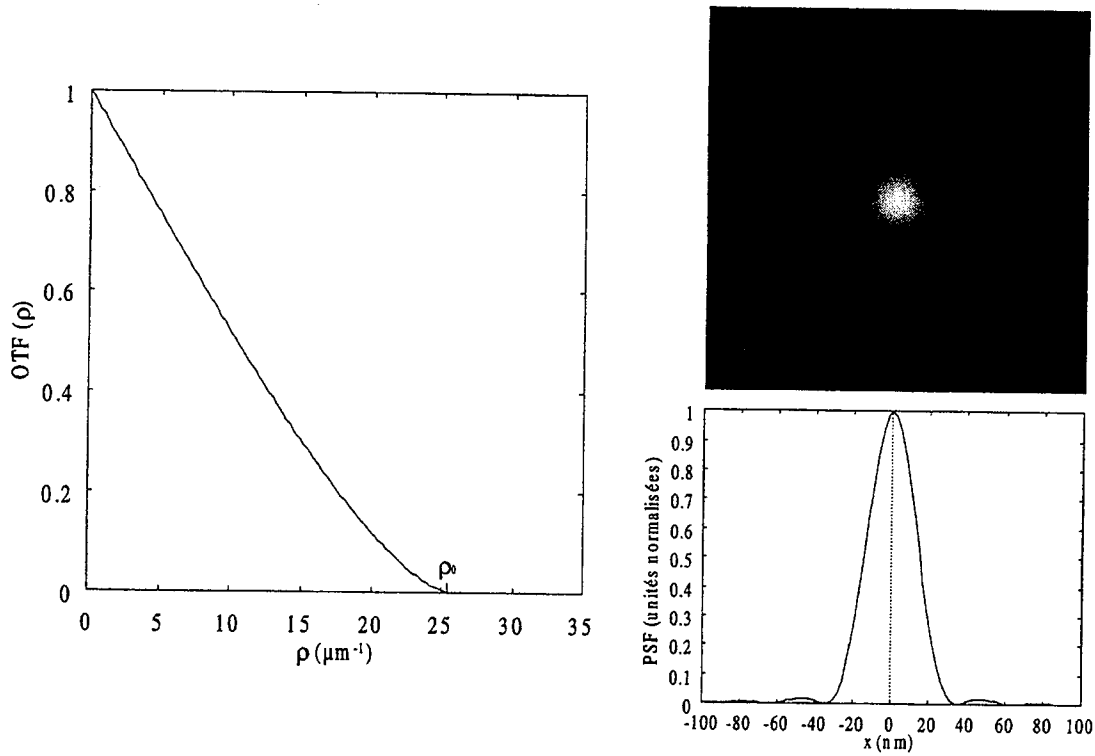


Figure 4-17. OTF et PSF théoriques calculés pour la micro-zone de Fresnel MZP39.

Dans cette approximation, on peut appliquer, pour chaque foyer de la zone de Fresnel, le critère de Rayleigh qui exprime la résolution d'un système optique en fonction de l'ouverture numérique de la lentille, soit

$$\delta_m = \frac{0,61\lambda}{\alpha_m} \quad (4-81)$$

où  $\alpha_m$  est l'ouverture numérique associée au  $m^{\text{ème}}$  ordre de diffraction de la zone de Fresnel (équation 4-53).

Pour un objet à l'infini et pour de petits angles, en substituant la relation (4-54) dans l'équation (4-81), on obtient

$$\delta_m = \frac{1,22dr_N}{m} \quad (4-82)$$

Cette relation nous montre donc que la résolution d'une zone de Fresnel dépend de deux paramètres : la largeur de l'anneau externe de la zone de Fresnel  $dr_N$  et l'ordre de diffraction  $m$ . Ainsi, de meilleures résolutions latérales peuvent être obtenues en

dessinant des zones de Fresnel avec des anneaux externes plus étroits. Ce premier paramètre est actuellement la limitation physique de la résolution d'un microscope à rayons X, d'où les efforts constants dans le domaine de la micro-fabrication. Un second moyen pour améliorer la résolution est d'utiliser les ordres supérieurs de diffraction, mais au dépend de l'intensité dans le plan focal (voir équation 4-76).

De même, la profondeur de champ d'une zone de Fresnel constituée d'un nombre d'anneaux supérieur à cent, peut être déterminée par analogie avec la microscopie optique, soit

$$\Delta f_m = \pm \frac{m\lambda}{4(1 - \sqrt{1 - NA^2})} \quad (4-83)$$

Ce paramètre définit la position axiale à partir de laquelle l'intensité est baissée de 80% par rapport à l'intensité dans le plan focal. Il doit être pris en compte lors de l'observation d'échantillons biologiques qui peuvent atteindre plusieurs microns d'épaisseur. Pour de faibles ouvertures numériques, comme c'est le cas en microscopie à rayons X (voir équation (4-54)), la relation (1-83) peut être développée par

$$\Delta f_m = \pm \frac{m\lambda}{2NA} = \pm \frac{f_m}{2N} = \pm \frac{2dr_N^2}{m\lambda} \quad (4-84)$$

Cette relation confirme qu'avec les optiques actuelles, la microscopie à rayons X est une technique de microscopie à grande profondeur de champ, ce qui est expliqué par la faible ouverture numérique des objectifs.

Un facteur important à prendre en compte pour l'évaluation des possibilités concernant l'observation tri-dimensionnelle, est le rapport  $\Delta f_m/\delta_m$ . Ce facteur nous informe sur les méthodes envisageables pour effectuer des acquisitions d'objets en 3D sur le microscope à rayons X en transmission. La Figure 4-18 représente l'évolution de  $\Delta f$  et de la largeur du champ au premier ordre de diffraction, en fonction de la taille du dernier anneau de la MZP. La taille du champ a été calculée pour un grandissement optimal, donnée par le théorème de Shannon-Whittaker (équation 4-85).

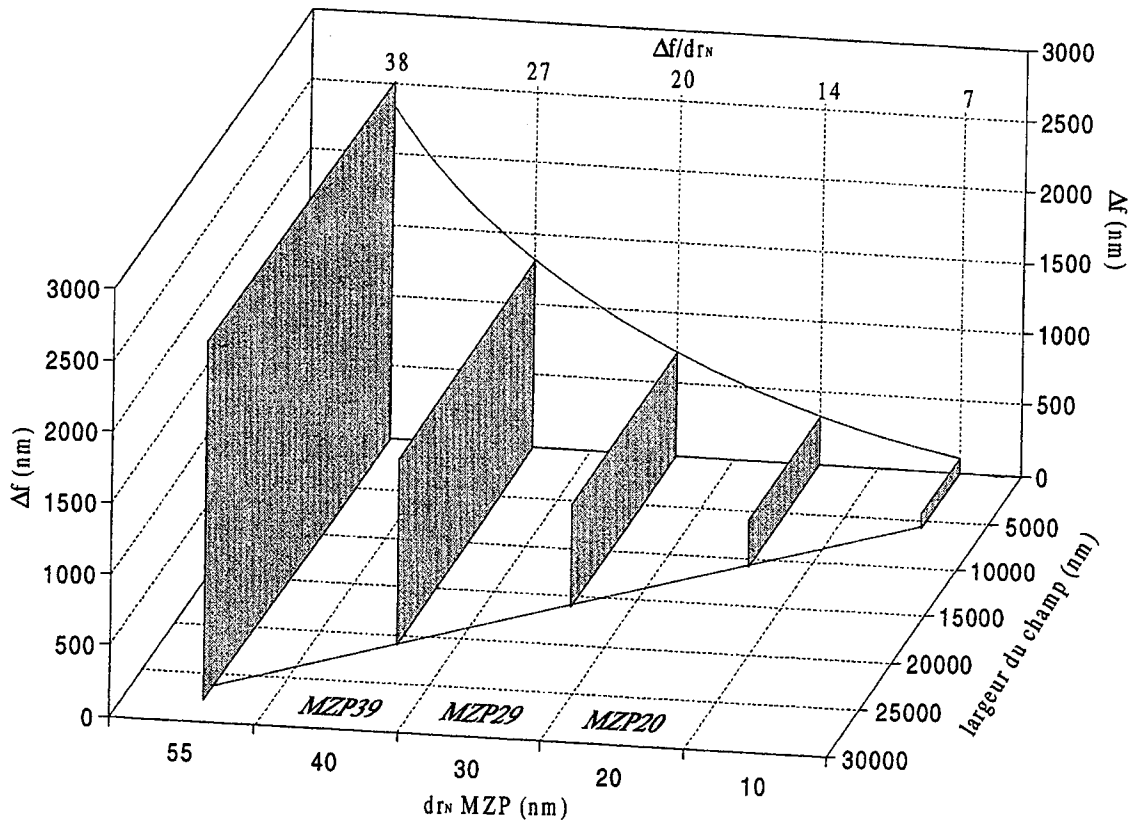


Figure 4-18. Evolution de  $\Delta f$ , de la largeur du champ et du rapport  $\Delta f/\delta$  en fonction de  $d_{rN}$ , à  $\lambda=2,4$  nm, pour un grandissement calculé par le théorème de Shannon-Whittaker.

L'analyse de la Figure 4-18 nous montre que les optiques actuelles ne nous permettent pas d'effectuer de reconstruction 3D à l'aide de sections optiques, au contraire de la microscopie confocale. Par contre, pour les fortes valeurs du rapport entre la résolution axiale et la résolution transverse, l'observation 3D haute résolution d'échantillons de quelques microns d'épaisseurs est possible par des techniques classiques de stéréoscopie ou de tomographie qui nécessitent de grandes profondeurs de champ. Pour les optiques hautes résolutions actuelles, l'observation 3D de structures de quelques microns d'épaisseur n'est pas possible par des techniques classiques de reconstruction. Dans ce cas, il est nécessaire de prendre en compte la fonction de transfert 3D du microscope.

Enfin, un dernier point important pour la caractérisation complète d'un système optique doté d'un capteur numérique pour l'enregistrement de l'image est l'échantillonnage. Le théorème de Shannon-Whittaker énoncé dans la section 4.1.2 qui

donne une condition sur la fréquence limite d'échantillonnage à utiliser, peut désormais être relié aux paramètres physiques du microscope par l'intermédiaire des relations (4-24) et (4-80). Soit  $t$  la taille d'un pixel de la caméra CCD,  $G$  le grandissement du microscope et  $\Delta$  la taille d'un pixel dans le plan image ( $\Delta = t/G$ ), la condition nécessaire pour vérifier ce théorème s'écrit alors

$$G \geq \frac{2t}{dr_N} \quad (4-85)$$

Cette relation nous permet ainsi de calculer les paramètres optimaux pour l'échantillonnage du microscope, en fonction des paramètres géométriques de l'objectif et de la caméra CCD.

Le Tableau 4-1 représente les résultats de l'évaluation du pas d'échantillonnage optimal théorique de la caméra CCD ( $t = 24\mu\text{m}$ ), calculé à l'aide de la relation (4-85), ainsi que de la fréquence d'échantillonnage utilisée dans la pratique, et ceci pour les trois micro-zones de Fresnel MZP20, MZP29 et MZP39.

Micro-zone de Fresnel $dr_N$	Diamètre $d$	Nombre d'anneaux $N$	paramètres d'échantillonnage			
			Grandissement ( $G$ )		taille d'un pixel ( $\Delta$ )	
			théorique	pratique	théorique	pratique
MZP20	55 $\mu\text{m}$	690	2400	2664	10 nm	9,0 nm
MZP29	57 $\mu\text{m}$	489	1665	1786	14,5 nm	13,4 nm
MZP39	68 $\mu\text{m}$	438	1230	1103	19,5 nm	21,8 nm

*Tableau 4-1. Pas d'échantillonnage théoriques calculés pour 3 différentes micro-zones de Fresnel. Comparaison avec les pas d'échantillonnage utilisés dans la pratique sur le microscope.*

Ce tableau nous montre que seule la configuration pour la micro-zone de Fresnel MZP39 ne vérifie pas la condition d'échantillonnage énoncée par le théorème de Shannon-Whittaker. Même si la fréquence d'échantillonnage théorique est calculée pour une zone de Fresnel parfaite, on peut se trouver dans la situation du sous-échantillonnage (voir section 4.1.2). Une solution est de vérifier ce point lors d'une

mesure expérimentale de la fonction de transfert du microscope. La partie suivante est consacrée à cette mesure expérimentale pour les différentes MZP.

En conclusion de cette partie, nous avons détaillé le principe de fonctionnement des zones de Fresnel utilisées en microscopie à rayons X pour focaliser les rayons X. Puis, nous avons utilisé l'analogie avec la microscopie optique, de manière à déterminer la fonction de transfert théorique du microscope à rayons X dans le cas d'un éclairage incohérent. Cette étape nous permet d'avoir une idée précise du potentiel du microscope à rayons X pour une zone de Fresnel donnée et supposée parfaite. Mais dans la majorité des cas, cette mesure n'est pas suffisante si l'on désire réellement connaître les caractéristiques du microscope. En effet, des imperfections de micro-fabrication, ou encore un objectif non adapté au condenseur peuvent modifier légèrement la cohérence de la lumière, et engendrer une baisse de la résolution.

La partie suivante est consacrée à l'étude expérimentale de la formation des images du microscope à rayons X en transmission de Göttingen à BESSY.

## 4.3 Étude expérimentale de la réponse impulsionnelle du microscope

La mesure expérimentale de la réponse impulsionnelle d'un microscope à rayons X est un problème à part entière qui a donné lieu à de nombreuses publications. Elle permet entre autres de caractériser un système optique, phase cruciale pour l'analyse et l'interprétation des images. De plus, son analyse peut permettre de détecter les problèmes éventuels d'optiques et d'alignement du microscope. Enfin, son utilisation dans le cadre de la restauration d'images est fondamentale. Ce dernier point fait l'objet du chapitre 6 sur l'amélioration et la restauration des images issues de la microscopie à rayons X.

Parmi les méthodes proposées pour la mesure expérimentale de la PSF, nous aborderons 3 techniques, et nous proposerons notre modèle qui est une extension d'un des modèles existants.

### 4.3.1 Les différentes approches pour la mesure de la PSF

Parmi les différentes approches utilisées dans la littérature pour la détermination expérimentale de la PSF d'un microscope, nous avons retenu trois techniques susceptibles de pouvoir être utilisées dans le cas de la microscopie à rayons X. Pour chacune d'entre elles, nous en présenterons le principe et discuterons les problèmes qui se posent lors de leur application

#### 4.3.1.1 Détermination à partir d'une micro-bille

Cette approche, très utilisée en microscopie confocale [Seger 93] [Scalettar 96], consiste à imager une bille dont les dimensions sont inférieures à la résolution du microscope. L'image ainsi acquise donne une mesure directe de la PSF (voir section 4.1.1.1).

L'utilisation de cette technique dans le cadre de la microscopie à rayons X reste très difficile car elle nécessite un bon contraste et un fort rapport signal sur bruit. Ces conditions restent actuellement très difficiles à réunir pour les raisons suivantes :

- tout d'abord, il faut pouvoir localiser ces billes isolées de diamètre inférieur à 20 nm, sachant que les profondeurs de champs sont de l'ordre du micromètre.

- de plus, même avec des temps d'exposition élevés, le bruit présent dans les images ne peut pas nous permettre d'utiliser les acquisitions brutes comme des estimations de la réponse impulsionnelle, surtout si elles doivent être utilisées en restauration d'images.

#### 4.3.1.2 Détermination à partir d'un bord

Cette technique utilise les propriétés géométriques de l'image d'un bord parfait à travers un système optique (voir section 4.1.1.4). Pratiquement, le profil d'intensité de l'image d'un bord parfait dans une direction perpendiculaire à la direction du bord, donne la fonction de bord (ESF). La dérivée de l'ESF donne la fonction de ligne du système (LSF), qui peut être approximée à la PSF dans le cas d'un système symétrique. Ce modèle a été appliqué dans le cadre de la microscopie à rayons X par Meyer-Ilse [Meyer-Ilse 92].

Deux problèmes majeurs se posent pour l'application de cette technique dans le cadre de la microscopie à rayons X :

- d'une part, construire un bord "parfait" pour la microscopie à rayons X est un réel problème car les techniques de micro-fabrication offrent des précisions insuffisantes. En effet, la limite de résolution du TXM étant directement proportionnelle à la taille du dernier anneau des zones de Fresnel (elles même fabriquées avec les techniques de micro-fabrication), il paraît donc inconcevable de pouvoir dessiner un bord avec des imperfections très inférieures à la résolution du TXM.

- d'autre part, le bruit présent dans les images rend l'exploitation des profils d'intensité difficile sans pré-traitement.

### 4.3.1.3 Détermination à partir d'objets tests périodiques

Très utilisée dans le cadre de la microscopie à rayons X cette approche permet d'extraire le module de la fonction de transfert optique (MTF) à partir de l'observation d'objets tests périodiques haute résolution (avec des structures de dimensions proches de la résolution du microscope). Dans cette approche, on distinguera deux variantes.

Une première variante [Diehl 92] [Meyer-Ilse 92] consiste à estimer la valeur de la MTF par la fonction de contraste définie par

$$\text{MTF}(f) = C(f) = \frac{I_{\max}(f) - I_{\min}(f)}{I_{\max}(f) + I_{\min}(f)} \quad (4-86)$$

La méthode consiste donc à dessiner des objets tests à des fréquences bien définies, puis à extraire pour chaque fréquence la fonction de contraste.

La seconde approche utilisée est basée sur le principe de formation des images, où l'image de l'objet test est obtenue par convolution entre l'objet test et la PSF du système (voir section 4.1 pour plus de détails sur la formation des images).

En appliquant le théorème de convolution, on peut écrire :

$$\text{MTF}(f) = \frac{|I(f)|}{|O(f)|} \quad (4-87)$$

où  $|O(f)|$  et  $|I(f)|$  désignent les MTF respectives de l'image acquise au TXM et de l'objet. Or cette technique nécessite une image numérique de l'objet test. C. Jacobsen [Jacobsen 91] a tout simplement levé le problème en utilisant une acquisition au microscope électronique à transmission comme image vraie de l'objet. Ramenée dans le repère du microscope à rayons X la MTF de cette dernière image est supposée valoir l'unité.

Dans ces techniques, la principale limitation réside en la micro-fabrication des grilles avec une précision suffisante. Pour les mêmes raisons que celles décrites dans la section précédente, la précision requise pour une exactitude des mesures ne peut pas être atteinte. De plus, le bruit reste un problème majeur pour l'exactitude des mesures, principalement pour les hautes fréquences.



### 4.3.2 Détermination de la PSF par interpolation

La méthode que nous présentons pour la détermination de la PSF du microscope est basée sur la mesure à partir d'un bord opaque présentée dans la partie précédente. Pour lever les problèmes du bruit, nous avons utilisé une fonction d'interpolation permettant de modéliser une fonction de bord dans le cas général. Pour le choix du bord, nous avons utilisé un bord d'or dont nous avons pris soin de vérifier la raideur au microscope électronique à balayage (voir remarque). L'épaisseur du bord a été choisie de manière à être inférieure à la profondeur de champ du microscope pour la lentille étudiée tout en étant la plus épaisse possible de manière à avoir une absorption la plus forte possible. Ces conditions nous assurent d'avoir un objet test bi-dimensionnel avec une absorption maximale.

La fonction analytique que nous avons choisie pour modéliser la fonction de bord est une fonction à 6 paramètres,  $a_0, \dots, a_5$ , de la forme

$$ESF(x) = a_0 + \frac{a_1}{1 + \exp(-a_2(x - a_3))} + a_4(x - a_3)\exp(-a_5(x - a_3)^2) \quad (4-88)$$

La raison de notre choix est que cette fonction est bien adaptée pour modéliser l'image dans le microscope d'un bord parfait dans le plan focal et hors du plan focal. Elle permet ainsi de prendre en compte les éventuels rebonds négatifs apparaissant lors de l'observation d'objets placés loin du plan focal du microscope. Cette forme est alors parfaitement adaptée pour une mesure rapide des contributions 3D de la PSF ainsi que de l'anisotropie et de la symétrie du microscope à rayons X.

Un modèle comportant moins de paramètres, tel qu'une Gaussienne, aurait également été possible. Son inconvénient est l'impossibilité de modéliser les rebonds négatifs, observés lorsque l'objet est situé loin du plan focal. Ces rebonds, clairement visibles lors de l'acquisition d'objets épais (voir l'exemple de la Figure 3-15) sont engendrés par un effet de phase. Ces effets sont exploités en microscopie à rayons X à haute énergie et en microscopie électronique en transmission, lors de l'observation de structures peu absorbantes.

**Remarque sur le choix du bord** : il faut noter que le choix du bord est une phase cruciale pour l'exactitude des résultats, et que l'utilisation d'un bord imparfait peut entraîner des erreurs de mesures considérables. Dans notre cas, la fabrication d'un bord idéal pour la zone de Fresnel étudiée est resté un problème. Nous avons utilisé plusieurs techniques de découpage pour obtenir un bord le plus parfait possible, en sachant que la feuille d'or faisait au maximum un micromètre d'épaisseur. Pour chaque procédé testé, nous avons observé la raideur du bord au microscope électronique à balayage. Finalement, nous avons opté pour la méthode qui consiste à découper la feuille d'or avec un scalpel, la feuille d'or légèrement trempée dans de l'alcool et tendue entre deux lames en verre pour qu'elle reste bien tendue et qu'elle ne se roule pas après la découpe. Mais cette technique ne donnait pas des résultats parfaits sur toute la longueur de la découpe, et la difficulté consistait à trouver la bonne zone au microscope à rayons X. Toutes ces raisons font que cette méthode peut s'avérer ne pas être parfaite, et le problème est que nous n'avons aucune mesure des erreurs éventuelles. D'un autre côté, elle reste à notre avis meilleure que la technique qui consiste à observer un bord micro-fabriqués à l'aide des techniques utilisées pour la conception des zones de Fresnel, et où les imperfections du bord sont observables sur l'acquisition.

Dans les sections suivantes, nous allons détailler toutes les étapes pour la mesure de la réponse impulsionnelle, de l'anisotropie, de la symétrie et la PSF 3D du microscope à rayons X. Pour chaque mesure nous présenterons des résultats expérimentaux des mesures pour trois micro-zones de Fresnel différentes (MZP39, MZP29 et MZP20).

### 4.3.3 Étapes pour la détermination de la PSF du TXM

La première étape consiste à ajuster le bord dans le plan focal du microscope. Ceci est effectué tout d'abord en pré-focalisant l'objet avec le plus gros objectif du microscope optique photonique monté sur le TXM, puis en balayant l'objet dans la

direction axiale pour obtenir la meilleure netteté. Cette phase, aussi élémentaire soit elle, est une phase déterminante pour l'exactitude des mesures.

L'étape suivante consiste à déterminer la direction du bord dans la région d'intérêt et à mesurer le profil d'intensité suivant une direction perpendiculaire à la direction du bord.

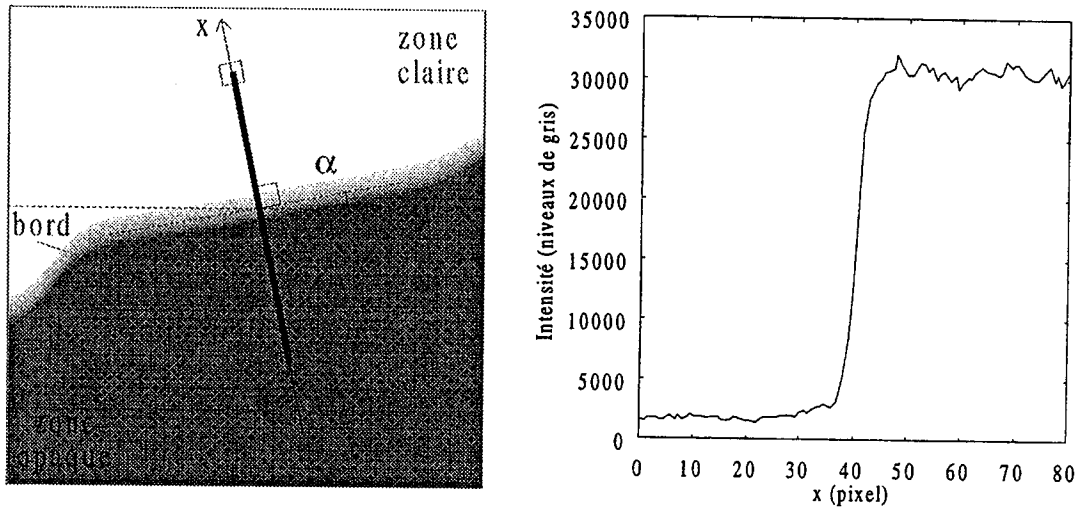


Figure 4-19. Détermination de la direction du bord et mesure du profil d'intensité suivant la direction perpendiculaire à la direction du bord.

La phase suivante consiste à effectuer une interpolation non linéaire du profil d'intensité par la fonction (4-85) de manière à déterminer les coefficients  $a_0$  à  $a_5$ . Une fois, ces coefficients évalués, on est en possession de la formulation analytique de l'ESF.

La Figure 4-20 représente les résultats de l'interpolation dans deux cas différents. Ces deux exemples mettent bien en évidence la robustesse au bruit de la méthode et sa faculté à modéliser l'image d'un bord dans et hors plan focal.

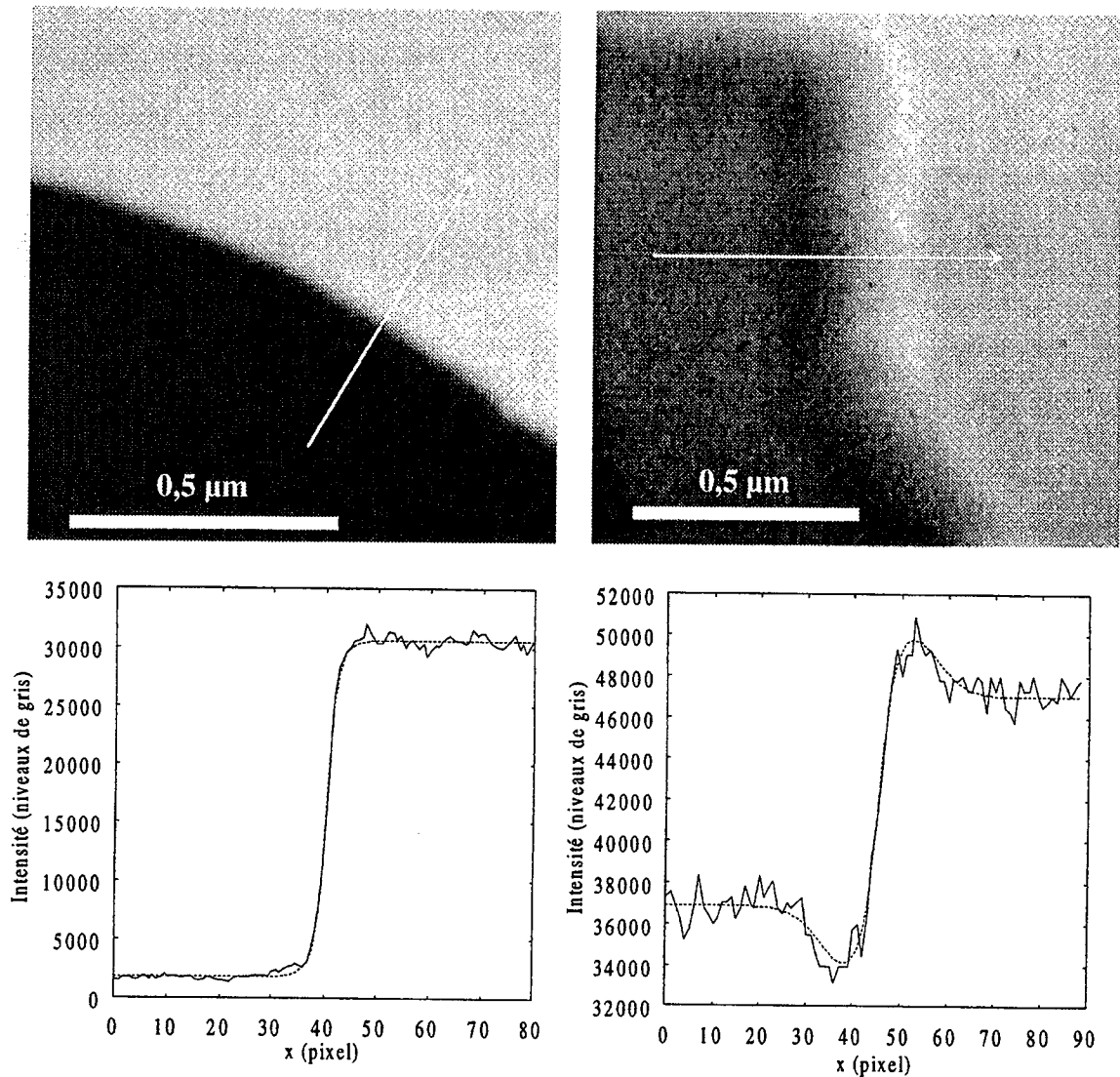


Figure 4-20. Exemples de détermination de l'ESF par interpolation sur les profils d'intensité des images d'un bord d'or, placés dans des plans focaux différents. (a) profil sur l'image d'un bord d'or situé dans le plan focal de l'objectif. (b) profil sur l'image d'un bord situé en dehors du plan focal de l'objectif.

L'étape finale consiste à déterminer la fonction de ligne (LSF). Nous avons vu dans la section 4.1.1.3 qu'elle pouvait se déduire par simple dérivation de l'ESF, d'où la relation

$$LSF(x) = \frac{d}{dx} ESF(x) \quad (4-89)$$

Un nouvel avantage de la méthode est que l'on dispose désormais de la formulation analytique de la LSF. La Figure 4-21 montre les résultats de la détermination expérimentale de la LSF appliqué sur les profils interpolés donnés en exemple sur la Figure 4-20.

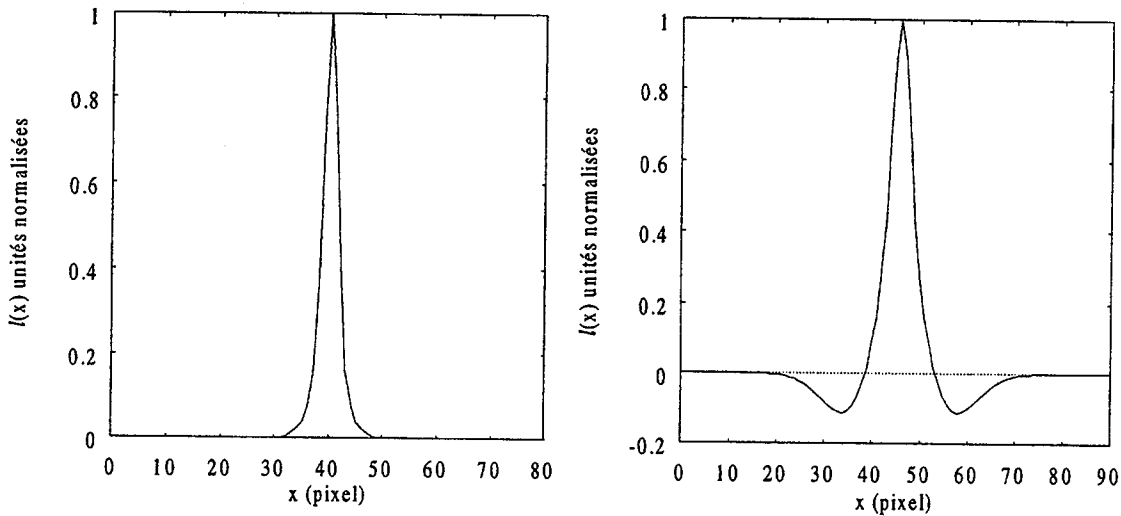


Figure 4-21. Résultats de la détermination expérimentale de la LSF par interpolation. Application sur les profils d'intensités représentés sur la Figure 4-20.

Dans la partie suivante, nous présentons les résultats de la détermination expérimentale de la réponse impulsionnelle du microscope par la méthode présentée, et comparons ces résultats à la PSF théorique déterminée par analogie avec la microscopie optique. Pour simplifier les mesures, nous avons fait l'hypothèse d'un système à symétrie circulaire, et donc approximé la PSF à la LSF. Nous verrons par la suite que cette hypothèse n'est pas toujours vérifiée dans tout le champ du microscope, mais qu'elle s'avère être une bonne hypothèse au centre du champ optique, où les acquisitions du bord ont été effectuées.

#### 4.3.4 Résultats de la détermination expérimentale de la PSF du microscope

Dans cette partie, nous allons présenter les résultats de la détermination de la réponse impulsionnelle du microscope à rayons X pour 3 différentes micro-zones de Fresnel. Afin de procéder à une mesure plus précise de la PSF, nous sommes passés par

une étape intermédiaire de sur-échantillonnage. La résolution expérimentale du microscope peut être déterminée comme étant la largeur à mi-hauteur (ou FWHM, de l'anglais *Full Width at Half-Maximum*) de la PSF expérimentale.

Une technique couramment utilisée pour obtenir une évaluation plus précise de la réponse impulsionnelle du microscope, consiste à sur-échantillonner l'image du bord. Ceci est tout simplement effectué en modifiant légèrement sur le microscope les distances objet-lentille et lentille-détecteur, de manière à obtenir un grandissement supérieur donné par le rapport de la seconde distance sur la première distance (équation 4-47).

En théorie, sur-échantillonner n'apporte aucune information supplémentaire. Ceci est dû à la limitation de résolution liée aux phénomènes de diffraction. Dans la pratique, cette technique n'est utilisée que dans des cas particuliers où l'on veut mesurer le flou du système, et où le sur-échantillonnage apporte une information supplémentaire. Cette technique est également utilisée dans le cadre de la restauration d'images, où l'on utilise l'information contenue dans le flou de l'image afin de d'augmenter le contraste et la résolution de l'image. Hormis ces deux cas de figures, l'utilisation du sur-échantillonnage n'est pas un choix judicieux, puisque dans ce cas, l'observation d'un objet nécessite plus de photons ce qui résulte en une dose absorbée plus importante que pour l'image du même objet acquise dans des conditions optimales d'échantillonnage (voir section 4.1.2).

La Figure 4-22 illustre les résultats de la mesure de la réponse impulsionnelle du microscope pour les 3 zones de Fresnel MZP20, MZP29 et MZP39. Les calculs pour les deux dernières zones de Fresnel ont été effectués pour 2 grossissements différents. On notera que dans tous les cas, le condenseur KZP7 a été utilisé, car c'est actuellement le meilleur condenseur disponible sur le microscope. Or, ce condenseur ne dispose pas d'une ouverture numérique adaptée aux différentes MZP. On peut donc s'attendre à une baisse de résolution par rapport à la PSF théorique calculée dans le cas incohérent, et ceci d'autant plus que l'ouverture numérique (NA) des MZP sera grande devant celle de KZP7.

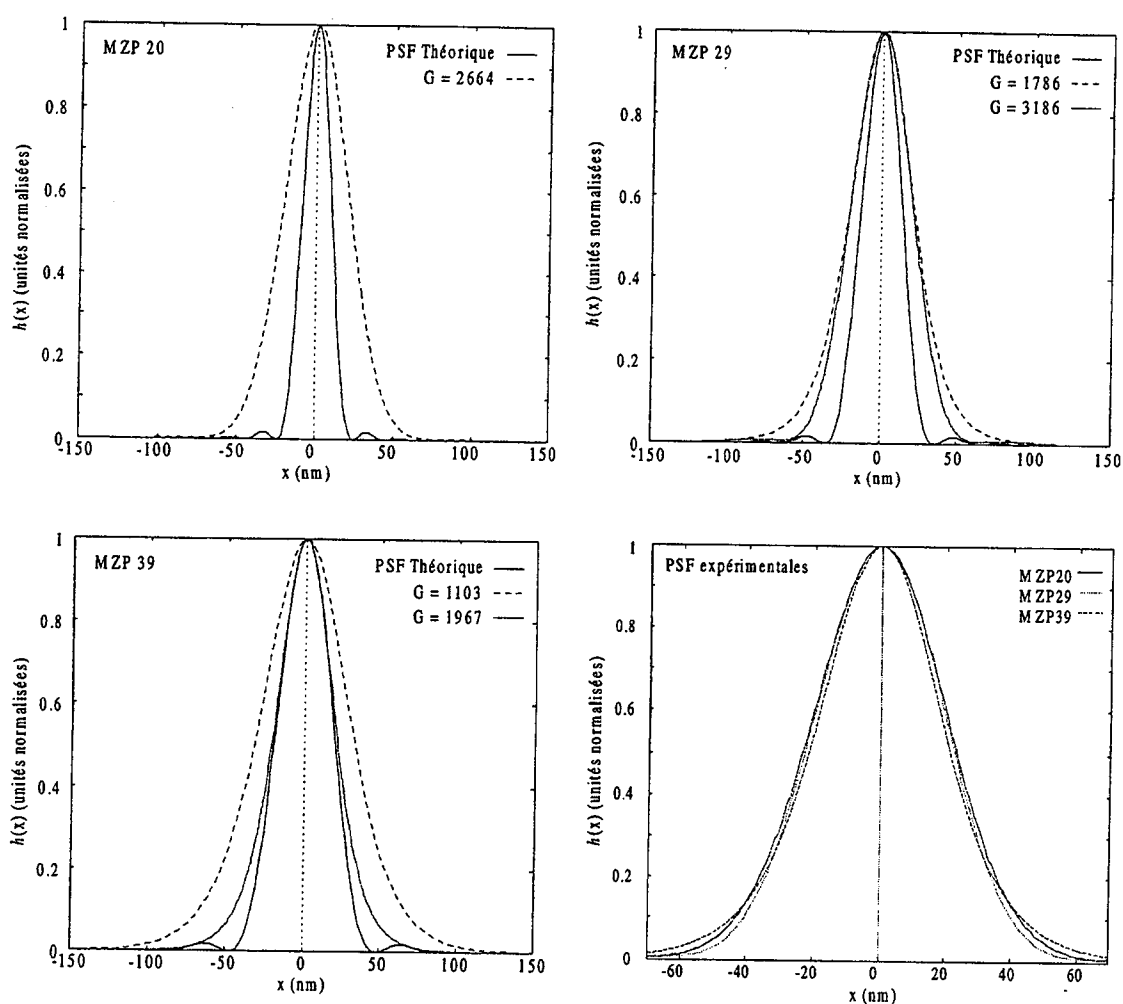


Figure 4-22. Résultats de la détermination expérimentale de la PSF par interpolation, et comparaison avec la PSF théorique dans le cas de l'éclairage incohérent.

L'analyse des résultats de la Figure 4-22 montre que les résolutions déterminées expérimentalement sont moins bonnes que celles calculées avec le modèle théorique de la formation des images dans le cas de l'éclairage incohérent. Seuls les résultats obtenus sur MZP39 avec le sur-échantillonnage sont proches de la figure de diffraction théorique.

D'autre part, l'effet du sur-échantillonnage sur MZP39 engendre non seulement une mesure plus précise de la fonction de flou, comme c'est le cas pour MZP29, mais également une augmentation de la résolution. Les différences observées sur MZP29 peuvent toutefois être liées aux erreurs de mesures.

Dans la section concernant la mesure théorique de la PSF du microscope, nous avons observé que la fréquence spatiale d'échantillonnage utilisée pour la micro-zone de Fresnel MZP39 était supérieure à la fréquence minimale d'échantillonnage théorique donnée par le théorème de Shannon-Whittaker (voir Tableau 4-1). Cette remarque peut être une solution pour expliquer cette différence de mesure de la PSF pour deux grossissements différents.

Les différences importantes de mesures entre les PSF expérimentales et théoriques pour les MZP29 et MZP39 proviennent certainement en partie du condenseur. En effet, comme nous l'avons mentionné au début de cette section, le condenseur KZP7 utilisé pour toutes les acquisitions ne possède pas une ouverture numérique appropriée aux différents objectifs, ce qui engendre une baisse de l'incohérence du système optique [Born 93]. Ainsi, cette baisse sera d'autant plus grande que l'ouverture numérique des objectifs utilisés sera différente de celle du condenseur. Le modèle de formation des images que nous avons utilisé pour la détermination de la fonction de transfert théorique du microscope n'est alors plus exact. La baisse de la résolution est une des conséquences immédiates de la baisse de l'incohérence. Une étude théorique sur ce sujet a été réalisée par Oestreich [Oestreich 95] ; il a calculé l'évolution de la fonction de transfert optique en fonction des ouvertures numériques relatives entre MZP et KZP. A ce sujet, il a bien constaté une baisse de résolution par rapport à la résolution théorique calculée dans le cas incohérent.

Le Tableau 4-2 représente les valeurs théoriques et expérimentales des résolutions latérales du microscope pour les différents objectifs.

MZP ( $dr_N$ )	Résolution latérale théorique ( $\delta = 1,22dr_N$ )	Résolution latérale expérimentale (FWHM)	
		$G_1$	$G_2$
MZP20	24 nm	47 nm (G=2664)	x
MZP29	35 nm	47 nm (G=1786)	46 nm (G=3186)
MZP39	48 nm	65 nm (G=1103)	44 nm (G=1967)

Tableau 4-2. Comparaison entre les valeurs théoriques et expérimentale des résolutions latérales.



Les résultats représentés sur le Tableau 4-2 montrent que MZP20 offre au TXM un pouvoir de résolution légèrement inférieur à celui offert lors de l'utilisation de MZP29 ou de MZP39. Les raisons de ce résultat peuvent être multiples. En effet, il peut tout d'abord s'agir du phénomène d'illumination partiellement cohérente comme nous l'avons mentionné précédemment, à l'origine d'une baisse de la résolution. Mais à ce problème, peut venir s'ajouter les imperfections de micro-fabrication pouvant surgir pour des zones de Fresnel avec un petit  $dr_N$ , où encore la faible efficacité de cette zone de Fresnel. Toutes ces raisons peuvent altérer la résolution du microscope, ce qui expliquerait les différences de résolutions mesurées sur le TXM lors de l'utilisation des différentes MZP.

Pour argumenter les résultats concernant les différences observées entre les PSF expérimentales et théoriques, nous avons, pour chaque zone de Fresnel et chaque grossissement, acquis une image d'un objet test, dont les structures internes font 24,6 nm de large. La Figure 4-23 illustre le résultat de ces acquisitions. Afin de pouvoir comparer toutes les images entre elles, nous les avons représentées à la même échelle.

On constate que l'image acquise avec MZP20 comme objectif présente une moins bonne résolution que celles acquises avec MZP29 et MZP39, ce qui confirme les résultats concernant les différences entre les PSF théoriques et expérimentales. On observe également une différence de résolution pour les deux différents grossissements de MZP39, ce qui renforce l'hypothèse du sous échantillonnage émise précédemment.

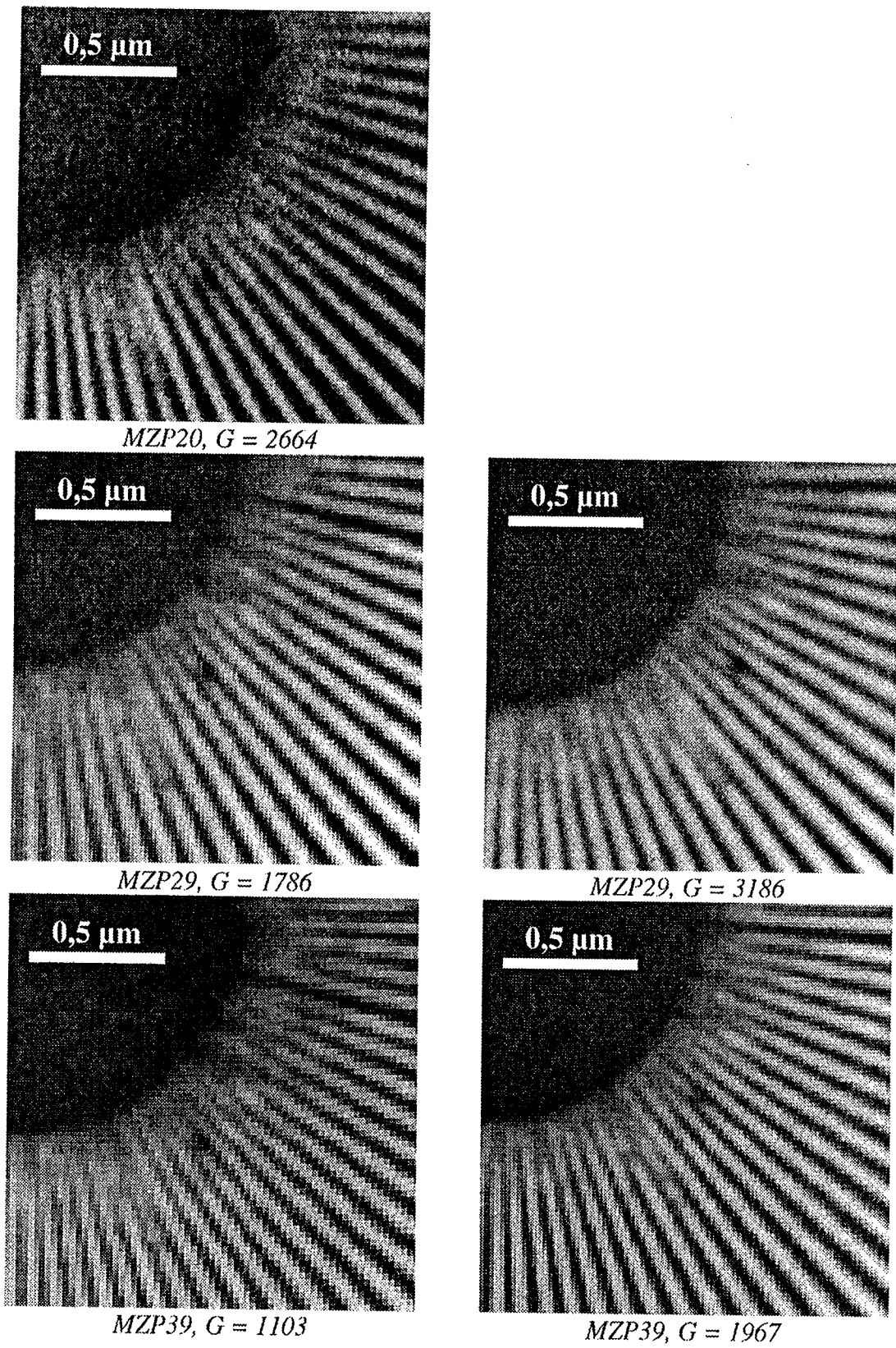


Figure 4-23. Galerie d'images d'un objet test acquises avec différents objectifs (MZP29, MZP 39 et MZP20) et différents grossissements.

### 4.3.5 Mesure de l'anisotropie et de la symétrie

Comme nous l'avons noté dans la section 4.1.1.4, la détermination de la LSF par la méthode du bord franc ne nous donne une information que suivant une seule direction. Or, il peut être nécessaire de connaître l'anisotropie et la symétrie du système, ne serait ce que pour valider nos approximations de symétrie pour la détermination de la PSF.

L'anisotropie est mesurée en déplaçant le bord dans le plan focal du microscope. La Figure 4-24 illustre le principe d'acquisition pour la détermination de l'anisotropie suivant la direction horizontale.

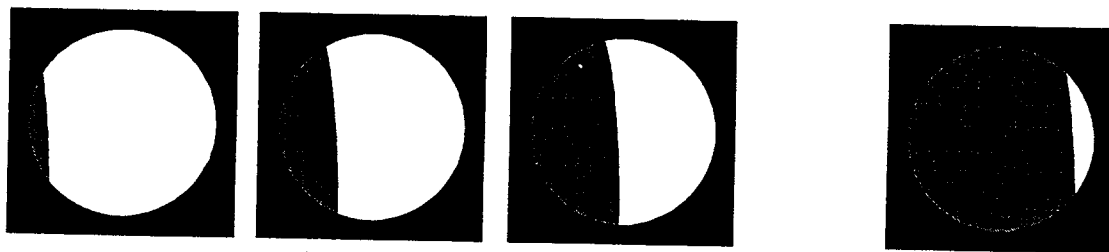


Figure 4-24. Méthode utilisée pour la mesure de l'anisotropie du système suivant la direction horizontale. Le bord franc est déplacé horizontalement.

De même, la symétrie du système optique est mesurée en prenant des images du bord suivant plusieurs directions de l'espace. Comme il serait long et fastidieux d'effectuer des mesures de symétrie suivant toutes les directions du plan, nous avons décidé de faire des mesures suivant deux directions perpendiculaires. La raison de ce choix est que la rotation de l'échantillon sur le TXM de Göttingen à BESSY est manuelle. Par conséquent, avant chaque acquisition suivant une nouvelle direction, il est nécessaire de baisser le bras du condenseur, de tourner le porte-objet manuellement d'un angle approximatif puis de remonter le bras du condenseur, et ceci pour tous les points de l'espace si l'on veut mesurer l'anisotropie. Il faut toutefois garder à l'esprit que cette mesure ne permet pas une détermination exacte de l'asymétrie, qui peut être marquée suivant une direction différente des deux directions de mesures (voir remarque à la fin de la section).

Une fois les acquisitions effectuées suivant la direction horizontale, nous avons tourné le porte échantillon d'un angle approximatif de 90 degrés, puis nous avons

effectué une nouvelle série d'acquisitions du bord en translatant cette fois l'objet suivant la direction verticale. La Figure 4-25 illustre le principe d'acquisition pour déterminer l'anisotropie suivant la direction verticale.

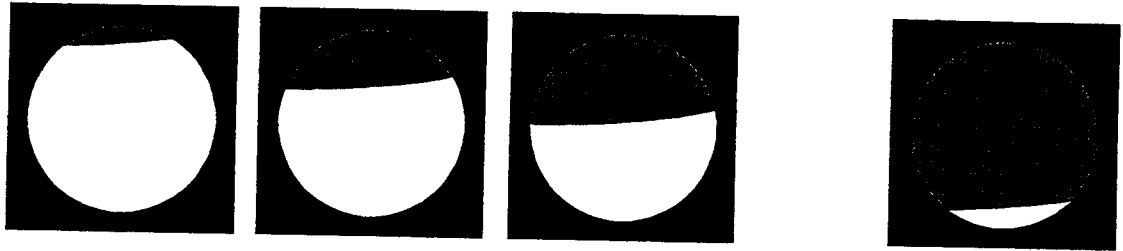


Figure 4-25. Méthode utilisée pour la détermination de l'anisotropie du système suivant la direction verticale. Le bord franc est déplacé verticalement.

Une fois la phase d'acquisition terminée, il faut extraire les points de mesure de la LSF. L'étape a été réalisée au moyen d'une détection de bord de type gradient + seuillage sur toutes les acquisitions, puis par superpositions des images binaires associées. Les points d'intersection sont numérotés et leurs coordonnées sont mesurées. Ces points constituent alors les points de mesures sur lesquels la PSF sera déterminée suivant les deux directions du bord. L'image obtenue par combinaison de toutes les images binaires des bords est représentée sur la figure ci-dessous.

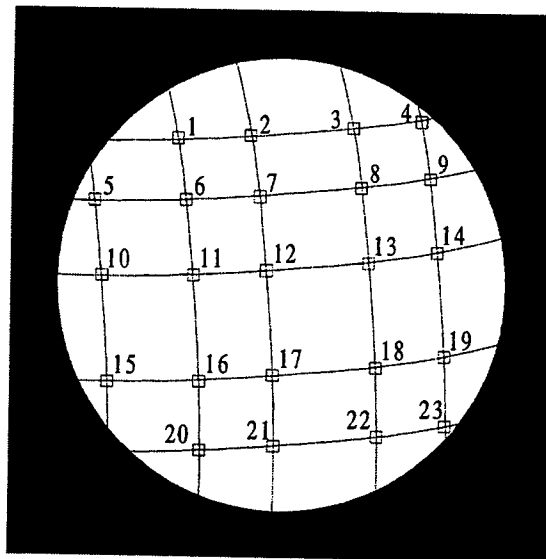


Figure 4-26. Détermination des points de mesure de l'anisotropie et de la symétrie pour la zone de Fresnel MZP20.

L'étape suivante consiste à extraire pour chaque acquisition, les deux directions associées à chaque point d'intersection. Ces directions sont déterminées pour chaque point par les angles  $\alpha_{h,i}$  et  $\alpha_{v,i}$  représentant les angles respectifs suivant les directions horizontales et verticales pour le  $i^{\text{ème}}$  point.

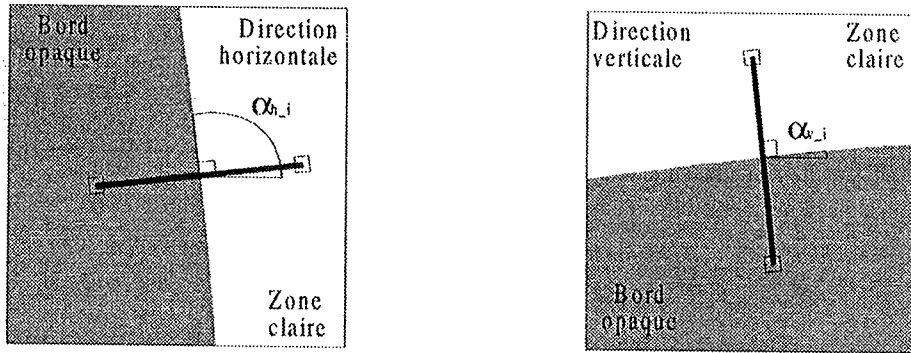


Figure 4-27. Détermination des angles  $\alpha_{h,i}$  et  $\alpha_{v,i}$  pour le  $i^{\text{ème}}$  point d'intersection.

Les étapes suivantes qui consistent à extraire la LSF à partir de l'ESF interpolée sont identiques à celles présentées précédemment.

Les figures (Figure 4-28), (Figure 4-29), (Figure 4-30) et (Figure 4-31) représentent les résultats des mesures de l'anisotropie/symétrie appliqués sur les micro-zones de Fresnel MZP20 et MZP39 suivant les directions verticales et horizontales. Pour chaque mesure, nous avons calculé la largeur à mi-hauteur (FWHM), que nous avons représenté sur la Figure 4-32.

**Remarque 1 :** l'exemple utilisé pour illustrer les étapes pour la détermination de la symétrie et de l'anisotropie est un cas optimal dans le sens où le bord utilisé est jugé "parfait" dans tout le champ du microscope. Il est donc possible de quadriller le plan image et de déterminer la PSF en tous les points d'intersection comme pour la micro-zone de Fresnel MZP20. Dans certains cas, il n'est pas possible de trouver une région du bord assez grande et "parfaite" sur toute la longueur du champ. Le déplacement du bord suivant les directions horizontales et verticales ne nous donne alors des informations que sur une partie restreinte du champ ; ceci a été le cas pour la micro-zone de Fresnel MZP39.

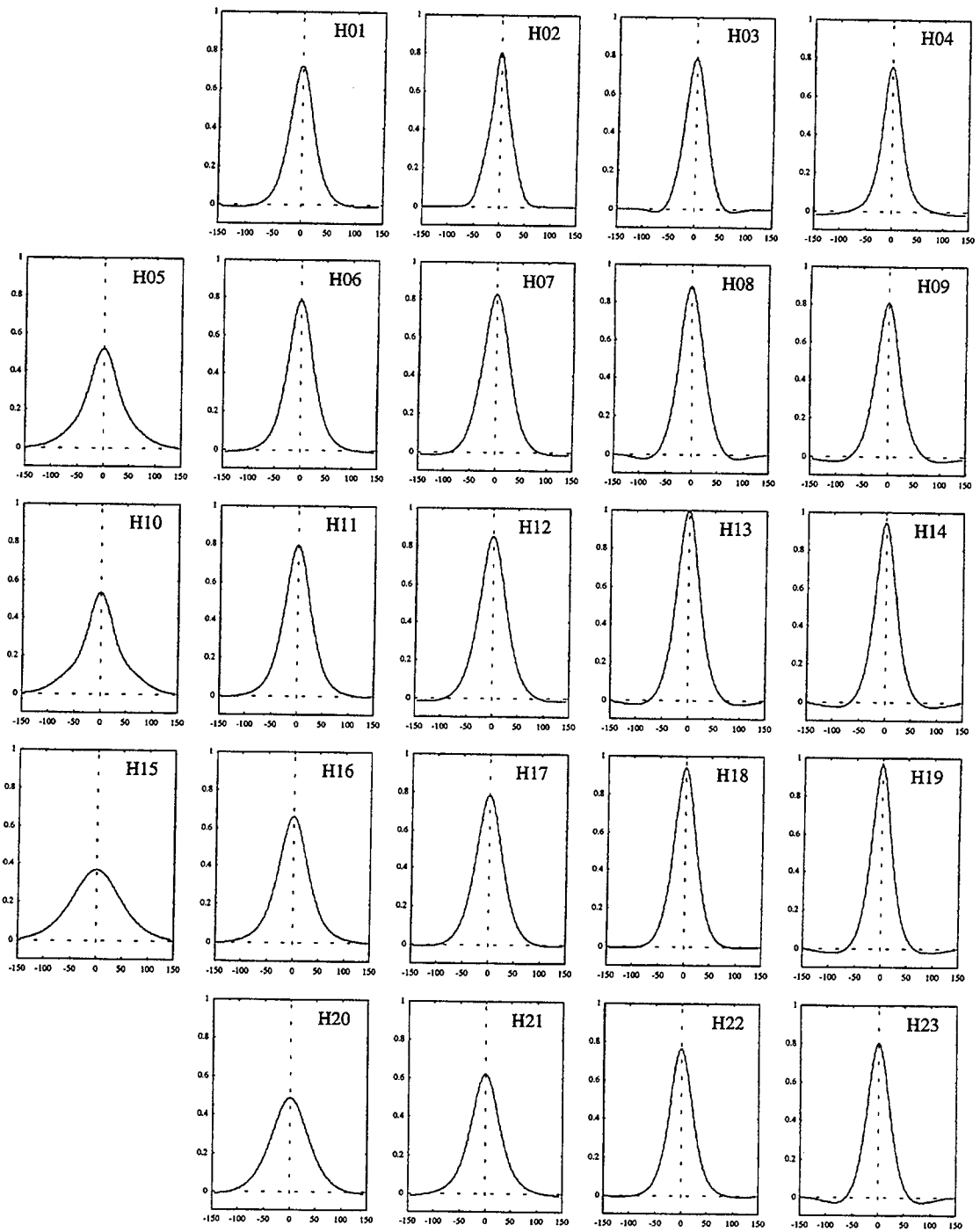


Figure 4-28. Résultats de la mesure de l'anisotropie de la LSF suivant la direction horizontale pour la micro-zone de Fresnel MZP20.

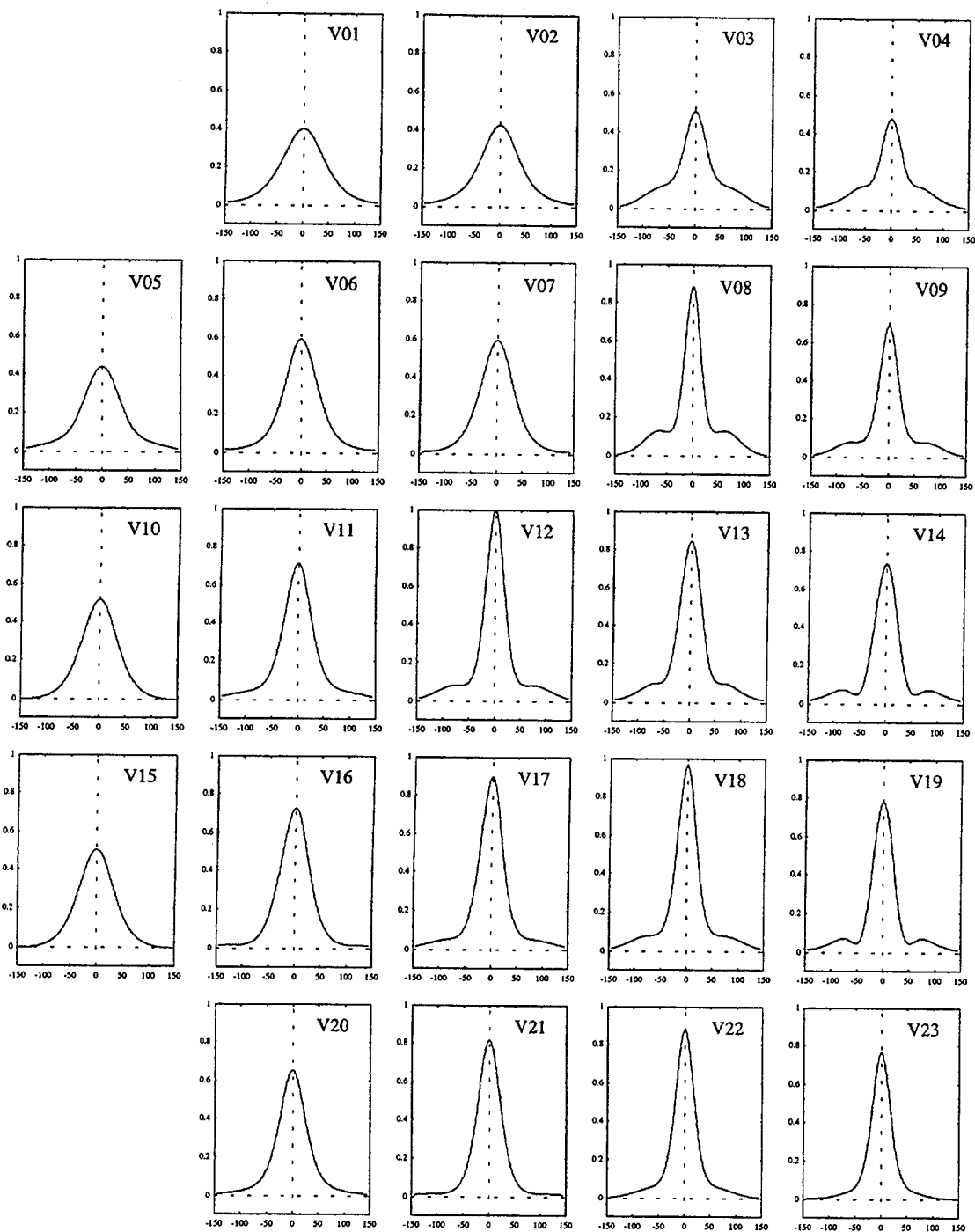


Figure 4-29. Résultats de la mesure de l'anisotropie de la LSF suivant la direction verticale pour la micro-zone de Fresnel MZP20.

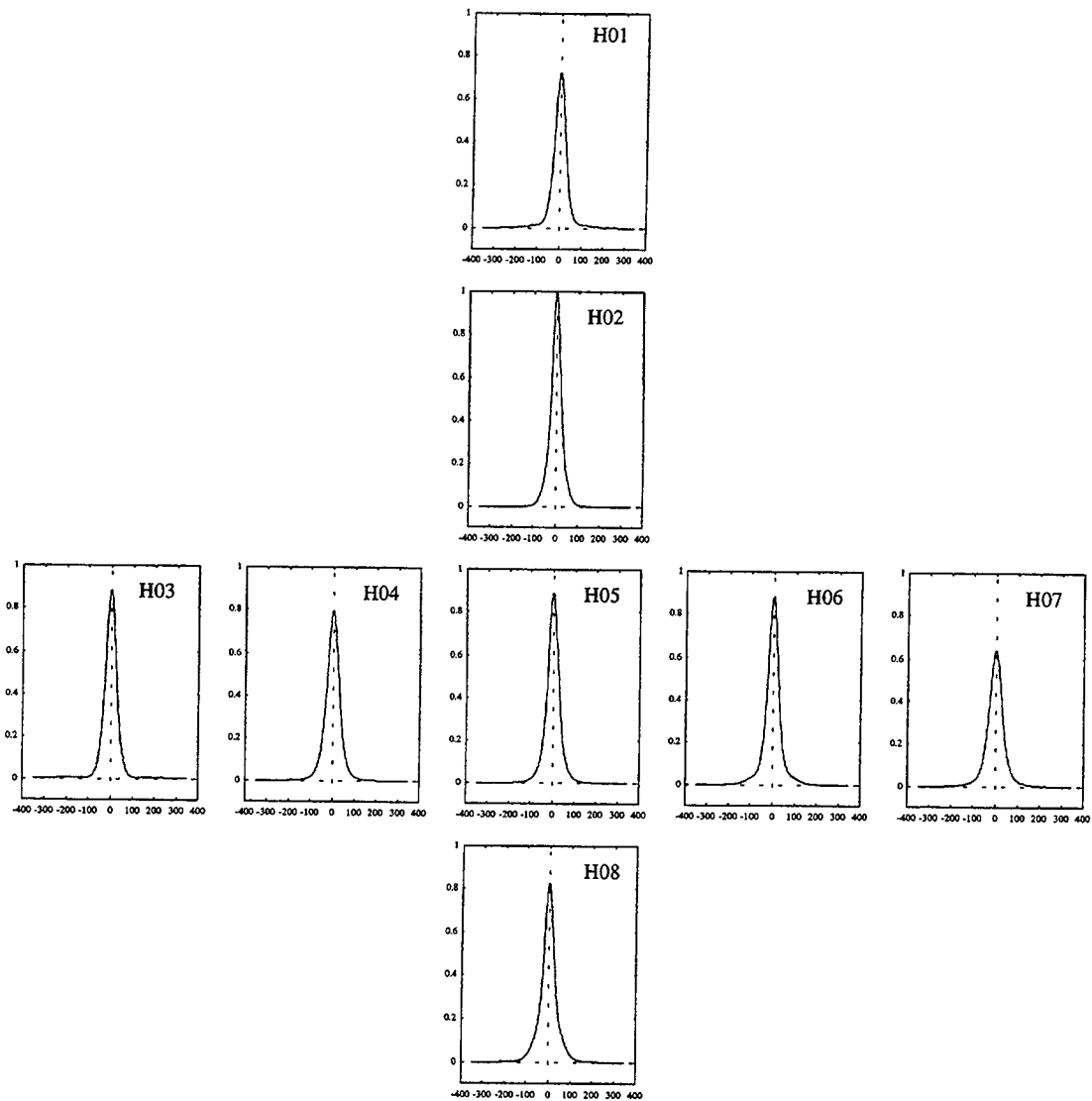


Figure 4-30. Résultats de la mesure de l'anisotropie de la LSF suivant la direction horizontale pour la micro-zone de Fresnel MZP39.



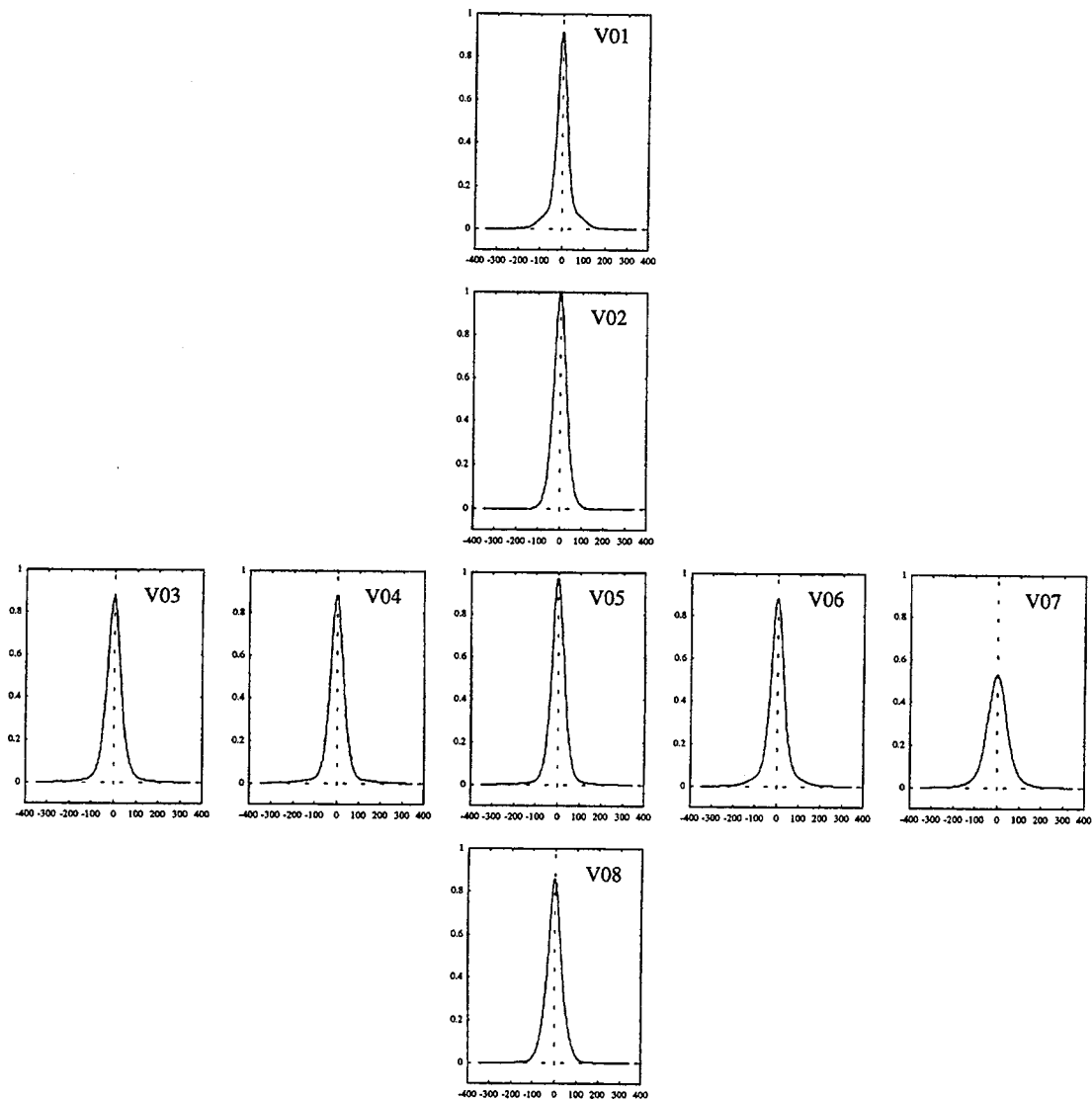


Figure 4-31. Résultats de la mesure de l'anisotropie de la LSF suivant la direction verticale pour la micro-zone de Fresnel MZP39.

Les résultats de la mesure de l'anisotropie et de la symétrie du TXM de Göttingen à BESSY pour les deux objectifs MZP39 et MZP20 sont différents. Hormis aux bords du champ, la LSF semble relativement symétrique et isotrope dans le cas de l'utilisation de MZP39 comme objectif. Ce n'est pas du tout le cas lorsque MZP20 est utilisée comme objectif. En effet, aux regards des Figure 4-28, Figure 4-29 et Figure 4-32, il apparaît clairement que la fonction de transfert est asymétrique et anisotrope. On peut constater une très forte asymétrie du système optique, qui se manifeste par des harmoniques très différentes ainsi que par de fortes variations de la résolution suivant l'orientation du bord. On peut également constater une évolution de ces harmoniques en fonction de la position de mesure dans le champ du microscope, qui caractérise l'anisotropie du microscope dans le cas de l'utilisation de MZP20.

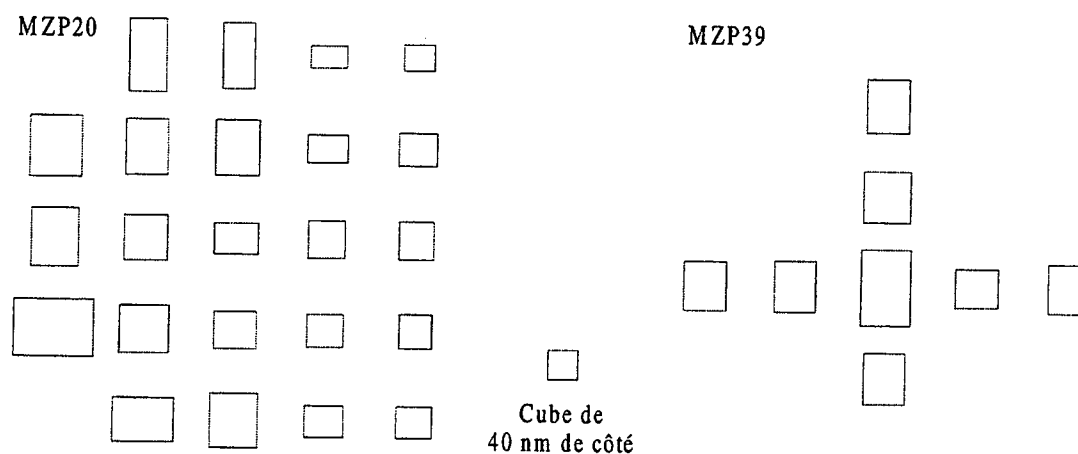


Figure 4-32. FWHM horizontales et verticales pour la mesure de l'anisotropie et de la symétrie pour MZP20 et MZP39.

Les changements de propriétés optiques de l'image observés aux bords sont certainement liés aux aberrations sphériques et chromatiques. Elles sont présentes dans toute technique de microscopie à image directe.

**Remarque 2 :** Suite aux mesures de symétrie et d'isotropie du microscope, il est nécessaire de souligner qu'une mesure de la symétrie suivant deux directions n'est pas suffisante pour conclure. En effet, la non symétrie du système optique peut être marquée suivant une direction différente des directions de mesure, comme c'est illustré sur la Figure 4-33.

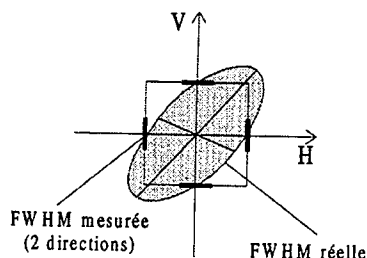


Figure 4-33. Exemple de non symétrie de la PSF, ne pouvant être caractérisée par une seule mesure suivant deux directions.

La section suivante est consacrée à l'étude des contributions suivant l'axe optique du microscope.

### 4.3.6 Détermination de la PSF 3D

La détermination des contributions suivant les trois dimensions de l'espace est primordiale à partir du moment où l'on dispose d'une technique de microscopie capable d'observer des échantillons épais. En effet, il est important de connaître les contributions des plans inférieurs et supérieurs au plan focal lorsque l'on veut effectuer des acquisitions bi-dimensionnelles d'objets dont l'épaisseur est supérieure à la profondeur de champ du microscope. De plus, cette mesure nous renseigne sur la technique à utiliser pour l'observation d'échantillons en trois dimensions.

La méthode que nous avons utilisée pour la détermination de la PSF 3D du TXM est de déplacer le bord d'or suivant la direction de l'axe optique et de mesurer les contributions associées à l'observation du bord en fonction de la défocalisation (voir Figure 4-34).

La détermination de la PSF pour chaque plan est effectuée par interpolation sur les profils d'intensité exactement de la même manière que dans les cas précédents.

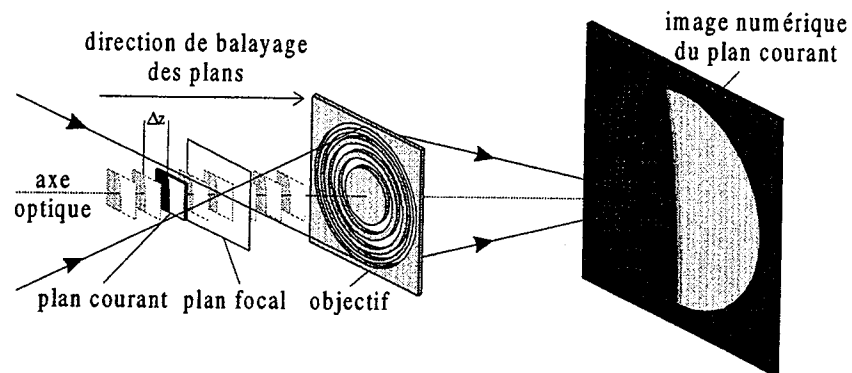


Figure 4-34. Schéma explicatif pour la détermination de la PSF 3D du microscope

Les Figure 4-35 et Figure 4-36 représentent les résultats de l'extraction de la PSF 3D du microscope pour les zones de Fresnel MZP20 et MZP39, et les Figure 4-37 et Figure 4-38 représentent leurs PSF 3D respectives dans le plan x-z. Les plans intermédiaires aux plans de mesures ont été obtenus par interpolation linéaire. Afin de suivre l'évolution de la résolution en fonction de l'axe des z, nous avons représenté sur la de la Figure 4-40 les variations de la résolution (FWHM) en fonction de la profondeur, que nous avons interpolé avec une courbe du second degré.

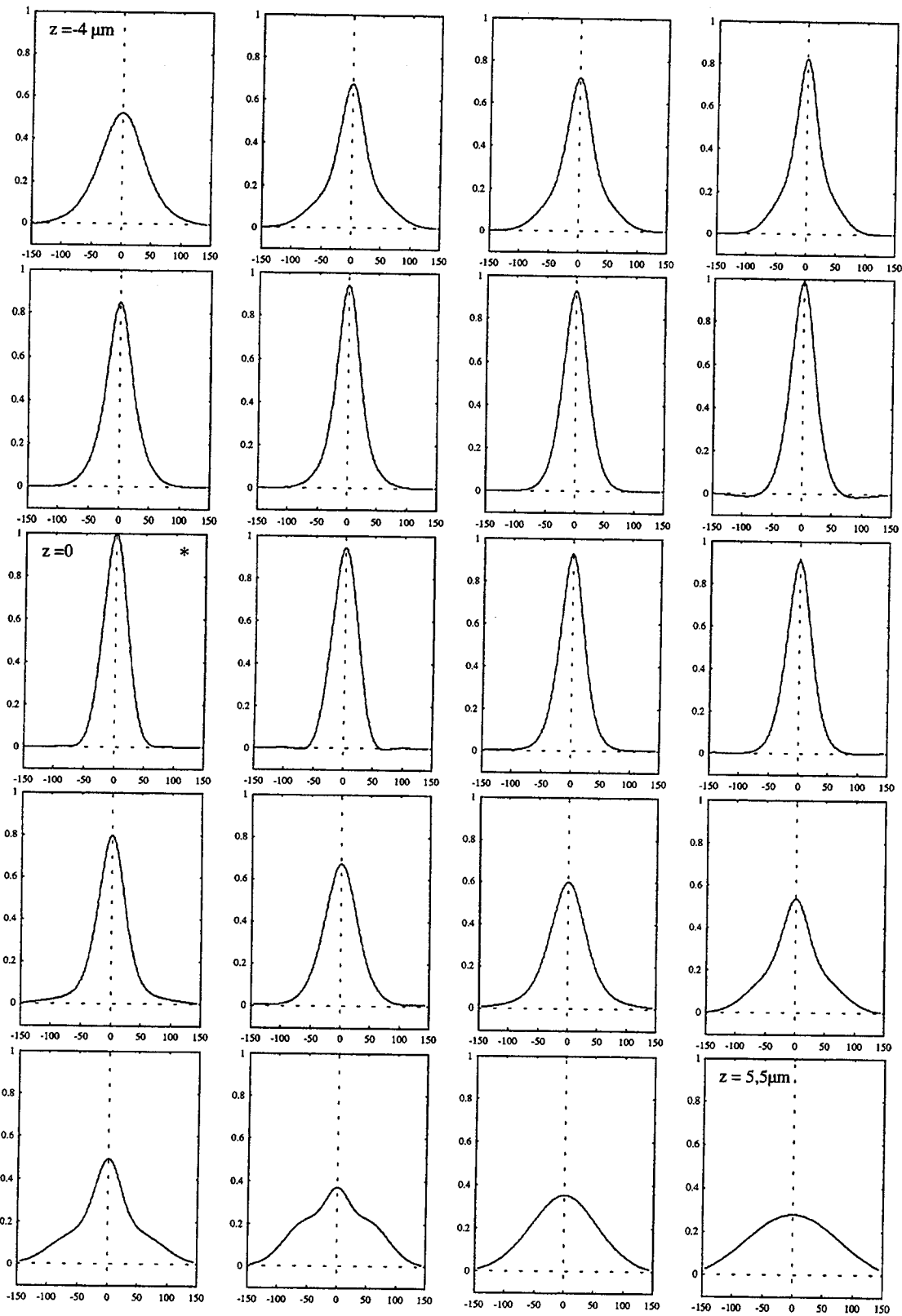


Figure 4-35. Résultats de l'extraction de la PSF 3D en utilisant le modèle expérimental.

$MZP20 \text{ nm}$ ,  $\Delta z = 0,5 \mu\text{m}$ . La PSF dans le plan focal est marquée d'une \*.

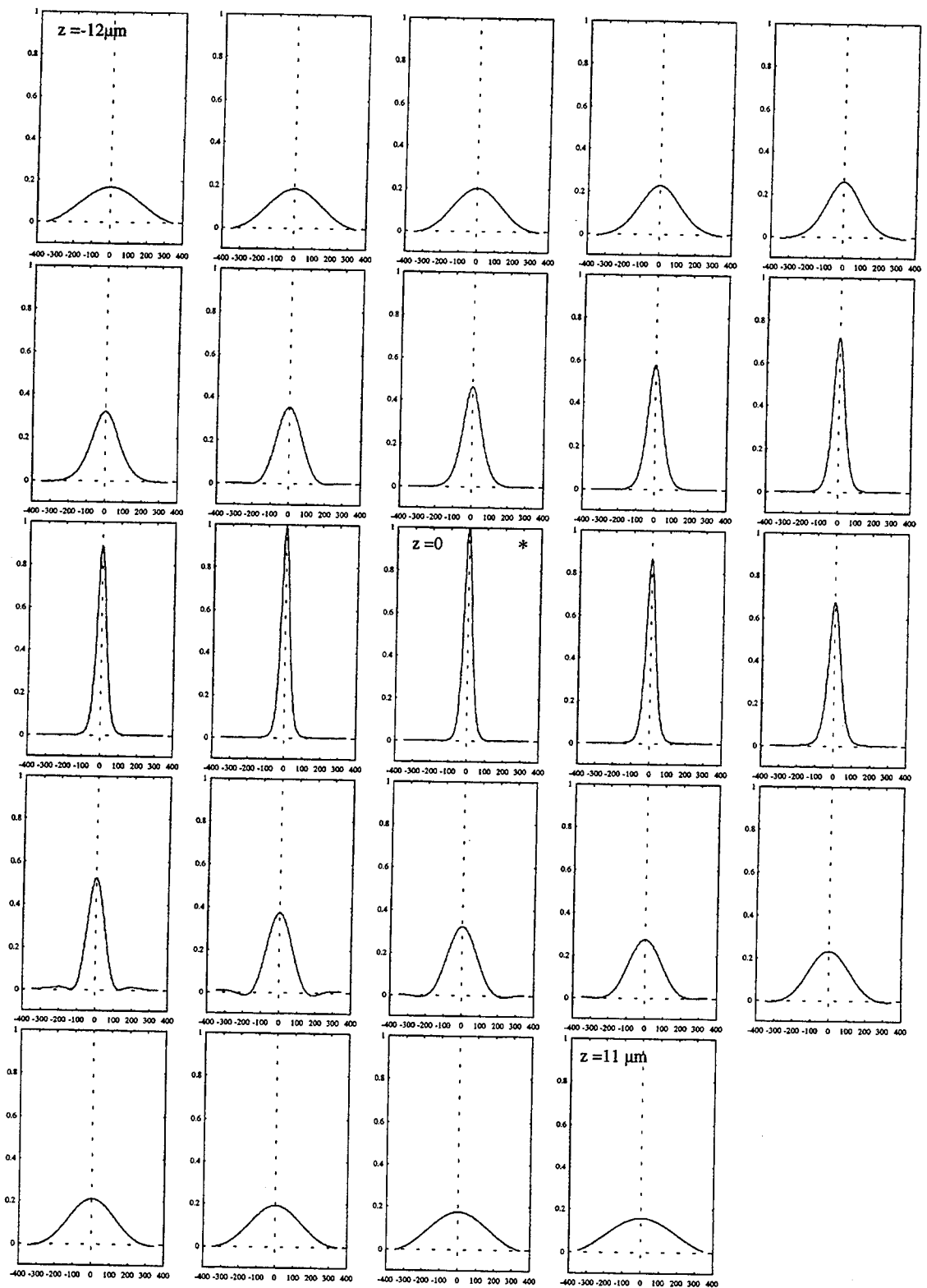


Figure 4-36. Résultats de l'extraction de la PSF 3D en utilisant le modèle expérimental. MZP39 nm,  $\Delta z = 1 \mu\text{m}$ . La PSF dans le plan focal est marquée d'une \*.



Figure 4-37. Coupe longitudinale de la PSF 3D du microscope à rayons X, pour la MZP 20.



Figure 4-38. Coupe longitudinale de la PSF 3D du microscope à rayons X, pour la MZP 39.

Les résultats de ces mesures expérimentales des contributions 3D de la réponse impulsionnelle du microscope, nous confirment l'anisotropie qui existe entre les directions axiales et transverses. Cette propriété fait de la microscopie à rayons X une microscopie à grande profondeur de champ, et ceci contrairement à des techniques telles que la microscopie confocale, dont un exemple de PSF 3D de microscope confocal laser à balayage est représenté sur la Figure 4-39.

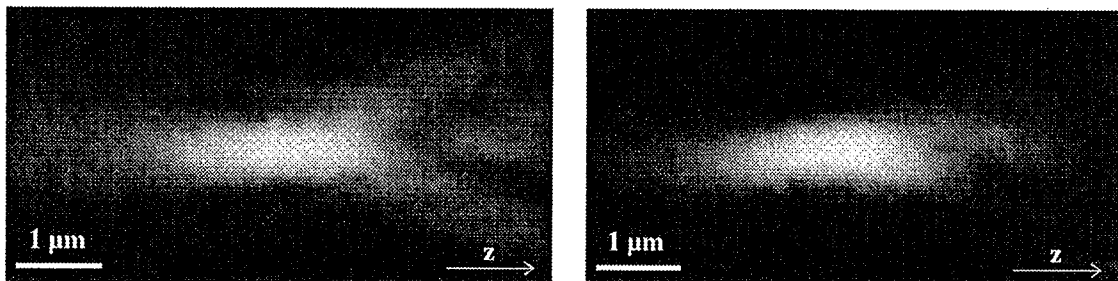


Figure 4-39. PSF expérimentale 3D d'un microscope laser à balayage ZEISS, avec un objectif x 63 NA 1,4, non confocal (gauche), et confocal (droite). Mesures effectuées à l'aide de billes fluorescentes de 0,2 μm de diamètre.

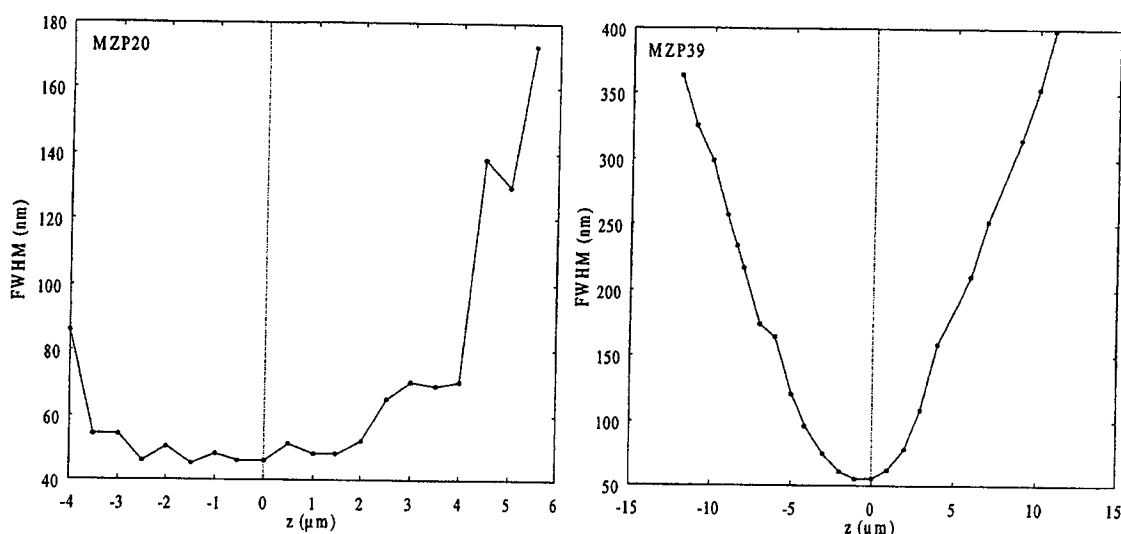


Figure 4-40. Evolution de la largeur à mi-hauteur (FWHM) de la PSF, en fonction de la profondeur (z).

La microscopie à rayons X en transmission permet alors d'accéder à l'information tri-dimensionnelle des objets, soit directement par stéréoscopie, soit par des techniques numériques de reconstruction volumique à partir de projections (tomographie). Inversement, la microscopie confocale permet d'accéder à cette information tri-dimensionnelle directement à partir de coupes focales successives.

Ces techniques d'observation 3D sont actuellement en cours de développement sur le microscope à rayons X en transmission de Göttingen à BESSY [Lehr 96]. Le problème est principalement pratique puisqu'elles nécessitent une rotation précise de l'objet autour d'un axe, et ceci dans un espace de quelques micromètres.

## 4.4 Conclusion sur l'étude de la formation des images en microscopie à rayons X

Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord étudié de manière théorique le processus de formation des images à travers une zone de Fresnel. Cette étude nous a permis de détailler le mécanisme de fonctionnement des anneaux de diffraction utilisés en microscopie à rayons X pour focaliser les rayons X. Nous avons ensuite évalué la fonction de transfert théorique d'une zone de Fresnel par analogie avec la microscopie



optique soumis à un éclairage incohérent, de manière à avoir une mesure de référence de la figure de diffraction créée par une zone de Fresnel. Puis, nous avons proposé une méthode pour la détermination expérimentale de la fonction de transfert du microscope. Cette méthode, qui consiste à interpoler des profils bruités extraits de l'image d'un bord franc à travers le microscope, a l'intérêt d'être simple à implémenter, rapide et robuste au bruit. Enfin, nous avons étendu cette méthode pour mesurer la symétrie, l'anisotropie et la réponse impulsionnelle 3D du microscope à rayons X, et ceci pour différentes zones de Fresnel.

Toutes ces mesures nous ont permis de confirmer de manière expérimentale les propriétés offertes par la microscopie à rayons X concernant l'observation d'objets bi-dimensionnels ou tri-dimensionnels. Elles nous ont également permis de mesurer de manière expérimentale les effets occasionnés par un condenseur non adapté à l'objectif sur les propriétés optiques du microscope.

Enfin, ces mesures nous ouvrent les portes de la restauration d'images. En effet, cette forme de traitement numérique des images, ayant pour but d'augmenter le contraste et la résolution des images, nécessite un modèle des dégradations liées au processus de formation des images dans le microscope. Dans le chapitre 6 consacré à ce sujet, nous verrons entre autre l'importance de cette étape préalable de la détermination expérimentale de la fonction de transfert du microscope, sur la qualité des résultats.

## 5. Dommages occasionnés par les radiations

Acquérir des images avec un "bon" rapport signal sur bruit est très important en microscopie. Or, le rapport signal sur bruit de l'image et les dommages subis par un échantillon soumis à des radiations sont étroitement liés et varient de façon contraire avec le temps d'exposition. Le rapport signal sur bruit d'une image est lié à la notion plus générale de qualité d'une image, dont il est important de distinguer la résolution latérale du minimum détectable [Cazaux 89]. La résolution latérale d'un système optique est déterminée par la distance minimale entre deux points pouvant être séparés, et peut être évaluée expérimentalement par l'intermédiaire de la réponse impulsionnelle (voir chapitre 3). Quand au minimum détectable, il est défini par la dimension minimale donnant lieu à un signal discernable du bruit de fond ; il est par conséquent dépendant du bruit statistique, alors que la résolution ne l'est pas. Nous étudierons par la suite l'influence de ces deux paramètres sur la quantité de photons nécessaire à la détection d'une structure isolée de composition et de dimensions données.

Les dégradations sont la conséquence de l'ionisation d'un atome par un photon ou une particule chargée. Dans ce chapitre, nous introduirons brièvement certaines notions de bases concernant les dommages subis par un échantillon soumis à un

rayonnement ionisant. Ensuite, nous considérerons le modèle du cube isolé pour évaluer la *dose* absorbée par un échantillon soumis à des radiations X. Puis, nous présenterons les limitations de ce modèle dans le cas de l'observation de structures dont les dimensions sont proches de la résolution du microscope. Pour pallier à ces limitations, nous proposerons un modèle prenant en compte la formation des images dans le microscope. Afin de quantifier l'apport de notre approche, nous effectuerons des simulations à l'aide des résultats obtenus dans le chapitre précédent. Enfin, nous terminerons ce chapitre par une étude expérimentale des effets des radiations observés sur des échantillons biologiques, non fixés, fixés ou vitrifiés, et nous conclurons.

## 5.1 Généralités sur les radiations

Le problème des dommages subis par les échantillons biologiques en microscopie à rayons X est un problème majeur qui a donné lieu à de nombreuses publications. Dans l'ordre chronologique, Sayre et al. [Sayre 77] ont proposé un modèle simple de calcul dans le but de réaliser une étude comparative avec la microscopie électronique. Puis, Rudolph et al. [Rudolph 90] et Gözl [Gözl 92] ont développé des modèles pour mesurer les doses absorbées par les échantillons biologiques en microscopie à image directe et en contraste de phase. La dose, exprimée en Grays ( $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$ ) ou en rads ( $1 \text{ rad} = 10^{-2} \text{ Gy}$ ), est une mesure de la quantité d'énergie absorbée par unité de masse de la matière irradiée. Williams et al. [Williams 93] ont fait des mesures de perte de matériel en fonction des doses appliquées sur des chromosomes non fixés et fixés après déshydratation et en milieu aqueux. Bennett et al. [Bennett 94], puis Foster et al. [Foster 94] ont examiné les effets des radiations sur les fonctions et les structures des myofibrilles. Plus récemment, Schneider [Schneider 94] a développé un modèle complet pour l'estimation des dommages occasionnés par les radiations dans le cas d'objets biologiques non fixés, fixés et vitrifiés. Il a effectué des simulations en tenant compte dans son modèle de la sensibilité des liaisons chimiques aux radiations et du phénomène de diffusion de matière par mouvement Brownien. Il a également observé la résistance des échantillons biologiques vitrifiés en fonction de la dose

[Schneider 95]. Enfin, Fujisaki et al. [Fujisaki 95] ont étudié les pourcentages de cellules vivantes en milieu aqueux en fonction du flux de photons appliqué.

Toutes ces études ont montré qu'à partir d'une dose de  $10^6$  Gy, la perte de masse commençait à devenir conséquente, dans le cas d'échantillons fixés. Il faut noter que les agents de fixation agissent au niveau des liaisons chimiques intra et intermoléculaires, et que des modifications de structures peuvent en résulter, et ainsi engendrer des artefacts dans les images. Concernant le cas d'échantillons non fixés en milieu aqueux, l'expérience montre qu'à partir de  $10^4$  Gy des changements de structure commencent à être dramatiques et les fonctions biologiques détruites. Toutefois, ce sujet reste complexe et peu de travaux ont été réalisés dans ce domaine. Un autre moyen pour limiter les dommages est de vitrifier les échantillons. Cette technique a pour principal avantage de protéger les échantillons en limitant les phénomènes de diffusion, ce qui leur permet d'accepter des doses jusqu'à  $10^8$  Gy sans modification apparente des structures. La vitrification est la seule technique envisageable pour nous permettre d'acquérir une série d'images du même échantillon biologique et assurer la reproductibilité des mesures. Sans cette technique, il ne paraît pas concevable d'effectuer des acquisitions 3D sur un objet biologique.

## 5.2 Dose et radiations

L'acquisition d'une image en transmission avec une résolution donnée, nécessite d'autant plus de photons que l'on voudra accéder à une image de bonne qualité (en terme de rapport signal sur bruit). Ceci est dû à la nature Poissonienne du bruit qui varie comme la racine carré du nombre de photons, alors que l'intensité du signal est une fonction directe du nombre de photons à condition d'avoir un détecteur à réponse linéaire. Le bruit statistique influence directement le minimum détectable dans une image, et augmenter le temps d'exposition pour obtenir une image de meilleure qualité aura pour conséquence d'accroître les dommages occasionnés par les radiations sur l'échantillon.

Un modèle pour évaluer la dose absorbée par un objet isolé modélisé par un cube de côté  $t$  dans un milieu aqueux de hauteur  $h$ , consiste à évaluer le nombre de photons absorbés par unité de surface.

L'intensité  $I$  d'un signal mesuré par le détecteur est proportionnelle au nombre  $N$  de photons atteignant un pixel de ce détecteur. Ces grandeurs sont liées par la relation  $I = QE.N$ , où  $QE$  désigne l'efficacité quantique du détecteur. Le nombre de photons par unité de surface  $N_s$  ayant traversé l'objet considéré est :

$$N_s = \frac{N}{S} = \frac{N_0}{S} \exp(-\mu_{\text{obj}} t) \quad (5-1)$$

où  $N_0$  est le nombre de photons incidents sur l'élément de surface  $S$ .

Il nous paraît judicieux de choisir  $S$  comme étant la surface correspondant à un pixel de l'image acquise. Auquel cas

$$S = \frac{\Delta^2}{G^2} \quad (5-2)$$

où  $\Delta$  est la taille d'un pixel de la caméra CCD et  $G$  le grandissement du système.

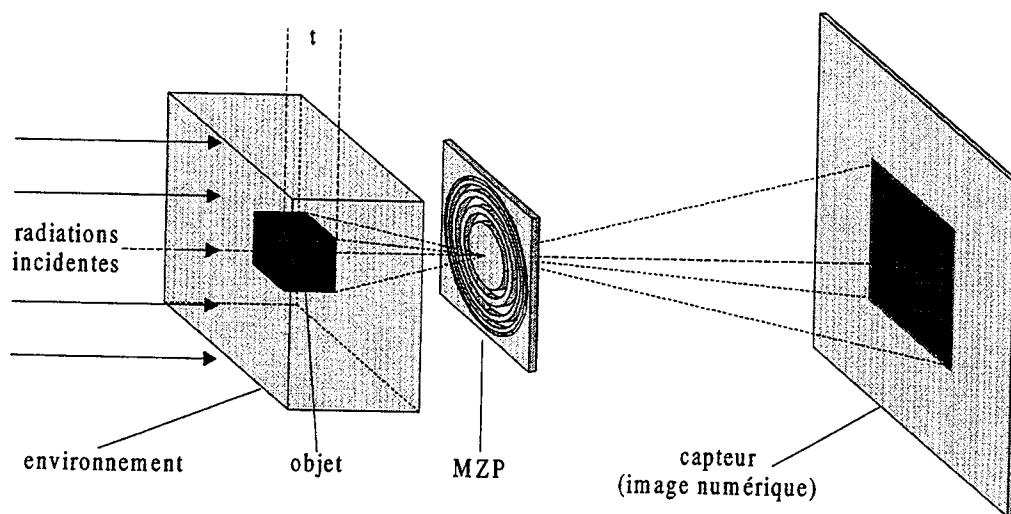


Figure 5-1. Modèle utilisé pour le calcul de la dose absorbée par un cube isolé de côté  $t$ .

Si on néglige l'absorption des photons par le milieu, le nombre de photons absorbés par l'objet isolé par unité de surface est

$$\frac{N_0}{S} (1 - \exp(-\mu_{\text{obj}} t)) \quad (5-3)$$

L'absorption  $\mu_{\text{obj}} t$  étant très petite devant l'unité, on peut faire un développement limité de l'équation (5-3) au premier ordre. Le nombre de photons absorbés par unité de surface devient alors  $N_0 \mu_{\text{obj}} t / S$ .

La dose  $D$  définie comme l'énergie absorbée par unité de masse s'écrit

$$D = \frac{nE}{\rho t^3} \quad (5-4)$$

où  $E$  est l'énergie de chaque photon,  $\rho$  la densité de l'objet, et  $n$  le nombre de photons absorbés par l'objet. Dans le cas de notre modèle,  $D$  prend la forme

$$D = \frac{N_0 \mu_{\text{obj}} E}{\rho S} \quad (5-5)$$

Un critère de qualité d'une image défini par Rose stipule que pour qu'un objet soit visible sur un fond, il faut que le rapport entre le signal ( $I_0 - I$ ) et le bruit dans l'image du fond soit supérieur à 5. Dans le cas de notre objet isolé, sachant que le bruit est proportionnel à la racine carrée du nombre de photons, le critère de Rose s'écrit

$$\frac{QEN_0 \mu_{\text{obj}} t}{\sqrt{QEN_0}} \geq 5 \quad (5-6)$$

En prenant comme mesure du contraste  $C$  la définition suivante

$$C = \frac{I_0 - I}{I_0} = \frac{N_0 \mu_{\text{obj}} t}{N_0} \quad (5-7)$$

le critère de Rose peut s'écrire en fonction du contraste par

$$\sqrt{QE \cdot N_0} C \geq 5 \quad (5-8)$$

En combinant les équations (5-5) et (5-8), il est maintenant aisé de déterminer la dose minimale nécessaire pour obtenir l'image d'un cube isolé de côté  $t$  vérifiant le critère de qualité de Rose

$$D_{\min} = \frac{25E}{QE \cdot \mu \rho S t^2} = \frac{25\mu E}{QE \cdot \rho S C^2} \quad (5-9)$$

La dose est donc fonction du contraste  $C$  et de l'échantillonnage (exprimée ici par  $S$ , la surface d'un pixel). Ainsi, la dose minimale nécessaire à l'observation d'une structure sera d'autant plus élevée que la fonction de contraste liée à l'absorption sera faible. L'élément de surface  $S$  nous indique également que sur-échantillonner l'image engendre une augmentation de la dose, ce qui se comprend tout à fait puisqu'il faudra dans ce cas plus de photons pour former une image. Ainsi, pour un contraste donné, échantillonner avec une fréquence double entraîne une augmentation de la dose d'un facteur 4. Cette observation nous montre qu'il est nécessaire de prendre en compte la configuration du microscope.

La limitation de ce modèle au seul phénomène d'absorption nous a semblé être insuffisante, notamment lors de l'observation de structures dont les dimensions sont proches de la résolution du système optique. En effet, dans ce cas particulier, la PSF du microscope qui conduit à une diminution du contraste doit être pris en compte.

La section suivante est consacrée à l'étude plus approfondie des effets de la prise en compte du processus de formation des images sur la dose minimale nécessaire à l'observation de structures isolées.

### 5.3 Prise en compte de la formation des images pour l'estimation des dommages

Pour une résolution donnée, le contraste  $C$  ne dépend pas uniquement de l'interaction entre le rayonnement et l'objet tel que nous l'avons décrit dans la section 2.3. Comme nous l'avons constaté, l'échantillonnage est un critère à ne pas négliger lorsqu'on étudie la dose et le contraste. Or, cette notion d'échantillonnage est directement liée à la notion plus générale de formation des images, où l'image d'un objet est obtenue par la convolution entre l'image de contraste de l'objet et la réponse impulsionnelle du système. De même, l'efficacité des zones de Fresnel est un facteur important à prendre en compte dans l'évaluation de la dose absorbée par un objet.

Dans cette partie, nous étudierons l'influence de ces paramètres sur la dose minimale nécessaire pour observer un cube isolé de côté  $t$ . Pour cette étude, nous nous placerons dans les mêmes conditions de bruit que celles proposées dans la section 5.2 (conditions imposées par le critère de Rose) en utilisant les mêmes approximations. Cette phase a pour but de quantifier l'importance du phénomène de formation des images, principalement lors de l'observation de structures de dimensions proches de la limite de résolution du microscope.

### 5.3.1 Prise en compte de l'échantillonnage

Comme l'équation (5-9) nous l'indique, l'échantillonnage est un facteur à prendre en compte pour la mesure de la dose absorbée par l'objet à imager. Comme nous l'avons mentionné précédemment, échantillonner avec une fréquence double, ce qui s'obtient en utilisant un grandissement deux fois supérieur, engendre une augmentation de la dose d'un facteur 4. Ce phénomène provient du fait qu'il faudra dans ce cas précis quatre fois plus de photons pour obtenir le même SNR que dans le cas où l'on ne sur-échantillonne pas.

En théorie, sur-échantillonner n'apporte rien au niveau de l'information contenue dans l'image. Ceci est dû au phénomène de diffraction qui limite la résolution d'un microscope. Le sur-échantillonnage n'est utilisé que dans le cas particulier où l'on désire faire des traitements spécifiques sur l'image numérique et où l'information contenue dans le flou est exploitée ; c'est le cas de la restauration d'images par exemple, dont l'objectif est d'augmenter la résolution et le contraste des images en utilisant un modèle de la fonction de flou. Il peut alors être nécessaire d'utiliser cette possibilité, notamment dans le cas d'observation d'objets de dimensions proches de la limite de résolution.

### 5.3.2 Prise en compte de la fonction de transfert

Lorsque l'objet à observer a des dimensions proches de la limite de résolution du microscope, son image aura un contraste réduit (Figure 5-2.c). Il en est de même lorsque l'objet n'est pas isolé mais situé dans un milieu plus opaque aux rayons X que l'eau



(Figure 5-2.b). Dans ces deux cas de figures, le nombre de photons nécessaires pour distinguer l'objet de son environnement devra être augmenté, et par conséquent la dose de rayons X absorbée par l'échantillon sera plus importante.

Restons dans le cas d'un objet isolé, et posons  $1/\alpha$  comme étant un coefficient d'atténuation du contraste lié au phénomène de limite de résolution (Figure 5-2)

$$\frac{1}{\alpha} = \frac{I_0 - I}{I_0 - I_T} \quad (5-10)$$

Soit  $N$  le nombre de photons nécessaires à l'observation d'une structure isolée défini par le critère de Rose, où seul le phénomène d'absorption est pris en compte (équations 5-7 et 5-8). La relation entre  $N$  et le contraste  $C$  donné par la relation (5-7) peut s'écrire sous la forme

$$N = 25 \left( \frac{I_0}{I_0 - I_T} \right)^2 \quad (5-11)$$

Soit  $N_1$  le nombre de photons nécessaires à l'observation de la même structure isolée en prenant en compte la baisse de contraste due à l'observation de structures dont les dimensions sont proches de la limite de résolution

$$N_1 = 25 \left( \frac{I_0}{I_0 - I} \right)^2 \quad (5-12)$$

$N$  et  $N_1$  sont alors liés par la relation

$$N_1 = \alpha^2 N \quad (5-13)$$

et la dose correspondante absorbée est alors

$$D_1 = \alpha^2 D \quad (5-14)$$

où  $D$  correspond à la dose associée à  $N$ .

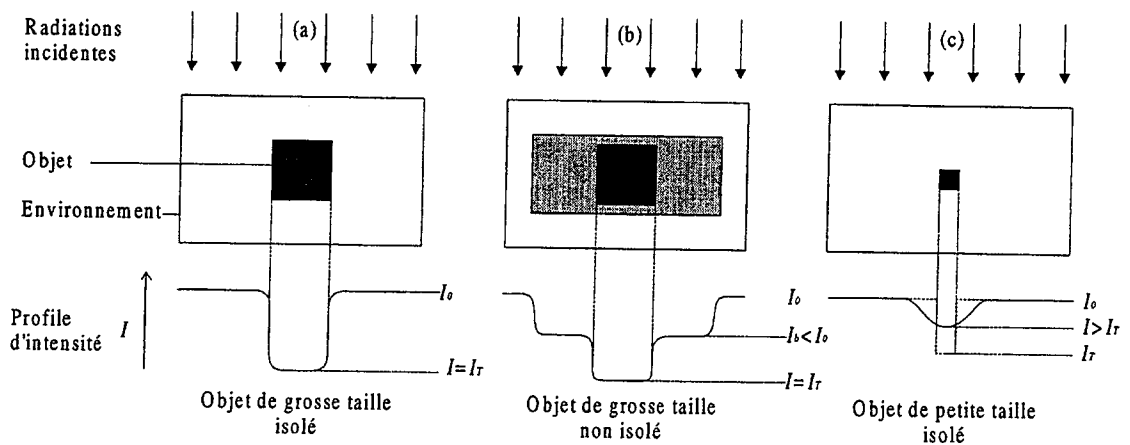


Figure 5-2. Evolution de  $I_{\max} - I$  en fonction de la taille et de l'environnement de l'objet à observer. Pour simplifier le schéma, le système optique n'est pas représenté.

La section 5.3.4, consacrée à l'application numérique dans le cas de l'observation d'une structure isolée de taille et de densité données, nous donne des valeurs de ce paramètre  $\alpha$  en fonction des lentilles utilisées. Nous verrons alors que ce paramètre devient non négligeable lorsque les dimensions des structures approchent la limite de résolution du microscope.

### 5.3.3 Prise en compte de l'efficacité des micro-zones de Fresnel

En plus de l'atténuation due au mécanisme de formation des images, l'efficacité des lentilles utilisées est un critère à ne pas négliger. En effet, la mesure du nombre de photons par pixel nécessaire pour observer des structures se mesure au niveau du détecteur. Or l'image dans le détecteur s'effectue à travers la lentille jouant le rôle d'objectif dans le microscope.

Soit  $\eta$  l'efficacité de la micro-zone de Fresnel utilisée. La dose réellement absorbée par l'objet est liée à la dose mesurée dans le détecteur par la relation

$$D_1 = \frac{D}{\eta} \quad (5-15)$$

Typiquement, en microscopie à rayons X ces efficacités sont de l'ordre de 10 % (voir chapitre 4 pour plus de détails sur la formation des images à travers une zone de

Fresnel). Ainsi, le nombre de photons atteignant l'échantillon est 10 fois supérieur au nombre de photons atteignant le détecteur, et la dose absorbée est donc 10 fois celle mesurée. Mais il arrive que, pour des problèmes de micro-fabrication, cette efficacité descende jusqu'à des valeurs de 4%, et dans ce cas la dose absorbée atteint jusqu'à 25 fois celle mesurée dans le détecteur.

### 5.3.4 Application numérique à un problème concret en biologie

Pour ramener cette étude à un problème concret de la biologie, il serait intéressant de pouvoir observer des fibres de l'ordre de 30 nm dans un chromosome. Constituées principalement de protéines et d'acides nucléiques, ces structures représentent un niveau intermédiaire de la chaîne chromosomique et n'ont jusqu'à présent pu être observées dans leur état naturel (voir Figure 5-3). La question qui se pose est alors de savoir si l'on peut s'attendre ou non à observer de telles structures au microscope à rayons X avec les optiques actuelles ?

Pour cette étude, l'idée est de mesurer la dose minimale nécessaire à l'observation de telles structures, et de la comparer aux courbes de dommages calculées par G. Schneider [Schneider 94] données dans l'annexe A. Pour rester cohérent avec la réalité, nous utiliserons des configurations existantes du TXM de Göttingen à BESSY, sur lesquelles nous avons effectué les mesures des réponses impulsionnelles (voir section 4.3) et dont les efficacités expérimentales ont été mesurées. Afin de pouvoir exploiter les résultats précédents, nous modélisons le problème en représentant ces structures comme des cubes de protéine isolés de 30 nm de côté. Le modèle de protéine utilisé est  $C_{94}H_{139}N_{24}O_{31}S$ , de densité  $\rho = 1,35$  g/ml, et dont la courbe d'absorption aux rayons X est représentée sur la Figure 2-3.

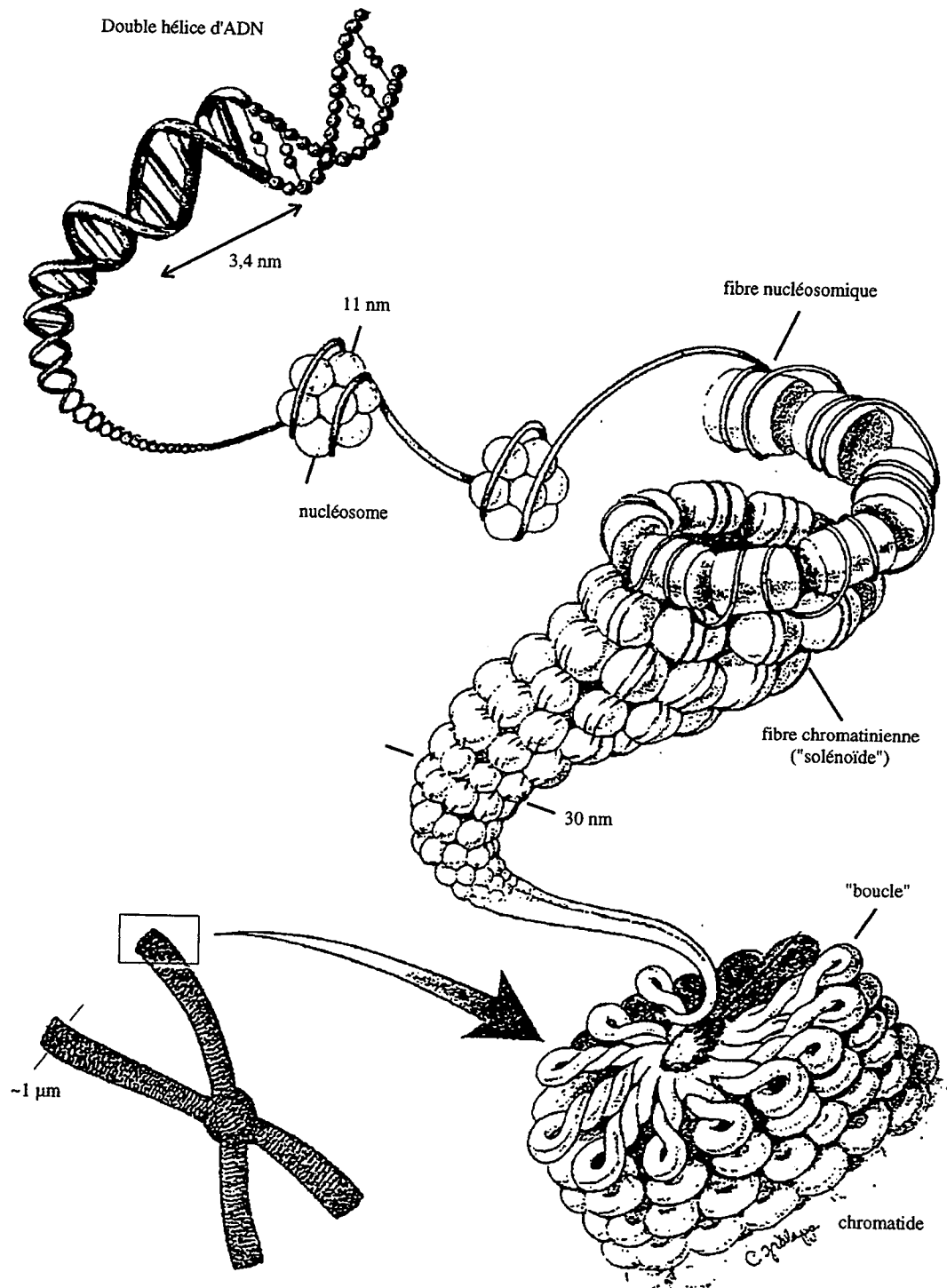


Figure 5-3. Schéma de l'organisation chromosomique. Extrait de [Douglas 90].

Négligeons dans un premier temps la perte de contraste due à la limite de résolution ainsi que l'efficacité des lentilles comme dans la plupart des études proposées dans la littérature. En supposant le contraste  $C$  comme étant le contraste naturel donné par la relation (5-7), le nombre de photons par pixel nécessaire au niveau du détecteur pour vérifier le critère de Rose (équation 5-8) est  $N_0 = 310$  photons (avec  $QE.=10$ ). La dose correspondante pour différentes configurations du microscope est représentée dans le Tableau 5-1 ci-dessous.

Micro-zone de Fresnel	Grandissement G	Taille d'un pixel (nm)	Dose minimale D (Gy)
MZP 39	1103	22	$1,2 \cdot 10^5$
	1967	12	$3,9 \cdot 10^5$
MZP 29	1786	13,5	$3,1 \cdot 10^5$
	3186	7,5	$10^6$
MZP 20	2664	9	$7 \cdot 10^5$

Tableau 5-1. Nombre de photons nécessaire à l'observation de structures isolées de 30 nm de côté en fonction des différentes micro-zones de Fresnel et différents grandissements. Seul l'échantillonnage est pris en compte, l'atténuation due à la limite de résolution est négligée.

Dans une seconde phase, prenons en compte l'atténuation de l'intensité due à la limite de diffraction ainsi que l'efficacité expérimentale des micro-zones de Fresnel. Le Tableau 5-2 représente différentes valeurs numériques du coefficient  $\alpha$  que nous avons calculés dans le cas d'un cube isolé de 30 nm, pour différentes zones de Fresnel et différents grandissements. Ces valeurs sont obtenues en mesurant l'atténuation entre la fonction de contraste et cette même fonction convoluée par la PSF du système (équation 4-8). Les réponses impulsionnelles utilisées pour la convolution sont celles que nous avons évaluées expérimentalement dans la section 4.3.

Micro-zone de Fresnel	Grandissement	Taille d'un pixel (nm)	Efficacité $\eta$ (%)	$\alpha$
MZP 39	1103	22	4,9	6,6
	1967	12		3,3
MZP 29	1786	13,5	6,3	4,4
	3186	7,5		3,0
MZP 20	2664	9	2,9	3,1

Tableau 5-2. Valeurs du coefficient d'atténuation  $\alpha$  et de l'efficacité  $\eta$  en fonction des différentes micro-zones de Fresnel et différents grandissements, dans le cas de l'observation d'une structure isolée de 30 nm de côté.

Ainsi, la valeur du paramètre  $\alpha$  peut varier de 3,0 à 6,6 en fonction des lentilles utilisées et de l'échantillonnage.

Pour revenir à notre modèle, la dose minimale totale nécessaire à l'observation d'une structure isolée de 30 nm est donnée par la relation

$$D_{\min} = \frac{\alpha^2}{\eta} D \quad (5-16)$$

La Figure 5-4 représente, dans le cas de notre modèle, les valeurs de  $D$  et  $D_{\min}$ , que nous avons calculées pour plusieurs MZP et différents grandissements.

Il faudra alors dans le meilleur des cas une dose de  $8.10^7$  Gy pour espérer observer un objet isolé de 30 nm de diamètre avec un rapport signal sur bruit de 5, alors qu'une dose de  $10^5$  Gy semblait suffisante avec le modèle sans prise en compte de la formation des images. Si l'on compare ces résultats avec les courbes de radiations données en annexe A, on constate que la cryomicroscopie apparaît comme la seule technique de préparation permettant d'observer de tels objets avec un SNR de 5 sans qu'il y ait de modifications de structures, alors qu'une simple fixation apparaissait comme suffisante sans la prise en compte de la formation des images.

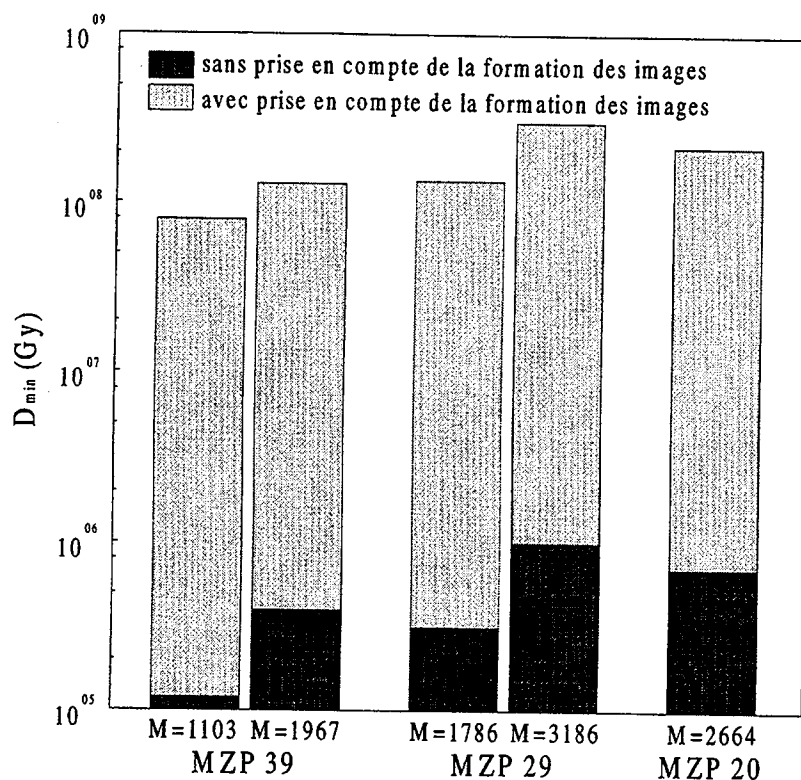


Figure 5-4. Représentation de la dose minimale nécessaire à l'observation d'une structure isolée de 30 nm de côté, avec et sans prise en compte du processus de formation des images, pour différentes MZP et différents grossissements

En conclusion, nous avons vu que la prise en compte du mécanisme de formation des images entraîne une augmentation de la dose d'un facteur pouvant varier entre 300 et 700 par rapport à une étude ne prenant en compte que les phénomènes d'absorption. Ce facteur peut s'avérer désastreux dans le cas d'observations d'échantillons biologiques, où les principales modifications de structures surgissent dans un intervalle d'un à deux ordres de grandeur sur une échelle de la dose. Malgré tout, il faut toujours garder à l'esprit que ces calculs ont été effectués en utilisant les résultats de mesures expérimentales de la PSF, et qu'une erreur sur ces résultats peut engendrer une erreur de calcul sur le facteur  $\alpha$ . Toutefois, les ordres de grandeurs concernant l'augmentation de la dose minimale nécessaire à l'observation de structures dont les dimensions sont proches de la limite de résolution nous montrent clairement qu'il ne faut pas négliger les phénomènes de diffraction des optiques.

Nous pouvons également remarquer que les simulations ont été faites dans l'hypothèse où le microscope était parfaitement focalisé sur l'objet. Au regard de la PSF 3D du microscope (voir section 4.3.6), il apparaît que l'observation d'une même structure dans le cas d'une mauvaise focalisation engendrera une baisse d'intensité encore plus prononcée. Par conséquent, la dose minimale nécessaire à la visibilité de cette structure dans l'image devra être augmentée. Même si cette remarque est évidente, elle est à garder à l'esprit lors de l'observation d'échantillons dont l'épaisseur est supérieure à la profondeur de champ du microscope et dont on voudrait localiser des structures d'une taille donnée. C'est le cas des chromosomes géants présentés tout au long du document, dont les épaisseurs peuvent atteindre plusieurs micromètres.

## 5.4 Observation directe des dommages sur échantillons biologiques

Dans cette partie, nous allons observer l'effet de l'irradiation dans le cas d'échantillons biologiques non fixés, fixés ou vitrifiés. L'échantillon observé est un chromosome polyténique de *Chironomus Thummi* isolé en milieu aqueux.

Cette partie a pour but d'observer les modifications de structures en fonction de la dose absorbée par l'échantillon, de manière à pouvoir comparer la stabilité des échantillons en fonction des différentes techniques de préparation.

Pour cette étude, l'évaluation locale de la dose absorbée est déterminée par la relation

$$D = \frac{(I_0 - I_T)E}{QE \cdot \rho S t \eta} \quad (5-17)$$

où, dans la zone d'intérêt,  $(I_0 - I_T)/QE$  est le nombre de photons absorbé par pixel,  $E$  l'énergie des photons,  $S$  est la surface d'un pixel,  $\rho$  la densité volumique du chromosome,  $t$  l'épaisseur du chromosome et  $\eta$  l'efficacité de la zone de Fresnel utilisée.

Pour ce calcul, nous avons utilisé  $S = 182 \text{ nm}^2$ , et  $\eta = 6,3 \%$ , ce qui correspond aux paramètres d'échantillonnage utilisés pour l'acquisition des images avec MZP29



(voir Tableau 5-2). Quand aux grandeurs propres à l'échantillon, nous avons pris  $\rho = 1,35 \text{ g/ml}$  et  $t = 4 \text{ }\mu\text{m}$ . Nous pouvons toutefois noter les valeurs réelles moyennes des densités d'ADN + protéine en milieu aqueux, qui sont de  $150 \text{ mg/ml}$  pour un chromosome polyténique, et de  $1200 \text{ mg/ml}$  pour un chromosome métaphasique.

Pour nous permettre de mieux visualiser les effets des radiations dans le cas d'échantillons non fixés et fixés, nous avons placé des marqueurs représentés par des flèches sur les Figure 5-5 et Figure 5-6. Afin de mieux pouvoir localiser les régions principales et mieux suivre l'évolution de ces régions, nous avons délibérément augmenté le contraste des images. Les images brutes sont représentées dans la section 3.2 qui concerne le protocole de préparations des échantillons. Enfin, pour déterminer si les modifications de structures observées au cours des expositions successives sont la conséquence d'une perte de masse ou d'un phénomène de contraction de la matière, nous avons, dans une zone donnée marquée par un carré blanc sur les Figure 5-5 et Figure 5-6, mesuré l'absorption moyenne à chaque exposition. Afin de suivre les durées d'exposition des échantillons aux rayons X, le temps d'exposition utilisé pour l'acquisition (TE) ainsi que la durée totale d'exposition (DT) sont détaillés sous chaque image.

### 5.4.1 Échantillons non fixés

La série d'images présentée sur la Figure 5-5 représente l'image d'une région d'un chromosome polyténique observé après un nombre croissant d'expositions de 0,1 seconde.

On observe des modifications de structure dès la première exposition. Ces modifications de structures sont caractérisées par un flou dans l'image, et sont probablement dues au déplacement des structures lié à la contraction et la perte du matériel biologique durant l'exposition. Les valeurs moyennes d'absorption mesurées dans la zone marquée restent relativement constantes au cours des expositions, on peu

conclure à une perte de masse pour une irradiation croissante. Ce phénomène a déjà été constaté lors de l'observation de chromosomes fixés en milieu aqueux [Williams 93].

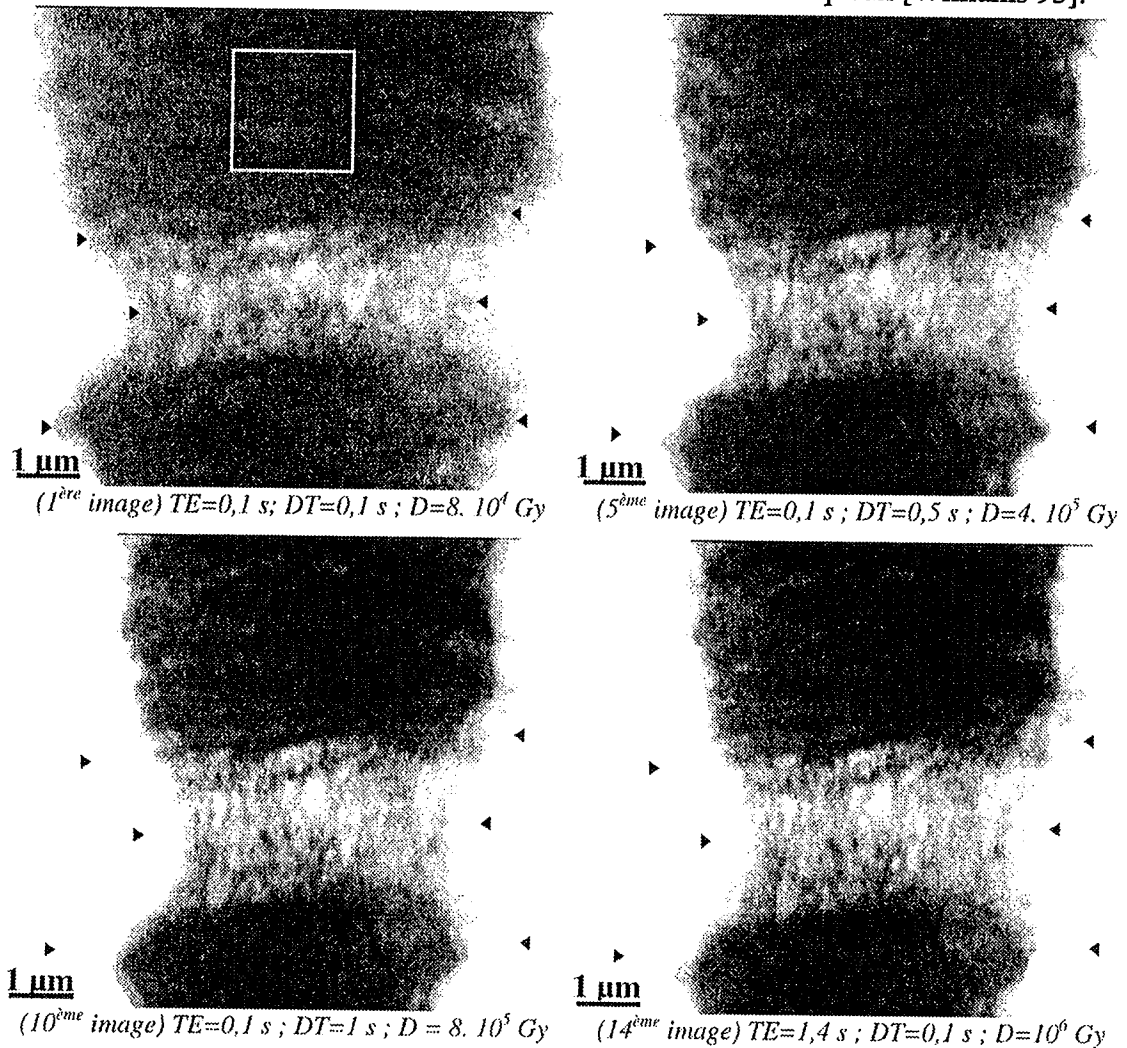


Figure 5-5. Effets des radiations sur échantillons non fixés en milieu aqueux. Les flèches ont été placées aux frontières du chromosome sur la première acquisition de manière à suivre les modifications de structures au cours des expositions successives.

Nous pouvons malgré tout noter la qualité de ces images qui permettent tout de même d'accéder à un niveau de résolution très fin, et de visualiser ainsi des fibres de chromatine dans une interbande. Cette information ne peut pas être obtenue avec une autre technique de microscopie dans des conditions similaires d'observation.

## 5.4.2 Échantillons fixés

La préparation a été obtenue après une fixation de 5 minutes à la glutaraldéhyde diluée dans 2 % de PBS, puis rincée dans une solution de PBS.

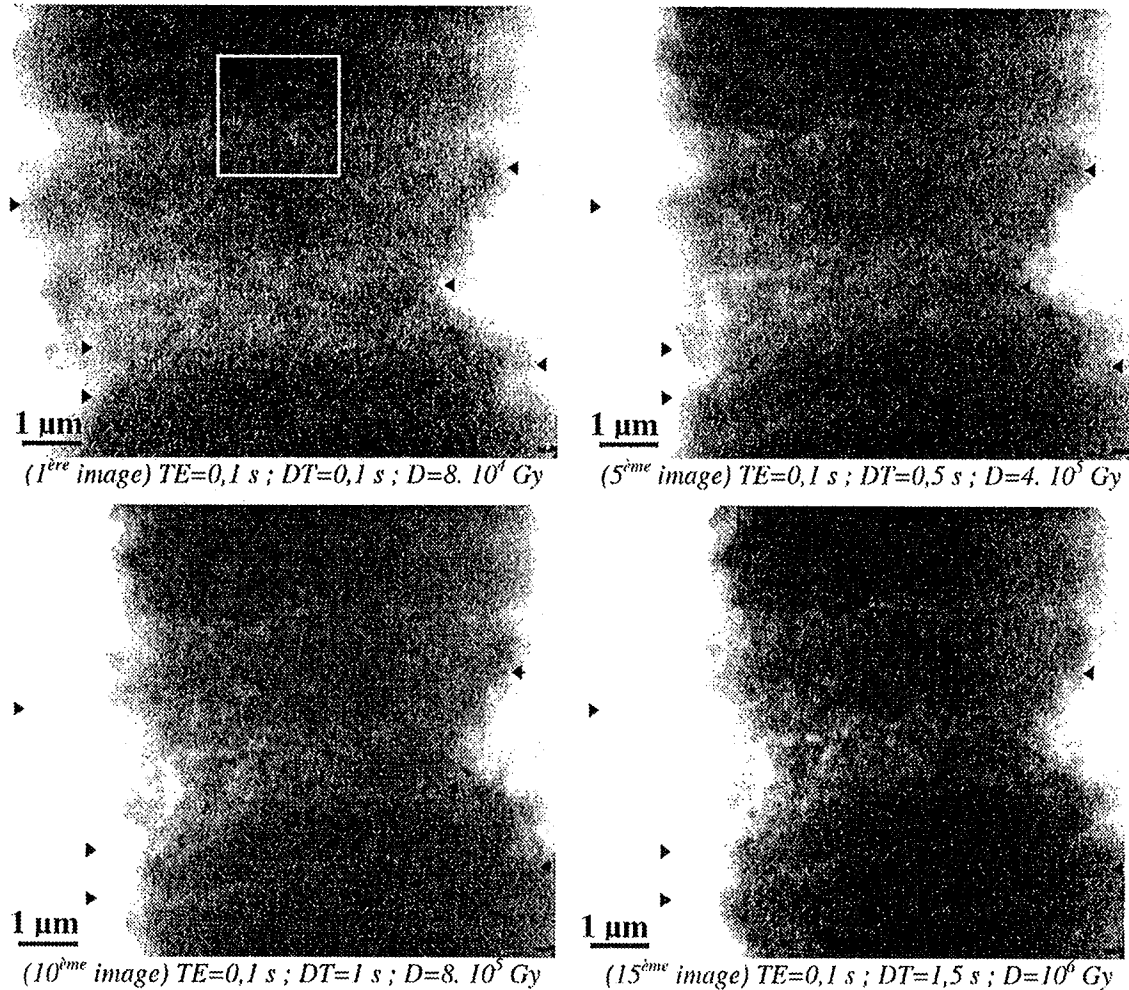


Figure 5-6. Effets des radiations sur échantillons fixés en milieux aqueux. Les flèches ont été placées aux frontières du chromosome sur la première acquisition de manière à suivre les modifications de structures au cours des expositions successives.

Même si les structures semblent plus stables que dans le cas de préparations non fixées, des changements de structures commencent à être visibles dès les premières observations. De plus, tout comme dans le cas d'échantillons non fixés, la mesure de l'absorption moyenne dans la zone marquée nous indique qu'un phénomène de perte de matériel est présent.

Par contre, les effets des radiations au cours du temps apparaissent moins prononcées que dans le cas d'échantillons non fixés. Ceci est principalement dû au processus de fixation qui a pour rôle de renforcer les liaisons chimiques intra et inter moléculaires. Il faut quand même souligner que la fixation que nous avons utilisée est relativement faible. Bien sûr, il est possible d'utiliser des fixations plus fortes, mais au risque d'induire des artefacts dès la phase de fixation. On peut d'ailleurs observer une augmentation de l'opacité des structures liée à la fixation avec le glutaraldéhyde, qui crée des liaisons croisées entre les atomes et engendre ainsi une baisse de contraste dans les images. Le type de fixation que nous avons utilisé peut être utile par exemple pour des séries d'images ou pour réaliser l'observation d'un objet plus grand que le champ d'observation du microscope. La Figure 3-11 représente le résultat d'une telle opération, appliquée sur un bras de chromosome polyténique.

### 5.4.3 Échantillons vitrifiés

Le chromosome isolé a été vitrifié dans de l'azote liquide et maintenu au froid dans les vapeurs d'azote. Nous n'avons observé aucun changement de structures au cours des acquisitions successives. La Figure 5-7 présente les résultats de l'observation d'une région chromosomique après plusieurs minutes d'irradiation. Ces images illustrent clairement une grande stabilité du matériel biologique au cours des expositions, qui se manifeste par une plus grande richesse de l'information en comparaison avec l'observation d'échantillons non vitrifiés (que ce soit avec ou sans fixation). On peut alors conclure que ce mode d'observation permet une reproductibilité des mesures, ce qui est un point fondamental en imagerie.

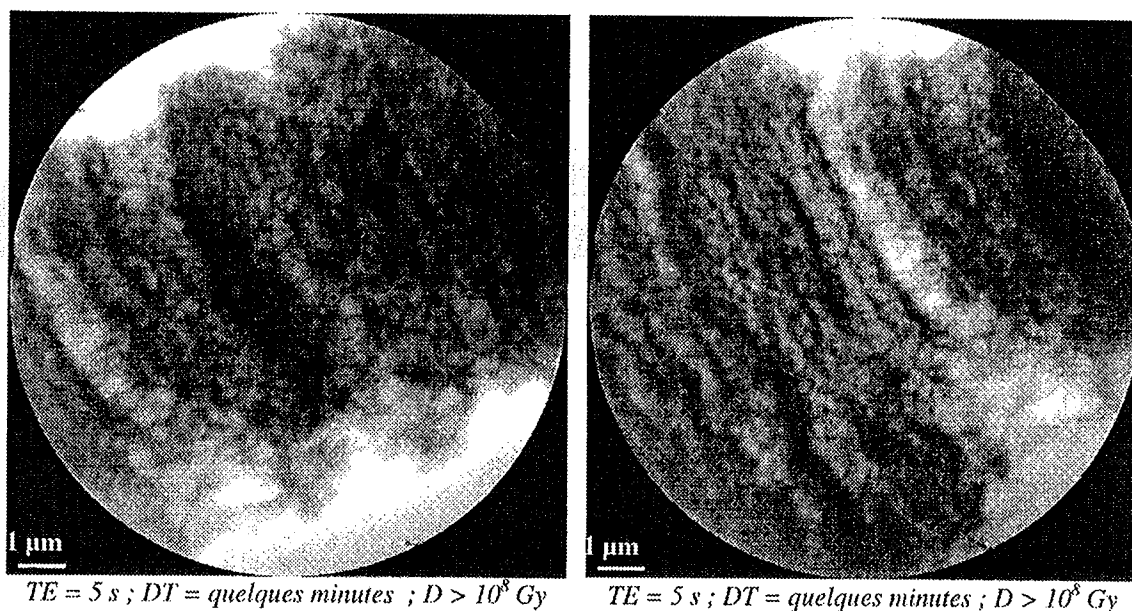


Figure 5-7. Images d'une région de chromosome polyténique vitrifié observée au TXM après plusieurs minutes d'irradiation.

La cryomicroscopie s'avère donc être un outil indispensable du point de vue des radiations pour l'observation d'objets biologiques. La limitation actuelle pour permettre l'observation en routine d'échantillons biologiques épais en solution saline est la phase de refroidissement. En effet, lorsqu'elle est trop lente, elle est à l'origine de formation de cristaux de sel à la surface, ce qui rend la préparation impossible à observer au microscope à rayons X. Il n'est malheureusement pas possible de bénéficier de la longue expérience des techniques de refroidissement utilisées en microscopie électronique. Ceci est dû au fait que dans cette technique d'observation les échantillons sont principalement bi-dimensionnels et que les temps de refroidissement restent alors suffisamment courts pour éviter ce phénomène de cristallisation. C'est donc actuellement sur ce point que les efforts se concentrent, car c'est la seule technique de préparation qui rendra possible l'observation tri-dimensionnelle d'échantillons biologiques au TXM.

## 5.5 Synthèse sur l'effet des radiations

Dans ce chapitre, nous avons dans une première partie présenté une étude de la dose minimale nécessaire à l'observation d'une structure isolée, en utilisant le critère de visibilité de Rose. Nous avons vu qu'il était crucial de prendre en compte ce processus

de formation des images dans le microscope à rayons X, et ceci notamment lors de l'observation de structures dont les dimensions avoisinent la résolution du microscope. Pour valider notre modèle, nous avons effectué une simulation pour l'observation d'un cube isolé de protéine de 30 nm de côté. Nous avons alors constaté que la dose minimale nécessaire à l'observation d'une telle structure était deux ordres de grandeurs supérieure à celle calculée par le modèle ne prenant pas en compte la fonction de transfert du microscope et l'efficacité des zones de Fresnel.

Puis, dans une seconde partie, nous avons effectué une observation directe des effets des radiations X sur une portion de chromosome géant, pour différents protocoles de préparations. A ce sujet, nous avons conclu que même si la cryomicroscopie ne permet pas actuellement l'investigation d'échantillons biologiques en routine, cette technique nous paraît fondamentale pour l'observation de structures sensibles aux radiations X. Elle apparaît également sans aucun doute comme l'unique solution pour l'observation tri-dimensionnelle d'échantillons biologiques en microscopie à rayons X. La méthode consistant à observer sans aucune fixation des échantillons biologiques très sensibles aux rayons X, tels que des chromosomes, donne de bons résultats, même si elle contraint les acquisitions à être réalisées avec de faibles temps d'exposition et engendre donc des images à faibles rapports signal sur bruit. Il faut souligner que baisser le nombre de photons se fait au détriment du rapport signal sur bruit et donc du niveau de résolution des images. Une solution intermédiaire pour l'observation de tels échantillons en limitant les dommages est la fixation plus ou moins forte des échantillons. Toutefois, il faut garder à l'esprit que ce processus peut occasionner des artefacts sur les images et qu'elle ne fait que limiter les effets de radiation, et qu'il ne nous permettra pas d'augmenter considérablement les temps d'exposition.

Le caractère bruité des images qui nous est imposé dans ces deux derniers cas de figure, nous guide naturellement vers l'utilisation de techniques numériques de traitement des images. Cette étape de traitements, qui fait l'objet du chapitre suivant, a pour rôle principal de nous permettre la meilleure exploitation possible des résultats et de faciliter la phase d'interprétation de ces résultats.



# 6. Amélioration des images et restauration

## 6.1 Introduction générale sur le traitement numérique des images

Le traitement numérique des images en général présente de multiples intérêts. Il permet de traiter les images pour en augmenter la qualité, de manière à rendre plus facile l'interprétation de l'information contenue dans celles ci pour l'observateur humain. Il offre également la possibilité à certaines machines d'analyser automatiquement des scènes, de manière à les rendre autonomes pour des tâches bien spécifiques. Un troisième secteur d'application du traitement numérique consiste à compresser des images, pour en réduire la taille, les stocker ou les transmettre à grande vitesse. Ce domaine est aujourd'hui en pleine expansion avec la télévision numérique.

Sur ces trois secteurs d'application, vient se greffer une multitude de traitements qui font du traitement d'images un domaine scientifique et technique important en pleine essor. Le nombre de ces traitements et de leurs domaines d'application sont trop importants pour en faire une description détaillée. A se sujet, on pourra se référer à [Rosenfeld 82], [Gonzales 87], [Jain 89] ou [Kunt 93].



En ce qui concerne l'imagerie microscopique, nous nous plaçons dans le premier secteur présenté, à savoir l'amélioration de la qualité des images. Il peut s'agir de traiter des images dégradées lors du processus de formation des images, ou encore de modifier une image pour que son apparence soit plus plaisante pour l'œil humain. On parle dans ce cas de restauration et de rehaussement d'images.

Dans ce chapitre, nous présenterons les travaux que nous avons réalisés sur l'amélioration des images issues de la microscopie à rayons X. Nous détaillerons dans un premier temps la méthode que nous avons développée pour la correction de la non homogénéité des images, puis nous exposerons nos travaux sur la restauration et le débruitage des images. Nous observerons la robustesse au bruit de l'algorithme de restauration itératif de Richardson-Lucy, dans l'objectif majeur de réduire au maximum la dose absorbée par les échantillons biologiques en diminuant les temps d'exposition aux radiations X. Toujours dans cet objectif, nous proposerons une technique de débruitage d'images acquises avec de courts temps d'expositions, que nous avons développée par combinaison de techniques de restauration et de filtrage dans le domaine de Fourier. Enfin, nous proposerons une méthode pour l'observation d'échantillons dont l'épaisseur est supérieure à la profondeur de champ du microscope, en reconstruisant une image à grande profondeur de champ à partir de coupes optiques de l'échantillon, et nous conclurons.

## 6.2 Les outils pour le pré-traitement des images

Tout au long de ce chapitre, nous aurons besoin d'outils pour le pré-traitement et la comparaison des images entre elles. Ces outils ont une grande importance si l'on désire pouvoir suivre l'évolution des images lors de leur modification par des traitements informatiques, pouvoir comparer les résultats entre eux ou avec une image de référence, ou encore être capable de donner une mesure quantitative du niveau de bruit dans une image. Cette première section est consacrée à la présentation des différents outils que nous serons amenés à utiliser par la suite.

## 6.2.1 Modification d'histogramme

Il s'agit de modifier une image  $i$  en lui appliquant une transformation ponctuelle d'intensité. Ainsi, à toute intensité  $i_j$  de l'image, on lui associe une intensité  $i_j' = T(i_j)$ . La transformation  $T$  est choisie croissante, de manière à conserver les contrastes relatifs entre les régions de l'image traitée [Cocquerez 95].

Du fait de leur caractère ponctuel, les méthodes de transformation d'histogramme n'affectent pas la forme des régions et modifient uniquement l'apparence visuelle de l'image. Pour l'étude de ces transformations, il est aisé de considérer chaque image  $i$  comme un ensemble de variables aléatoires  $i_j$  admettant une densité de probabilité  $f(i_j)$  et une fonction de répartition  $F(i_j)$ .  $f$  correspond alors à l'histogramme normalisé de  $i$ , et  $F$  à son histogramme normalisé cumulé.

### 6.2.1.1 Expansion de la dynamique

Ce traitement élémentaire consiste à utiliser au mieux l'échelle des niveaux de gris disponibles sur le système d'acquisition d'image.

Soient  $i_j'$  un point de l'image après expansion de la dynamique,  $[i_0, i_1]$  l'intervalle des intensités de l'image initiale et  $[i_{min}, i_{max}]$  l'intervalle des intensités disponibles. L'expansion de la dynamique correspond à la transformée linéaire  $T$ , définie par

$$i_j' = \alpha + \beta i_j \quad (6-1)$$

avec 
$$\alpha = \frac{i_{min} \cdot i_1 - i_{max} \cdot i_0}{i_1 - i_0} \text{ et } \beta = \frac{i_{max} - i_{min}}{i_1 - i_0} \quad (6-2)$$

Cette transformation ne fait pas qu'améliorer l'aspect visuel des images. Elle permet également d'éviter les erreurs d'arrondi pouvant se propager lors de traitements ultérieurs. Elle permet ainsi d'éviter de recourir à la représentation des nombres en virgule flottante, coûteuse en temps de calcul et en place mémoire.

Dans notre cas précis où le nombre de photons (et donc la dynamique) est variable, nous utiliserons cette transformation à chaque fois que nous représenterons une acquisition ou une image traitée.

### 6.2.1.2 Egalisation d'histogramme

Cette transformation consiste à rendre le plus uniforme possible l'histogramme de niveaux de gris de l'image. Cette méthode permet souvent de renforcer le contraste sur des détails de l'image qui sont masqués par des variations d'intensité de plus grande amplitude et à plus grande échelle.

Soit  $a$  l'image à traiter,  $f_a$  sa densité de probabilité non nulle sur  $]a_{min}, a_{max}[$  et  $F_a$  sa fonction de répartition.

Soit  $b$  l'image résultante de l'égalisation d'histogramme, telle que  $b = T(a)$  soit uniformément répartie sur  $[b_{min}, b_{max}]$ . Soit  $f_b$  la densité de probabilité de  $b$  et  $T'$  la fonction dérivée de  $T$ , on obtient

$$f_b = \begin{cases} f_a \frac{1}{T'(a)} = \frac{1}{b_{max} - b_{min}} & \text{pour } b_{min} < b < b_{max} \\ 0 & \text{ailleurs} \end{cases} \quad (6-3)$$

soit

$$T'(a) = (b_{max} - b_{min})f_a \quad (6-4)$$

La fonction  $T$  est alors définie par

$$T(a) = (b_{max} - b_{min})F_a + b_{min} \quad (6-5)$$

Cette fonction a pour rôle d'amplifier les faibles fluctuations dans les zones ayant une densité de probabilité élevée.

En pratique, la fonction de répartition  $F_a$  est estimée par l'histogramme cumulé normalisé de l'image  $a$ .

La figure ci-dessous représente le résultat d'une égalisation d'histogramme. Certains niveaux d'intensité sont rehaussés, permettant de visualiser certains détails auparavant camouflés par une dynamique importante.

Dans la pratique, il est impossible d'obtenir une égalisation parfaite pour des raisons de valeurs entières des niveaux de gris.

### 6.2.1.3 Spécification d'histogramme

Cette transformation consiste à rendre la distribution d'intensité de l'image traitée voisine de la distribution d'une image de référence [Gonzales 87].

Soient  $a$  l'image initiale,  $r$  l'image de référence,  $b$  l'image transformée et  $T$  la transformation d'intensité. Comme pour l'égalisation d'histogramme, ces images sont caractérisées par leur densité de probabilité  $f_a$ ,  $f_r$  et  $f_b$  et leur fonction de répartition  $F_a$ ,  $F_r$  et  $F_b$ . On suppose que  $f_r$  est non nulle sur  $]r_{min}, r_{max}[$ .

Soit  $a_j$  un pixel de l'image à spécifier et  $b_j = T(a_j)$ . On détermine  $T$  à l'aide des relations suivantes :

$$P(b \leq b_j) = P(a \leq a_j)$$

ce qui revient à  $F_b(T(a_j)) = F_a(a_j)$  pour  $a_j \in ]r_{min}, r_{max}[$

Or, on veut obtenir  $F_b = F_r$ , et puisque  $F_r$  est inversible sur  $]r_{min}, r_{max}[$ , on peut écrire

$$T = F_r^{-1} \circ F_a \quad (6-6)$$

La spécification d'histogramme revient donc à appliquer à l'image  $a$  un échange de référence  $T_l$  et à appliquer à l'image résultante  $c$ , l'inverse  $T_0^{-1}$  de la transformation d'égalisation de  $r$ . Pour les mêmes raisons que celles données pour l'égalisation d'histogramme, l'histogramme de l'image spécifiée n'est pas rigoureusement identique à celui de l'image de référence, mais les aspects visuels sont semblables.

Cette transformation est utile lorsque, par exemple, les conditions d'acquisition entre plusieurs images sont légèrement différentes (typiquement des temps d'exposition différents). La spécification d'histogramme permet alors de ramener les acquisitions dans les conditions optimales. Une autre utilisation de l'égalisation d'histogramme peut être effectuée lorsqu'après divers traitements, l'histogramme a changé d'aspect et que l'on désire par la suite comparer les images entre elles (pour voir l'évolution des algorithmes par exemple).

## 6.2.2 Estimation du niveau bruit dans les images

Dans notre application qui consiste à observer des échantillons biologiques sensibles aux rayons X et dont on veut limiter le temps d'exposition, il paraît utile de pouvoir donner une évaluation du niveau de bruit dans les images. La nature locale du bruit nous a conduit vers l'utilisation d'une méthode basée sur l'analyse locale des statistiques du type de celle développée par Chehdi [Chehdi 93]. Cette méthode consiste à mesurer les variations locales de la moyenne et de l'écart type dans les régions homogènes de l'image à analyser. La raison de ce choix est liée à la nature Poissonnienne du bruit qui engendre un niveau de bruit dépendant du signal. Par conséquent, effectuer une estimation du bruit dans une région non homogène n'a aucun sens.

Un point crucial réside en la détection des régions homogènes de l'image. Pour cela, l'idée est de considérer pour chaque pixel de l'image un voisinage  $7 \times 7$  que l'on divise en 9 régions. Le découpage utilisé est représenté sur la figure ci-dessous. Il correspond à celui du découpage de Lee avec le pixel central en plus [Lee 80].

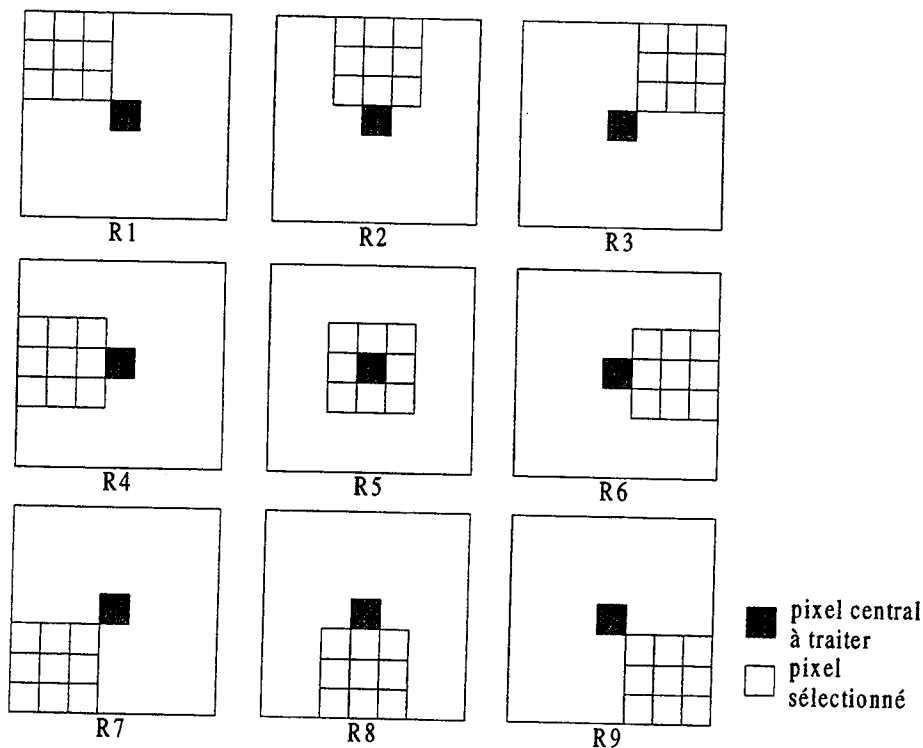


Figure 6-1. Masques pour la mesure de l'isotropie locale

Le critère d'homogénéité locale d'une image est choisi par la région  $R_i$  qui possède la variance minimale. C'est dans ces régions homogènes que seules les statistiques du bruit interviennent et que l'on pourra effectuer une mesure cohérente du niveau de bruit dans l'image. Ainsi, une région  $R_i$  est plus homogène qu'une région  $R_j$  si la variance de  $R_i$  est plus faible que celle de  $R_j$ .

Bien évidemment, ce critère n'est pas valide globalement dans le cas d'un bruit Poissonnien où la variance est directement proportionnelle à l'intensité, mais il reste un bon critère local. Il faut bien souligner que ce critère ne permettra en aucun cas de comparer deux images d'objets différents mais il permettra la comparaison du niveau de bruit d'images similaires, et c'est le point qui nous intéresse.

L'étape suivante consiste à extraire, pour chaque pixel  $f_i$  de l'image, les écarts types  $\sigma_i$  dans les régions homogènes du pixel. On obtient ainsi une carte des écarts types de l'image dans les régions homogènes. L'estimateur du niveau de bruit de l'image (NL) est alors donné par la moyenne des écarts types dans les régions homogènes, soit

$$NL = E[\sigma_i] \quad (6-7)$$

Cet estimateur permet de donner une valeur numérique du niveau de bruit dans une image, même s'il faut garder à l'esprit que dans le cas d'un bruit Poissonnien cette valeur ne peut représenter une mesure absolue du niveau de bruit dans l'image. Cet estimateur ne peut avoir de sens que dans le cas où l'on voudrait comparer deux images du même objet. Dans le cas où l'on voudrait utiliser cet estimateur afin de comparer le niveau de bruit d'images acquises dans des conditions différentes (telles que des temps d'expositions différents), il faudra bien veiller à appliquer une spécification d'histogramme auparavant.

### 6.2.3 Comparaison des images entre elles (SNR)

Très utilisé dans le domaine de la compression des images [Chen 94], [Davoine 96], le rapport signal sur bruit (SNR) est une mesure donnée en décibel (dB) permettant de comparer deux images entre elles. Dans le domaine de la compression des images, ces mesures donnent une estimation des dégradations causées par la compression des images, entre l'image compressée et l'image initiale. Cette mesure peut s'avérer être

intéressante dans notre cas pour observer l'évolution d'un traitement sur une image bruitée que l'on voudrait comparer avec une image de référence.

Soit  $i$  l'image traitée que l'on veut comparer à une image de référence  $r$ . Le SNR en dB de l'image  $i$  est donné par la relation

$$\text{SNR}_{\text{dB}} = 10 \log_{10} \frac{\sum_{m,n} (r_{m,n})^2}{\sum_{m,n} (r_{m,n} - i_{m,n})^2} \quad (6-8)$$

Cette mesure permet de comparer point par point l'image traitée à l'image de référence. Dans le cas de notre étude, il s'agira principalement de comparer des images avec des temps d'exposition différents et possédant des dynamiques différentes. Par conséquent, une phase au préalable d'égalisation d'histogramme sera nécessaire de manière à ce que des intensités d'images en chaque point soient comparables.

## 6.2.4 Séparation d'un noyau de convolution Gaussien

Utiliser un noyau de convolution Gaussien pour modéliser la réponse impulsionnelle d'un système à des fins de déconvolution, peut être un choix judicieux d'un point de vue vitesse de calculs. En effet, une fonction bi-dimensionnelle Gaussienne bénéficie de la propriété de l'exponentielle d'être séparable. Cette propriété s'écrit tout simplement

$$h_2(x, y) = e^{-\frac{x^2+y^2}{\sigma^2}} = e^{-\frac{x^2}{\sigma^2}} \cdot e^{-\frac{y^2}{\sigma^2}} = h_1(x) \cdot h_1(y) \quad (6-9)$$

D'un point de vue matriciel, il devient donc possible dans un premier temps de séparer la matrice Gaussienne bi-dimensionnelle  $h$  par un produit de deux matrices mono-dimensionnelles  $h_x$  et  $h_y$ , comme c'est illustré sur la Figure 6-2.

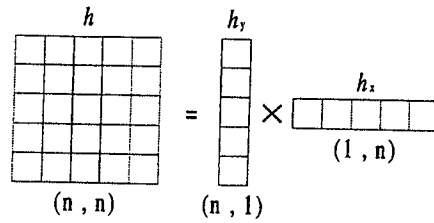


Figure 6-2. Séparation d'un noyau de convolution Gaussien  $h$  2D en 2 noyaux de convolution 1D,  $h_x$  et  $h_y$ .

La fonction  $h_2(x,y)$  peut également être développée comme le produit de convolution suivant

$$h_2(x,y) = (h_{1x} \otimes h_{1y})(x,y) \tag{6-10}$$

où  $\otimes$  dénote la convolution 2D, et où les deux noyaux de convolution  $h_{1x}$  et  $h_{1y}$  sont définis par

$$\begin{aligned} h_{1x} &= h_1(x)\delta(y) \\ h_{1y} &= h_1(y)\delta(x) \end{aligned}$$

$\delta$  étant la fonction de Dirac. Les deux noyaux de convolution  $h_{1x}$  et  $h_{1y}$  n'ont bien de support que sur l'axe  $x$  et l'axe  $y$  respectivement.

Ainsi, le développement de l'équation de convolution (6-10) donne

$$\begin{aligned} h_2(x,y) &= \iint h_1(\alpha)\delta(\beta).h_1(y-\beta)\delta(x-\alpha)d\alpha d\beta \\ &= h_1(x).h_1(y) \end{aligned} \tag{6-11}$$

Le produit de convolution n'est, dans ce cas particulier, rien d'autre qu'une multiplication.

La convolution étant associative, la convolution bi-dimensionnelle d'une image de taille  $(M \times N)$  par un noyau de convolution Gaussien 2D de taille  $(n \times n)$  équivaut donc à une double convolution de l'image par les deux matrices correspondant aux noyaux de convolution Gaussien 1D de dimensions  $(n \times 1)$  et  $(1 \times n)$ . Cette opération équivalente de convolution nécessitera  $2nMN$  opérations, au lieu de  $n^2MN$  opérations sans séparation du noyau de convolution (voir Figure 6-3).



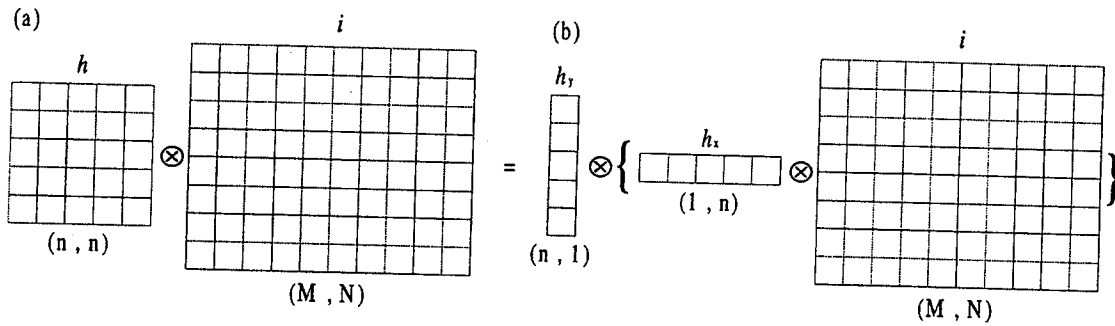


Figure 6-3. Principe de convolution d'une matrice image  $i$  par une matrice Gaussienne séparable  $h$ .

Cette propriété de la Gaussienne n'est pas à négliger, surtout lorsque les opérations de convolution sont appliquées avec des noyaux de grandes dimensions. Par exemple, une opération de convolution effectuée avec un noyau de convolution  $(20 \times 20)$ , nécessitera 10 fois moins d'opérations dans le cas séparable que dans le cas non séparable. Pour citer un autre exemple, l'algorithme de restauration itératif de Richardson-Lucy, que nous utiliserons dans le cadre de la restauration d'image, requière deux opérations de convolution par itération (voir section 6.4.2), et nécessite, dans notre cas, une vingtaine d'itération pour obtenir une bonne convergence. Ce point ne doit donc pas être négligé, et doit nous pousser à utiliser dès que possible l'approximation Gaussienne de la PSF lors de la phase de restauration.

## 6.3 Correction de la non homogénéité du fond

Présente dans la plupart des techniques de microscopie nécessitant une source de lumière et un condenseur, la non homogénéité du fond dans les acquisitions est une source de dégradations importante qu'il ne faut pas négliger. Elle est engendrée par l'image de la source dans le plan objet à travers le condenseur. Cette non homogénéité de source implique que le champ d'observation dans le plan objet n'est pas éclairé de manière uniforme. Ainsi, l'image de l'objet par l'objectif est pondérée par l'image de la source ce qui donne lieu à des acquisitions non homogènes. En plus de dégrader la qualité visuelle des images, ce phénomène rend impossible toute phase ultérieure qui consisterait à effectuer des mesures quantitatives sur les acquisitions. La figure ci-

dessous représente une image du fond lorsqu'il n'y a pas d'objet. Cette image est également appelée champ plat.

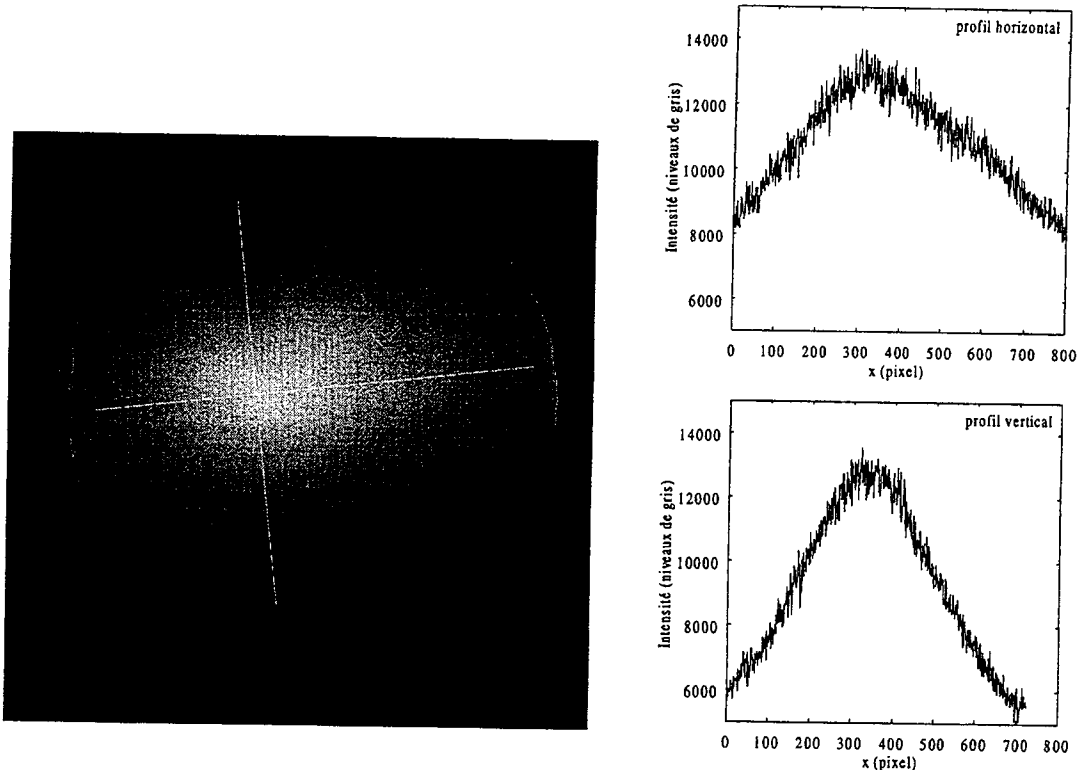
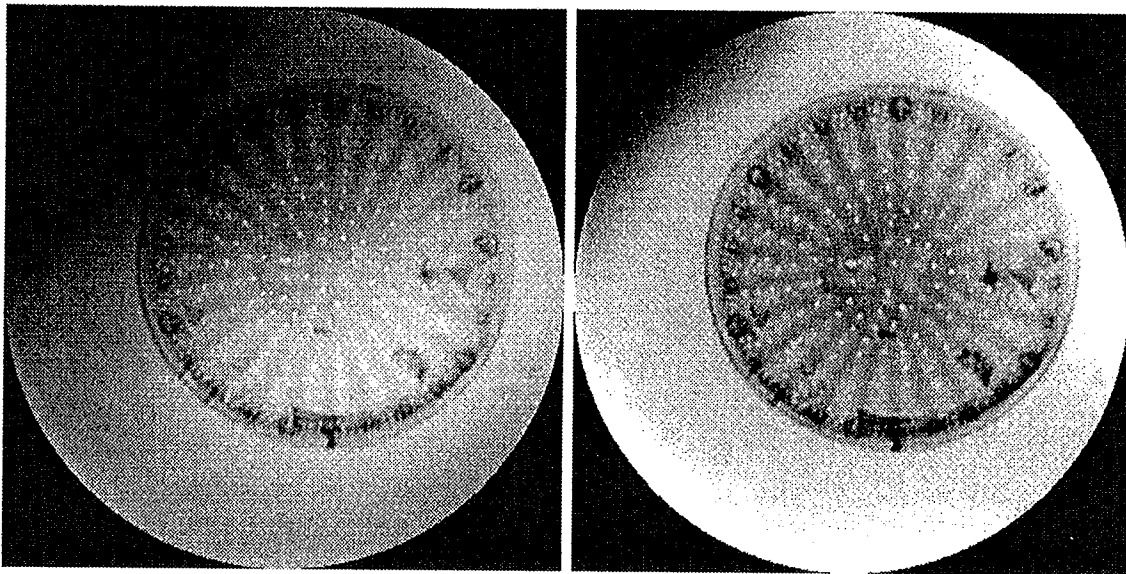


Figure 6-4. Image d'un champ plat et les profils d'intensité associés.

Dans cette partie nous présentons trois méthodes pour corriger ce phénomène. Une première solution physique consiste à modifier la configuration du microscope au niveau du condenseur. Les deux autres méthodes présentées sont des méthodes numériques, dont l'objectif est de corriger l'image une fois la phase d'acquisition terminée. Ainsi, la seconde méthode présentée utilise l'image d'un champ plat enregistrée au préalable pour corriger ce problème. Enfin, nous proposerons une solution interactive qui consiste à placer des points de contrôle sur l'image et à interpoler le fond de l'image par une fonction adéquate. Pour chacune de ces trois méthodes présentées, nous exposerons les avantages et les inconvénients.

### 6.3.1 Correction par balayage du condenseur

Cette solution pour corriger le fond non homogène consiste à mettre en mouvement le condenseur dans un plan pendant l'acquisition, de manière à répartir l'image de la source dans le plan objet et ainsi obtenir une illumination homogène de l'échantillon (voir chapitre 3 pour plus de détails à ce sujet). La Figure 6-5 montre le résultat de la correction du fond par balayage du condenseur sur une image de diatomées.



*Figure 6-5. Résultat de la correction du fond par balayage du condenseur.*

Cette solution est la plus simple à mettre en œuvre car elle ne nécessite aucun traitement ultérieur des images. Mais, il subsiste tout de même une limitation majeure à cette solution. En effet, pour que l'image acquise soit homogène, ce qui est le but de cette opération, il est nécessaire que le temps d'intégration soit assez long pour que les effets du balayage du condenseur soient pris en compte. Ainsi, dans la pratique, il est nécessaire d'exposer l'échantillon plusieurs secondes afin d'obtenir des images d'une bonne homogénéité. Ces temps d'exposition restent toutefois trop longs si l'on veut observer des structures sensibles aux rayons X, et limiter la dose absorbée par l'échantillon en baissant les temps d'exposition. Dans ce cas précis, l'utilisation de cette technique pour homogénéiser le fond de l'image reste impossible, à moins d'augmenter considérablement la vitesse de balayage du condenseur, et permettre des temps d'acquisition inférieurs à la seconde.

Les deux parties suivantes présentent deux solutions numériques post-acquisition pour corriger l'effet de non homogénéité des images.

### 6.3.2 Correction par l'image d'un champ plat

Cette méthode consiste à effectuer, avec chaque série d'images, une image d'un champ plat, c'est à dire l'image d'une région ne possédant aucun objet. Il suffit ensuite de diviser les acquisitions par cette image et à ramener la dynamique de l'image à la dynamique initiale pour corriger les acquisitions. L'intérêt de cette technique est qu'elle est relativement simple à mettre en œuvre. Malheureusement, elle possède quelques inconvénients majeurs. Le premier est le bruit ; en effet, les acquisitions restent bruitées, et la correction d'images par une image bruitée peut engendrer des erreurs non négligeables. Une solution consiste à prendre plusieurs acquisitions du fond de manière à réduire le niveau de bruit, mais ça devient lourd et fastidieux et donc peu intéressant. Un second problème réside en la difficulté de trouver une région de la préparation sans objet. En effet, il n'est pas évident de trouver une telle région dans la préparation, d'autant plus qu'il est absolument nécessaire qu'il n'y ait aucun objet sur le champ ou la correction est faussée. De plus, la solution qui consisterait à enlever l'objet du support et à prendre une image n'est pas possible car elle nécessite de baisser le bras du condenseur, et suffit pour changer l'alignement du condenseur et donc le champ plat. Enfin, le dernier inconvénient est le stockage des images. En effet, si à chaque série d'acquisition il est nécessaire d'effectuer plusieurs acquisitions de champs plats, à plus de 2 méga-octets l'image, il se pose le problème de l'archivage des données.

Dans la partie suivante, nous proposons une méthode numérique souple et efficace pour pallier ce problème de non homogénéité des images.

### 6.3.3 Correction par interpolation

Cette méthode est une technique interactive qui consiste à interpoler le fond non homogène des images par une fonction en forme de cloche, à partir de points préalablement ajustés par l'utilisateur. Une fois l'équation du fond déterminée, il suffit de diviser l'image à corriger par l'image du fond interpolé.

La fonction que nous avons choisie pour l'interpolation est une fonction à 6 paramètres, de la forme

$$Z(x, y) = \exp(Pol(x, y)) \quad (6-12)$$

où  $Pol(x, y)$  est une fonction polynomiale du 2<sup>nd</sup> degré, de la forme

$$Pol(x, y) = \sum_{l=0}^2 \sum_{m=0}^{2-l} k_{lm} x^l y^m \quad (6-13)$$

Les  $k_{lm}$  représentent les 6 paramètres de la fonction à déterminer. L'intérêt de cette fonction est qu'elle possède une forme relativement bien adaptée à notre problème, et qu'elle assure également la positivité des résultats.

L'idée est donc de répartir  $N$  points de contrôle sur l'image à corriger, de manière à ce qu'ils soient placés sur des points du fond non homogène. Puis écrire que chaque point, caractérisé par son intensité  $z_i$  et ses coordonnées dans l'image  $(x_i, y_i)$ , vérifie les équations (6-12) et (6-13). Pour pallier aux problèmes du bruit, on attribue à la valeur de chaque point de contrôle la moyenne des valeurs dans un voisinage  $V$  de taille  $T_V$ , soit

$$Z_i = \frac{1}{T_V} \sum_V z_k \quad (6-14)$$

On obtient ainsi un système de  $N$  équations à 6 inconnues qui va nous permettre de déterminer l'équation de la surface modélisant le fond de l'image. Le système à résoudre est le suivant

$$Z_i(x_i, y_i) = \exp\left(\sum_{l=0}^2 \sum_{m=0}^{2-l} k_{lm} x_i^l y_i^m\right), \quad 1 \leq i \leq N \quad (6-15)$$

On remarquera que pour que ce système ait une solution, il est nécessaire d'avoir  $N \geq 6$ . Dans la pratique, cette condition est facile à vérifier, et on est même dans le cas où l'on a plus d'équations que d'inconnues. Les incertitudes des mesures liées aux acquisitions et au modèle impliquent qu'il n'y a pas unicité de la solution. Par conséquent, une façon de procéder pour résoudre ce système est de minimiser l'erreur au sens des moindres carrés.

Pour simplifier le problème, en prenant dans un premier temps le logarithme de l'équation (6-15), le système à résoudre devient

$$L_i(x_i, y_i) = \sum_{l=0}^2 \sum_{m=0}^{2-l} k_{lm} x_i^l y_i^m, \quad 1 \leq i \leq N \quad (6-16)$$

avec  $L_i(x_i, y_i) = \log(Z_i(x_i, y_i))$ . Ecrivons maintenant l'équation (6-16) sous forme matricielle, en posant

$$[L] = \begin{bmatrix} L_1 \\ L_2 \\ \vdots \\ L_n \end{bmatrix}, [XY] = \begin{bmatrix} 1 & y_1 & y_1^2 & x_1 & x_1 y_1 & x_1^2 \\ 1 & y_2 & y_2^2 & x_2 & x_2 y_2 & x_2^2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & y_n & y_n^2 & x_n & x_n y_n & x_n^2 \end{bmatrix} \text{ et } [K] = \begin{bmatrix} k_{00} \\ k_{01} \\ k_{02} \\ k_{10} \\ k_{11} \\ k_{20} \end{bmatrix} \quad (6-17)$$

Le système d'équation à résoudre s'écrit donc sous la forme

$$[L] = [XY][K] \quad (6-18)$$

$(N,1)$      $(N,6)$   $(6,1)$

En multipliant les deux membres de l'équation (6-18) par le transposé de  $[XY]$ , on obtient

$$[XY]^T [L] = [XY]^T [XY][K] \quad (6-19)$$

$(6,N)$   $(N,1)$      $(6,N)$   $(N,6)$   $(6,1)$

Le système (6-19) donne une solution de  $[K]$  pour  $\| [XY][K] - [L] \|^2$  minimum. Ce système admet toujours au moins une solution. De plus, si la matrice  $[XY]^T [XY]$  est régulière, c'est à dire si  $\text{rang}([XY]) = N$ , la solution est unique.

En posant  $[V] = [XY]^T[XY]$ , on a

$$\begin{matrix} [XY]^T [L] = [V][K] \\ \begin{matrix} (6,N) & (N,1) & & \end{matrix} & \begin{matrix} (6,6) & (6,1) \end{matrix} \end{matrix} \quad (6-20)$$

$[V]$  étant une matrice symétrique, elle est donc inversible, et par conséquent

$$\begin{matrix} [K] = [V]^{-1} [XY]^T [L] \\ \begin{matrix} (6,1) & (6,6) & (6,N) & (N,1) \end{matrix} \end{matrix} \quad (6-21)$$

Cette équation donne la solution des  $k_{i,m}$  au sens des moindres carrés. La Figure 6-6 montre le résultat de la correction en utilisant cette résolution matricielle. Les matrices  $[XY]$  et  $[L]$  sont déterminées à partir de la grille de contrôle placée sur l'image initiale.

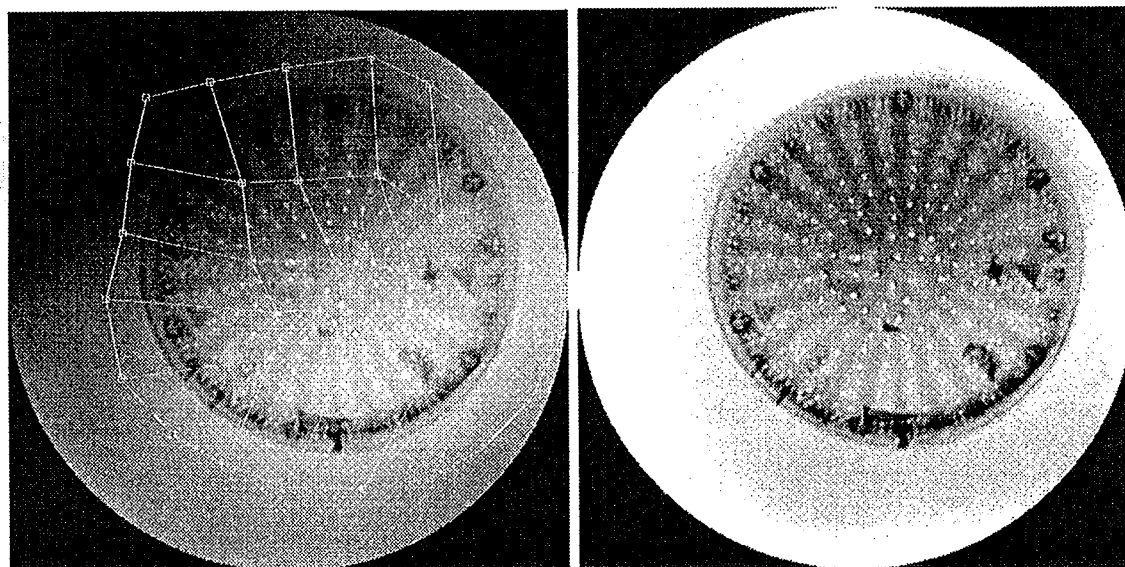


Figure 6-6. Résultat de la correction du fond par interpolation

Dans le cas où l'image à traiter ne contient que peu de surface constituant le fond, il reste toujours possible d'effectuer une interpolation du fond sur une image d'un champ plat. Le gros avantage par rapport au cas où l'on effectue une correction directement à partir de l'acquisition du champ plat est qu'il n'est pas crucial pour cette étape que ce champ plat soit parfait. En effet, il peut subsister quelques impuretés sur l'acquisition sans pour autant gêner l'interpolation, il suffira alors de disposer les points correctement. La Figure 6-7 montre le résultat d'interpolation appliqué sur un champ plat représenté à l'aide des profils d'intensité suivant deux directions principales du fond.

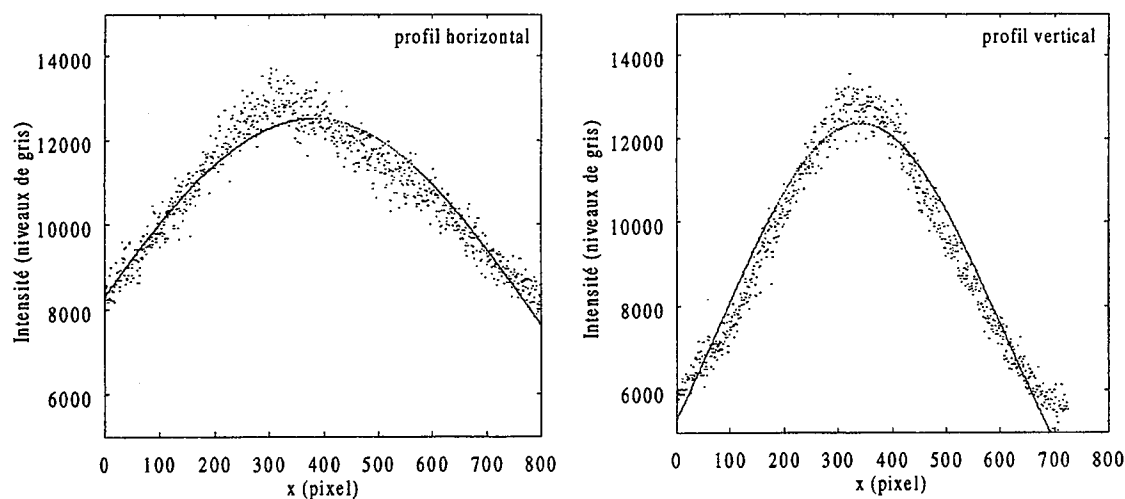


Figure 6-7. Profils d'intensité du fond et de la solution de l'interpolation

La solution présentée a l'avantage d'être robuste au bruit et d'offrir de bons résultats tout en restant très stable. De plus, elle a l'avantage d'être très rapide, même s'il subsiste une intervention de l'utilisateur. Enfin, et alors que l'on parle de plus en plus de compression, on peut très bien imaginer de n'associer à une image (ou à une série d'images) que les 6 coefficients nécessaires à la détermination du fond (soit 24 octets), et ceci au lieu de l'image intégrale du champ plat (qui correspond à plus de 2 méga-octets !).

## 6.4 Amélioration du contraste par restauration

Dans cette partie, nous utiliserons la restauration d'images afin d'augmenter la résolution et le contraste des acquisitions issues du TXM de Göttingen à BESSY. Pour des raisons d'efficacité, cette phase nécessite la meilleure connaissance a priori du système optique, ce qui a fait l'objet du chapitre 4. Nous décrivons l'algorithme de restauration que nous avons choisi ainsi que les raisons de notre choix. Enfin, nous observerons les effets du niveau de bruit dans les images sur les résultats de la restauration, et proposerons une approche pour le débruitage des images.



## 6.4.1 Généralités sur la restauration d'images

La restauration d'images est un processus à prendre en compte lorsqu'une acquisition est effectuée en présence d'une ou plusieurs sources de dégradations, et où l'image ainsi enregistrée représente une version dégradée de l'objet. Il existe beaucoup de sources de dégradations, dont les trois principales sources sont le flou, la non-linéarité et le bruit. Le flou est une forme de limitation des fréquences dans une certaine région du spectre. Il peut être causé par le mouvement relatif entre la caméra et l'objet pendant l'acquisition, mais aussi par le système optique lui-même. Ce dernier point nous concerne directement, car nous avons vu dans le chapitre 4 qu'il était présent dans tout système optique limité par la diffraction. D'autres sources de flou peuvent également entrer en jeu comme c'est le cas par exemple de l'imagerie aérienne où les turbulences atmosphériques et le mouvement relatif entre le capteur et la terre sont à l'origine d'une image flou.

La seconde principale source de dégradations est la non-linéarité introduite par une réponse non linéaire du capteur aux différentes excitations. Un exemple de non-linéarité est la sensibilité des films photographiques qui varie approximativement de manière logarithmique avec la lumière incidente entre le noir et le blanc. Dans notre cas où le détecteur utilisé est une caméra CCD qui a la particularité d'être linéaire sur toute la dynamique [Wilhein 94], nous n'avons pas à prendre en compte ce problème.

Enfin, la dernière source majeure de dégradations est le bruit présent dans les acquisitions. Dans notre cas d'imagerie avec des photons, la principale origine du bruit provient de la nature statistique de la formation des images. Les autres sources de bruit tels que le bruit de détecteur peuvent être négligées devant le bruit de photons.

Le processus de restauration consiste à prendre en compte toutes les sources de dégradations de l'image afin de restituer au mieux l'image de l'objet à travers le système d'acquisition.

La restauration d'images nécessite une première phase de modélisation du processus de formation des images du système étudié, de manière à extraire une relation générale entre l'objet à observer et son image dans le capteur.

Soit  $f(x,y)$  l'objet à observer et  $g(x,y)$  l'image dégradée de cet objet à travers le système optique. Nous avons vu dans le chapitre 4 sur la formation des images, que dans le cas d'un système linéaire, invariant par translation et soumis à un éclairage incohérent, l'équation reliant l'objet  $f$  à son image à travers le système optique  $g$  était une équation de convolution de la forme

$$g(x,y) = \iint_{-\infty}^{\infty} h(x-x', y-y') f(x', y') dx' dy' + n(x,y) \quad (6-22)$$

où  $h(x,y)$  caractérise la réponse impulsionnelle du système (PSF), et  $n(x,y)$  représente un bruit additif. Le schéma-bloc de ce modèle est représenté sur la Figure 6-8.

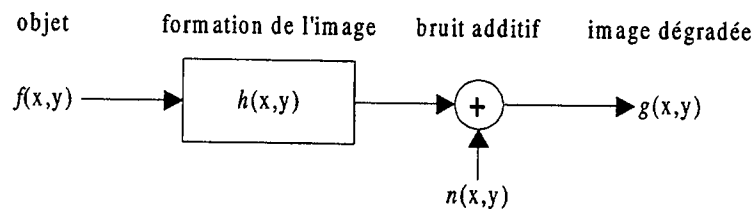


Figure 6-8. Schéma-bloc modélisant le processus de dégradations d'images.

Etant en possession d'une image numérique obtenue par échantillonnage de l'image dégradée continue (voir section 4.1.2 sur le principe d'échantillonnage), il est adéquat d'écrire l'équation de convolution (6-22) sous sa forme discrète, soit

$$g_m = \sum_k h_{m-k} f_k + n_m \quad (6-23)$$

Cet échantillonnage, s'il vérifie le théorème de Shannon-Whittaker (voir section 4.1.2), n'induit aucune dégradation, et le passage à la forme continue exacte est possible moyennant une interpolation.

Le problème général de restauration d'images est le suivant : étant donné l'image dégradée et des éventuelles connaissances a priori du modèle de dégradations, comment obtenir l'image idéale de l'objet observé, ou du moins comment obtenir une solution la plus exacte possible de cet objet ?

Les travaux à ce sujet sont nombreux. Plus particulièrement, la classe d'algorithmes de restauration basée sur un processus itératif a connu un plein essor durant les années 80 [Schafer 81], [Meinel 86], [Mammone 87], [Biemond 90]. Ces algorithmes itératifs recouvrent une large classe de problèmes, où les connaissances a priori du modèle de dégradations sont plus ou moins connues. Parmi ces algorithmes itératifs, nous avons retenu l'algorithme de Richardson-Lucy. La partie suivante est consacrée à la présentation de cet algorithme de restauration, et des raisons de notre choix.

## 6.4.2 L'algorithme de Richardson-Lucy

Dans le processus de formation des images en microscopie à rayons X, les fluctuations statistiques concernant le nombre de photons atteignant le détecteur sont gouvernées par une distribution de Poisson. Par conséquent, la probabilité  $P(x|\mu)$  qu'un nombre  $x$  de photons atteignent le détecteur pendant un intervalle de temps donné, est décrite par la relation

$$P(x|\mu) = \frac{e^{-\mu} \mu^x}{x!} \quad (6-24)$$

où  $\mu$  est la valeur moyenne et également le paramètre de la distribution. Une propriété de cette loi de distribution est qu'il existe une relation simple entre la moyenne  $\mu$  et la variance  $\sigma^2$ , donnée par

$$\mu = \sigma^2 \quad (6-25)$$

Par conséquent, soit  $N$  un nombre de photons atteignant le détecteur dans un pixel. Ce nombre de photons donne lieu à un signal d'intensité  $I = QE.N$ , où  $QE$  est l'efficacité quantique du détecteur. L'écart type du signal  $\sigma = \sqrt{N}$  est alors proportionnel à  $\sqrt{I}$ . Le bruit de Poisson est clairement dépendant du signal.

Or, nous avons vu dans le chapitre 5 sur les effets des radiations sur le matériel biologique que l'observation de certains échantillons biologiques nécessitait une faible dose afin de réduire au maximum les dommages créés par les radiations. Cette

contrainte sur le nombre de photons est à l'origine d'acquisitions bruitées. Ce caractère bruité des images à traiter nous a orienté vers l'utilisation d'un algorithme prenant en compte le bruit des images. C'est une des raisons qui nous a guidé vers l'utilisation de l'algorithme de Richardson-Lucy [Richardson 72]. C'est un algorithme de restauration itératif, basé sur la minimisation du bruit de Poisson [Meinel 86].

Cet algorithme propose une solution à l'équation classique discrète de la formation des images donnée par l'équation (6-23), que l'on peut noter sous la forme

$$i_m = \sum_k h_{m-k} o_k + n_m = a_m + n_m \quad (6-26)$$

où  $o$  représentent l'objet à observer,  $i$  l'image de l'objet dans le détecteur,  $h$  la réponse impulsionnelle du système optique et  $n$  le bruit.  $a$  est l'image de  $o$  sans bruit, obtenue par convolution entre l'objet et la PSF, soit

$$a_m = \sum_k h_{m-k} o_k \quad (6-27)$$

En considérant chaque pixel de l'image comme une réalisation statistique indépendante, suivant la loi de distribution de Poisson (équation 6-24), la probabilité d'obtenir le pixel de l'image  $i_m$  autour de sa valeur moyenne  $a_m$  est donnée par

$$P(i_m | a_m) = \frac{a_m^{i_m} e^{-a_m}}{i_m!} \quad (6-28)$$

Chacune des réalisations étant indépendante, la probabilité  $P(ila)$  d'obtenir l'image  $i$ , appelée la vraisemblance du bruit, est égale au produit de chaque probabilité individuelle, soit

$$P(ila) = \prod_m \left[ \frac{a_m^{i_m} e^{-a_m}}{i_m!} \right] \quad (6-29)$$

L'étape suivante consiste à maximiser cette probabilité, ce qui équivaut à minimiser le bruit des images. En prenant le logarithme de l'équation (6-29), on obtient

$$\ln[P(ila)] = \sum_m [i_m \ln a_m - a_m - \ln(i_m!)] \quad (6-30)$$

La solution du maximum de vraisemblance en chaque point est obtenue en mettant à zéro la dérivée de  $\ln[P(i|a)]$  par rapport à la variable  $o_k$  pour  $i$  fixé, soit

$$\frac{\partial}{\partial o_k}(\ln[P(i|a)]) = \sum_m h_{m-k} \frac{i_m}{a_m} - 1 = 0 \quad (6-31)$$

Cette équation est à l'origine de nombreux algorithmes de restauration récursifs. Parmi ces algorithmes, celui de Richardson-Lucy est obtenu en ajoutant 1 de chaque côté de l'équation puis en multipliant chaque membre par  $o_m$ , d'où

$$o_m^{j+1} = o_m^j \sum_k h_{m-k} \frac{i_k}{\sum_l h_{k-l} o_l^j} \quad (6-32)$$

Cet algorithme itératif nous donne le nouvel estimé  $o^{j+1}$  en fonction du précédent  $o^j$ , de l'image  $i$  et de la PSF  $h$  du système optique. L'initialisation de la valeur du premier estimé est

$$o^0 = i \quad (6-33)$$

L'intérêt de cet algorithme est qu'il ne nécessite aucune connaissance du bruit. Cette propriété est tout simplement liée à la loi de Poisson (équations 6-24 et 6-25) qui permet de relier le paramètre de la distribution à l'intensité de chaque pixel. Ainsi, chaque estimé est déterminé moyennant une double convolution.

Le problème de cette classe d'algorithmes itératifs, est qu'ils ne possèdent pas de critère d'arrêt. C'est à l'utilisateur de déterminer à quelle itération il juge bon de stopper l'algorithme. Dans notre cas particulier, nous avons décidé de nous baser sur un compromis visuel, tout en nous appuyant sur une mesure du degré de convergence de l'algorithme. Pour évaluer cette mesure, nous avons utilisé deux paramètres  $\alpha^j$  et  $\phi^j$ , déterminés par

$$\alpha^j = \frac{1}{T} \sum_m (o_m^j - o_m^{j-1})^2 \quad (6-34)$$

et

$$\phi^j = \frac{1}{T} \sum_m (i_m - h \otimes o_m^j)^2 \quad (6-35)$$

où  $T$  représente le nombre de pixels de l'image traitée. Le paramètre  $\alpha^j$  donne une mesure de l'erreur quadratique moyenne entre le nouvel estimé et l'estimé précédent.  $\phi^j$  donne une mesure de l'erreur quadratique moyenne entre l'image acquise et le nouvel estimé floué par la PSF.

Afin de tester les performances de l'algorithme de restauration de Richardson-Lucy sur nos acquisitions, nous avons utilisé des images d'objets tests. Ces objets tests, habituellement observés pour tester la résolution du microscope, ont des structures internes de 24,7 nm.

Dans la suite de ce chapitre sur la restauration d'images issues de la microscopie à rayons X, nous allons étudier l'influence sur les résultats du niveau de bruit dans les images, ainsi que du choix de la PSF. Ces deux paramètres sont fondamentaux pour notre étude sur la restauration d'images d'échantillons plus ou moins sensibles aux radiations X, et dont les calculs sont basés sur une détermination expérimentale de la fonction de transfert du microscope.

#### 6.4.2.1 Effets du niveau de bruit des images sur les résultats

Dans le cadre de notre étude qui consiste à traiter des images d'échantillons plus ou moins sensibles aux rayons X, nous sommes amenés à acquérir des images présentant des niveaux de bruit variables. En effet, dans un souci de réduction de la dose absorbée par les échantillons en limitant le temps d'exposition aux rayons X, les images acquises présentent des niveaux de bruit variable et ceci en fonction du degré de sensibilité des échantillons aux rayons X. Il est par conséquent crucial d'observer le comportement de l'algorithme de restauration de Richardson-Lucy en fonction du niveau de bruit dans les images à traiter. Pour cette étape, nous avons utilisé comme fonction de flou dans l'algorithme de restauration la PSF expérimentale déterminée dans le chapitre 3 sur la formation des images. Les raisons de ce choix sont argumentées dans la section suivante concernant l'évolution des résultats en fonction du choix de la PSF.

La Figure 6-9 représente l'évolution des paramètres  $\alpha$  et  $\phi$  au cours des itérations dans le cas d'images d'objets tests acquises avec un niveau de bruit différent.

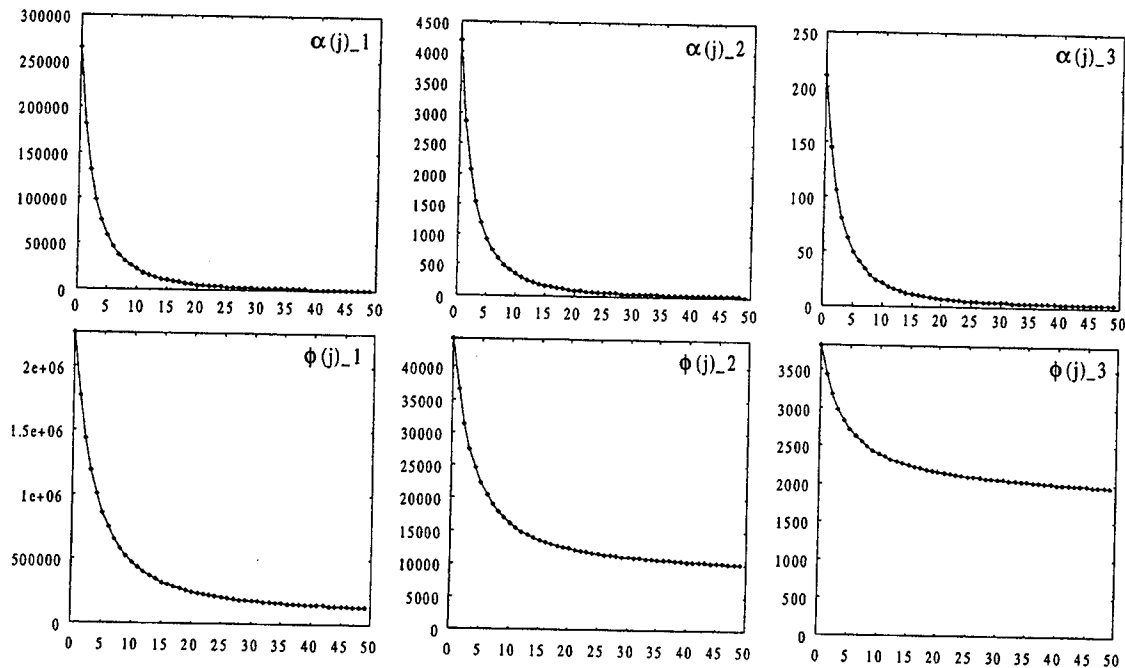
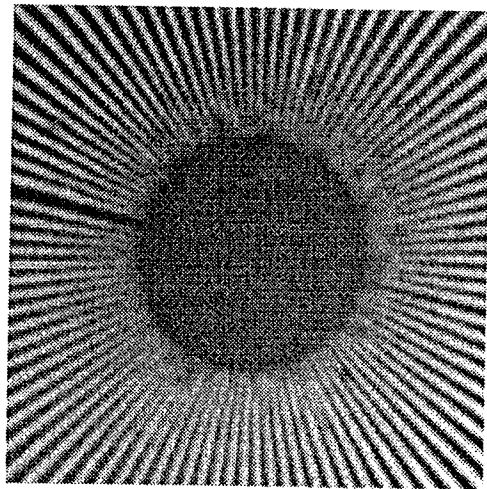


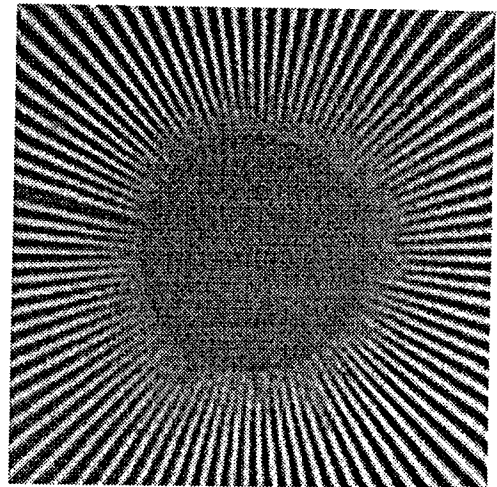
Figure 6-9. Evolution des paramètres  $\alpha$  et  $\phi$  au cours des 50 premières itérations de l'algorithme de Richardson-Lucy appliqué sur les images (a-1), (a-2) et (a-3) de la Figure 6-10 avec utilisation de la PSF expérimentale comme noyau de déconvolution.

L'observation des paramètres  $\alpha$  et  $\phi$  au cours des itérations représentés sur la Figure 6-10, ainsi que l'évolution visuelle des résultats au cours des itérations, nous ont guidé vers un choix de 20 itérations pour la phase de restauration, et ceci quelque soit le niveau de bruit des images initiales.

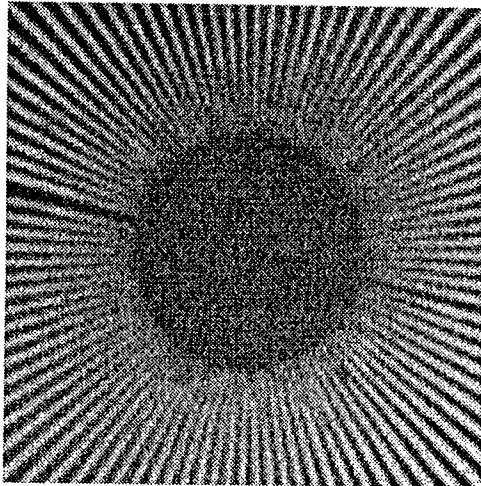
La Figure 6-10 illustre trois résultats de restauration appliqués sur des images de grilles tests obtenues avec des temps d'exposition différents. Ces acquisitions ont été obtenues avec la micro-zone de Fresnel MZP29 avec un grandissement de 1786. Les calculs ont été effectués en utilisant comme noyau de convolution les résultats de la détermination expérimentale de la PSF du microscope (voir section 4.3).



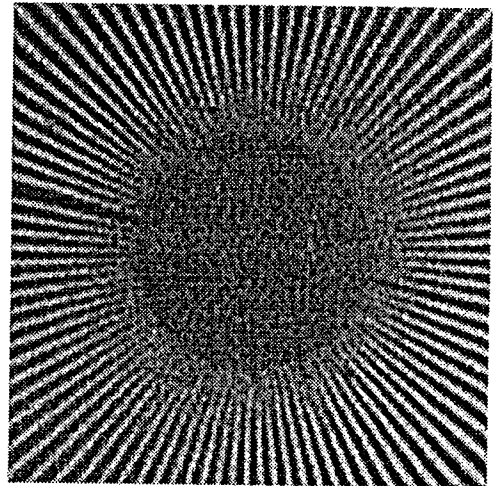
(a-1) Image initiale, T.E. = 4 sec.



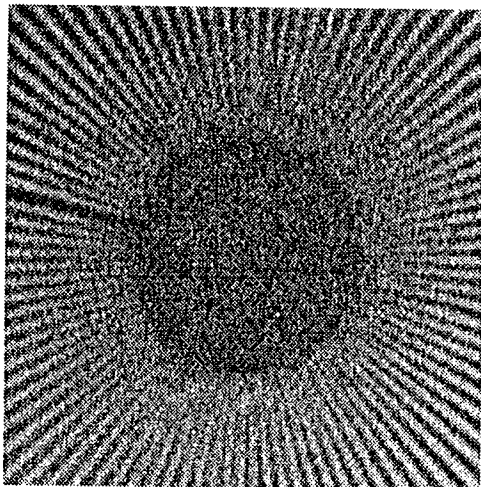
(a-2) Résultat de la restauration sur (a-1)



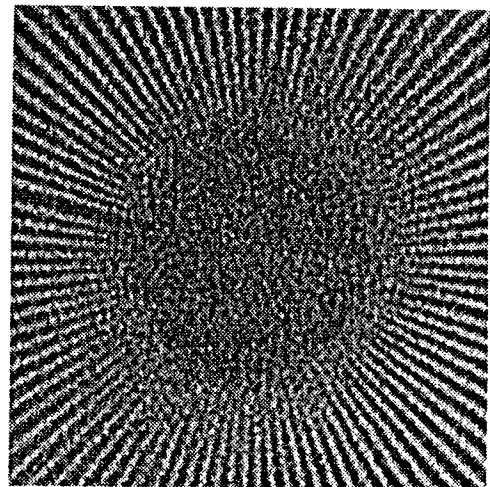
(b-1) Image initiale, T.E. = 0,5 sec.



(b-2) Résultat de la restauration sur (b-1)



(c-1) Image initiale, T.E. = 0,1 sec.



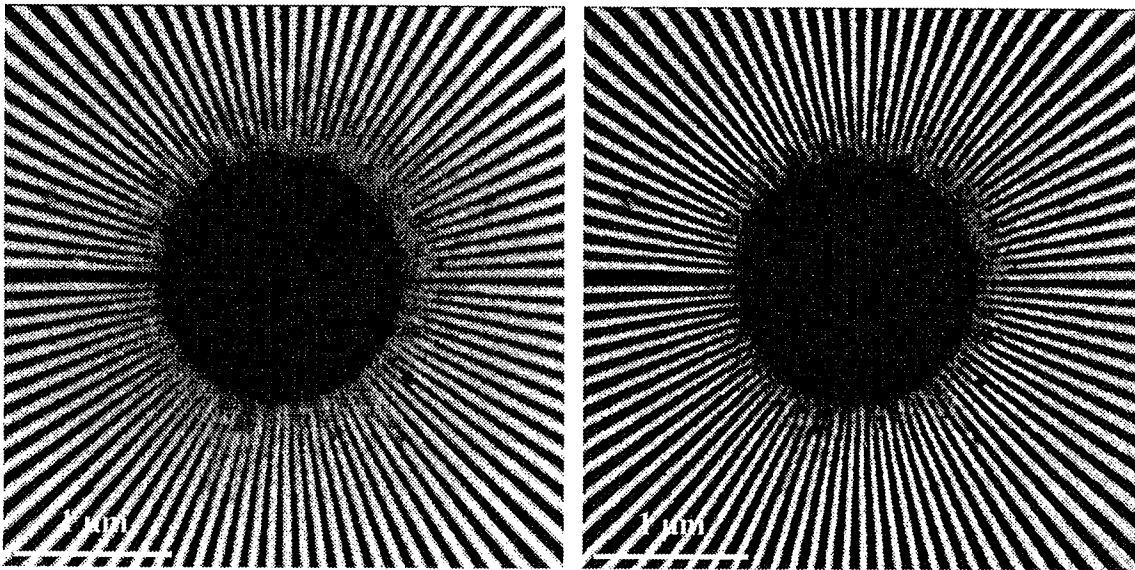
(c-2) Résultat de la restauration sur (c-1)

Figure 6-10. Résultats de la restauration avec l'algorithme de Richardson-Lucy, 20 itérations, appliqué sur des images d'objet test acquises avec des temps d'exposition différents



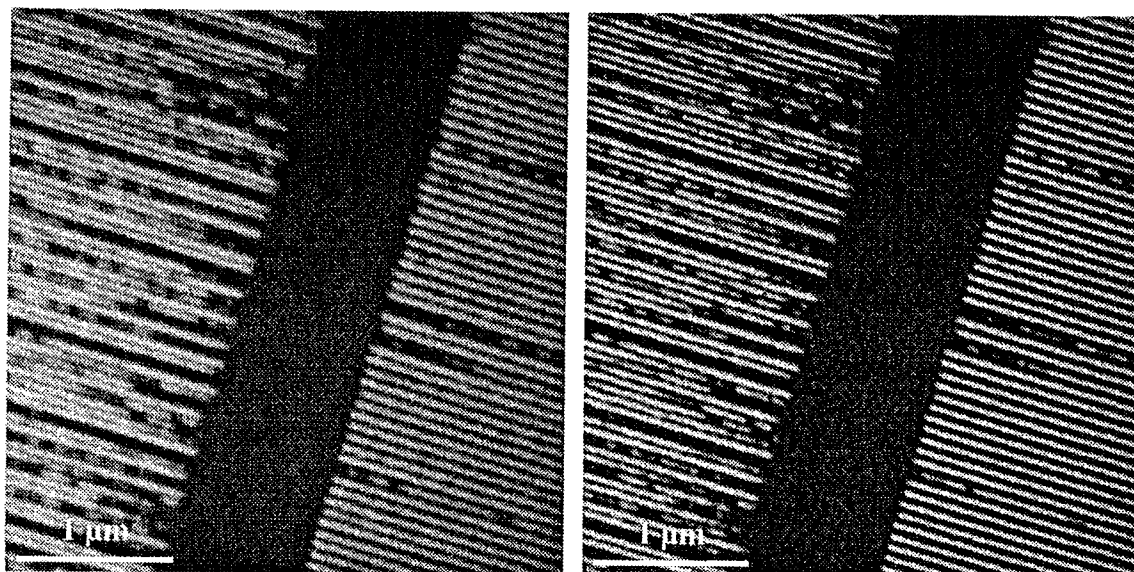
Les résultats du processus de restauration sur des images acquises avec des temps d'exposition différents montrent très clairement que le niveau de bruit influence les performances de l'algorithme de Richardson-Lucy. Alors que les résultats obtenus sur des images ayant un fort rapport signal sur bruit sont très bons (les structures internes peuvent être discernées et le contraste global de l'image est augmenté), ceux obtenus sur les images au caractère plus bruité laissent apparaître des artefacts. Au regard des résultats de la restauration sur les images bruitées, on peut également constater une organisation des artefacts de reconstruction sous la forme d'une texture régulière qui semble se superposer à l'image. Ces artefacts rendent l'image résultat de la restauration inexploitable et de moins bonne qualité que l'image initiale, dans le sens où elle est moins compréhensible et qu'elle peut engendrer une erreur d'interprétation lors de l'observation d'échantillons "inconnus".

Les Figure 6-11 illustre le résultat du processus de restauration sur des images d'objets tests acquises avec un fort rapport signal sur bruit, en utilisant la PSF expérimentale et 20 itérations.



(a-1) Image initiale, T.E. = 4 sec.

(a-2) Résultat de la restauration sur (a-1)



(b-1) Image initiale, T.E. = 4 sec.

(b-2) Résultat de la restauration sur (b-1)

Figure 6-11. Résultats du processus de restauration avec l'algorithme de restauration de Richardson-Lucy, 20 itérations, avec utilisation de la PSF expérimentale.

Les résultats de restauration sur différents objets tests observés sur la Figure 6-11 nous montrent clairement un gain en contraste et en résolution. Les structures de 24 nm de la Figure 6-11(a) sont visibles jusqu'à leur extrémité après l'étape de restauration, alors qu'elles sont floues sur l'image initiale. De même, les structures parallèles de 30 nm de la Figure 6-11(b) sont parfaitement séparées sur l'image restaurée.

#### 6.4.2.2 Effets du choix de la PSF sur les résultats

La classe des algorithmes itératifs dont fait partie l'algorithme de Richardson-Lucy n'est valable qu'à condition de disposer d'un modèle connu de la PSF du système optique. Or, à ce sujet, nous avons dans la section 4.3 déterminé de manière expérimentale la PSF du microscope à rayons X, que nous avons comparée à la PSF théorique calculée par analogie avec la microscopie optique. Cette partie est consacrée à l'observation des résultats de la restauration appliquée sur des objets tests acquis avec des temps d'exposition variables, et en utilisant la PSF théorique comme estimation de la fonction de flou. L'intérêt de cette étape est bien sûr de comparer ces résultats avec ceux obtenus en utilisant la PSF expérimentale, mais aussi d'introduire l'étape de filtrage qui fait l'objet du chapitre 6.5.

La Figure 6-13 représente les résultats de la restauration une série d'images d'un objet test obtenues au TXM avec différents temps d'exposition, en utilisant la PSF théorique comme noyau de déconvolution.

Comme dans le cas précédent où nous avons utilisé la PSF expérimentale comme noyau de déconvolution, il est nécessaire de suivre l'évolution des paramètres  $\alpha$  et  $\phi$  au cours des itérations. Cette évolution au cours des 20 premières itérations est représentée sur la Figure 6-12.

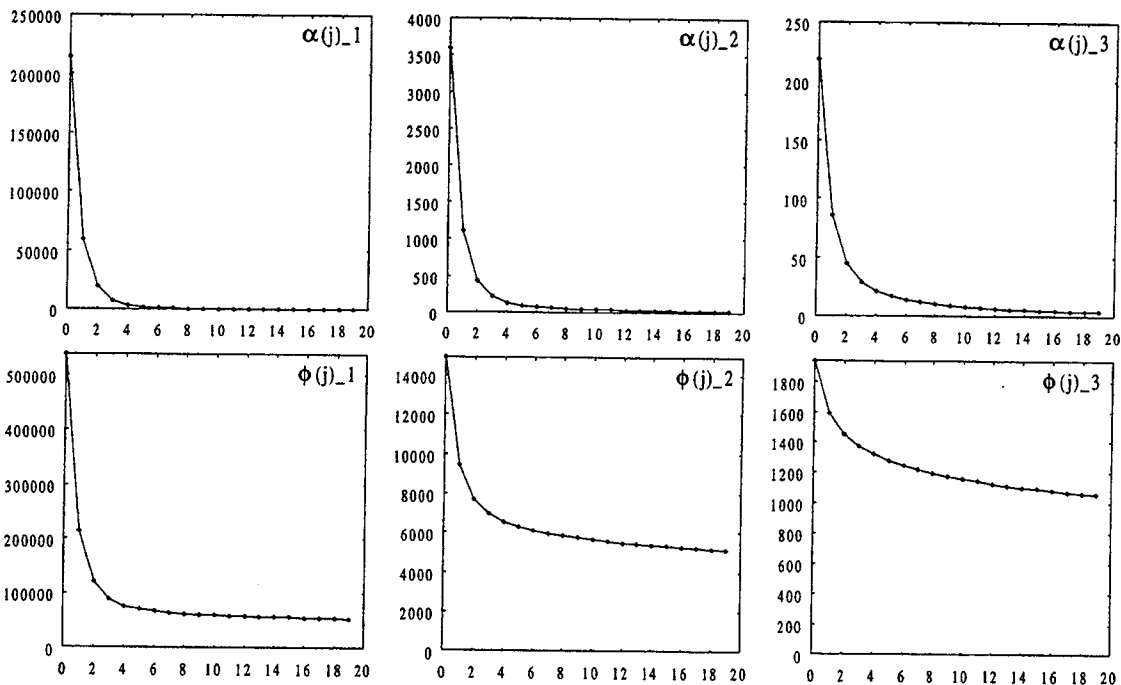
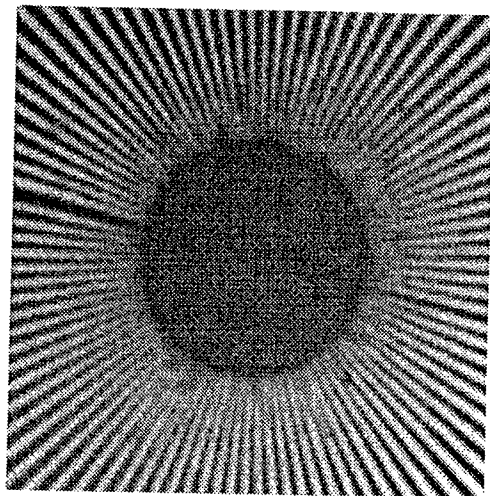
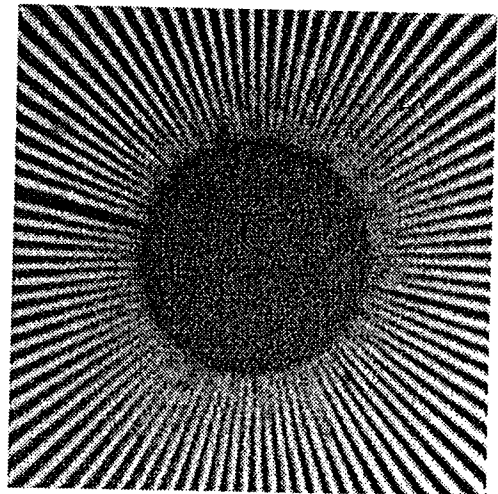


Figure 6-12. Evolution des paramètres  $\alpha$  et  $\phi$  au cours des 20 premières itérations de l'algorithme de Richardson-Lucy appliqué sur les images (a-1), (a-2) et (a-3) de la Figure 6-13 avec utilisation de la PSF théorique comme noyau de déconvolution.

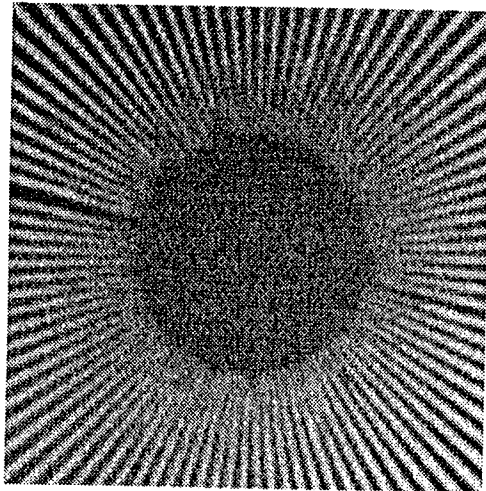
Les résultats de l'évolution des paramètres  $\alpha$  et  $\phi$  au cours des itérations nous montrent que l'algorithme converge bien au cours des itérations, même dans le cas où la PSF utilisée n'est pas exacte. On observe d'ailleurs une convergence plus rapide de l'algorithme vers la solution.



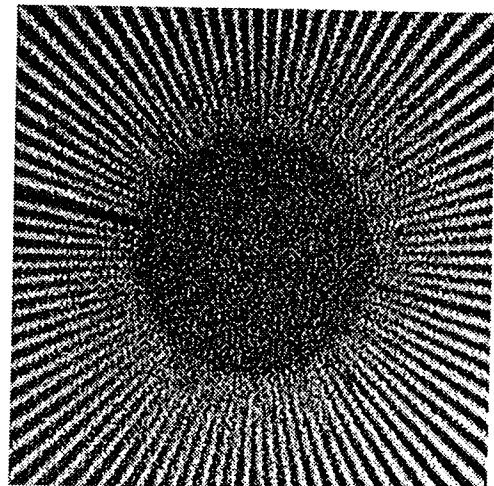
(a-1) Image initiale, T.E. = 4 sec.



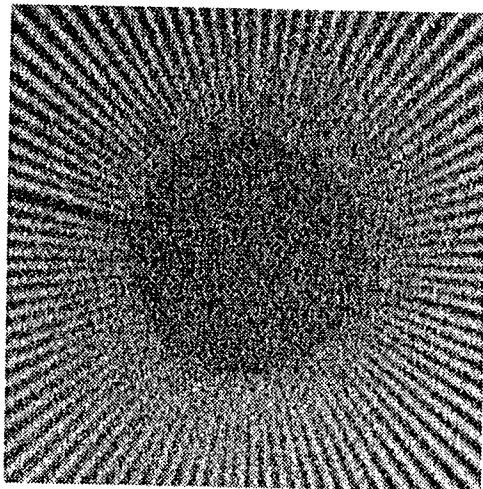
(a-2) Résultat de la restauration sur (a-1)



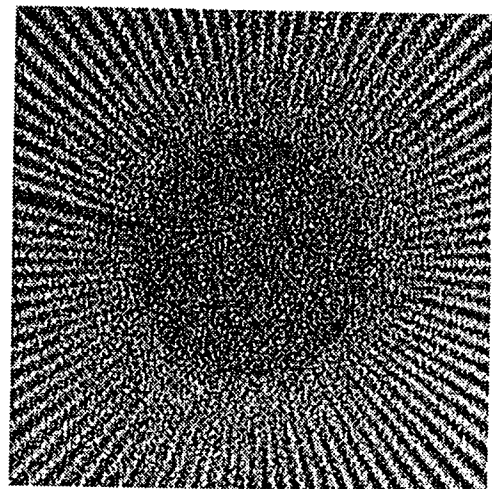
(b-1) Image initiale, T.E. = 0,5 sec.



(b-2) Résultat de la restauration sur (b-1)



(c-1) Image initiale, T.E. = 0,1 sec.



(c-2) Résultat de la restauration sur (c-1)

Figure 6-13. Résultats de la restauration avec l'algorithme de Richardson-Lucy, 20 itérations et utilisant la PSF théorique du microscope, appliqué sur des images d'objet test acquises avec des temps d'exposition différents.

A première vue, les résultats de la restauration représentés sur la Figure 6-13 semblent nettement moins bons que lorsqu'on utilise la PSF expérimentale comme estimation de la fonction de flou (comparer avec la Figure 6-10). Ce point confirme l'importance de la mesure expérimentale de la PSF pour la phase de restauration.

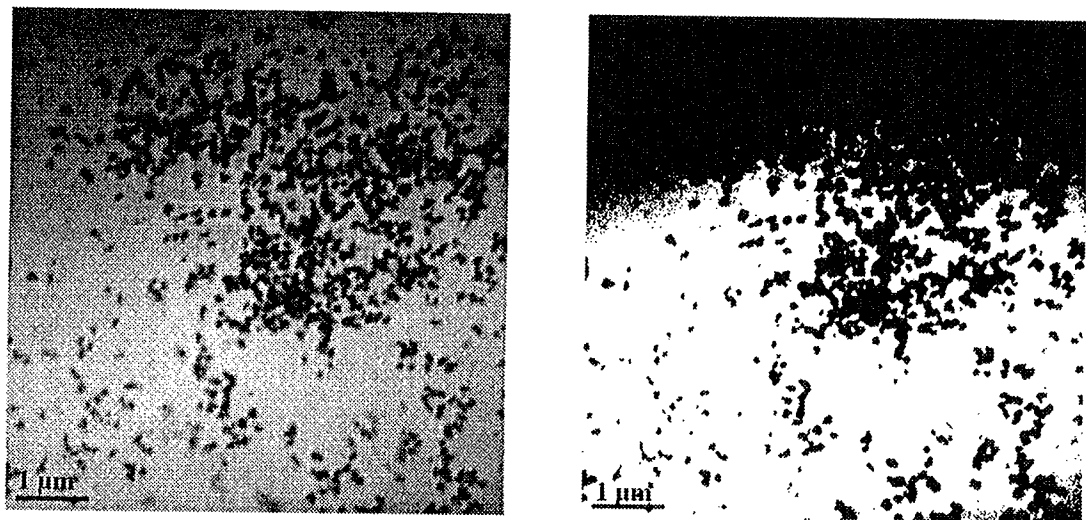
Un second point important que nous avons exploité, faisant l'objet de cette section, est l'observation d'une texture régulière d'autant plus prononcée que le niveau de bruit dans l'image à traiter est élevé. Cette texture, déjà observée dans la section précédente et dont nous ne connaissons pas l'origine mathématique exacte, rend les résultats de la restauration de moins bonne qualité visuelle que l'image initiale, et donc impossible à exploiter. En revanche, elle possède la particularité de contenir une partie du bruit. C'est cette particularité que nous proposons d'exploiter afin de filtrer le bruit présent dans les acquisitions.

### 6.4.3 Application à un problème concret de la biologie

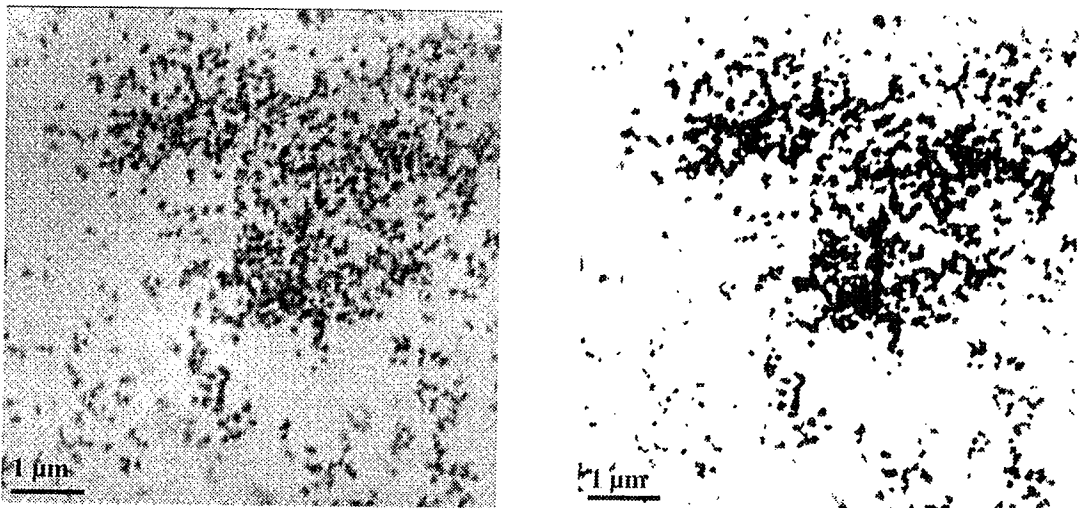
Dans cette section, nous donnons un exemple d'application en biologie, dans laquelle le traitement des images apporte une contribution indispensable pour l'exploitation du résultat des acquisitions. L'application porte sur les images d'hybridation *in situ*, présentées dans le chapitre 3.2.2, où les marqueurs d'argent sont clairement visibles. Dans ces images, il pourrait être envisageable d'effectuer une mesure statistique sur les marqueurs distincts, de manière à mesurer leur position, par exemple. Or, ce genre d'opération nécessite des images d'une grande homogénéité, ainsi qu'une haute résolution, surtout lorsqu'il s'agit de discerner des structures dont les dimensions avoisinent la limite de résolution du microscope.

De manière à observer l'apport des traitements effectués sur les images, nous avons effectués une segmentation des images par seuillage.

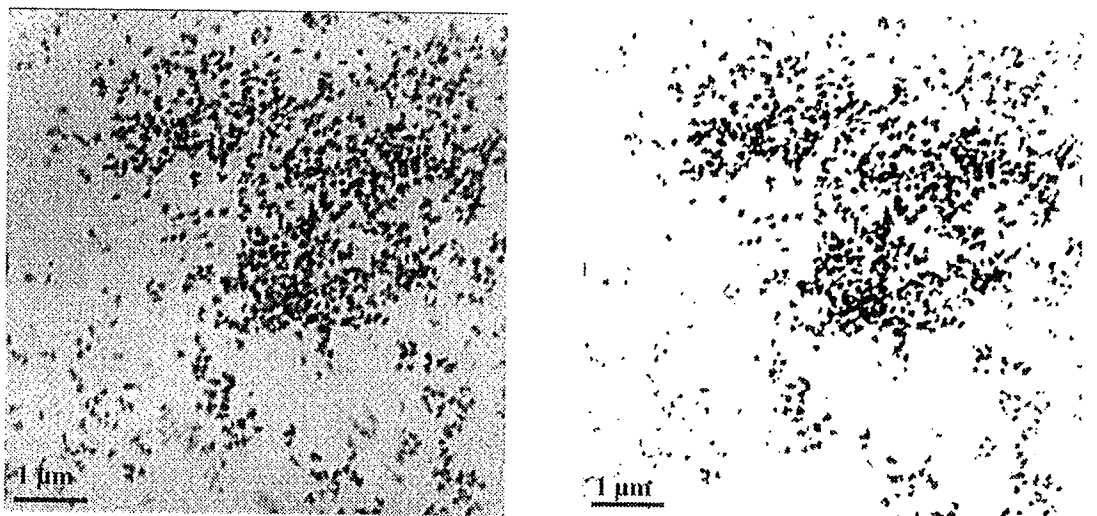
On observe nettement le gain au niveau de la qualité de la segmentation, apporté par les opérations de correction du fond et de restauration.



(a) Image initiale



(b) Image après correction du fond



(c) Image après restauration puis correction du fond

Figure 6-14. (a) images d'hybridation *in situ* représentées (b) après correction de la non homogénéité du fond et (c) restauration, et les images segmentées correspondantes.

## 6.5 Coopération restauration/filtrage dans domaine de Fourier pour le débruitage d'images

Le débruitage des images est un processus couramment utilisé en traitement d'images. Son but est de réduire le niveau de bruit présent dans une image, nuisant à la compréhension et à l'interprétation de l'information contenue dans cette image. Ce procédé est très utilisé comme pré-traitement pour la reconnaissance automatique de formes, où le bruit et la texture restent les facteurs limitants les plus importants. Parmi les nombreuses méthodes utilisées dans la littérature pour réduire le bruit, nous soulignerons la classe des filtres adaptatifs. Cette classe de filtre utilise une fenêtre d'analyse, dont l'orientation et la taille sont déterminées en fonction d'informations extraites de cette fenêtre. L'intérêt de cette classe de filtres est qu'elle permet d'adapter le traitement à effectuer en fonction de l'information locale contenue dans l'image, et permet ainsi de diminuer le bruit, tout en conservant les structures présentes dans l'image traitée. Dans la suite de nos travaux, nous serons amenés à utiliser cette classe de filtres à diverses reprises, et plus particulièrement le filtre développé par Vila et Bolon, et dont l'étape de filtrage est conditionnée par un critère d'anisotropie calculé dans la fenêtre d'analyse sélectionnée [Vila 93].

Dans cette partie, nous allons présenter une approche complètement différente des méthodes existantes, qui consiste à faire coopérer de manière itérative une étape de restauration avec une étape de filtrage dans le domaine de Fourier. Le principe de base consiste à filtrer les artefacts de texture apparaissant après une étape de restauration d'images bruitées par l'algorithme de Richardson-Lucy. Cette partie ne découle pas d'un raisonnement mathématique rigoureux, mais principalement d'une intuition basée sur l'observation de certains résultats, et de quelques propriétés de la transformée de Fourier.

## 6.5.1 Déconvolution avec un noyau spécifique

L'origine de notre méthode est en réalité liée à l'historique du cheminement que nous avons suivi pour la restauration. En effet, ne disposant pas d'une mesure expérimentale de la PSF du microscope au début de nos travaux sur les problèmes inverses, nous avons commencé nos investigations en utilisant la PSF théorique, calculée par analogie avec la microscopie optique photonique. Les résultats de la restauration appliqués à des images à faible rapport signal sur bruit présentaient tous une forme de texture régulière, comme celle observée dans la section 6.4.2.2. L'idée a donc été de localiser, puis de filtrer cette texture dans le domaine de Fourier [Sibarita 95-a], [Sibarita 95-b]. La caractéristique de cette texture est qu'elle présente une telle régularité dans le domaine spatial, qu'elle se manifeste dans le domaine de Fourier sous la forme d'un anneau régulier centré sur le pic de fréquence ( $u=0, v=0$ ), et surtout bien distinct des basses fréquences. De plus, elle est absolument reproductible, et ceci quelle que soit la nature de l'image traitée (voir Figure 6-16-b).

Or, il s'est avéré que les résultats de la restauration appliquée sur les mêmes images, mais en utilisant la PSF expérimentale comme noyau de convolution, ne présentent pas toujours cette forme de texture régulière. Par contre, les résultats obtenus sur des images à fort rapport signal sur bruit sont bien meilleurs. Les artefacts de restauration dus à la présence du bruit ne s'organisent pas de manière aussi constructive, mais aléatoirement. Ceci constitue une source de difficulté pour les localiser et les filtrer simplement sans craindre une altération de la qualité et de la résolution de l'image.

Nous avons vu dans le chapitre 4 sur l'étude de la formation des images que la principale différence entre les PSF théoriques et expérimentales est "l'étroitesse" de la première par rapport à la seconde. L'idée a donc été d'utiliser une fonction gaussienne d'écart type proche de la PSF théorique du microscope, et d'appliquer l'algorithme de restauration de Richardson-Lucy avec cette fonction comme noyau de convolution, de manière à reproduire cette texture spécifique.



Les simulations que nous avons effectuées sur des images analytiques de la Figure 6-15, que nous avons dégradées suivant le modèle de formation des images illustré sur la Figure 6-8, nous ont montré que quelle que soit la nature du flou, et pour une quantité de bruit donnée, la texture était présente et relativement stable et invariante.

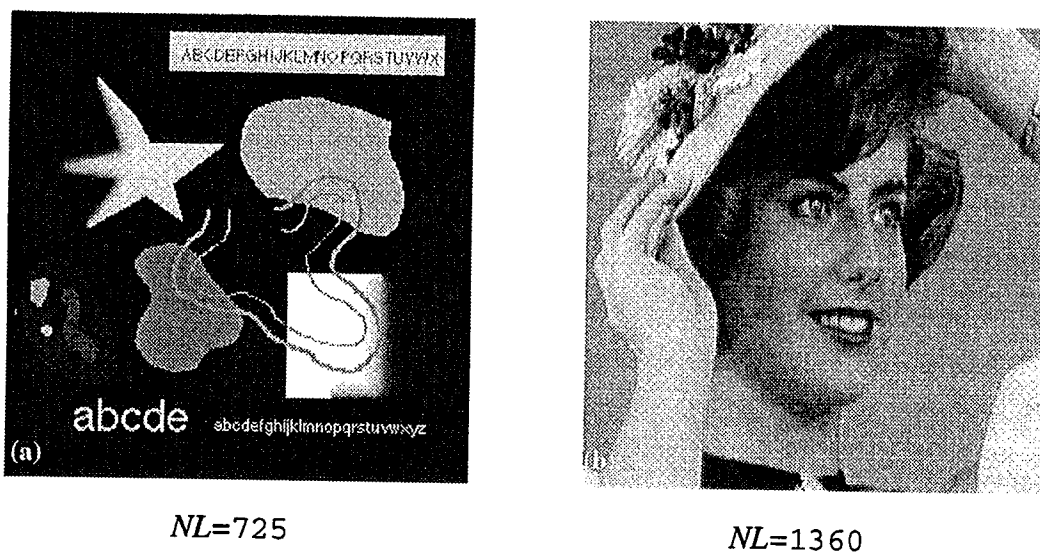
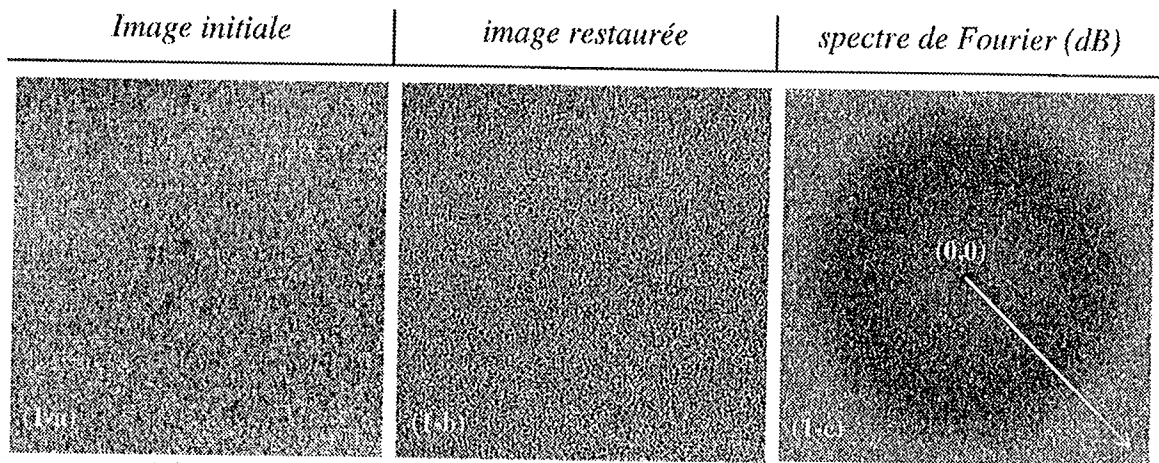


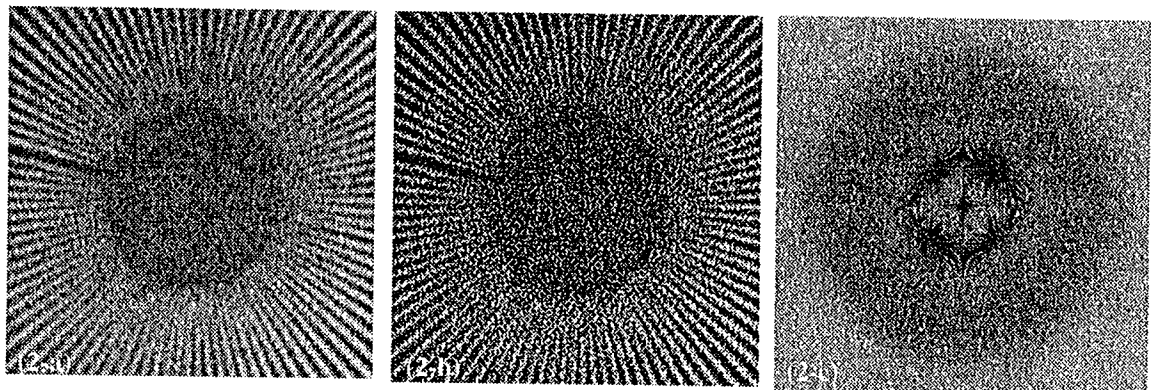
Figure 6-15. Images analytiques utilisées pour illustrer le débruitage. (a) est une image présentant plusieurs structures de différentes tailles et différents contrastes. (b) est la fameuse image de Lena, utilisée comme image de référence dans de nombreux travaux de traitement d'images.

La Figure 6-16 illustre les résultats de la restauration appliquée sur des images acquises au TXM (images 1 et 2) ou d'origine analytique (images 3 à 6). Ces images sont présentées avec leurs spectres de Fourier correspondants. Les images analytiques ont été flouées avec des noyaux de convolution variables (écart types différents), et bruitées suivant une statistique de Poisson. Enfin, pour toutes les images, nous avons appliqué l'algorithme de restauration de Richardson-Lucy, 15 itérations, avec une PSF Gaussienne d'écart type 0,9. Le choix de la valeur de 0,9 pour l'écart type de la PSF Gaussienne, a été fait suite à différents tests.

De manière à suivre l'évolution du niveau de bruit (NL) contenu dans chaque images, nous avons procédé à son estimation par la méthode présentée dans la section 6.2.2, en ayant auparavant pris soin d'effectuer une expansion de la dynamique sur [0, 65535].



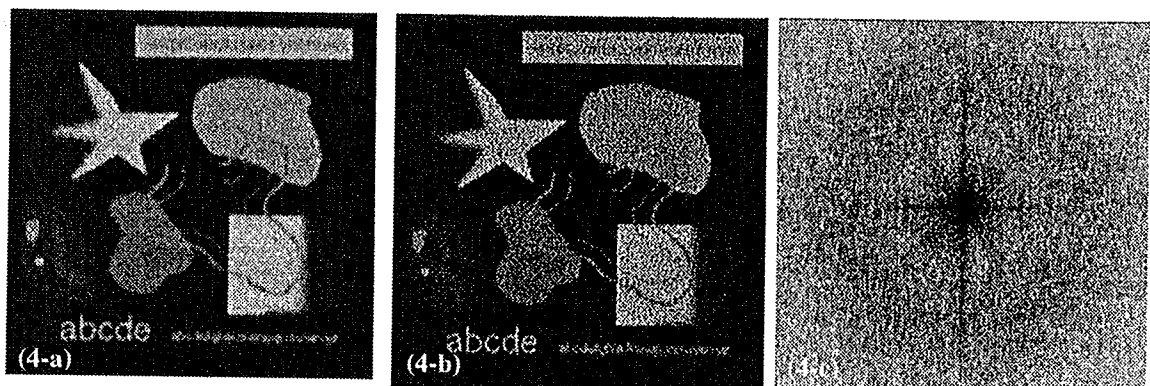
(1) fond homogène acquis au TXM (MZP 29),  $TE=0,1$  s,  $NL=4500$



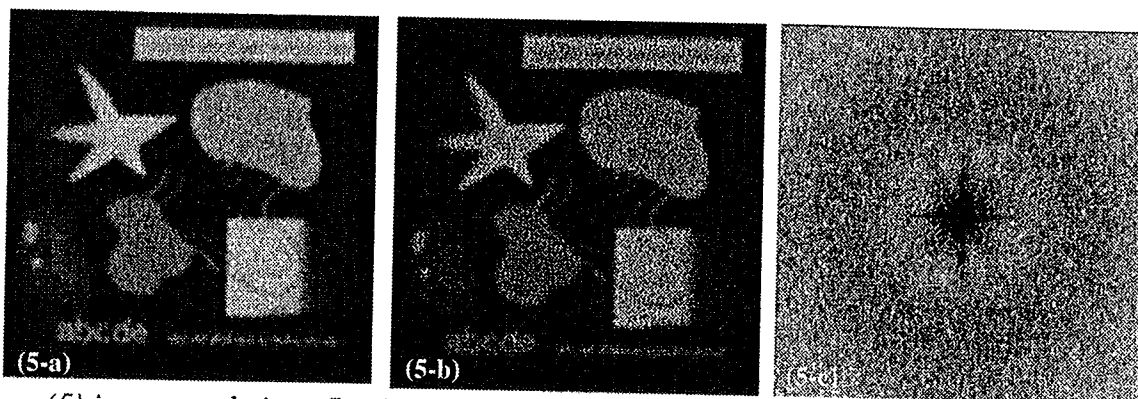
(2) objet test acquis au TXM (MZP39),  $TE=0,1$  s,  $NL=4800$



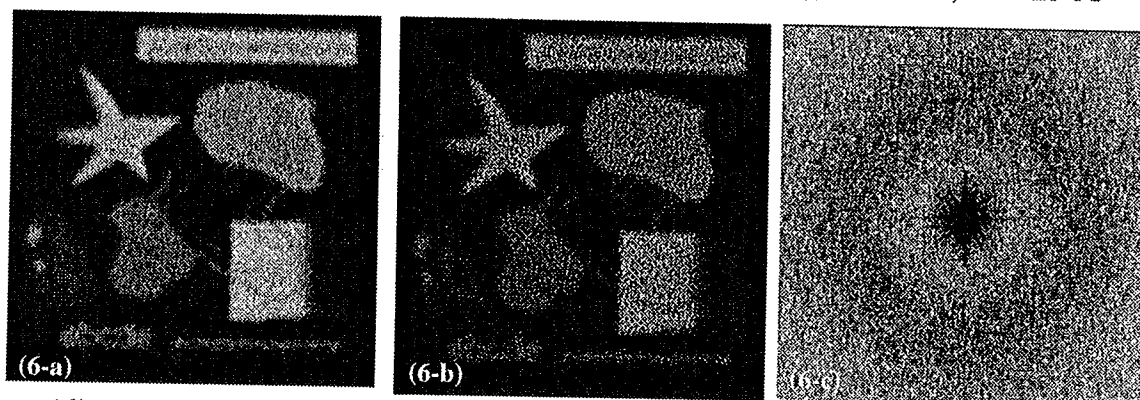
(3) image de Lena bruitée,  $NL=3100$



(4) image analytique flouée avec un noyau Gaussien ( $\sigma=1$ ), et bruitée,  $NL=1845$



(5) image analytique flouée avec un noyau Gaussien ( $\sigma=2$ ), et bruitée,  $NL=1985$



(6) Image analytique flouée avec un noyau Gaussien ( $\sigma=3$ ), et bruitée,  $NL=2295$

Figure 6-16. (b) résultats de la restauration par l'algorithme de restauration de Richardson-Lucy, 15 itérations, avec utilisation d'une Gaussienne d'écart type 0,9 comme noyau de déconvolution et (c) leurs spectres de Fourier associés. (a) images acquises au TXM et des images analytiques utilisées pour la restauration.

Dans toutes les images restaurées, on observe de façon nette cette texture caractéristique qui se manifeste dans le spectre de Fourier par un même anneau, centré sur la fréquence centrale ( $u=0, v=0$ ).

Nous n'avons actuellement pas de raisonnement mathématiquement rigoureux qui justifierait la présence de cette texture régulière et indépendante de la fonction de flou. Selon notre hypothèse, l'origine serait un effet de Moiré créé par la convolution entre l'image du bruit et le noyau de convolution utilisé pour la restauration.

En effet, considérons l'image à traiter  $i$  comme la somme de l'image acquise par le système optique non bruitée  $a$ , et le bruit additif  $n$ . Soient  $w_a$  et  $w_n$  les fréquences d'échantillonnage respectives des signaux  $a$  et  $n$ . La fréquence  $w_a$  est fixée pas le

système optique. Le bruit étant indépendant du système optique, sa fréquence d'échantillonnage  $wn$  est fixé par le pas de la caméra CCD et le grandissement. On peut donc écrire la relation suivante

$$i_{wn} = a_{wa} + n_{wn} \quad (6-36)$$

Par conséquent, si on applique à l'image  $i$  une opération d'échantillonnage  $\mathcal{E}_{ws}\{\}$  à la fréquence  $we$  telle que

$$wa < we < wn \quad (6-37)$$

on obtient

$$\mathcal{E}_{we}\{i_{wn}\} = \mathcal{E}_{we}\{a_{wa}\}_{o1} + \mathcal{E}_{we}\{n_{wn}\}_{o2} \quad (6-38)$$

La contrainte sur l'ordre des fréquences imposée par l'équation (6-36) implique deux remarques fondamentales : d'une part l'opération  $o1$  est une opération de sous-échantillonnage appliquée sur l'image du bruit  $n$ , pouvant induire un effet de Moiré et donc la création de pseudo-fréquences [Rosenfeld 82]. D'autre part, la seconde opération  $o2$  est une opération de sur-échantillonnage appliquée sur l'image  $a$ , qui n'induit aucune modification sur le contenu de  $a$ .

Par conséquent, la texture pourrait être un effet de Moiré causé par le sous-échantillonnage du bruit. Une autre propriété importante, est que cette texture est additive, et ne devrait normalement contenir que du bruit. Son filtrage par une simple opération de soustraction ne devrait par conséquent pas altérer la résolution de l'image initiale sous-jacente.

La section suivante traite de ce problème.

## 6.5.2 Suppression de la texture dans le domaine de Fourier

Cette section est consacrée à la localisation et la suppression de la texture dans le domaine de Fourier. Pour cette étape, nous avons extrait des profils du spectre de Fourier d'une image ne contenant aucune autre information que du bruit, telle que l'image 1-a de la Figure 6-16.

Afin d'avoir un contraste le meilleur possible pour les faibles variations d'intensité du spectre, nous avons représenté l'intensité des spectres en décibels (dB), en utilisant la relation

$$|I(u, v)|_{\text{dB}} = -20 \log \frac{|I(u, v)|}{|I(0, 0)|} \quad (6-39)$$

avec 
$$I(u, v) = \mathcal{FF} \{i(x, y)\} \quad (6-40)$$

où  $i$  est l'image à filtrer, et  $\mathcal{FF}$  dénote la transformée de Fourier bi-dimensionnelle.

La symétrie circulaire de l'anneau à l'origine de la texture, clairement visible sur les spectres des images restaurées, nous a permis de ramener cette étude à une dimension dans le domaine fréquentiel, en utilisant la variable  $\rho$  définie par

$$\rho = \sqrt{u^2 + v^2} \quad (6-41)$$

Afin de mieux localiser cet anneau à l'origine de la texture dans le domaine spatial, nous avons effectué un lissage circulaire du spectre. La Figure 6-17-(a) représente les profils d'intensités du spectre de l'image restaurée correspondant à l'image 1-a de la Figure 6-16. Elle met bien en évidence cet anneau en forme de cloche, centré sur les basses fréquences.

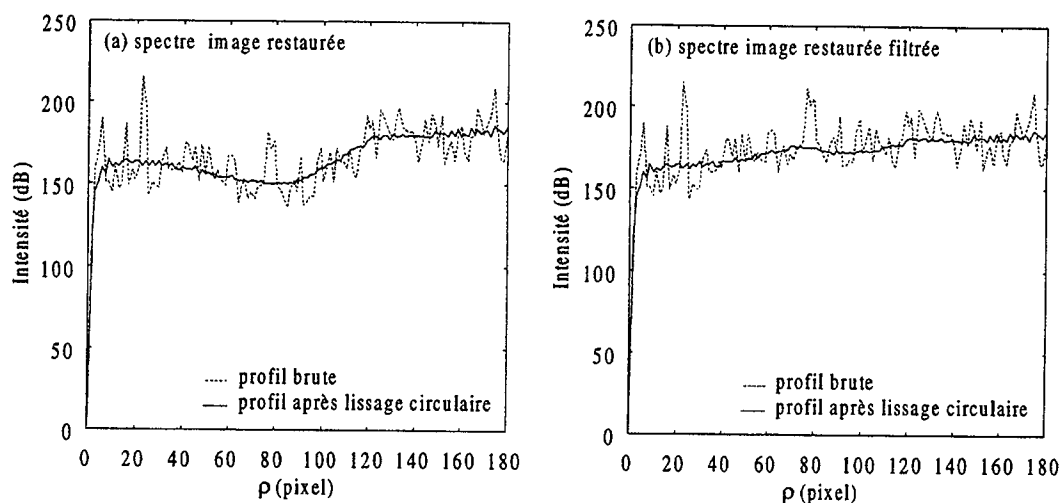


Figure 6-17. Profils des spectres des images restaurées avant filtrage (a) et après filtrage (b).

En partant de l'hypothèse émise concernant une texture additive causée par la présence d'un bruit additif, nous avons décidé de filtrer cette texture dans le domaine de Fourier, en appliquant un filtrage coupe bande adéquat. La forme des profils des spectres des images restaurées nous a guidé vers l'utilisation d'un filtre Gaussien circulaire de la forme

$$G(\rho)_{dB} = G_0 e^{-\frac{(\rho-\rho_0)^2}{\sigma^2}} \quad (6-42)$$

où les paramètres à ajuster sont l'intensité de l'atténuation  $G_0$ , la fréquence centrale du filtre  $\rho_0$ , et la largeur du filtre caractérisée par  $\sigma$ .

La phase d'extraction des paramètres de la Gaussienne est illustrée sur la Figure 6-18.

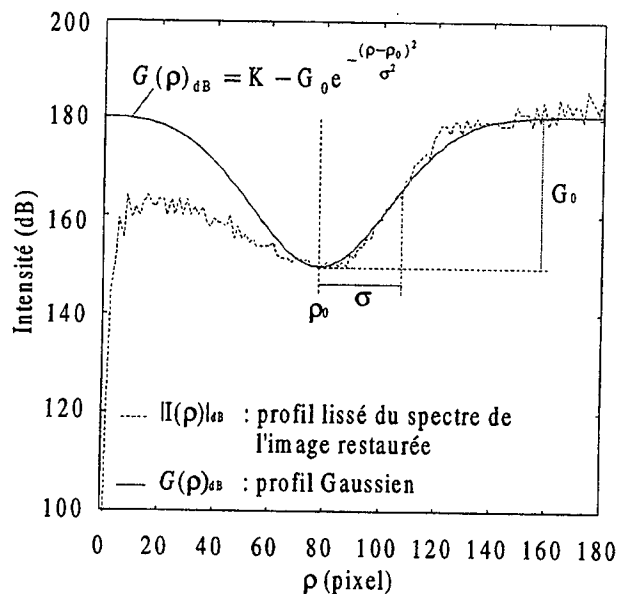


Figure 6-18. Détermination des paramètres de la Gaussienne pour le filtrage circulaire dans le domaine de Fourier.

Une fois les paramètres de la Gaussienne déterminés, et sachant que l'on travaille sur les modules en décibels des transformées de Fourier, il est nécessaire de déterminer ce qu'implique l'addition de la gaussienne  $G(\rho)_{dB}$  sur les parties réelles et imaginaires du spectre de l'image à filtrer, de manière à appliquer la transformation adéquate. Soient  $\Pi(u, v)_{dB}$  et  $\hat{\Pi}_F(u, v)_{dB}$  les modules des spectres (en dB) respectifs de

l'image restaurée contenant la texture à supprimer et de l'image filtrée. L'étape de filtrage s'écrit

$$|\hat{I}_F(u, v)|_{dB} = |I(u, v)|_{dB} + G(\rho)_{dB} \quad (6-43)$$

Soient  $Re(u, v)$  et  $Im(u, v)$  les parties réelles et imaginaires de  $I(u, v)$ , l'équation (6-40) peut se développer sous la forme

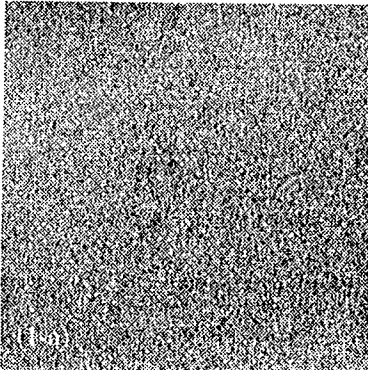
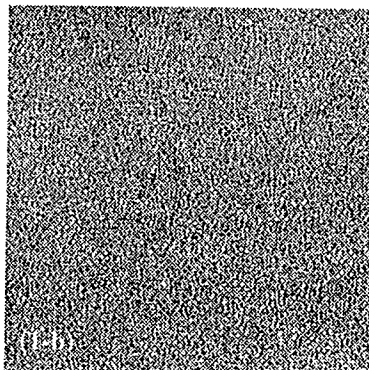
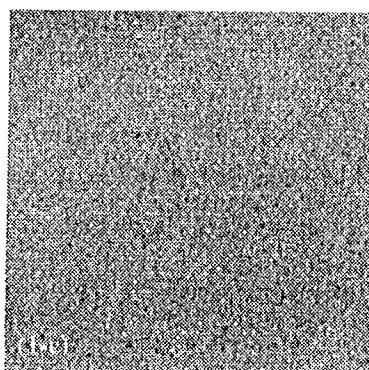
$$|\hat{I}_F(u, v)|_{dB} = -20 \log \frac{(Re^2(u, v) + Im^2(u, v))^{1/2}}{|I(0,0)|} + G(\rho) \quad (6-44)$$

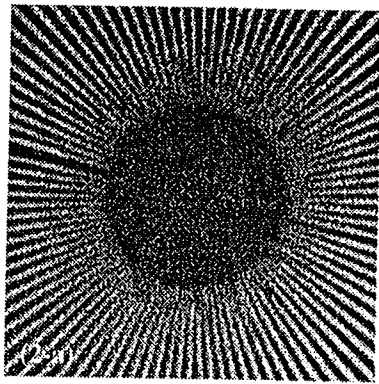
En développant la Gaussienne, on peut factoriser l'équation (6-41) sous la forme

$$|\hat{I}_F(u, v)|_{dB} = -20 \log \frac{\left[ \left[ Re(u, v) e^{-\frac{G(\rho)}{20}} \right]^2 + \left[ Im(u, v) e^{-\frac{G(\rho)}{20}} \right]^2 \right]^{1/2}}{|I(0,0)|} \quad (6-45)$$

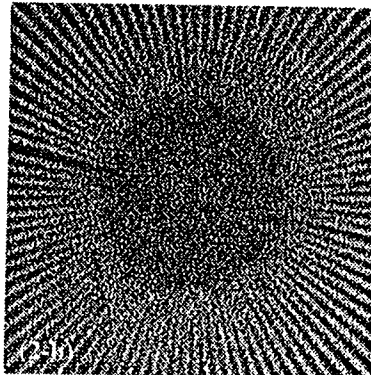
Par conséquent, l'addition de la gaussienne  $G(\rho)_{dB}$  au module  $|\hat{I}_F(u, v)|_{dB}$  s'obtient en multipliant les parties réelles et imaginaires de la transformée de Fourier de l'image restaurée  $I(u, v)$  par la quantité  $\exp(-G(\rho)/20)$ . La Figure 6-17 montre le résultat du filtrage Gaussien sur le profil du spectre de l'image filtrée.

Quelques résultats de ce filtrage appliqués sur les images texturées issues de la phase de restauration de la Figure 6-16 sont illustrés sur la Figure 6-19. Le Tableau 6-1 résume les résultats de l'estimation du niveau de bruit appliqué sur les images initiales et les images traitées par le processus restauration + filtrage.

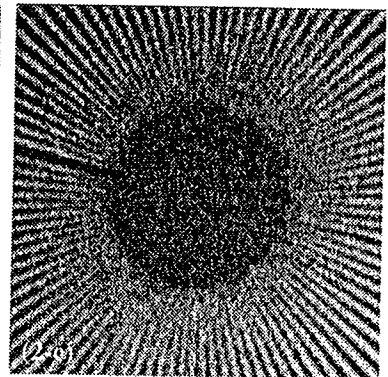
<i>image initiale</i>	<i>image restaurée</i>	<i>image filtrée</i>
		
NL=4500	(I)	NL=3200



*NL=4800*



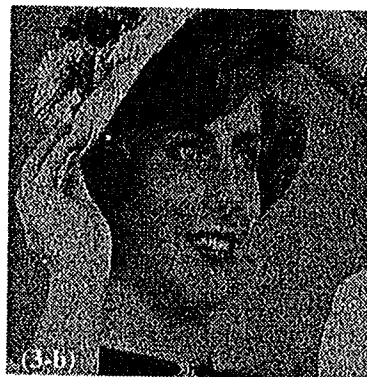
(2)



*NL=4500*



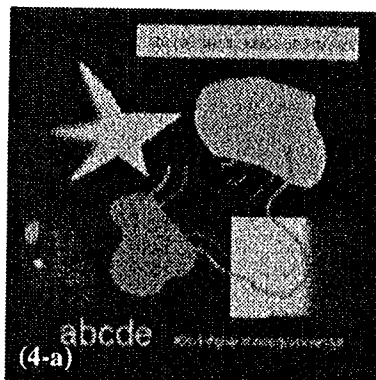
*NL=3100*



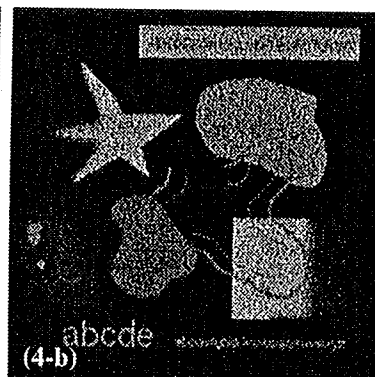
(3)



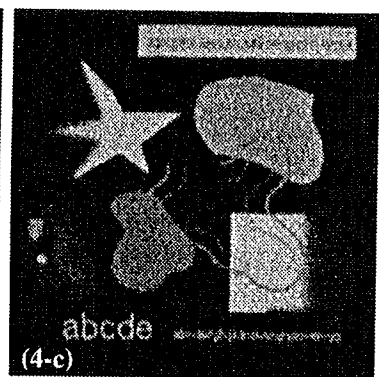
*NL=2845*



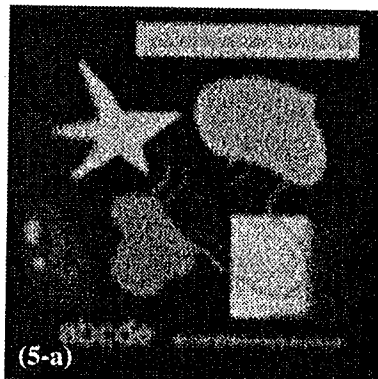
*NL=1845*



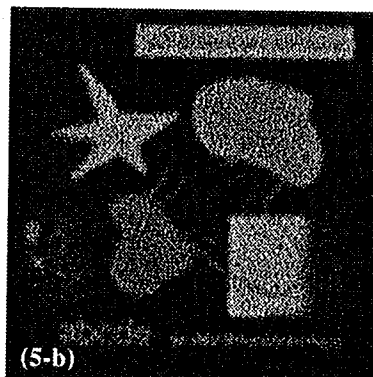
(4)



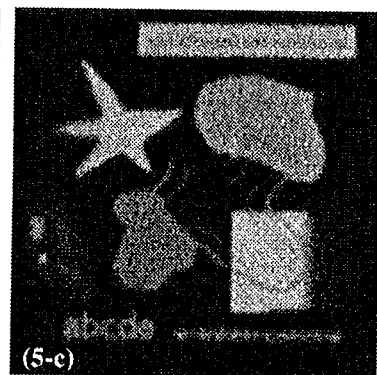
*NL=1105*



*NL=1985*



(5)



*NL=1752*



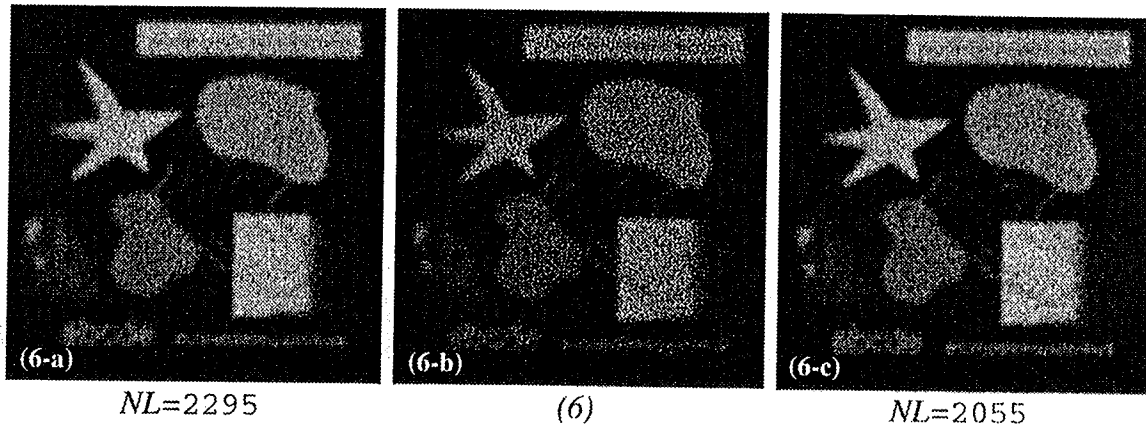


Figure 6-19. (c) résultats du filtrage dans le domaine de Fourier, appliqué sur images restaurées (b) d'images acquises au TXM et d'images analytiques flouées et bruitées (a).

Image	NL image initiale	NL image restaurée + filtrée
(1)	4500	3200
(2)	4800	4500
(3)	3100	2845
(4)	1845	1105
(5)	1985	1752
(6)	2295	2055

Tableau 6-1. Tableau récapitulatif sur les niveaux de bruit (NL), avant et après la phase de restauration + filtrage. Le numéro des images correspond à celui des images représentées sur la Figure 6-19 et la Figure 6-16.

Les résultats présentés sur la Figure 6-19, illustrent bien la suppression de la texture ainsi que la baisse du niveau de bruit, sans altération visible de la résolution. En effet, aucune des images traitées ne semble avoir perdu d'information, et ceci quelle que soit la taille et le contraste des structures présentes. Ces observations vont dans le sens de l'hypothèse que nous avons émise dans la section 6.5.1, concernant la création de pseudo-fréquences uniquement causées par le bruit.

### 6.5.3 Application itérative du processus restauration + filtrage

En admettant que seul le bruit est affecté au cours du processus restauration + filtrage, l'idée finale a été d'appliquer ce processus de manière itérative. Ce traitement engendre une décroissance du niveau de bruit à chaque itération, sans que la qualité visuelle des images ne soit affectée.

Afin de s'assurer de la convergence des résultats, nous avons pour chaque itération explicité des variations du rapport signal sur bruit de crête (PSNR) entre le résultat et l'image du même objet acquise avec un temps d'exposition plus long (Tableau 6-2). Pour cette opération, nous avons utilisé l'image d'un objet test de la Figure 6-20 demeurant stable pendant l'exposition. Cette comparaison sur des images d'échantillon biologique n'a aucun sens puisque ces derniers sont susceptibles d'être dégradés pendant la durée de l'acquisition.

Image/Itération	Initiale TE=4 s	Initiale TE=0,5 s	1 <sup>ère</sup> itération	2 <sup>nde</sup> itération	3 <sup>ème</sup> itération
NL	3645	4115	3740	3695	3690
PSNR	infini	24,8	31,2	31,6	32,0

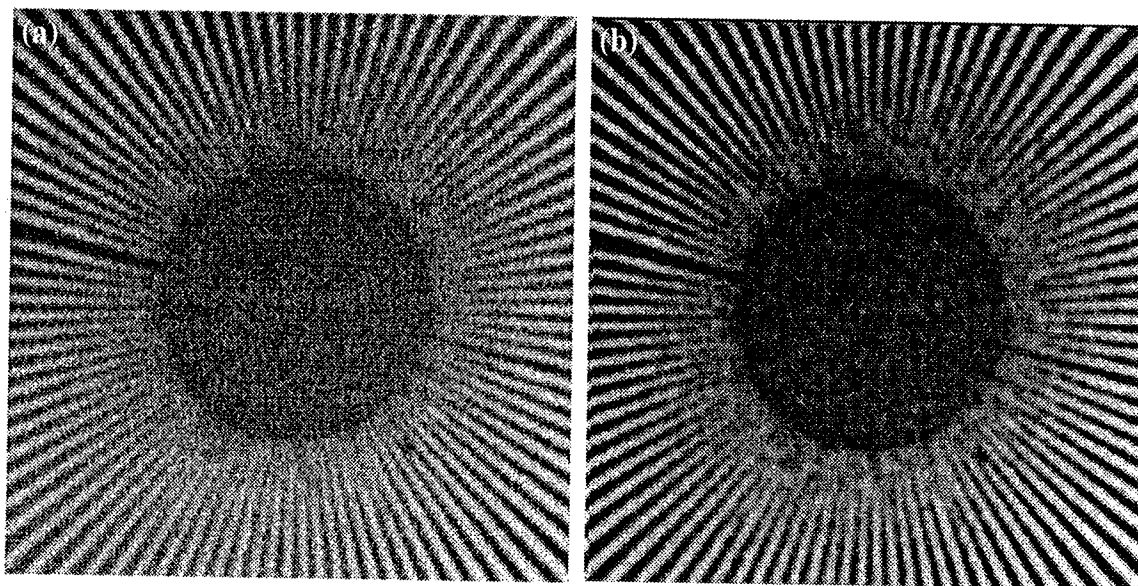
Tableau 6-2. Evolution au cours du processus itératif de restauration + filtrage des niveaux de bruit (NL) et rapport signal sur bruit de crête (PSNR), sur l'image d'un objet test acquise au TXM.

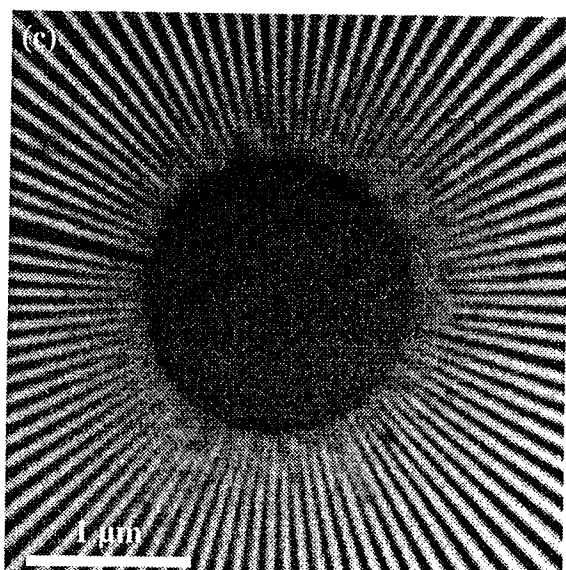
La Figure 6-20 représente quelques résultats du processus de restauration + filtrage après 4 itérations, appliqué sur des images d'échantillons biologiques. Pour chaque résultat, nous avons détaillé l'évolution du niveau de bruit (NL) au cours des itérations (Tableau 6-3).

Image	Niveau de bruit (NL)			
	initiale	1 <sup>ère</sup> it.	2 <sup>nde</sup> it.	3 <sup>ème</sup> it.
objet test	4115	3740	3695	3690
chromosome fixé	2530	1990	1860	1770
chromosome non fixé	2430	1980	1750	1605
Diatome	3025	2400	2020	1900

Tableau 6-3. Evolution du niveau de bruit (NL) au cours des 3 premières itérations du processus restauration + filtrage, appliqué sur différentes images présentées sur la Figure 6-20.

On observe bien une décroissance du niveau de bruit au cours des itérations, tout en n'observant aucune perte de la résolution des images acquises. L'intérêt, de la méthode présentée est qu'elle permet de filtrer une partie du bruit présent dans les images, tout en conservant leur niveau de résolution. Le contraste est alors augmenté, et les structures deviennent plus facile à observer.



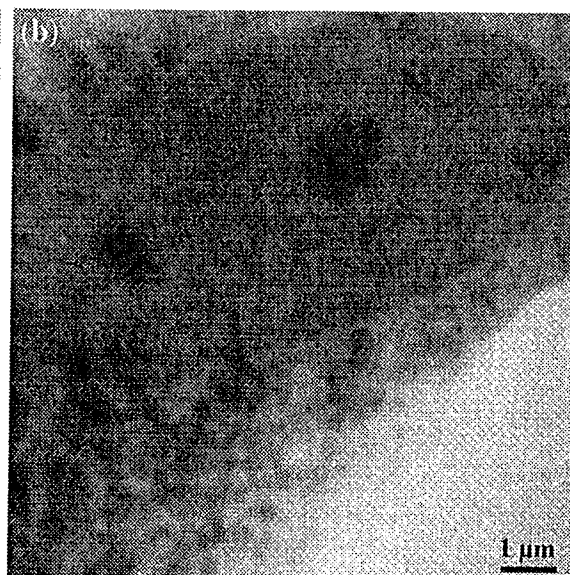
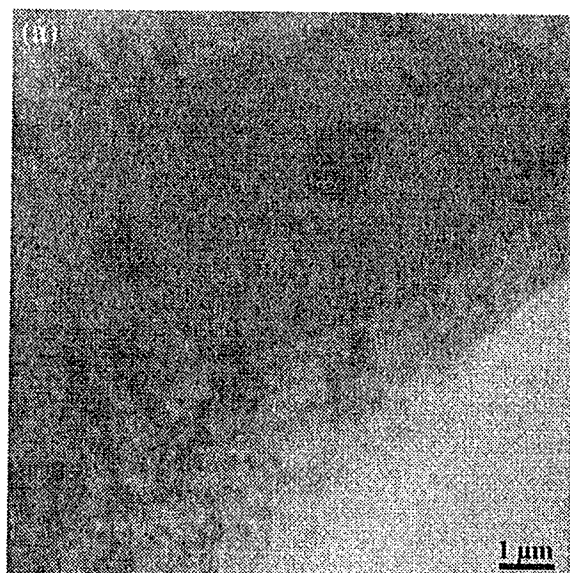


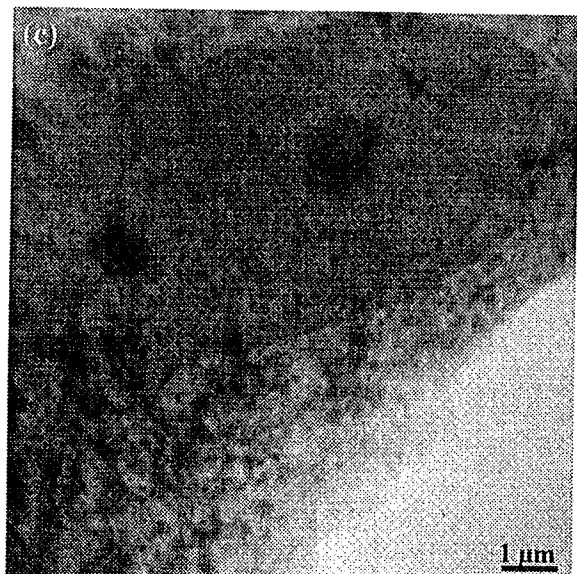
*Image d'objet test. Acquisition effectuée sur le TXM de Göttingen à BESSY.*

*(a) Image initiale ; TE=0,5 s ; NL=4115.*

*(b) Résultat du filtrage appliqué sur (a) après 4 itérations ; NL=3690.*

*(c) Image initiale ; TE=4 s ; NL=3640.*



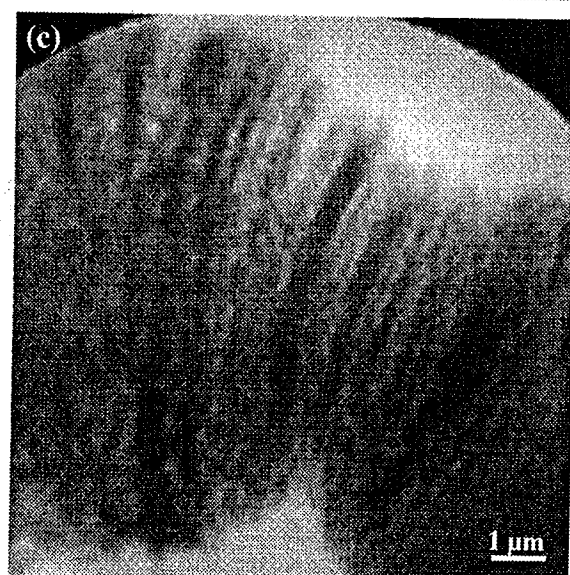
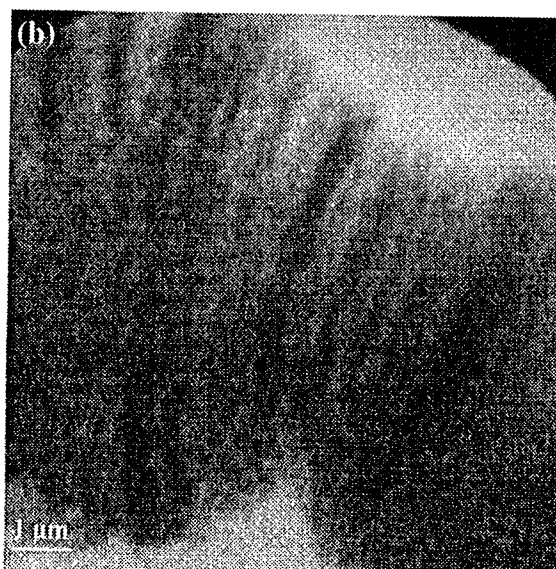
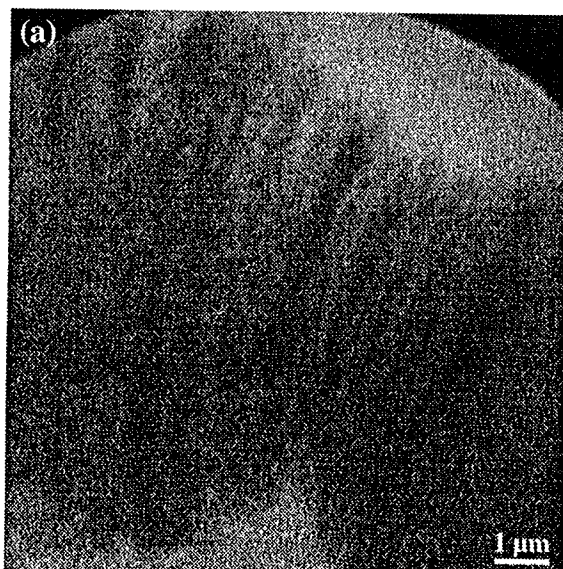


*Image de cellule de rat fixée. Acquisition effectuée sur le TXM de Göttingen à BESSY.*

(a) Image initiale ;  $TE=0,1$  s ;  $NL=2740$ .

(b) Résultat du filtrage appliqué sur (a) après 4 itérations ;  $NL=1880$ .

(c) Image initiale ;  $TE=5$  s ;  $NL=1090$ .

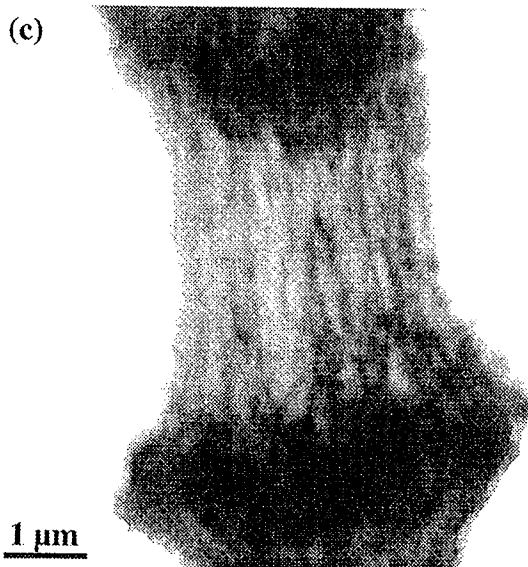
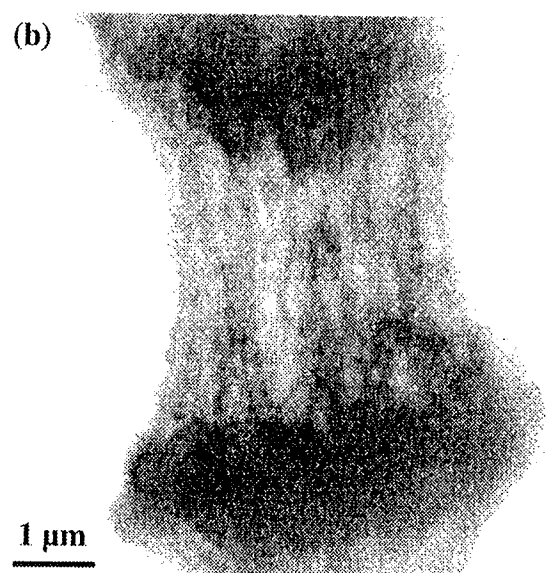
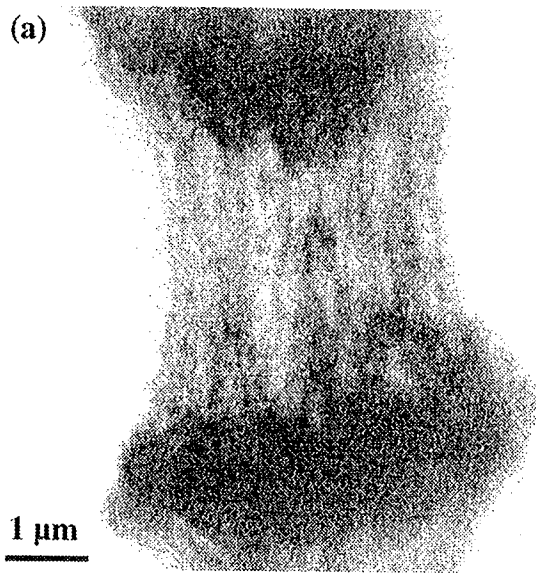


*Image d'une région de chromosome polyténique fixé. Acquisition effectuée sur le TXM de Göttingen à BESSY.*

(a) Image initiale ;  $TE=0,5$  s ;  $NL=2530$ .

(b) Résultat du filtrage appliqué sur (a) après 4 itérations ;  $NL=1680$ .

(c) Image initiale ;  $TE=5$  s ;  $NL=720$ .

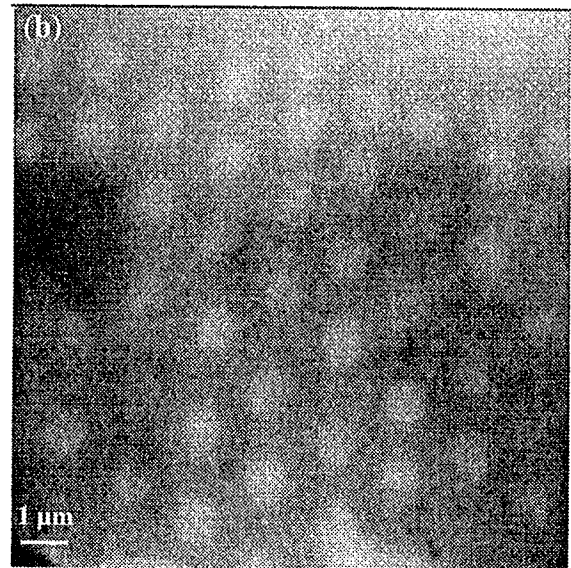
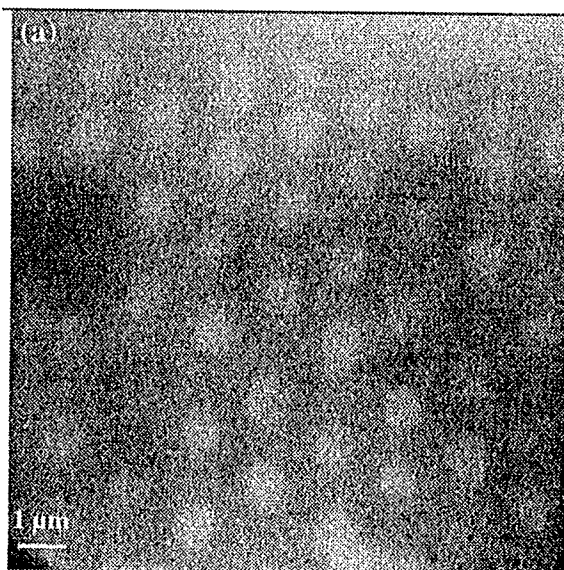


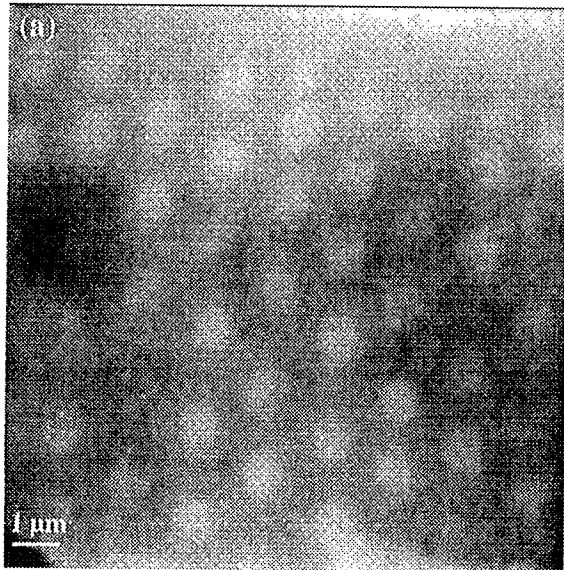
*Image d'une région de chromosome polyténique non fixé. Acquisition effectuée sur le TXM de Göttingen à BESSY.*

(a) *Image initiale ; TE=0,1 s ; NL=2430.*

(b) *Résultat du filtrage appliqué sur (a) après 3 itérations ; NL=1605.*

(c) *Image initiale ; TE=1 s ; NL=1060.*





*Image d'un diatome. Acquisition effectuée sur le microscope à source plasma pulsée de Göttingen.*

*(a) Image initiale ; TE = quelques ns ; NL=3030.*

*(b) Résultat du filtrage appliqué sur (a) après 4 itérations ; NL=1805.*

*(c) Résultat du filtrage de rang adaptatif appliqué sur (c) ; NL=530.*

*Figure 6-20. Résultats du processus itératif restauration + filtrage, après 4 itérations. TE = temps d'exposition, D = dose absorbée durant l'exposition.*

La raison pour laquelle nous nous arrêtons à la troisième ou quatrième itération, est qu'à partir de ce nombre d'itérations, des artefacts commencent à surgir. Ces artefacts proviennent certainement de la forme Gaussienne du filtre qui n'est pas tout à fait adaptée à la forme du profil des spectres lissés des images restaurées. Une éventuelle optimisation pourrait consister à déterminer un filtre plus adéquat. Il serait également envisageable de déterminer automatiquement les paramètres du filtre, afin de supprimer la partie interactive qui ralentit énormément le processus de débruitage.

## 6.5.4 Conclusion sur le débruitage d'images

Dans cette section, nous avons proposé une méthode pour le débruitage des images issues de la microscopie à rayons X. Cette méthode combine l'algorithme de restauration de Richardson-Lucy avec une étape de filtrage dans le domaine de Fourier. Le noyau de convolution utilisé lors de la phase de restauration est choisi de manière à faire converger le bruit, sans modifier l'information contenue dans l'image. Son avantage, par rapport aux techniques classiques de débruitage, est qu'elle permet de diminuer le niveau de bruit des images traitées, tout en préservant un bon niveau de résolution et de contraste. Son application dans le cadre de la microscopie à rayons X,

est adaptée pour l'observation d'échantillons biologiques sensibles aux rayons X, et qui nécessitent des courts temps d'exposition afin de réduire au maximum l'effet des radiations.

## 6.6 Reconstruction d'images à grande profondeur de champ

L'acquisition d'objets épais avec un système optique dont la profondeur de champ est inférieure à la profondeur de l'objet présente un réel problème de la vie quotidienne. En effet, qui ne s'est pas un jour trouvé dans la situation de vouloir prendre une photo en gros plan d'un objet étendu, en s'apercevant qu'il était impossible d'avoir une image "nette" de tout l'objet ?

En microscopie, le problème est identique. Par contre, lorsque l'on travaille en transmission, et que l'on dispose d'une résolution axiale proche de la résolution latérale, comme c'est par exemple le cas en microscopie confocale, il devient possible de reconstruire un volume à partir d'une série de coupes optiques réalisées sur l'échantillon. Dans le cadre de la microscopie à rayons X, nous avons vu que les optiques actuelles ne sont pas adaptées pour l'observation d'échantillons de plusieurs micromètres d'épaisseurs. En effet, leur profondeur de champ est trop grande pour effectuer une reconstruction à partir de coupes optiques, et trop petite pour réaliser une reconstruction 3D par des techniques tomographiques.

Dans cette section, nous allons présenter une approche pour reconstruire une image à grande profondeur de champ à partir d'une série de coupes optiques réalisées sur l'échantillon à observer. Nous illustrerons ce procédé à l'aide d'images acquises en réflexion, puis nous donnerons des résultats dans le cas d'images acquises en contraste d'amplitude sur le TXM de Göttingen à BESSY.



## 6.6.1 Détails de la méthode

La méthode présentée consiste à reconstruire une image la plus représentative possible de l'objet épais, à l'aide d'une série de coupes optiques effectuées sur l'objet. La Figure 6-21 rappelle le principe d'acquisition d'une série de coupes optiques en microscopie à rayons X.

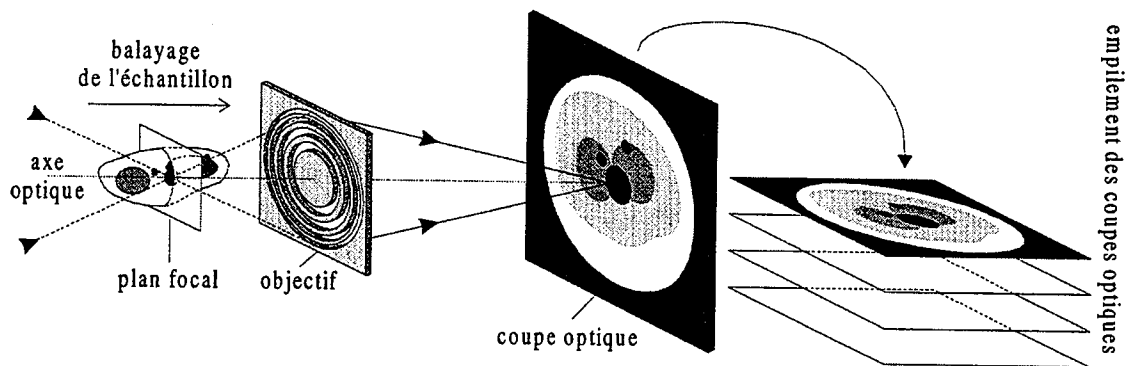


Figure 6-21. Schéma explicatif pour l'acquisition d'une série de coupes optiques d'un objet épais.

Le modèle que nous avons développé consiste tout simplement à parcourir la surface du volume constitué de l'empilement des coupes optiques, et pour chaque pixel de cette surface, balayer le volume suivant la direction axiale et ne garder que l'information "nette". Le critère que nous avons choisi pour la sélection de cette information est basé sur une mesure du gradient, suivie d'une mesure de la dérivée seconde. Le calcul du gradient sur la colonne en cours de traitement consiste à déterminer les points de plus fortes pentes (la plus négative et la plus positive), de manière à localiser l'entrée et la sortie de la structure. Puis le calcul du point d'inflexion sur la zone déterminée par le gradient, nous permet de déterminer le point le mieux focalisé suivant la direction considérée. La Figure 6-22 schématise le processus de sélection.

On peut tout de suite remarquer que cet algorithme ne peut parfaitement traiter le cas où différentes structures se superposent exactement, mais dans ce cas il permet tout de même d'avoir une idée précise de l'échantillon observé. Par contre, cette méthode est

parfaitement adaptée lorsqu'aucune structure n'est située en dessous d'une autre. Ce dernier cas est vérifié lorsque l'on travaille en réflexion.

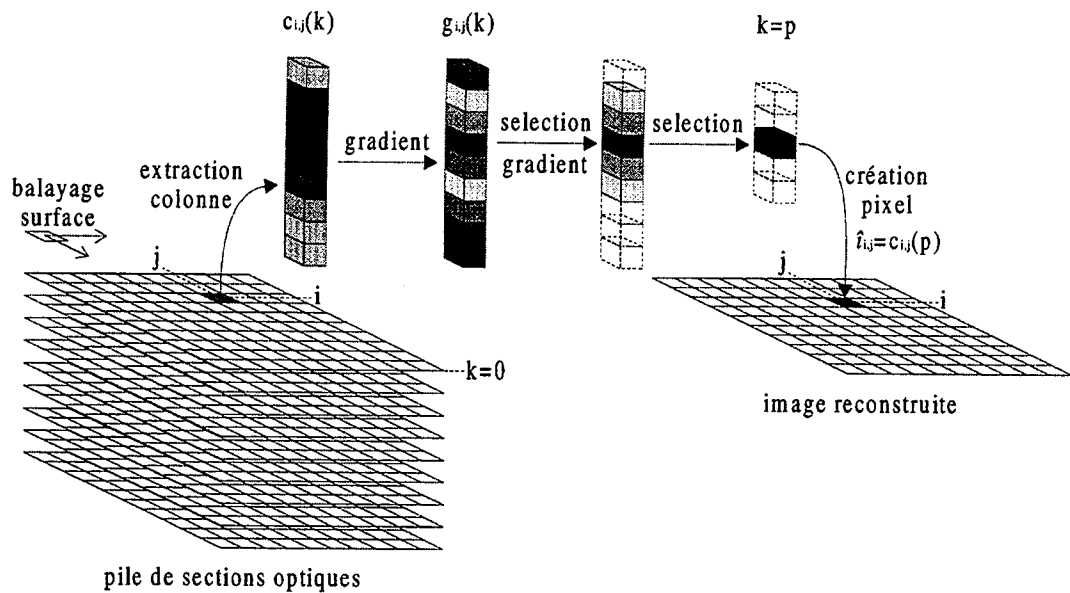


Figure 6-22. Schéma explicatif pour le calcul d'images à grandes profondeurs de champ.

Pour moins de sensibilité au bruit, on peut recourir à un lissage des images avant de procéder à la phase de parcours du volume.

La partie suivante est consacrée à l'application de cette méthode sur deux formes d'acquisition différentes, l'une en réflexion Figure 6-24, et l'autre en transmission.

## 6.6.2 Applications

Dans cette partie, nous allons présenter deux exemples, pour illustrer la méthode que nous avons développée, consacrée à la reconstruction d'une image à grande profondeur de champ calculée par l'intermédiaire d'une série de coupe optiques.

### 6.6.2.1 Images acquise en réflexion

La Figure 6-23 représente une série de coupes optiques acquises en réflexion. Hormis les coupes extrêmes, chaque image est focalisée sur une partie précise des

objets, mais aucune des images ne contient la totalité des objets en focus. La Figure 6-24 représente le résultat de la reconstruction par la méthode présentée précédemment. Tous les plans nets de la série de sections optiques apparaissent sur l'image reconstruite, ce qui nous donne l'impression d'une image acquise avec une grande profondeur de champ. On pourra apprécier la qualité du résultat de cette reconstruction. De plus, ces images ayant un très bon rapport signal sur bruit, il n'est pas nécessaire d'effectuer un débruitage au préalable des images, ce qui rend la reconstruction très rapide. Sur ces données, qui représentent un volume de 6 images de 348x661 pixels, le temps de calcul pour la reconstruction complète est inférieur à 2 secondes sur une station SGI à processeur RISC, 150 MHz.

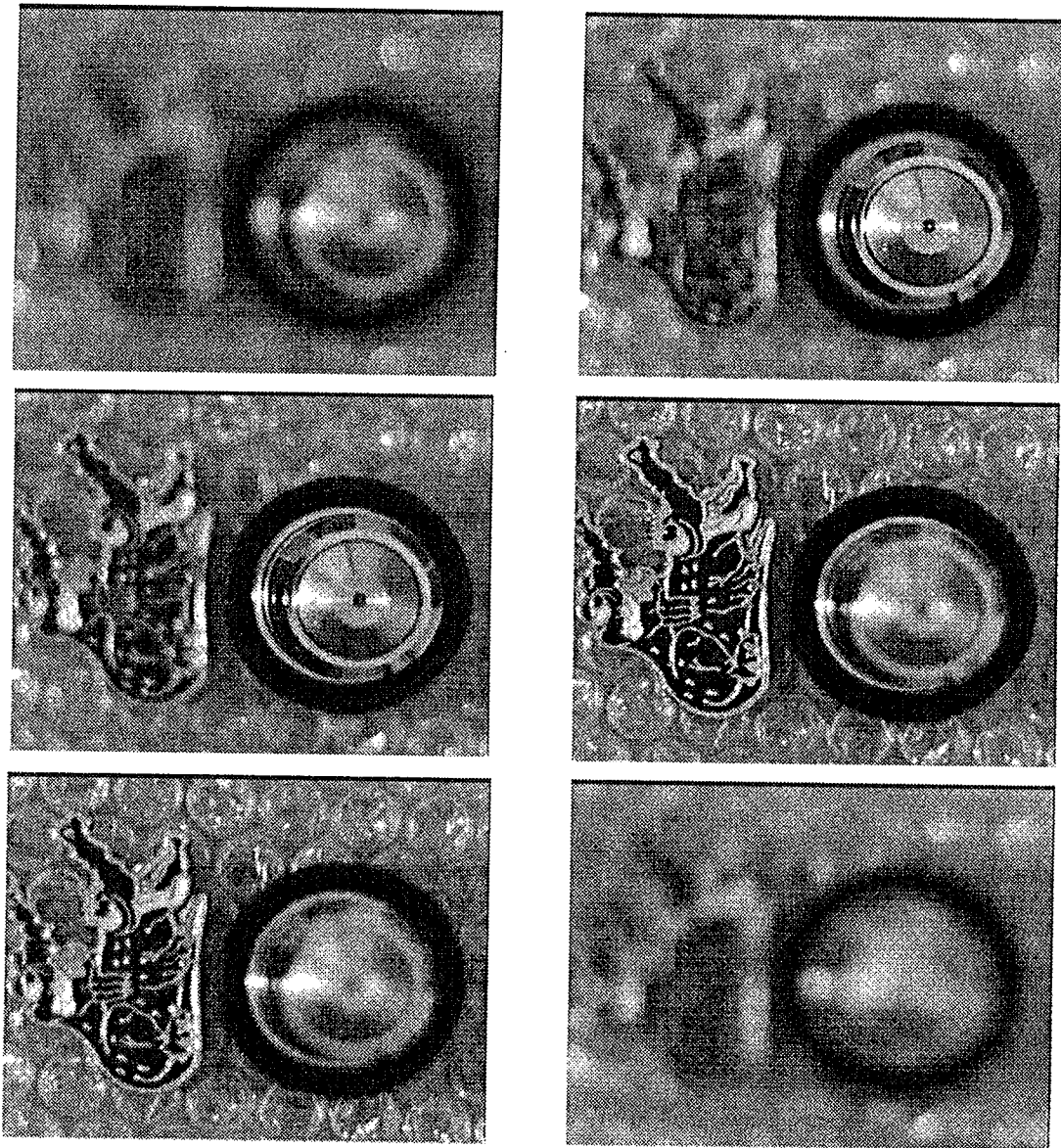


Figure 6-23. Série de coupes optiques acquises en réflexion.

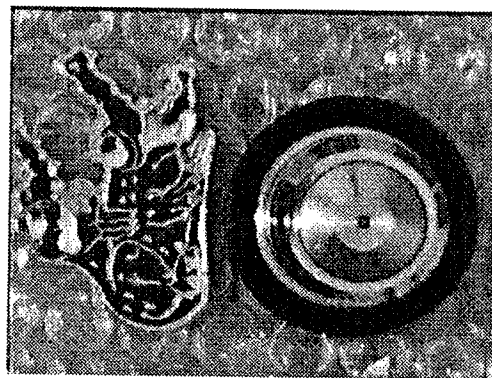


Figure 6-24. Reconstruction à partir de la série de coupes optiques de la Figure 6-23.

Nous avons bien sur noté, lors de la partie concernant le détail de la méthode, que ce cas représentait la situation idéale. Ce point est bien confirmé sur ces résultats.

### 6.6.2.2 Images acquises en transmission

Dans cette partie, nous allons observer les résultats de la méthode précédente appliquée à partir de coupes optiques acquises sur le microscope à rayons X en transmission de Göttingen à BESSY. La Figure 6-25 représente quelques unes des coupes optiques utilisées pour la phase de reconstruction. La série complète est représentée sur la Figure 3-15. Les images issues de la série de coupes optiques laissent bien apparaître différents plans distincts. Parmi ces plans, trois principaux plans se détachent clairement, à savoir la structure en forme de boule dans un premier plan, puis les deux tubes disjoints perpendiculairement l'un par rapport à l'autre.

Les résultats de la reconstruction sont représentés sur la Figure 6-26. Un gain en netteté observé sur les images reconstruites est flagrant. De plus, l'utilisation de l'étape de pré-filtrage de la série d'images, permet une meilleure robustesse au bruit de la méthode. Malgré quelques artefacts de reconstruction, visibles au bord de certaines structures, le résultat reste de bonne qualité et l'on peut noter la disparition quasi complète des rebonds de défocalisation.

Le temps de calcul pour la reconstruction de l'image à partir de 16 images de 512x512 pixels est de 9 secondes sur une station SGI à processeur RISC, 150 MHz. Ce temps passe à 50 secondes si l'on applique une étape de lissage adaptatif au préalable.

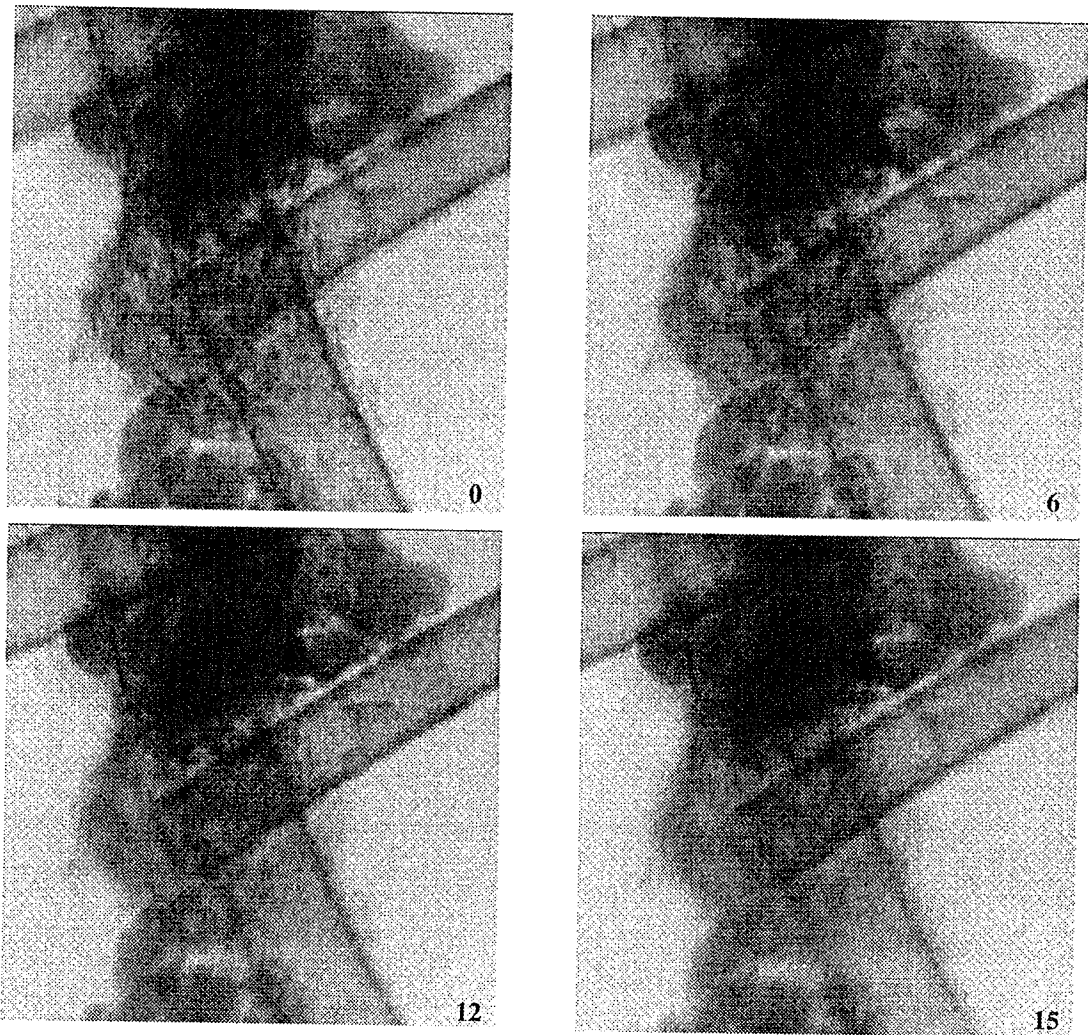


Figure 6-25. Coupes optiques réalisées sur le TXM de Göttingen à BESSY.

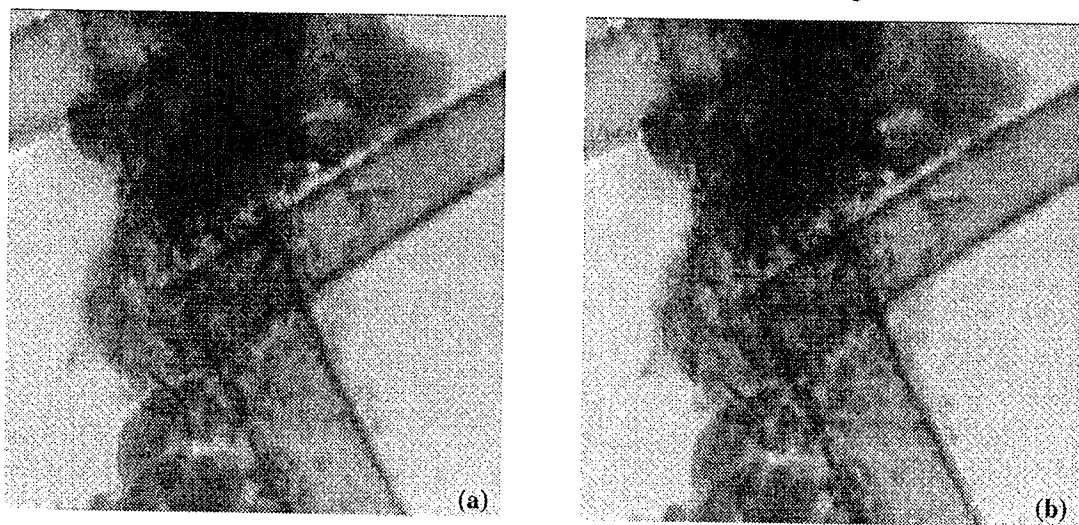


Figure 6-26. Reconstruction à partir de la série de coupes optiques de la Figure 6-25, sans lissage au préalable du bruit (a) et avec lissage au préalable du bruit (b).

### 6.6.3 Conclusion

La première limitation de ce modèle est l'impossibilité de traiter le cas où plusieurs objets se superposent, car il ne peut être retenu qu'un seul pixel sur l'axe des  $z$ . Son intérêt est qu'il est très rapide, et que le processus même d'acquisition est très simple. Ce modèle permet ainsi très rapidement d'apprécier l'information contenue dans le volume, mais ne peut évidemment pas être utilisé comme source d'information pour effectuer des mesures quantitatives par exemple.

## 6.7 Synthèse sur le traitement d'images en microscopie à rayons X

Dans ce chapitre, nous avons présenté plusieurs outils pour le traitement des images issues de la microscopie à rayons X, dans l'objectif d'améliorer la qualité de ces images. Pour ces travaux, nous avons exploité l'information au niveau des diverses sources de dégradation surgissant au niveau de la formation des images. Une première partie a consisté à corriger la non homogénéité des images, qui rend ces dernières difficiles à interpréter, et impossible à exploiter de manière quantitative. Puis, nous avons introduit et étudié l'algorithme de restauration itératif de Richardson-Lucy, dans un but d'améliorer la résolution et le contraste des images. Lors de cette étude, nous avons constaté qu'il était fondamental de posséder un modèle de réponse impulsionnelle du microscope le meilleur possible, et qu'une étude au préalable du processus de formation des images dans le microscope était nécessaire. Nous avons également constaté que cet algorithme de restauration donne de très bon résultats dans le cas d'images faiblement bruitées, mais qu'il présente des artefacts dès que les images à traiter sont trop fortement bruitées.

Or, la sensibilité aux rayons X de certains échantillons biologiques implique qu'ils soient exposés le moins longtemps possible, de manière à limiter les effets des radiations, et obtenir ainsi une image, ou une série d'images, la plus proche de la réalité. Malheureusement, la baisse du temps d'exposition se fait au détriment du rapport signal sur bruit des images ainsi acquises. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au

débruitage d'images acquises au microscope à rayons X avec de faibles temps d'exposition. A ce sujet, nous avons développé un algorithme combinant restauration et filtrage dans le domaine de Fourier. Nous avons vu que l'intérêt de cette technique est qu'elle diminue le niveau de bruit tout en préservant la résolution et le contraste des images, même si de nombreuses optimisations restent à apporter.

Enfin, dans les chapitres précédents, nous avons mesuré les possibilités concernant l'observation d'objets épais. Nous avons vu qu'un cas limite en microscopie à rayons X consistait à observer des échantillons de plusieurs microns d'épaisseurs, avec des objectifs offrant des profondeurs de champ de l'ordre du micron. C'est pourquoi nous avons développé un modèle qui consiste à reconstruire l'image d'un objet épais à partir de coupes focales successives de cet objet, de manière à obtenir une image intégrant toutes les contributions issues des différentes images. L'avantage de ce modèle est qu'il est très rapide à exécuter et qu'il ne nécessite pas d'étude précise du modèle de formation des images. Son inconvénient est qu'il ne donne pas de résultats parfaits, ne prenant pas en compte la formation des images, et ne peut donc pas être utilisé comme une étape préliminaire de tomographie par exemple.





## 7. Conclusion et perspectives

Dans ce mémoire, nous présentons le principe de formation des images en microscopie à rayons X. Puis, nous déterminons en détail la fonction de transfert du microscope à rayons X en transmission de Göttingen à BESSY. Ce microscope, dont nous donnons une description complète, est équipé pour l'observation d'échantillons biologiques. Nous présentons également quelques résultats d'acquisitions que nous avons effectuées et qui exploitent pleinement les ressources du microscope. Nous avons réalisé ces acquisitions dans l'optique d'utiliser le microscope à rayons X comme un outil complémentaire pour l'étude de l'organisation des chromosomes, qui est la thématique principale du laboratoire de recherche DyOGen. Nos résultats confirment que la microscopie à rayons X permet d'accéder à une information spécifique non accessible par d'autres techniques d'observation dans les mêmes conditions d'observation.

La limitation actuelle de la microscopie à rayons X est liée à l'action des radiations sur les échantillons biologiques. A ce sujet, nous avons pu constater, lors d'une étude sur les relations entre contraste et dose, que l'observation de structures dont les dimensions étaient proches de la limite de résolution du microscope, nécessitaient la prise en compte du modèle de formation des images dans le microscope. Une conséquence directe de cette prise en compte pour pouvoir observer de telles structures avec un contraste donné est une augmentation non négligeable de la dose, ce qui peut être à l'origine de dégradations irréversibles sur les échantillons.

Afin de réduire les effets des radiations, il est nécessaire de travailler avec des temps d'exposition très courts ce qui a pour conséquence directe une baisse du rapport signal sur bruit des images.

Or, nous avons vu qu'il était possible d'avoir recours à des traitement numériques d'images, afin de corriger toute source de diminution de contraste pendant la phase d'acquisition. Nous avons donc développé des outils spécifiques pour la correction, la restauration et le débruitage d'images, de manière à traiter les images acquises avec des temps d'expositions variables, dans le but d'augmenter la résolution et le contraste de ces images, ou de diminuer leur niveau de bruit.

De plus, bien qu'il subsiste encore de nombreux problèmes techniques concernant la vitrification des échantillons épais, grâce aux progrès récents réalisés dans le domaine de la cryomicroscopie, nous avons observé que les échantillons observés restaient stables pendant la phase d'acquisition. Ainsi, en s'affranchissant des problèmes dus aux effets des radiations, cette technique nous permet aujourd'hui d'observer des échantillons biologiques dans leur milieu naturel avec un niveau de résolution de l'ordre de 30 nm.

Les applications biologiques dans le domaine de la microscopie à rayons X restent encore peu nombreuses, alors que cette technique offre de nombreux points forts qui ne demandent qu'à être exploités. Le dernier congrès en date concernant la microscopie à rayons X (Würzburg 1996) nous a encore montré que, si les efforts concernant le développement et l'amélioration des optiques sont extraordinaires, ceux concernant les applications biologiques restent prometteurs mais encore très minoritaires.

Alors biologistes : à vos paillasses, près, partez !

# Bibliographie

- [Bennett 93] P. M. Bennett, G. F. Foster, C. J. Buckley, R. E. Burge, The effect of soft X-radiation on myofibrils, *Journal of microscopy*, Vol. 172, p. 109-119, (1993).
- [Berkaloff 81] A. Berkaloff, J. Bourguet, P. et N. Favvard, J.-C. Lacroix, **Biologie et physiologie cellulaire IV**, Collection Hermann, Paris, (1981).
- [Biemond 90] J. Biemond, R. L. Lagendijk, R. M. Mersereau, Iterative methods for image deblurring, *Proceedings of the IEEE*, Vol. 78, n°5, (1990).
- [Born 93] M. Born, E. Wolf, **Principles of optics**, 6<sup>ème</sup> édition, Pergamon Press, (1993).
- [Bruhat 92] G. Bruhat, **Cours de physique générale : optique**, 6<sup>ème</sup> édition, Masson, Paris, (1992).
- [Buckley 95] C. J. Buckley, The measuring and mapping of calcium in mineralised tissues by absorption difference imaging, *Reviews of Scientific Instruments*, (1995).

- [Burry 92] R. Burry, et al., Silver enhancement of gold antibodies probes in pre-embedding electron microscopic immunocytochemistry, *J. Histochem. Cytochem.*, Vol. 40, p. 1849-1856, (1992).
- [Cazaux 89] J. Cazaux, Minimal detectable dimension, resolving power and quantification of scanning Auger microscopy at high lateral resolution, *Surface and interface analysis*, Vol. 14, p. 354-366, (1989).
- [Cazaux 93] J. Cazaux, A new quantification procedure for elemental mapping by x-ray (absorption) microscopy, *Microsc. Microanal. Microstruct.*, Vol. 4, p. 513-537, (1993).
- [Chehdi 93] K. Chehdi, Identification de la nature du bruit pour un filtrage optimal, *Quatorzième colloque GRETSI*, (1993).
- [Chen 94] K. Chen, T. V. Ramabadran, Near Lossless compression of medical images through entropy-coded DPCM, *IEEE transaction on medical imaging*, vol. 13, n°3, p. 538-548, (1994).
- [Cocquerez 95] J.-P. Cocquerez, S. Philipp, **Analyse d'images : filtrage et segmentation**, Masson, (1995)
- [Davoine 96] F. Davoine, Compression d'images par fractale basée sur une triangulation de Delaunay, Thèse de l'Université Joseph Fourier, Grenoble, (1996).
- [Diehl 90] M. Diehl, Experimental determination of the modulation transfer function of the Göttingen laboratory x-ray microscope, dans [Michette 92], p. 290-292, (1992).
- [Douglas 90] **Form and function**, ed. Douglas Vaughan, Lawrence Laboratory, (1990).

- 
- [Erko 94] A. I. Erko, V. V. Aristov, **X-Ray Microscopy IV**, Chernogolovka, Moscow, (1994).
- [Foster 94] G. F. Foster, P. M. Bennett, C. J. Buckley, R. E. Burge, Structural radiation damage to mammalian myofibrils, dans [Erko 94], (1994).
- [Folwes 89] G. R. Folwes, **Introduction to modern optics**, 2<sup>nd</sup> edition, Dover publication, New York, (1989).
- [Fujisaki 95] H. Fujisaki, S. Takahashi, H. Ohzeki, K. Sugisaki, H. Kondo, H. Nagata, H. Kato, S. Ishiwata, Soft X-ray damage to biological samples, *Journal of Microscopy*, Vol. 182, p. 79-83, (1996).
- [Gaskill 78] J. D. Gaskill, **Linear systems, Fourier transforms and optics**, J. Wiley & Sons, (1978).
- [Gözl 92] P. Gözl, Calculation on radiation dosages of biological materials in phase contrast and amplitude contrast x-ray microscopy, dans [Michette 92], p. 313-315, (1992).
- [Gonzales 87] R.C. Gonzales, P. Wintz, **Digital image processing**, Addison Wesley, 2<sup>nd</sup> édition, (1987).
- [Goodman 68] J.W. Goodman, **Introduction to Fourier optics**, McGraw-Hill, New York, (1968).
- [Gutmann 90] P. Guttmann, G. Schneider, M. Robert-Nicoud, B. Niemann, D. Rudolph, J. Thieme, M. Jovin, G. Schnahl, X-ray microscopy investigation on polythene chromosomes isolated from salivary glands of Chironomus Thummi larvae, dans [Michette 90], (1990).
- [Hecht 80] E. Hecht, A. Zajac, **Optics**, Addison-Wesley, 6<sup>ème</sup> édition, Philippines, (1980)
- [Henke 93] B. L. Henke, E. M. Gullikson, J. C. Davis, X-ray interaction : photoabsorption scattering, transmission, and reflection at E=50-

- 30000 eV, Z=1-92, *Atomic data and nuclear data tables*, Vol. 54, p. 181-342, (1993).
- [Jain 89] A. K. Jain, **Fundamentals of digital image processing**, Prentice-Hall, (1989).
- [Kaulich 94] B. Kaulich, Nanostructures with high aspect ratios for phase zone plates for a phase contrast x-ray microscope at ESRF for wavelengths around 0.3 nm, dans [Erko 94], p. 131-135, (1994).
- [Kirz 74] J. Kirz, Phase zone plate for x-rays and the extreme UV, *Journal of the optical society of America*, N° 64, p. 301-309, (1974).
- [Kirz 94] J. Kirz, C. Jacobsen, M. Howells, Soft x-ray microscope and their biological applications, *Quarterly reviews of biophysics*, (1994)
- [Kirz 85] J. Kirz, D. Sayre, Soft x-ray microscopes, *Review of scientific instrument*, N° 56, p. 1-13, (1985).
- [Kunt 93] M. Kunt, G. Granlund, M. Kocher, **Traitement numérique des images**, Presses polytechniques et universitaires romandes, (1993)
- [Lee 80] J. S. Lee, Digital image enhancement and noise filtering by use of local statistics, *IEEE transaction on pattern analysis and machine intelligence*, Vol. 2, p. 165-168, (1980).
- [Lehr 95] J. Lehr, 3D x-ray microscopy : High resolution stereo-imaging with the Göttingen x-ray microscope at BESSY, *Zoological studies*, N°34, supplement, p. 137-138, (1995).
- [Lehr 96] J. Lehr, 3D x-ray microscopy : tomographic imaging of mineral sheaths of bacteria leptothrix ochracea with the Göttingen x-ray microscope at BESSY, *Optik*, sous presse.

- 
- [Mammone 87] R. FJ. Mammone, R. J. Rothacker, General iterative method of restoring linearly degraded images, *Journal of Optical Society of America*, Vol. 4, n°1, p. 208-215, (1987).
- [Meinel 86] E. S. Meinel, Origins of linear and nonlinear recursive restoration algorithms, *Journal of Optical Society of America A*, Vol. 3, N°6, p. 787-799, (1986).
- [Meyer-Ilse 93] W. Meyre Ilse, T. Wilhein, P. Guttman, Thinned back illuminated CCD for x-ray microscopy, *Charged-coupled devices and solid state optical sensor III*, Vol. 1900, Society of photo-optical instrumentation engineers (SPIE), (1993).
- [Michette 86] A. G. Michette, **Optical systems for soft x-rays**, Chapitre 8, Plenum Press, (1986).
- [Michette 92] A. G. Michette, G. R. Morrison, C. J. Buckley, **X-ray microscopy III**, Springer-Verlag, Berlin, (1992).
- [Moulton 96] C. Moulton-Clemson et al., XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase : evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure, *J. Cell Biol.*, Vol. 132, P. 259-275, (1996).
- [Niemann 74] B. Niemann, D. Rudolph, G. Schmahl, Soft x-ray imaging zone plates with large zone numbers for microscopic and spectroscopic applications, *Optics Communications*, 12, p. 160-163, (1974).
- [Niemann 94] B. Niemann, G. Schneider, P. Guttman, D. Rudolph, G. Schmahl, The new Göttingen x-ray microscope with object holder in air for wet specimens, dans [Erko 94], p. 66-75, (1994).
- [Oestreich 95] S. Oestreich, Untersuchungen über einen Kondensator mit hoher Apertur für ein Röntgenmikroskop an einer synchrotronstrahlungsquelle, Diplomarbeit, (1995).



- [Richardson 72] W. H. Richardson, Bayesian-based iterative method for image restoration, *Journal of the Optical Society of America*, Vol. 62, N°1, p. 55-59, (1972).
- [Robert-Nicoud 84] M. Robert-Nicoud, D. J. Arndt-Jovin, D. A. Zarling, T. M. Jovin, Immunological detection of left-handed Z DNA in isolated polytene chromosomes. Effects of ionic strength, pH, temperature and topological stress, *EMBO Journal*, Vol. 3, N°4, p. 721-731, (1984).
- [Robert-Nicoud 75] M. Robert-Nicoud, Isolation and manipulation of salivary gland, nuclei and chromosomes, **Methods in cell biology**, ed. D. M. Prescott, Vol. IX, Academic Press, New York, p. 377-390, (1975).
- [Röntgen 1895] W.C. Röntgen, Über eine neue art von Strahlen, I Mitteilung, Sitzungsber, *Phys. Med. Ges., Würzburg*, 137, p. 41, (1895).  
*Traduction en anglais dans Nature 53, p. 274.*
- [Rosenfeld 82] A. Rosenfeld, A. C. Kak, **Digital picture processing**, 2<sup>nd</sup> edition, Werner Rheinboldt, (1982).
- [Rudolph 84] D. Rudolph, B. Niemann, G. Schmahl, O. Christ, The Göttingen x-ray microscope and x-ray microscopy experiments at the BESSY storage ring, dans [Schmahl 84], p. 192-202, (1984).
- [Rudolph 90] D. Rudolph, G. Schmahl, B. Niemann, Amplitude and phase contrast in x-ray microscopy, **Modern Microscopies**, p. 59-67, Duke et Michette, New York, (1990).
- [Sayre 77] D. Sayre, J. Kirz, R. Feder, D. M. Kim, E. Spiller, transmission microscopy of unmodified biological materials : comparative dosages with electrons and ultrasoft x-ray photons, *Ultramicroscopy*, Vol. 2, p. 337-341, (1977).

- [Sayre 88] D. Sayre, W. Yun, J. Kirz, H. Rarback, **X-ray microscopy II**, Springer-Verlag, Berlin, (1988).
- [Scalettar 96] B. A. Scalettar, J. R. Swedlow, J. W. Sedat, D. Agard, Dispersion, aberration and deconvolution in multi-wavelength fluorescence images, *Journal of microscopy*, Vol. 182, p. 50-60, (1996).
- [Schafer 81] R. W. Schafer, R.M. Merseau, M. A. Richards, Constrained iterative signal restoration algorithms, *Proceedings of the IEEE*, Vol. 69, p. 432-450, (1981).
- [Schmahl 84] G. Schmahl, D. Rudolph, **X-ray microscopy**, p. 192-202, Springer-Verlag, Berlin, (1984).
- [Schmahl 94] G. Schmahl, P. Guttman, G. Schneider, B. Niemann, C. David, T. Wilhein, J. Thieme, D. Rudolph, dans [Erko 94], p. 196-206, (1994).
- [Schneider 92] G. Schneider, B. Niemann, Environmental chamber for x-ray imaging of wet biological specimens, dans [Mchette 92], p. 350-354, (1992).
- [Schneider 94] G. Schneider, Investigation of soft x-ray microscopy induced structural changes in wet biological objects, dans [Erko 94], p. 181-195, (1994).
- [Schneider 95a] G. Schneider, T. Schliebe, H. Aschoff, Cross-linked polymers for nanofabrication of high-resolution zone plates in nickel and germanium, *J. Vac. Sci. Technol. B*, Vol. 13, p. 2809-2812, (1995).
- [Schneider 95b] G. Schneider, B. Niemann, P. Guttman, D. Rudolph, G. Schmahl, Cryo x-ray microscopy, *Synchrotron radiation news*, Vol. 8, N°3, p. 19-28, (1995)

- [Seger 93] O. Seger, Model building and restoration with applications in confocal microscopy, Thèse de l'Université de Linköping, Departement of Engireering, Suède, (1993).
- [Sibarita 95-a] J.-B. Sibarita, J.M. Chassery, M. Robert-Nicoud, Image restoration applied to x-ray microscopy, *SPIE*, Vol. 2329, p. 337-347, (1995).
- [Sibarita 95-b] J.-B. Sibarita, J.-M. Chassery, M. Robert-Nicoud, Restauration d'images appliquée à la microscopie à rayons X, *Quinzième Colloque GRETSI*, p. 471-474, (1995).
- [Sibarita 96] J.-B. Sibarita, J. Lehr, J.-M. Chassery, Image restoration in x-ray microscopy. Application to biological studies, *IEEE Transaction on Image Processing*, accepté 1996.
- [Sibarita 97] J.-B. Sibarita, J. Lehr, M. Robert-Nicoud, J.-M. Chassery, P. Guttman, G. Schmahl, Image quality enhancement in x-ray microscopy, dans [Thieme 97], sous presse, (1997).
- [Susini 97] J. Susini, The x-ray microscopy facility project at the ESRF, dans [Thieme 97], sous presse, (1997).
- [Thieme 94] J. Thieme, C. David, N. Fay, B. Kaulich, R. Mendenwalt, M. Hettwer, P. Guttman, U. Kögler, J. Maser, G. Schneider, D. Rudolph, G. Schmahl, Zone plate for high resolution x-ray microscopy, dans [Erko 94], p. 487-493, (1994).
- [Thieme 97] J. Thieme, **X-ray microscopy V**, sous presse, (1997).
- [Trachuk 91] D. C. Trachuk, et al., Clinical applications of fluorescence in situ hybridization, *GATA*, Vol. 8, p. 67-74, (1991).
- [Williams 93] S. Williams, X. Zhang, C. Jacobsen, J. Kirz, S. Lindaas, J. Van't Hof, S.S. Lamm, Measurement of wet metaphase chromosomes in

- 
- the scanning transmission x-ray microscope, *Journal of Microscopy*, Vol. 170, p. 155-165, (1993).
- [Wilhein 94] T. Welhein, D. Rothweiler, A. Tusche, F. Scholze, W. Meyer-Ilse, Thinned, back illuminated CCDs for x-ray microscopy, dans [Erko 94], p. 470-474, (1994).
- [Zhang 94] X. Zhang, R. Bahlorn, C. Jacobsen, J. Kirz, S. Williams, Mapping DNA and protein in biological samples using the scanning transmission x-ray microscope, *Proceedings of the 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Microscopy Society of America*, San Francisco, p. 50-51, (1994).



# Annexe A

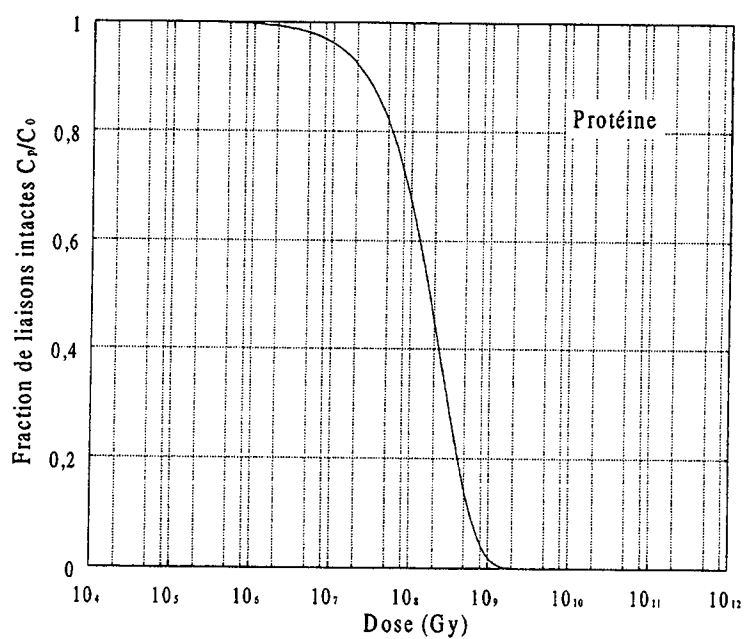


Figure A-1. Fraction de liaisons chimiques intactes dans la protéine en fonction de la dose appliquée dans le cas d'échantillons fixés. Extrait de [Schneider 93].

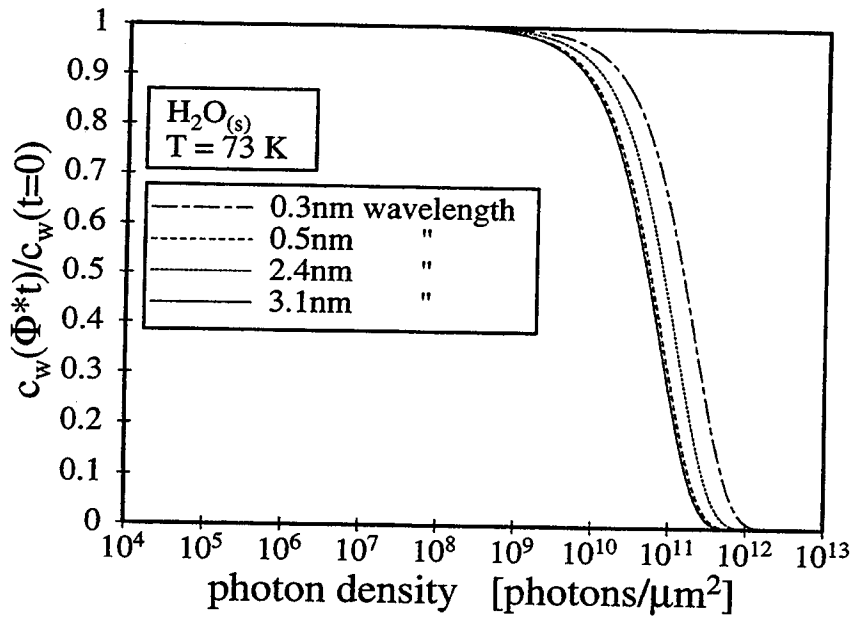


Figure A-2. Fraction de liaisons chimiques intactes dans la molécule d'eau à 73 °K en fonction de la densité de photons, pour les longueurs d'ondes de 0,3, 0,5, 2,4 et 3,1 nm respectivement. Extrait de [Schneider 95b].

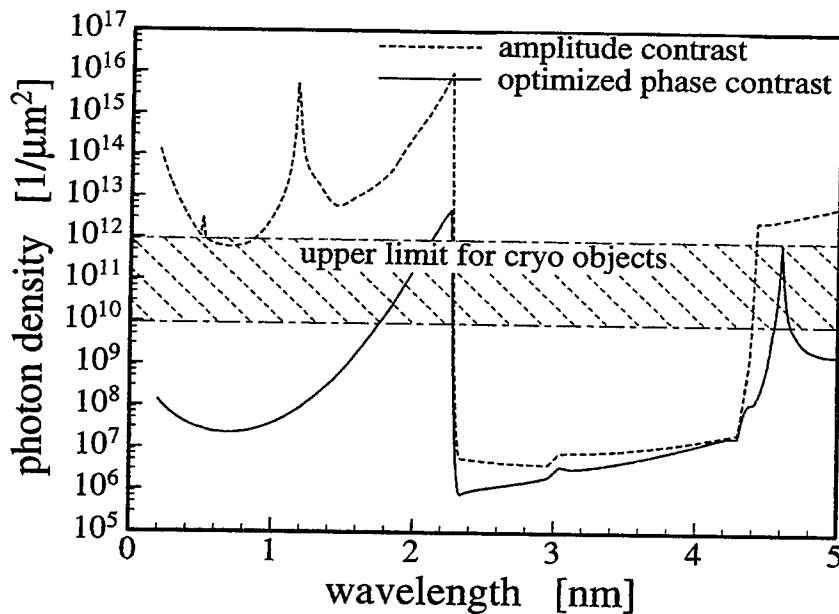
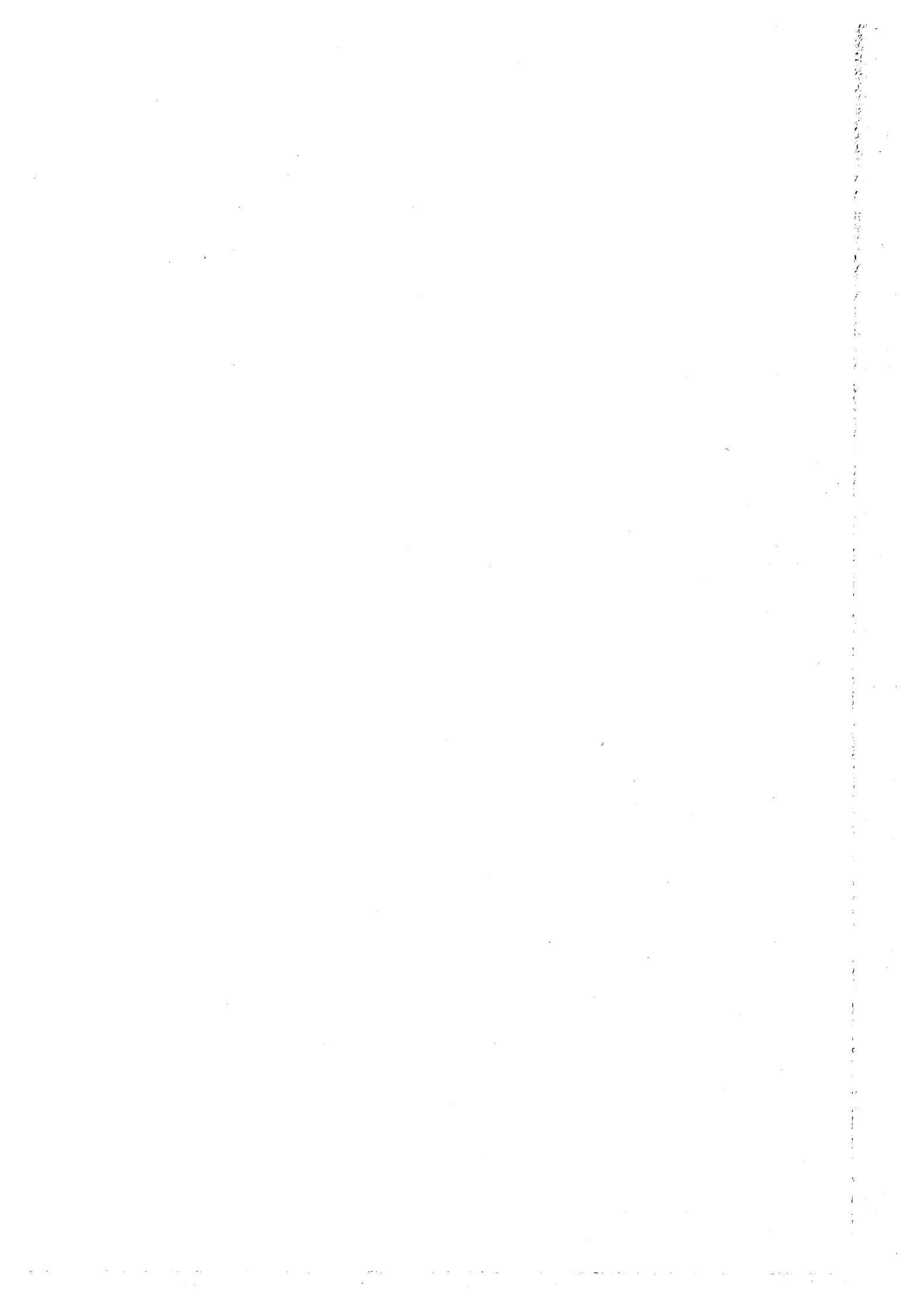


Figure A-3. Densité de photons dans le plan objet nécessaire à la visibilité d'une structure de protéine de 50 nm dans la glace, en contraste d'amplitude et contraste de phase. Les calculs ont été réalisés pour un rapport signal sur bruit de 3, pour une fonction de transfert supposée valoir l'unité, et pour une épaisseur de glace de 10 μm. Extrait de [Schneider 95b].





## **RESUME**

Technique récente, la microscopie à rayons X offre aujourd'hui une résolution spatiale supérieure à celle de la microscopie optique (20 nm contre 200 nm en microscopie optique confocal laser). Elle offre également un meilleur pouvoir de pénétration que la microscopie électronique (jusqu'à 10  $\mu\text{m}$  contre 1  $\mu\text{m}$  en microscopie électronique à moyenne et haute tension). Ainsi, la microscopie à rayons X mous (longueurs d'onde comprises entre 2,4 et 4,3 nanomètres) permet l'analyse à haute résolution en 2 ou 3 dimensions d'échantillons biologiques placés dans des conditions proches de leur milieu naturel (contrairement aux microscopes électroniques classiques qui imposent une préparation des échantillons).

Cependant, la réduction de la dose absorbée par l'échantillon nécessite des durées d'expositions aussi courtes que possible. Or, effectuer une acquisition avec peu de photons se fait au détriment du rapport signal sur bruit des images. Un de nos objectifs a été le développement d'outils pour l'amélioration et la restauration de ces images.

La première partie de nos travaux a consisté à déterminer la fonction de transfert du microscope à rayons X en transmission et à comparer les résultats obtenus avec le modèle théorique de la formation des images. Dans la seconde partie, nous avons complété les modèles existants liant le nombre de photons et le contraste, en prenant en compte le mode de formation des images dans le microscope. La troisième partie de ces travaux concerne le développement de techniques de traitement numérique des images dans le but d'améliorer et de restaurer des images obtenues par microscopie à rayons X avec de faibles temps d'exposition. Ces processus ont été appliqués à l'étude par microscopie à rayons X de différents types d'échantillons biologiques.

## **ABSTRACT**

X-ray microscopy offers a higher spatial resolution than optical microscopy (20 nm versus 200 nm for confocal laser microscopy), and provides a higher penetration power than electron microscopy (about 10  $\mu\text{m}$  versus 1  $\mu\text{m}$  in electron microscopy). Consequently, soft x-ray microscopy (wavelengths between 2.4 and 4.3 nm) allows 2D or 3D high resolution analysis of biological specimens in their native state, i.e. in an aqueous environment and without fixation.

However, in order to minimise the radiation dose applied on the sample, it is necessary to keep exposure time as short as possible. Unfortunately, acquiring images with few photons, leads to images with low signal to noise ratio. One of our objectives was to develop tools for image enhancement and image restoration, in order to compensate this low image quality.

The first part of our work was devoted to the determination of the transfer function of the x-ray microscope, and to the comparison of the results with the theoretical model of image formation. In the second part, we have modified existing models dealing with the relationship between the number of photons and the contrast by taking into account the image formation process in the microscope. The third part of this work concerns the development of specific numerical treatments for image enhancement and image restoration applied on x-ray microscopy images obtained with short exposure time. These procedures were applied to study various biological samples in x-ray microscopy.