



**HAL**  
open science

## Suivi 3D de nanoparticules d'or par holographie digitale

Frédéric Verpillat

► **To cite this version:**

Frédéric Verpillat. Suivi 3D de nanoparticules d'or par holographie digitale. Instrumentations et Détecteurs [physics.ins-det]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66301 . tel-00836925

**HAL Id: tel-00836925**

**<https://theses.hal.science/tel-00836925>**

Submitted on 21 Jun 2013

**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 DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité : Physique

Ecole doctorale 389

Présentée par  
**Frédéric VERPILLAT**

pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

**Suivi 3D de nanoparticules d'or  
par holographie digitale**

Soutenue le 06 juillet 2012

devant le jury composé de :

Mme	Agnès	<b>Maître</b>	Examinatrice
Mme	Anne	<b>Sentenac</b>	Rapporteur
M.	Pierre	<b>Marquet</b>	Rapporteur
Mme.	Corinne	<b>Fournier</b>	Examinatrice
M.	Gilles	<b>Tessier</b>	Examineur
M.	Michel	<b>Gross</b>	Directeur de thèse
M.	Pierre	<b>Desbiolles</b>	Membre invité



---

## Table des matières

---

<b>Introduction</b>	<b>5</b>
<b>I Holographie digitale à décalage de phase</b>	<b>9</b>
I.A Principe de l'holographie . . . . .	10
I.B Holographie digitale . . . . .	17
I.C L'holographie à décalage de phase . . . . .	25
<b>II Développement du microscope holographique pour le suivi en 3D de nanoparticules d'or</b>	<b>43</b>
II.A Diffusion de lumière par une nanoparticule d'or . . . . .	45
II.B Mouvement brownien d'une nanoparticule dans un fluide . . . . .	56
II.C Réalisation du montage de microscopie holographique. . . . .	58
<b>III Développement d'un algorithme de reconstruction rapide pour la microscopie holographique</b>	<b>65</b>
III.A Technique de parallélisation des calculs sur une carte graphique . . . . .	66
III.B Algorithme de reconstruction des hologrammes . . . . .	69
III.C Amélioration de la vitesse de reconstruction . . . . .	80
<b>IV Résultats expérimentaux</b>	<b>83</b>
IV.A Observation de nanoparticules de 100 nm fixées dans un gel . . . . .	84
IV.B Suivi de nanoparticules de 100 nm en diffusion Brownienne dans l'eau . . .	93
IV.C Résultat préliminaire d'observation de nanoparticules dans des cellules vivantes . . . . .	100
IV.D Critiques, limites et perspectives . . . . .	112
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>115</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>117</b>
<b>Table des figures</b>	<b>125</b>



# Suivi 3D de nanoparticules d'or par holographie digitale.

## Résumé

Nous présentons dans ce manuscrit un dispositif optique combinant l'holographie digitale et la microscopie en champ noir dans le but de suivre en trois dimensions des nanoparticules d'or en mouvement dans des fluides transparents ou des milieux biologiques. Ce montage permet à partir d'un seul hologramme de localiser simultanément plusieurs particules en mouvement dans un volume épais, avec une précision de localisation indépendante de la position des particules. Nous rappelons tout d'abord le principe de l'holographie et nous dresserons un état de l'art des techniques de suivi 3D existantes utilisant l'holographie digitale. Nous expliquerons pourquoi l'utilisation d'une illumination en champ noir est nécessaire à l'observation de nanoparticules, étant donné leur très faible section efficace de diffusion. Ensuite, nous décrirons le dispositif mis en place ainsi que le logiciel développé pour la reconstruction des hologrammes numériques en temps réel. Enfin, nous présenterons les résultats expérimentaux obtenus sur des particules en mouvement brownien ainsi que des résultats préliminaires de localisation de nanoparticules injectées dans des cellules vivantes.

**Mots clés :** Holographie digitale, microscopie, suivi 3D, nanoparticule, diffusion

# 3D tracking of gold nanoparticles by digital holography.

## Abstract

We present a new technique that combines off-axis Digital Holography and Dark Field Microscopy to track in three dimensions gold nanoparticles diffusing in a fluid or in biological medium. We show that a single hologram is sufficient to localize several particles in a thick sample with a localization accuracy independent of the particle position. First, we remind the principle of digital holography then we present existing technique of 3D tracking using holography. We explain why we use a dark field illumination because of the small scattering cross section of nanoparticles. Then we describe the optical setup and the software developed to reconstruct holograms in real time. Finally, we present experimental results of 3D tracking of brownian nanoparticles and preliminary results of localization in living cells.

**Key words :** Digital holography, microscopy, 3D tracking, nanoparticle, scattering

En biologie, l'étude de processus cellulaires à l'échelle de la molécule unique est un domaine de recherche en plein essor. La localisation et le suivi des protéines individuelles à l'intérieur de cellules vivantes permet d'étudier les mécanismes naturels de diffusions et de transport propres aux cellules. Des informations quantitatives peuvent être extraites de l'analyse des trajectoires de ces molécules uniques. La technique standard en biologie utilisée pour le suivi de molécule unique est la microscopie de fluorescence (SMFM – Single Molecule Fluorescence Microscopy) [1]. Cette technique consiste à associer la molécule étudiée à un fluorophore ou un quantum dots et à imager au travers d'un filtre adapté la lumière de fluorescence. L'avantage de cette technique est qu'elle permet d'isoler le signal optique provenant des molécules marquées de la diffusion parasite de lumière par la cellule. Cependant la technique standard de microscopie de fluorescence ne permet de suivre les molécules marquées qu'en 2 dimensions car elle ne donne aucune information sur la position de la cible le long de l'axe optique. Des développements récents en SMFM ont permis de réaliser un suivi 3D. Nous citerons parmi eux l'utilisation d'optique adaptative [2, 3], l'imagerie multi-plans [4, 5], la microscopie «  $4-\pi$  » [6], ou encore l'utilisation de PSF en double hélice [7]. Ces techniques ont permis d'atteindre des précisions de localisation nanométriques sur des profondeurs de typiquement 1 micron. Cette limitation sur la profondeur de champ est due à l'utilisation d'objectif de microscope de grande ouverture numérique ( $NA > 1$ ). Le suivi en trois dimensions d'une cible sur une profondeur supérieure au micron impose en SMFM de constamment ajuster mécaniquement la hauteur du plan focal de l'objectif. Le balayage mécanique de l'échantillon limite alors fortement la résolution temporelle du suivi.

L'holographie digitale utilisée en microscopie (DHM – Digital Holographic Microscopy) est une possible alternative à la microscopie de fluorescence. En holographie digitale, une caméra CCD enregistre le motif d'interférence entre le champ optique diffusé par l'échantillon et une onde de référence. Ce motif d'interférence, appelé hologramme, contient l'amplitude et la phase du champ optique diffusé par l'objet étudié. La propagation de l'hologramme par des calcul d'optique de Fourier permet de reconstruire une cartographie en trois dimensions du champ complexe optique à l'intérieur de l'échantillon, sur une profondeur de typiquement 100  $\mu\text{m}$ . De nombreuses équipes de recherche ont utilisé l'holographie digitale en biologie, pour par exemple imager en 3D des cellules [8–10], étudier la modification de la structure d'une cellule au cours du temps [11] ou encore observer la dynamique de certains

processus cellulaires [12]. Cette technique permet également à partir d'un seul hologramme de localiser en trois dimensions des particules à l'intérieur d'un milieu transparent. De nombreuses publications démontrent la possibilité de réaliser un suivi en 3D de particules micrométrique en microscopie holographique *in-line*, notamment pour des applications en rhéologie [13–20]. La difficulté dans ce genre d'expérience est de diminuer la taille des particules cibles. L'efficacité de la diffusion d'une particule est proportionnelle à son rayon élevé à la puissance 6 [21]. L'observation de particules inférieures au micron nécessite un développement technologique supplémentaire par rapport au montage d'holographie *in-line*. La localisation de nanoparticules d'or de 50 à 200 nm dans un gel d'agarose a été montrée [22] en utilisant l'holographie digitale hors-axe [23, 24]. Plus récemment des nanoparticules d'or de 40 nm fixées sur des récepteur de la membrane cellulaire ont été observées en DHM [25, 26]. Nous avons choisi de travailler avec des particules d'or pour plusieurs raisons. Tout d'abord, ces particules ont la propriété d'être de bon diffuseur de lumière dans le domaine spectrale visible [27, 28]. De plus, nous utilisons la diffusion de lumière par ces particules, ce qui rend le signal très stable comparé à l'émission de fluorophores ou de quantum dots. Le nombre total moyen de photons émis par une protéine fluorescente est de l'ordre de quelques milliers avant le *bleaching* de la protéine [29]. L'absence de *bleaching* dans le cas de la diffusion de lumière par une particule d'or permet l'observation de ces marqueurs sur des durées plus longues qu'en microscopie de fluorescence. Les nanoparticules d'or sont également des marqueurs très intéressants en biologie, car elles sont inertes, non toxiques et facilement fonctionnalisables. Leur utilisation se généralise en biologie [30, 31], par exemple pour le suivi intra-cellulaire de particules en photothermie [32–34], la détection de cancer [35] ou encore en temps que vecteur de molécules [36].

Le projet de cette thèse est de développer un montage optique utilisant l'holographie digitale spécialisé pour le suivi 3D de nanoparticules d'or en mouvement. Dans ce but, nous avons combiné l'holographie hors-axe avec une illumination en champ noir pour suivre des nanoparticules d'or sur une profondeur 100 fois plus grande que la profondeur de champ d'un microscopie classique. Les applications possibles d'un tel montage sont multiples : une première idée serait d'injecter les nanoparticules dans une cellule vivante et de les fixer sur les moteurs protéiques afin d'étudier le transport intra-cellulaire [37]. Une autre application possible est l'étude de la diffusion dans des milieux encombrés. Les lois statistiques de temps de premier passage dans des milieux complexes ont été établies théoriquement par Condamine et al. [38]. Notre montage pourrait permettre de vérifier expérimentalement ces lois de diffusions.

**Organisation du manuscrit** Ce manuscrit de thèse peut se décomposer en deux grandes parties : le chapitre 1 d'une part, dans lequel nous rappelons le principe de l'holographie et nous présentons des résultats obtenus sur une expériences annexes au projet, et les chapitres 2, 3 et 4 dédiés à la conception puis à l'exploitation du montage optique de suivi 3D.

Le chapitre 1 permet de rappeler au lecteur les principes de l'holographie classique et digitale, ainsi que les calculs de reconstructions numériques des hologrammes. L'holographie hors-axe et la technique de l'holographie à décalage de phase seront également présentées. Nous présentons à la fin de ce chapitre des résultats originaux obtenus sur un montage d'holographie digitale en illumination stroboscopique pour l'étude d'objet en vibration. Les résultats obtenus en combinant l'holographie digitale avec une illumination stroboscopique montrent la possibilité de reconstruire le champ de vitesse instantané d'un objet en vibration, en balayant l'ensemble des harmoniques du spectre Doppler réfléchi par l'objet. Notre

---

montage optique utilisant des modulateurs acousto-optiques permet de réaliser l'étude de manière robuste et totalement automatisée. Ce projet annexe n'entre pas dans le sujet même de cette thèse, mais m'a permis de me familiariser avec les techniques d'holographie digitale et les calculs de reconstructions, afin d'être ensuite plus autonome dans la conduite du projet principal. Ceci m'a également permis de cibler une des limites de nos montages d'holographie digitale : les temps de calculs très long nécessaire à la reconstruction des hologrammes. C'est pourquoi j'ai ensuite pris l'initiative de développer un algorithme de reconstruction rapide, qui est aujourd'hui adopté par toute l'équipe de recherche et par plusieurs équipes avec lesquelles nous avons collaboré.

Le chapitre 2 présente la conception du montage optique. Nous avons évalué tout d'abord l'efficacité attendue de la diffusion de lumière par une nanoparticules d'or, en utilisant les modèles de Mie et de Rayleigh. Le signal attendu étant de l'ordre de  $10^{-8}$  fois inférieur à l'intensité de l'illumination, il n'est plus possible d'utiliser les montages existants d'holographie « in-line » pour réaliser le suivi 3D de ces particules. Nous avons testé plusieurs géométries d'illumination en champ noir et nous avons choisi d'utiliser un objectif en réflexion. Dans la suite de ce chapitre, nous rappelons les lois statistiques du mouvement brownien de nanoparticules dans l'eau. L'évaluation du coefficient de diffusion a permis d'anticiper le déplacement des nanoparticules entre deux hologrammes en fonction de la période d'acquisition. Nous décrivons dans la dernière section de ce chapitre le montage optique développé pour répondre à la problématique.

Le chapitre 3 résume le travail réalisé en programmation sur la reconstruction des hologrammes numériques. Les hologrammes sont reconstruits en 2 étapes. Dans un premier temps, notre algorithme propage les hologrammes dans le plan de la pupille arrière de l'objectif de microscope par la méthode de Fresnel. Cette première propagation permet d'isoler précisément l'ordre de diffraction contenant l'information sur le champ diffusé par l'échantillon et de corriger à la fois la phase quadratique introduite par l'objectif et l'angle de la géométrie hors-axe. Ensuite l'algorithme reconstruit une cartographie en trois dimensions du champ optique diffusé dans l'échantillon par propagation successives du champ par la méthode du spectre angulaire. Les calculs sont parallélisés sur les processeurs d'une carte graphique grâce à la technologie CUDA, ce qui a permis de diminuer les temps de calculs d'un facteur 120. Des opérations telles que l'affichage d'une tranche de l'échantillon ou la localisation d'une nanoparticule unique peuvent maintenant être réalisées en temps réel grâce à ce travail accompli en programmation. Nous disposons actuellement d'un outil de reconstruction rapide, confortable d'utilisation et très peu coûteux.

Le chapitre 4 présente les différents résultats expérimentaux obtenus sur la localisation et le suivi de nanoparticules en trois dimensions. Tout d'abord, nous avons localisés des nanoparticules de 100 nm fixées dans un gel d'agarose afin d'établir la précision de localisation du montage et de tester notre algorithme de suivi automatique. La précision de localisation obtenues est égale à 3 nm perpendiculairement à l'axe optique du microscope, et de 70 nm dans la direction de l'axe optique. Cette précision reste constante sur une profondeur de 200  $\mu\text{m}$  de part et d'autre du plan de netteté de l'objectif de microscope. Même si la précisions de localisation atteinte est inférieure à celle atteinte par les techniques modernes de super-résolution (type PALM et STORM), l'avantage de notre montage est la profondeur sur laquelle le suivi 3D est réalisable. Cette profondeur est de l'ordre de 100 fois supérieure aux techniques citées. Nous avons ensuite présenté les résultats obtenus sur le suivi de nanoparticules en diffusion brownienne dans l'eau. Le montage actuel est capable par exemple

de suivre une nanoparticule de 100 nm pendant plusieurs secondes et de reconstruire sa trajectoire en trois dimensions. Les coefficients de diffusion obtenus à partir des courbes de déplacement quadratique moyen expérimentales sont en accord avec la valeur prédite par la théorie. Notre objectif suivant était de suivre des nanoparticules d'or en diffusion à l'intérieur du cytoplasme d'une cellule. Le montage a été modifié en intégrant un microscope de fluorescence inversé pour combiner l'imagerie holographique avec la fluorescence. Nous nous sommes heurtés à des difficultés expérimentales nouvelles : j'ai dû apprendre dans un premier temps comment cultiver une lignée cellulaire, puis expérimenter des méthodes d'injection de nanoparticules dans le cytoplasme de cellules vivantes. Deux techniques ont été testées : l'injection par pinocytose et l'injection à travers la membrane par un micro-capillaire. Les images d'holographies et de fluorescences obtenues montrent la possibilité de détecter des nanoparticules de 50 et 100 nm dans le cytoplasme. Les résultats obtenus montrent que les particules injectées sont visiblement coincées dans le cytosquelette des cellules, ce qui nous empêche actuellement de pouvoir extraire des informations quantitatives sur la diffusion intra-cellulaire.

Les articles publiés pendant cette thèse (en tant que premier ou second auteur) sont présentés en annexe de la thèse.

---

## Holographie digitale à décalage de phase

---

### Sommaire

---

<b>I.A</b>	<b>Principe de l'holographie</b> . . . . .	<b>10</b>
I.A.1	Enregistrement d'un hologramme sur une plaque photographique	10
I.A.2	Holographie classique hors-axe . . . . .	12
I.A.3	Conditions de cohérence nécessaire à la formation des hologrammes . . . . .	14
<b>I.B</b>	<b>Holographie digitale</b> . . . . .	<b>17</b>
I.B.1	Holographie digitale hors-axe . . . . .	17
I.B.2	Limite de résolution en holographie digitale . . . . .	18
I.B.3	Reconstruction des hologrammes en holographie digitale . . . . .	21
I.B.3.a	Méthode à une transformée de Fourier : transformée de Fresnel . . . . .	21
I.B.3.b	Méthode à deux transformées de Fourier : méthode du spectre angulaire . . . . .	22
<b>I.C</b>	<b>L'holographie à décalage de phase</b> . . . . .	<b>25</b>
I.C.1	Principe théorique de la méthode . . . . .	25
I.C.2	Mise en oeuvre expérimentale . . . . .	26
I.C.3	Observation d'un objet vibrant en holographie à décalage de phase : visualisation des harmoniques de la vibration . . . . .	27
I.C.4	Publications sur le sujet et compléments . . . . .	29
I.C.5	Holographie à décalage de phase en illumination stroboscopique	36

---

## I.A Principe de l'holographie

L'holographie est une technique interférométrique qui permet d'enregistrer le champ diffracté par un objet éclairé par une lumière cohérente. L'onde diffractée par l'objet étudié interfère avec une onde de référence, appelée généralement oscillateur local, et génère ainsi un motif d'intensité, ou hologramme, qui peut être enregistré sur un support photosensible. L'holographie a été inventée en 1948 par le physicien hongro-britannique Dennis Gabor [39], dont la motivation était d'enregistrer séparément la phase et l'amplitude du signal émis dans un microscope électronique. L'invention du laser dans les années 60 a permis l'utilisation de l'holographie en optique. A l'origine, les hologrammes étaient enregistrés sur des plaques photographiques, qui une fois développées permettaient de restituer une image de l'objet étudié. L'apparition de capteurs photosensibles, type CCD (Charged-Coupled Device) puis CMOS (Complementary Metal Oxide Semi-conductor) a permis d'une part l'enregistrement dynamique des hologrammes et d'autre part l'étude quantitative des variations d'amplitude et de phase de l'onde étudiée. Les premières expériences utilisant ce type de support ont été réalisées dans les années 70 [40], donnant naissance à l'holographie digitale.

Dans cette section, nous allons rappeler le principe de la formation des hologrammes et expliquer comment reconstruire un hologramme enregistré sur une plaque photographique. Nous rappellerons également les conditions de cohérence nécessaire à la formation d'hologramme. Puis nous présenterons l'holographie digitale, ainsi que la reconstruction numérique des hologrammes.

### I.A.1 Enregistrement d'un hologramme sur une plaque photographique

L'expérience la plus simple pour illustrer la formation des hologrammes est d'illuminer un objet partiellement transparent placé devant une plaque photographique par une onde plane monochromatique  $E_R(x, y, z)$  d'intensité  $I_R$ , comme le montre la figure I.1. L'onde diffractée par l'objet  $E_S(x, y, z)$  va interférer avec l'onde d'illumination  $E_R$  et former un motif d'interférence que l'on enregistre sur un film photographique en  $z_p$ . Le champ lumineux total au niveau de la plaque est alors :

$$E_H(x, y, z_p) = E_R(x, y, z_p) + E_S(x, y, z_p) \quad (\text{I.1})$$

L'intensité d'un champ lumineux est définie comme la moyenne temporelle de l'énergie traversant une section unitaire pendant 1 seconde.

$$I = \epsilon_0 c \langle E^2(x, y, z) \rangle_t \quad (\text{I.2})$$

En notation complexe, et dans un souci de clarté des écritures, on notera simplement :

$$I = |EE^*| \quad (\text{I.3})$$

L'intensité  $I_H$  enregistrée sur la plaque photographique se décompose en quatre termes :

$$I_H(x, y) = I_R + I_S(x, y) + E_R(x, y)E_S^*(x, y) + E_R^*(x, y)E_S(x, y) \quad (\text{I.4})$$

Les deux premiers termes de l'équation I.4,  $I_R = |E_R(x, y, z_p)|^2$  et  $I_S(x, y) = |E_S(x, y, z_p)|^2$ , sont respectivement les termes d'intensité de l'onde de référence et de l'onde diffractée par

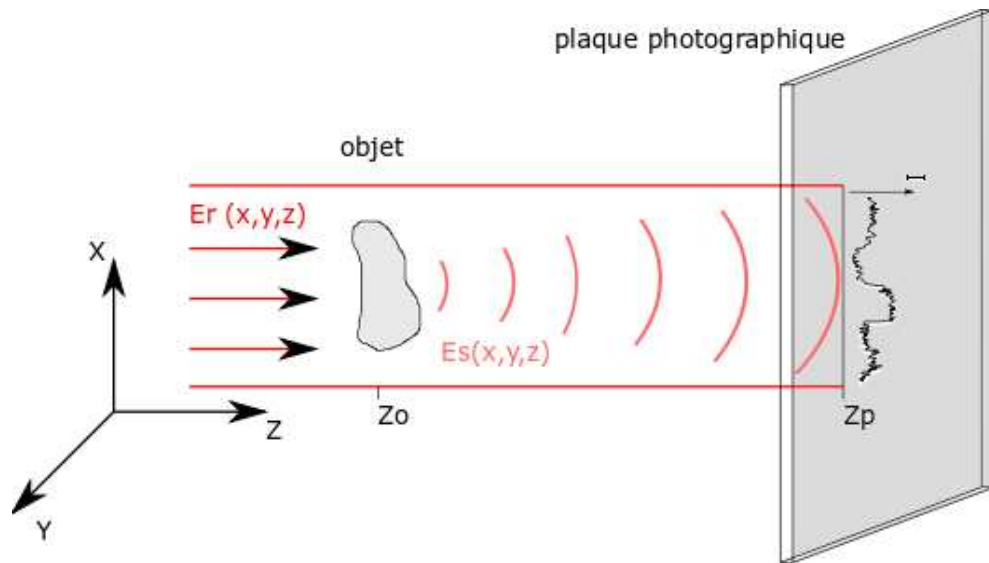


FIGURE I.1 – Dispositif d'enregistrement d'un hologramme sur une plaque photographique. L'onde de référence  $E_R$  se propage le long de l'axe  $z$  et interfère avec la lumière diffractée par l'objet  $E_S$  sur la plaque photographique.

l'objet.  $I_R$  est homogène sur la plaque photographique et donc ne dépend pas de  $x$  et  $y$ . Les troisième et quatrième termes proviennent de l'interférence entre les deux ondes. Ces termes sont des complexes conjugués, ainsi la somme est réelle. L'amplitude et la phase de l'onde émise par l'objet est directement contenue dans le quatrième terme. Après développement de la plaque photographique, sa fonction de transmission  $t(x, y)$  est proportionnelle à l'intensité  $I_H$ . On peut alors reconstruire un objet virtuel en retirant l'objet réel et en illuminant la plaque photo par une onde identique à celle d'illumination. La figure I.2 illustre le processus de reconstruction. La plaque photographique de transmission  $t(x, y) \propto I_H(x, y)$  illuminée par une onde  $E_R(x, y)$ . Le champ diffracté  $E_D(x, y)$  par l'hologramme au niveau de la plaque photographique (en  $z = z_p$ ) est la somme de trois ondes complexes comme le montre l'équation I.5 :

$$E_D(x, y) \propto E_R(x, y)t(x, y) \quad (\text{I.5})$$

$$\begin{aligned} &\propto E_R(x, y) (I_R + I_S(x, y)) \\ &\quad + E_R^2(x, y) E_S^*(x, y) \\ &\quad + I_R E_S(x, y) \end{aligned} \quad (\text{I.6})$$

- le premier terme, appelé ordre zéro, restitue l'onde de référence à un coefficient de proportionnalité près.
- le deuxième terme est l'ordre  $-1$  de diffraction. Il contient le complexe conjugué de l'onde diffracté par l'objet. Cette onde forme une image réelle de l'objet.
- le quatrième terme, proportionnel à  $E_S$ , est l'ordre  $+1$ , il restitue un « objet virtuel » à l'endroit exact où était placé l'objet lors de l'enregistrement. Ce terme contient l'information sur l'amplitude et la phase de l'onde émanant de l'objet. Ce terme étant proportionnel à  $I_R$ , l'onde diffracté par l'objet peut donc être amplifiée dans le cas où l'onde de référence est plus intense.



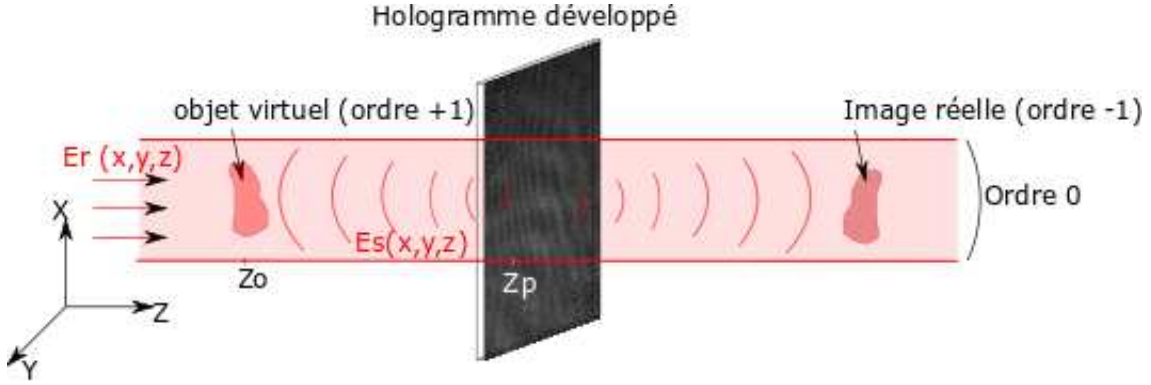


FIGURE I.2 – Relecture de l'hologramme développé. L'hologramme est illuminé par une onde de référence identique à celle utilisée lors de l'enregistrement. La diffraction à travers l'hologramme donne trois ondes, l'ordre 0 qui est une onde plane proportionnelle à l'onde de référence, l'ordre 1 restituant l'objet et l'ordre -1 qui est son complexe conjugué. Ces trois ordres sont superposés le long de l'axe optique en holographie dans l'axe.

Cependant dans cette configuration dites « dans l'axe », ces trois ondes diffractées se superposent le long de l'axe optique. Il est donc impossible d'isoler cette troisième onde des deux autres. En 1963, Leith et Upatnieks [23, 41] ont proposé un dispositif holographique dit « hors axe » permettant de séparer spatialement les 3 ordres de diffractions lors de la relecture de l'hologramme. L'holographie hors-axe est l'objet du paragraphe suivant. On verra plus tard dans ce chapitre I.C que l'holographie à décalage de phase est un autre moyen d'isoler le terme d'intérêt de l'équation I.5.

### I.A.2 Holographie classique hors-axe

Un exemple de dispositif holographique en géométrie hors-axe est illustré sur la figure I.3. L'onde de référence  $E_R$  est séparée de l'onde d'illumination  $E_I$  par une lame séparatrice et forme un angle  $\theta_R$  avec l'onde diffractée par l'objet  $E_S$ . Lors de l'enregistrement de l'hologramme, l'onde totale au niveau de la plaque photographique s'écrit :

$$E_H(x, y, z_p) = E_R(x, z) e^{-ikx \sin \theta_R} + E_S(x, y), \quad (\text{I.7})$$

où  $k = 2\pi/\lambda$ .

L'intensité enregistrée sur l'hologramme s'écrit alors :

$$I_H(x, y) = I_R + I_S(x, y) + e^{ikx \sin \theta_R} E_R E_S^*(x, y) + e^{-ikx \sin \theta_R} E_R^* E_S(x, y) \quad (\text{I.8})$$

Pour reconstruire l'hologramme, on retire l'objet réel et on illumine l'hologramme avec une onde plane parallèle à l'axe optique. L'onde diffractée par l'hologramme notée  $E_D$  se décompose en trois ondes qui se propagent dans des directions différentes comme l'illustre la figure I.4 :

$$\begin{aligned} E_D \propto & E_R (I_R + I_S) \\ & + e^{ikx \sin \theta_R} E_R^2 \cdot E_S^* \\ & + e^{-ikx \sin \theta_R} E_R^2 \cdot E_S \end{aligned} \quad (\text{I.9})$$

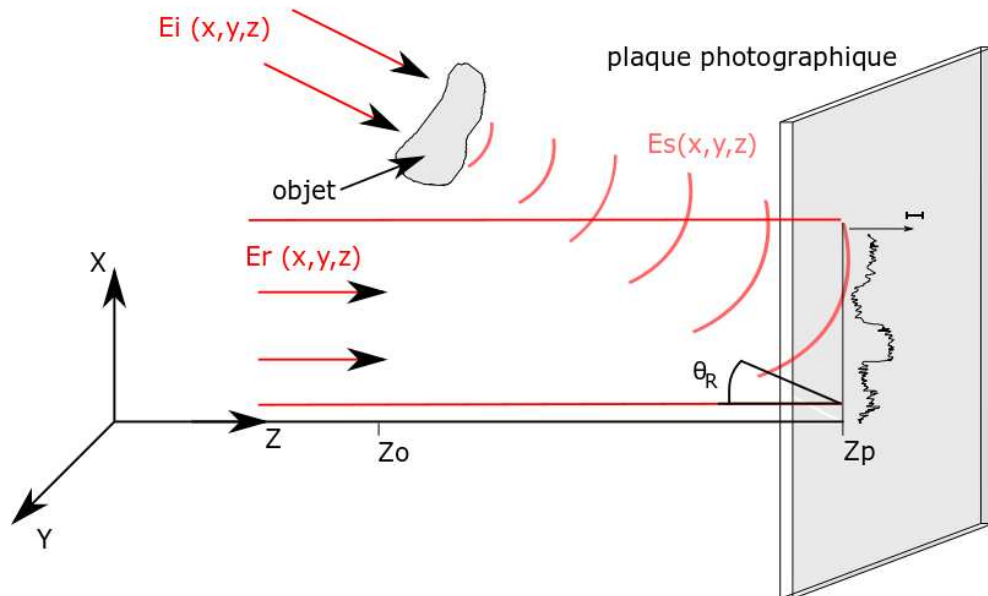


FIGURE I.3 – Dispositif d'enregistrement d'un hologramme en géométrie hors-axe sur une plaque photographique. L'onde de référence  $E_R$  se propage dans une direction faisant un angle  $\theta_R$  avec l'axe optique. L'objet est illuminé par une onde d'illumination  $E_I$ .

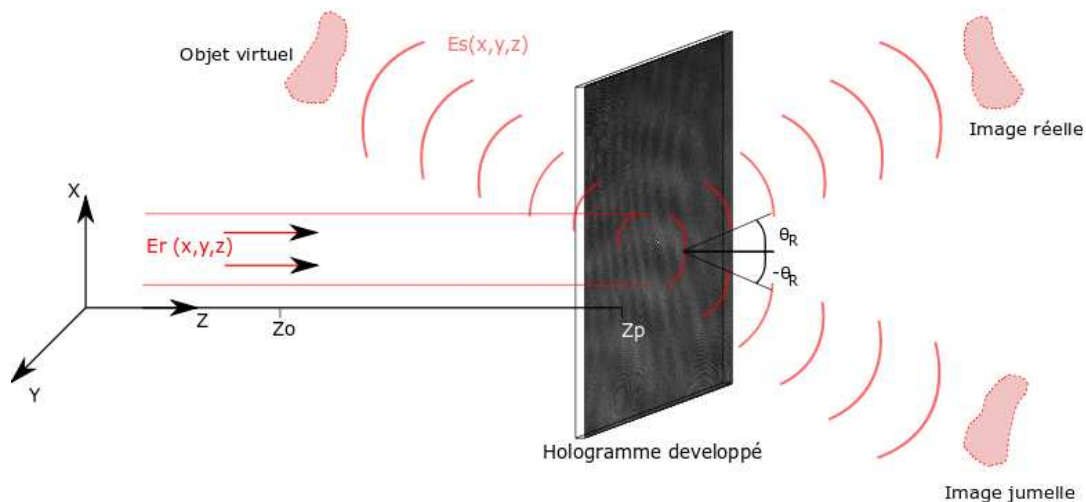


FIGURE I.4 – Relecture de l'hologramme en géométrie hors-axe. L'hologramme est illuminé par l'onde d'illumination. La diffraction à travers l'hologramme donne à nouveau trois ondes qui se propagent dans des directions différentes. Dans cette géométrie, les 3 ordres sont spatialement séparés.

- le premier terme est l'onde de référence se propageant dans la direction de l'axe  $z$ .
- les deuxième et troisième termes se propagent dans des directions faisant respectivement un angle  $\theta_R$  et  $-\theta_R$  avec l'axe  $z$ .

Il existe une valeur minimale à l'angle  $\theta_R$  pour assurer une séparation parfaite du quatrième terme avec l'ordre zéro. Cette valeur minimale dépend de l'étendu spectrale  $\Delta k_S$  de l'onde signal  $E_S$  au niveau de la plaque photographique. Ceci s'explique en passant dans le domaine des fréquences spatiales [42, 43]. On utilisera les notations suivantes pour la transformation de Fourier :

$$\begin{aligned} & \text{FFT} & (I.10) \\ I(x, y, z) & \rightarrow \tilde{I}(k_x, k_y, k_z) \\ E(x, y, z) & \rightarrow \tilde{E}(k_x, k_y, k_z) \end{aligned}$$

La transformée de Fourier  $\tilde{I}_H(k_x, k_y) = \mathcal{F}[I_H(x, y)]$  de l'intensité  $I_H(x, y)$  s'écrit dans le domaine des fréquences spatiales :

$$\tilde{I}_H(k_x, k_y) = \tilde{I}_R + \tilde{I}_S(k_x, k_y) + E_R \tilde{E}_S^*(k_x + k \sin \theta_R, k_y) + E_R^* \tilde{E}_S(k_x - k \sin \theta_R, k_y) \quad (I.11)$$

La figure I.5 représente  $\tilde{I}_H(k_x, k_y)$  défini à l'équation I.11 dans le domaine des fréquences spatiales le long de l'axe  $k_x$ .  $\tilde{I}_H(k_x, k_y)$  est composée de quatre termes. Le premier terme est le spectre de l'onde de référence, que l'on suppose uniforme sur la plaque photographique. Sa transformée de Fourier est donc un pic en 0. Le second terme est le spectre de l'intensité de l'onde diffractée par l'objet. Sa largeur est le double de l'étendu spectrale du champ  $E_S$ , soit  $2\Delta k_S$  et est centré en 0. Les deux derniers termes ont pour largeur  $\Delta k_S$  et sont centrés sur les fréquences spatiales  $\pm k \sin \theta_R$ . La condition de séparation des termes est donc :

$$\sin \theta_R \geq \frac{3\Delta k_S}{2k}. \quad (I.12)$$

Cette condition constitue une limite inférieure pour le choix de l'angle  $\theta_R$  en holographie hors-axe. On verra dans la partie I.B.2 qu'une limite haute à l'angle  $\theta_R$  est fixée par le choix du support d'enregistrement de l'hologramme, particulièrement en holographie digitale. En effet, la fréquence spatiale ajoutée par l'angle  $\theta_R$  ne doit pas sortir de la bande passante du support.

### I.A.3 Conditions de cohérence nécessaire à la formation des hologrammes

L'enregistrement d'un hologramme nécessite de superposer à l'onde signal une onde de référence au niveau du détecteur. Pour obtenir des interférences, ces deux ondes doivent être cohérentes à la fois temporellement et spatialement.

- **la cohérence temporelle** mesure la moyenne temporelle de la corrélation entre une onde émise à l'instant  $t$  une onde émise par la même source à l'instant  $t + \tau$ .

$$G(\tau) = \langle E^*(t)E(t + \tau) \rangle \quad (I.13)$$

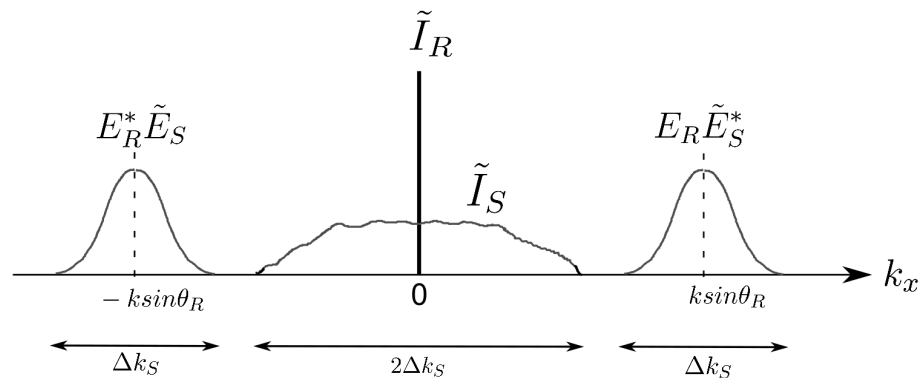


FIGURE I.5 – représentation du spectre de l'hologramme dans le domaine de Fourier le long de l'axe  $k_x$ .

Le degré de cohérence temporelle  $g(\tau)$  est défini par :

$$g(\tau) = \left| \frac{G(\tau)}{G(0)} \right| \quad (\text{I.14})$$

Le degré de cohérence est une valeur comprise entre 0 et 1. Pour n'importe quel type de source lumineuse, ce degré de cohérence vaut 1 en  $\tau = 0$ , puis chute à 0 après un temps caractéristique  $\tau_c$  appelé temps de cohérence. Les deux ondes émises aux instants  $t$  et  $t + \tau$  sont « fortement corrélées » si  $\tau < \tau_c$  et peuvent alors former des interférences. Ceci est réalisable dans la pratique si le faisceau de référence et le faisceau d'illumination sont issus d'un même faisceau laser et que la différence entre les deux chemins optiques du point de séparation jusqu'au détecteur est inférieure à la longueur de cohérence  $l_c$  du laser définie par :

$$l_c = \tau_c \times c, \quad (\text{I.15})$$

où  $c$  est la vitesse de la lumière et  $\tau_c$  le temps de cohérence de la source lumineuse. La figure I.6 illustre cette discussion dans le cas de l'holographie hors-axe.

- **la cohérence spatiale** d'un faisceau est défini par le fait que deux parties spatialement distinctes d'un même front d'onde peuvent interférer. Dans la pratique, on utilise généralement des lasers émettant dans le mode transverse fondamental  $\text{TEM}_{00}$ . Cela signifie que tous les points d'un même front d'onde ont la même phase, et donc que le faisceau est parfaitement spatialement cohérent.

En holographie hors-axe, étant donné que le faisceau de référence est séparé du faisceau d'illumination, cette configuration est plus sensible aux conditions expérimentales. Par exemple une vibration mécanique peut faire varier le chemin optique d'un des deux bras et ainsi créer un bruit technique. De plus, l'utilisation de source ayant une longueur de cohérence courte nécessite d'ajuster précisément la longueur des deux faisceaux pour conserver la cohérence. Néanmoins, la séparation des faisceaux présente l'avantage très intéressant de pouvoir ajuster la puissance de chaque faisceau de manière indépendante. Dans le cas où l'objet étudié émet un signal très faible devant la puissance d'illumination, comme c'est le cas pour des nanobilles d'or, on amplifie ce signal en ajustant la puissance de l'onde de référence comme on l'a expliqué dans l'équation I.5.

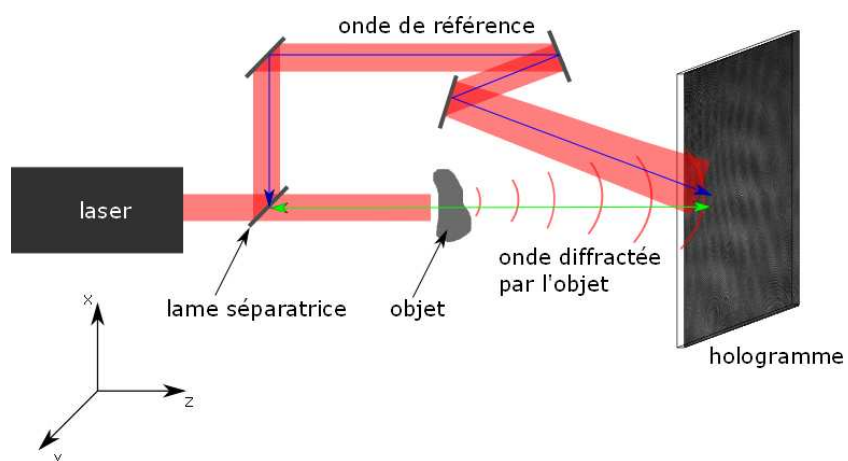


FIGURE I.6 – Dispositif d'enregistrement d'un hologramme. Pour que des interférences se forment au niveau du support d'enregistrement, il faut que la différence de chemin optique entre l'onde de référence (chemin bleu) et l'onde signal (chemin vert) soit inférieure à la longueur de cohérence  $l_c$  du laser.

## I.B Holographie digitale

L'enregistrement d'un hologramme sur une plaque photographique nécessite son développement par un processus chimique long. De ce fait, l'holographie classique n'est pas adaptée à l'observation d'objets en mouvement ou subissant une transformation. De plus, il est difficile de réaliser une étude quantitative de l'amplitude et de la phase du signal enregistrés sur l'hologramme. En holographie digitale, les hologrammes sont enregistrés sur des capteurs électroniques matriciels de type CCD ou CMOS. Les photons collectés par les pixels sont directement convertis en courant électrique puis enregistré en niveau de gris sur un ordinateur. Aucun processus chimique n'est nécessaire, la reconstruction des hologrammes se faisant de manière numérique. Les premiers enregistrements d'hologrammes numériques ont été réalisés en 1967 par J.W. Goodman et al. [44] puis généralisés en 1994 par U. Schnars et W. Jüptner [45] sur des capteurs CCD.

En holographie digitale, l'intensité du motif d'interférence notée  $I_H(x, y)$  (voir l'équation I.4) est proportionnelle à l'intensité enregistrée par le capteur, le facteur de proportionnalité étant l'efficacité quantique  $\eta$  du capteur :

$$I(x, y) = \eta I_H(x, y) \quad (\text{I.16})$$

Du fait de cette proportionnalité, nous ne ferons pas la distinction entre ces deux intensités dans la suite, et nous la noterons  $I_H(x, y)$ .

### I.B.1 Holographie digitale hors-axe

En holographie digitale, la reconstruction de l'objet se fait de manière numérique. Pour analyser de manière quantitative le champ diffracté par l'objet d'étude, il faut isoler le terme (ordre +1 de l'équation I.4) contenant cette information du reste de l'hologramme. Il existe deux techniques permettant d'isoler ce terme de diffraction : la géométrie hors-axe décrite dans la partie I.A.2, qui s'applique également en holographie digitale, ou le décalage de phase qui fait l'objet de la partie suivante (I.C). Nous allons détailler dans ce paragraphe comment le terme contenant l'information sur le champ diffracté par l'objet est isolé en holographie digitale hors-axe. Comme nous l'avons vu au paragraphe I.A.2, les 3 ordres de diffractions contenus dans l'hologramme sont séparables dans l'espace des fréquences spatiales. Pour visualiser ces fréquences spatiales, on calcule la transformée de Fourier discrète des hologrammes numériques :

$$\begin{aligned} \tilde{I}_H(k_x, k_y) &= \tilde{F}[I_H(x, y)] \\ &= \tilde{I}_R + \tilde{I}_S(k_x, k_y) + E_R \tilde{E}_S^*(k_x + k \sin \theta_R, k_y) + E_R^* \tilde{E}_S(k_x - k \sin \theta_R, k_y) \end{aligned} \quad (\text{I.17})$$

La décomposition de l'hologramme en fréquences spatiales est représentée sur la figure I.7(b). Cette représentation est une extension de la figure I.5 en deux dimensions. On observe trois domaines distincts dans le domaine de Fourier :

- L'ordre 0 est au centre du domaine de Fourier. Cette zone est la somme des 2 premiers termes de l'équation I.17.
- L'ordre -1 en bas à gauche centré sur la fréquence spatiale  $(-k \sin \theta_R, -k \sin \theta_R)$
- l'ordre +1 en haut à droite centré sur la fréquence spatiale  $(+k \sin \theta_R, +k \sin \theta_R)$ . C'est ce terme qui contient l'information sur le champ diffracté par l'objet.

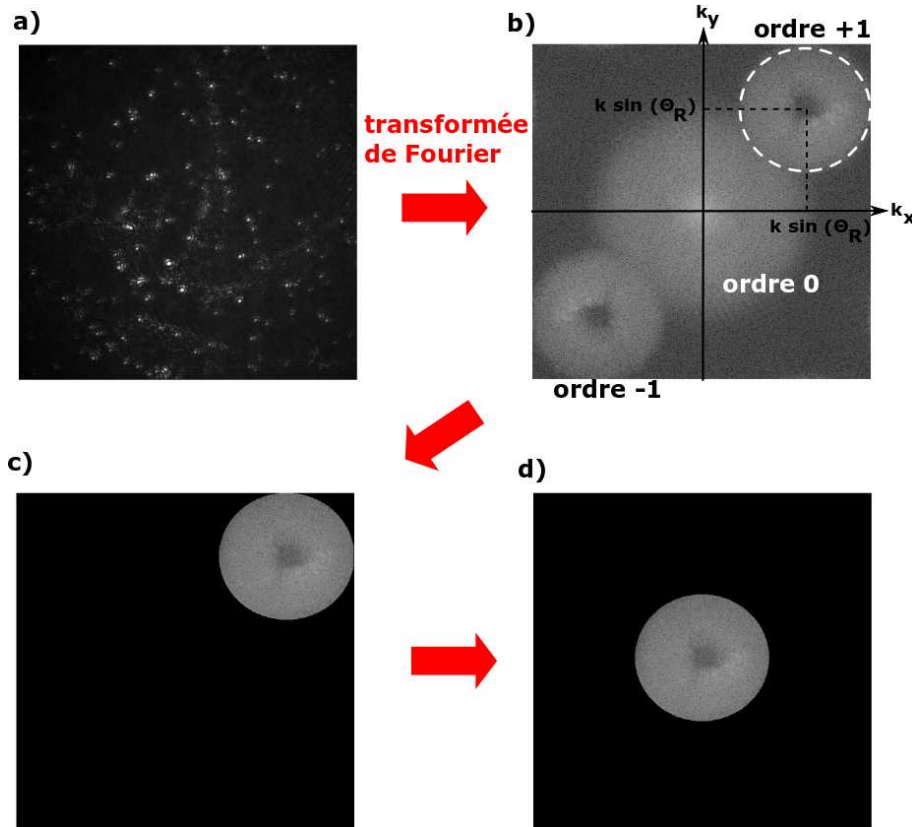


FIGURE I.7 – (a) hologramme de nanobilles d’or obtenu en holographie digitale hors-axe . (b) Spectre de l’hologramme obtenu en calculant la transformée de Fourier de (a). On observe la séparation des 3 ordres de diffraction dans l’espace des fréquences spatiales : l’ordre 0 au centre, l’ordre  $-1$  en bas à gauche et l’ordre  $+1$  en haut à droite centré sur la fréquence spatiale  $(+k \sin(\theta_R), +k \sin(\theta_R))$  correspondant à l’angle  $\theta_R$  de la géométrie hors-axe. Le cercle en pointillé blanc représente le masque du filtre numérique utilisé pour isoler l’ordre  $+1$ . (c) Spectre de l’hologramme après le filtrage numérique. (d) Centrage de la partie filtré au centre de l’espace de Fourier.

Pour isoler cet ordre, on applique un filtre numérique autour de cette ordre pour éliminer les ordres 0 et  $-1$ . Ce filtrage consiste à garder uniquement les fréquences spatiales contenues dans une zone (entourée en pointillé blanc sur la figure I.7(b)) et à supprimer toutes les fréquences en dehors. Ensuite la partie filtrée est translatée au centre du domaine des fréquences spatiales pour supprimer l’effet de la géométrie hors-axe (figure I.7(d)). La transformée de Fourier inverse du spectre filtré permet d’obtenir un hologramme contenant uniquement l’information sur la phase et l’amplitude du champ objet.

## I.B.2 Limite de résolution en holographie digitale

Si l’holographie digitale permet de s’affranchir du développement chimique des plaques photographiques, elle est néanmoins plus limitée en terme de résolution. Ceci est dû à la taille actuelle des pixels des capteurs CCD (généralement de quelques micromètres), plus grande que la taille des grains d’un film photographique. Les capteurs CCD sont généralement des matrices rectangulaires ou carrées de  $N_x \times N_y$  pixels identiques, de taille  $d_{pix}$  (voir I.8). Pour

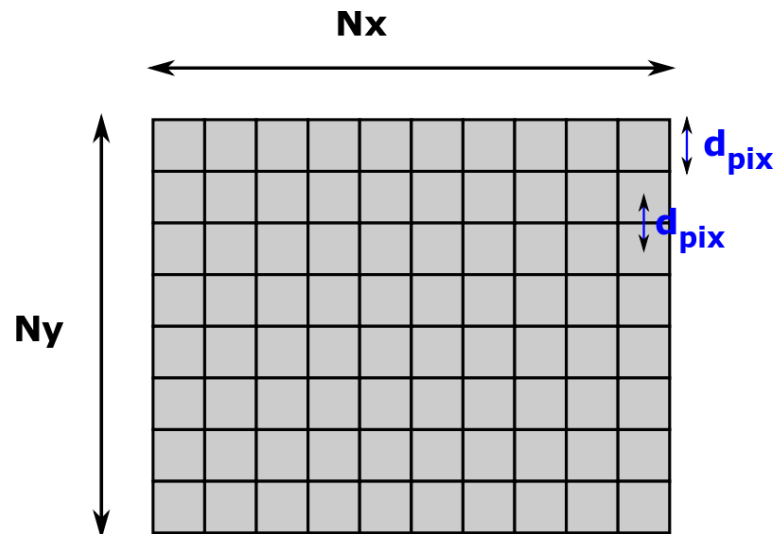


FIGURE I.8 – Représentation schématique d'un capteur CCD. On néglige ici l'espacement entre les pixels.

simplifier la discussion, on estimera que l'écart entre les pixels est nul, et donc que la distance entre les centres de deux pixels mitoyens est égale à  $d_{pix}$ . Considérons dans un premier temps que les pixels sont ponctuels, le théorème d'échantillonnage de Shannon et Nyquist indique que la fréquence spatiale maximale  $k_c$  (fréquence de coupure) qui peut être détectée par un tel capteur est égale à :

$$k_c = \frac{1}{2d_{pix}} \quad (I.18)$$

La fréquence de coupure est alors échantillonnée avec 2 pixels par période (voir I.9). L'écart entre les pixels ne permet pas d'échantillonner correctement une fréquence supérieure à  $f_c$ . Ceci signifie que le capteur ne pourra pas résoudre lors de l'enregistrement de l'hologramme des franges dont l'inter-frange est inférieure à  $d_c = 1/k_c$ . En holographie dans l'axe, toutes les fréquences spatiales de signal sont correctement échantillonnées si la fréquence spatiale maximale de son spectre  $k_{max}$  est inférieure à  $k_c$ . En reprenant la notation de la partie I.A.2,  $k_{max} = \Delta k_S / 2$  où  $\Delta k_S$  est la largeur totale du spectre du signal. La condition sur  $\Delta k_S$  est alors :

$$0 \leq \frac{\Delta k_S}{2} \leq k_c \quad (I.19)$$

En réalité, les pixels ne sont pas ponctuels, chaque pixel enregistre donc l'intégrale de l'intensité sur la surface de ce pixel multiplié par la fonction de détection  $f_{pix}$  du pixel. En 1 dimension, l'expression de l'intensité mesurée par le pixel  $n$  à la position  $x_n$  sur le capteur est donnée par l'équation suivante :

$$I_{pix} = \int_{-\frac{d_{pix}}{2}}^{+\frac{d_{pix}}{2}} I(x_n - x) \times f_{pix}(x) dx. \quad (I.20)$$

L'intensité mesurée est une convolution entre le motif d'intensité  $I$  et la fonction de détection  $f_{pix}$ . Dans l'espace des fréquences spatiales, cette relation devient :

$$\tilde{I}_{pix}(k) = \tilde{I}(k) \tilde{f}_{pix}(k). \quad (I.21)$$



Dans le cas simple où  $f_{pix}$  est uniforme sur le pixel, la révélation précédente prend la forme d'une fonction sinus cardinal faisant intervenir la fréquence de coupure  $k_c$  :

$$\tilde{f}_{pix}(k) = \text{sinc} \left( \pi \frac{k}{k_c} \right) \quad (\text{I.22})$$

L'effet de l'intégration sur la surface des pixels se traduit donc par un filtrage passe-bas du signal en plus de la coupure due à l'échantillonnage. Pour simplifier la discussion sur la limite de résolution en holographie digitale nous allons considérer dans la suite de cette section que l'échantillonnage est ponctuel.

En holographie hors-axe, l'angle  $\theta_R$  que fait l'onde de référence avec l'axe optique ajoute une fréquence spatiale au spectre du signal. Comme le montre la figure I.7(b), le spectre du signal est centré dans le domaine de Fourier sur la fréquence spatiale  $(+k \sin \theta_R, +k \sin \theta_R)$ . L'angle  $\theta_R$  doit donc être ajusté pour que le spectre décalé du signal ne dépasse pas  $k_c$ , soit la condition :

$$0 \leq k \sin \theta_R + \frac{\Delta k_S}{2} \leq k_c \quad (\text{I.23})$$

Cette condition est encore plus restreinte si l'on veut que l'ordre +1 de diffraction soit parfaitement séparé de l'ordre 0 dans le domaine de Fourier pour effectuer un filtrage comme expliqué dans la partie I.A.2 (condition I.12). La condition devient :

$$\frac{3\Delta k_S}{2} \leq k \sin \theta_R \leq k_c - \frac{\Delta k_S}{2} \quad (\text{I.24})$$

L'angle de l'onde de référence doit vérifier cette condition afin d'isoler l'ordre +1 de diffraction dans le domaine de Fourier tout en vérifiant les conditions d'échantillonnage de Nyquist. La résolution en holographie hors-axe est donc environ quatre fois inférieure à celle atteignable en holographie dans l'axe avec un même capteur CCD, puisqu'on utilise seulement un quart du domaine de Fourier pour isoler le spectre du signal.

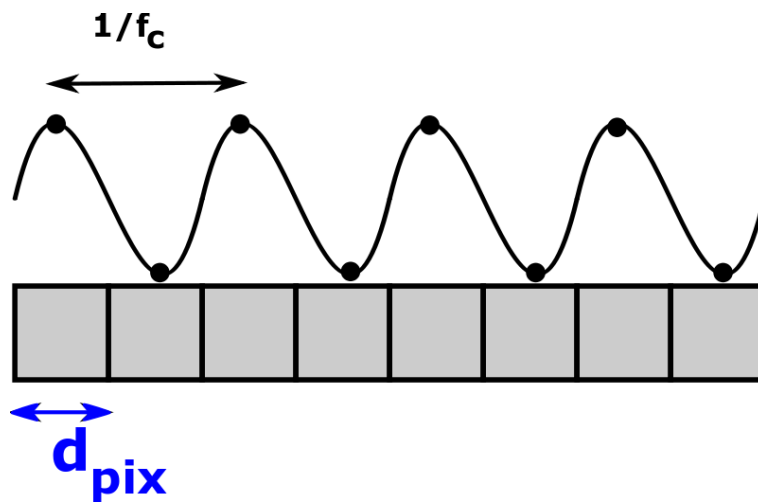


FIGURE I.9 – Échantillonnage de la fréquence spatiale de coupure. Le capteur enregistre 2 points par périodes.

### I.B.3 Reconstruction des hologrammes en holographie digitale

L'holographie digitale restituée (après filtrage numérique dans le cas de l'holographie hors-axe) une carte discrète et de taille finie du champ diffracté par l'objet au niveau du détecteur. Contrairement aux techniques classiques d'imagerie, on dispose à la fois de l'amplitude et de la phase de la lumière diffractée par l'objet. Dans le cas de l'holographie classique sur plaque photographie, la propagation d'une onde diffractée à travers l'hologramme reforme un objet virtuel là où était situé l'objet pendant l'enregistrement. En holographie digitale, la propagation de l'onde diffractée par l'hologramme jusqu'au plan de l'objet se fait de manière numérique. En effet la formule de Rayleigh-Sommerfeld [42] permet de calculer la propagation d'une onde sur une distance  $z$  à partir d'un plan dans lequel l'onde est connue. On considère une onde  $E_S(x, y, 0)$  définie dans le plan  $(x, y, 0)$ . Cette onde se propage selon le vecteur d'onde  $\vec{k}$  parallèle à l'axe  $z$ . Dans le plan  $(\xi, \eta, z)$  situé à une distance  $z$ , le champ propagé est donné par :

$$E_S(\xi, \eta, z) = \iint_{-\infty}^{+\infty} h(\xi - x, \eta - y, z) E_S(x, y, 0) dx dy \quad (I.25)$$

où  $h$ , appelé *noyau* de propagation, s'écrit :

$$h(\xi - x, \eta - y, z) = \frac{1}{i\lambda} \cdot \frac{e^{ikr}}{r} \cdot \cos(\vec{z} \cdot \vec{r}) \quad (I.26)$$

Le noyau  $h$  définit le déphasage entre un point  $P(x, y, 0)$  du plan de départ et un point  $Q(\xi, \eta, z)$  du plan d'arrivée.  $r$  est la distance entre ces deux points, et s'écrit :

$$r = |\vec{r}| = \sqrt{z^2 + (\xi - x)^2 + (\eta - y)^2} \quad (I.27)$$

L'écriture du calcul de propagation sous cette forme fait apparaître  $E_S$  comme une convolution entre l'onde dans le plan de départ et le noyau de propagation. Il existe deux méthodes habituellement utilisées en holographie digitale permettant de calculer cette convolution. La première développée en I.B.3.a, consiste à utiliser l'approximation des petits angles (approximation de Fresnel) ce qui permet de calculer la propagation en utilisant une seule transformée de Fourier. Cette méthode est valable pour des distances de propagations grande devant la taille du capteur. La seconde méthode, dite du spectre angulaire [46], consiste à décomposer l'onde diffractée en ondes planes, à propager les ondes planes en calculant le déphasage entre le plan de départ et le plan d'arrivée, puis de prendre la transformée de Fourier inverse pour reconstituer l'onde propagée. Cette seconde méthode est plus adaptée à la propagation sur des courtes distances.

#### I.B.3.a Méthode à une transformée de Fourier : transformée de Fresnel

L'approximation des petits angles permet de simplifier l'expression du noyau de propagation (I.26) :

$$h(\xi - x, \eta - y, z) = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{\frac{ik}{2z}((\xi-x)^2 + (\eta-y)^2)} \quad (I.28)$$

L'onde propagée s'écrit alors en développant  $h$  :

$$E_S(\xi, \eta, z) = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{\frac{ik}{2z}(\xi^2 + \eta^2)} \iint_{-\infty}^{+\infty} E_S(x, y, 0) e^{\frac{ik}{2z}(x^2 + y^2)} e^{-\frac{ik}{z}(x\xi + y\eta)} dx dy \quad (I.29)$$

La transformée de Fourier à deux dimensions  $\mathcal{F}$  d'une fonction  $f(x, y)$  étant définie par :

$$\mathcal{F}[f(x, y)] = F(k_x, k_y) = \iint_{-\infty}^{+\infty} f(x, y) e^{-2i\pi(k_x x + k_y y)} dx dy \quad (\text{I.30})$$

on peut écrire l'équation I.29 sous la forme d'une transformée de Fourier en effectuant les changements de variable suivant :

$$\tilde{\xi} = \frac{k\xi}{2\pi z} = \frac{\xi}{\lambda z} \text{ et } \tilde{\eta} = \frac{k\eta}{2\pi z} = \frac{\eta}{\lambda z} \quad (\text{I.31})$$

L'équation I.29 s'écrit alors :

$$E_S(\tilde{\xi}, \tilde{\eta}, z) = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{\frac{iz\pi\lambda}{2}(\tilde{\xi}^2 + \tilde{\eta}^2)} \iint_{-\infty}^{+\infty} \left[ E_S(x, y, 0) e^{\frac{ik}{2z}(x^2 + y^2)} \right] e^{-2i\pi(x\tilde{\xi} + y\tilde{\eta})} dx dy \quad (\text{I.32})$$

$$= \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{\frac{iz\pi\lambda}{2}(\tilde{\xi}^2 + \tilde{\eta}^2)} \cdot \mathcal{F} \left[ E_S(x, y, 0) e^{\frac{ik}{2z}(x^2 + y^2)} \right] \quad (\text{I.33})$$

L'onde propagée est donc proportionnelle à la transformée de Fourier de l'hologramme  $E_S(x, y, 0)$  multipliée par un terme de phase quadratique  $e^{\frac{ik}{2z}(x^2 + y^2)}$  qui décrit le déphasage dû au rayon de courbure de l'onde sphérique entre 0 et la distance  $z$ . Plusieurs remarques sont à faire sur cette méthode de reconstruction :

1. le système de coordonnées dans le plan de reconstruction  $(\tilde{\xi}, y\tilde{\eta}, z)$  dépend de la distance de reconstruction  $z$ . La base du plan augmente linéairement avec la distance  $z$ . Si on étudie l'hologramme d'un objet épais, la reconstruction par cette méthode va créer un objet distordu puisque le grandissement transverse dépend de la distance  $z$  avec l'hologramme. Cette méthode est adapté à l'étude holographique d'un objet « plat » ou d'une surface, mais nécessite un traitement supplémentaire dans le cas d'un objet épais.
2. l'onde propagée est proportionnelle à un terme en  $1/i\lambda z$  (équation I.33). Ce terme décrit la conservation de l'énergie de l'onde sphérique.
3. l'équation I.33 diverge pour une distance de propagation  $z$  trop petite. Ceci est dû au terme en  $1/z$ . Etant donné qu'on utilise l'approximation des petits angles pour écrire l'expression de l'onde propagée sus la forme d'une seule transformée de Fourier, cette méthode est adaptée à une propagation sur une distance grande par rapport à la taille de l'hologramme.

### I.B.3.b Méthode à deux transformées de Fourier : méthode du spectre angulaire

La méthode du spectre angulaire est une méthode de reconstruction adaptée à la propagation sur des distances petites devant la taille de l'hologramme. Elle nécessite le calcul d'une transformée de Fourier supplémentaire. Le principe est de décomposer l'onde  $E_S(x, y, 0)$  en onde planes en calculant la transformée de Fourier de l'hologramme, puis de calculer le spectre dans le plan de destination, et enfin de reconstruire l'onde propagée dans l'espace réel en calculant la transformée de Fourier inverse du spectre propagé.

La transformée de Fourier à deux dimensions a été défini à l'équation I.30. La transformée de Fourier inverse est défini par :

$$\mathcal{F}^{-1}[F(k_x, k_y)] = f(x, y) = \iint_{-\infty}^{+\infty} F(k_x, k_y) e^{2i\pi(k_x x + k_y y)} dk_x dk_y \quad (\text{I.34})$$

On note  $A_0(k_x, k_y)$  le résultat de la transformée de Fourier directe de  $E_S(x, y, 0)$  :

$$A_0(k_x, k_y) = \iint_{-\infty}^{+\infty} E_S(x, y, 0) e^{-2i\pi(k_x x + k_y y)} dx dy \quad (\text{I.35})$$

$A_0$ , appelé spectre angulaire de  $E_S(x, y, 0)$ , est la décomposition de l'hologramme dans la base des ondes planes  $\{E(x, y, z) = e^{i\vec{k}\vec{r}}\}$  vérifiant la relation :

$$\|\vec{k}\| = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (\text{I.36})$$

Ainsi, dans la décomposition de  $E_S$ , la contribution de l'onde plane  $e^{i\vec{k}\vec{r}}$  définit par :

$$\vec{k} = \begin{pmatrix} k_x \\ k_y \\ \sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2} \end{pmatrix} \quad (\text{I.37})$$

est égale à  $A_0(k_x, k_y)$ . Si on considère une onde plane  $E(x, y, z) = e^{i\vec{k}\vec{r}}$  définie en  $z = 0$  dans le plan  $(x, y, 0)$  se propageant jusqu'au plan  $(x, y, z_r)$  situé à la distance de reconstruction  $z_r$  du plan de départ, l'expression de cette onde plane dans le plan d'arrivée est alors :

$$E(x, y, z_r) = E(x, y, 0)e^{ik_z z_r} = E(x, y, 0)e^{i\sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2} z_r} \quad (\text{I.38})$$

On a donc la même relation entre  $A_0$  le spectre angulaire de l'onde  $E_S$  dans le plan de l'hologramme et  $A_{z_r}$  le spectre angulaire de l'onde dans le plan de propagation :

$$A_{z_r}(k_x, k_y) = A_0(k_x, k_y)e^{i\sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2} z_r} \quad (\text{I.39})$$

L'expression de l'onde propagée dans le plan  $(x, y, z_r)$  s'obtient finalement en calculant la transformée de Fourier inverse de  $A_{z_r}$  :

$$E_S(x, y, z_r) = \mathcal{F}^{-1}[A_{z_r}(k_x, k_y)] = \iint_{-\infty}^{+\infty} A_{z_r}(k_x, k_y) e^{2i\pi(k_x x + k_y y)} dk_x dk_y \quad (\text{I.40})$$

Le schéma I.10 résume les différentes étapes de la reconstruction par la méthode du spectre angulaire. Trois remarques sont à faire pour conclure sur cette méthode :

1. La méthode du spectre angulaire permet de propager le champ sur des distances petites devant la taille de l'hologramme. Ceci a un intérêt en microscopie holographique où les distances de reconstruction sont de l'ordre du micron comme nous le verrons par la suite.
2. Cette méthode nécessite de calculer deux transformées de Fourier contrairement à la reconstruction par la transformée de Fresnel, ce qui augmente le temps de calcul. Nous verrons au chapitre 2 comment réduire ce temps de calcul.
3. La propagation de l'onde revient à changer la phase des composantes du spectre angulaire de l'onde puisque l'on multiplie simplement  $A_0(k_x, k_y)$  par un facteur de phase  $e^{i\sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2} z_r}$ . Cette opération ne peut être réalisée qu'à la condition suivante :

$$k_x^2 + k_y^2 < k^2 = \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2. \quad (\text{I.41})$$

En dehors de ce domaine,  $A_{z_r}(k_x, k_y) = 0$ . La propagation par la décomposition en spectre angulaire agit comme un filtre passe-bas sur les fréquences spatiales.

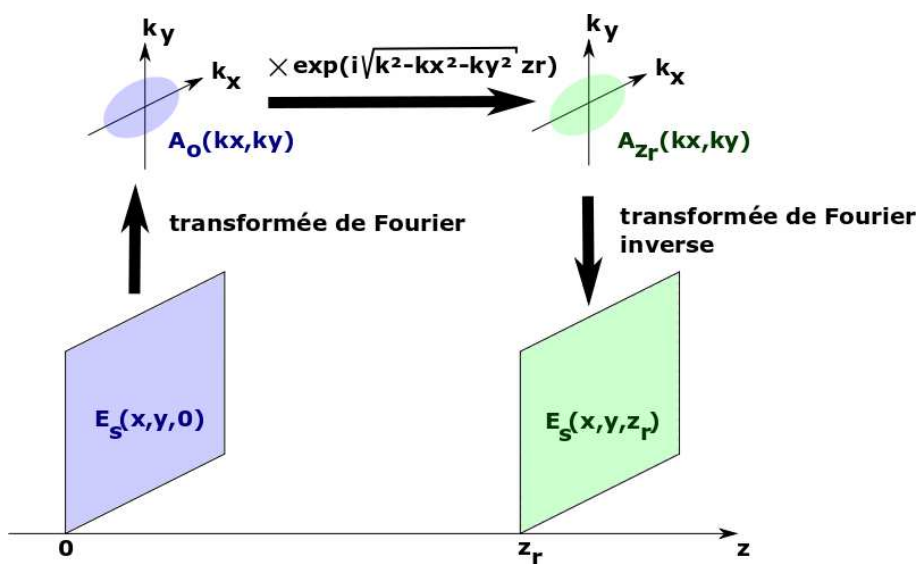


FIGURE I.10 – Représentation schématique des différentes étapes de la reconstruction des hologrammes par la méthode du spectre angulaire.

## I.C L'holographie à décalage de phase

Dans la section précédente, nous avons vu comment enregistrer un hologramme numérique, puis deux méthodes de reconstructions ont été présentées. Comme nous l'avons expliqué au paragraphe I.A.2, il est nécessaire d'isoler l'ordre +1 de diffraction des autres ordres contenus dans l'hologramme avant de procéder à la reconstruction. La géométrie "hors-axe" permet de séparer spatialement les ordres  $-1$ ,  $0$ , et  $+1$  dans l'espace de Fourier. Un filtrage spatial permet ensuite d'isoler le terme d'intérêt contenant l'onde diffractée par l'objet  $E_S$ . Yamaguchi et Zhang [47, 48] ont proposé en 1997 une nouvelle technique d'holographie à décalage de phase permettant d'obtenir le même résultat indépendamment de la géométrie du système (dans l'axe ou hors axe). Cette technique est nécessite d'enregistrer une série d'hologrammes entre lesquels on impose un déphasage entre l'onde de référence et l'onde d'illumination. Cette technique est similaire à une détection hétérodyne sur un capteur multi-pixels. Dans cette section, nous allons présenter cette technique et voir comment la mettre en œuvre expérimentalement. Notre équipe à développé avant mon arrivée au laboratoire une méthode de vibrométrie utilisant le principe de l'holographie à décalage de phase. Je rappellerai donc après avoir cité les publications sur le sujet les principaux résultats à retenir. Je présenterai enfin une expérience originale qui vient compléter les résultats publiés.

### I.C.1 Principe théorique de la méthode

Dans les dispositifs d'enregistrement d'hologrammes présentés dans les sections I.A et I.B, le déphasage entre le faisceau de référence et le faisceau d'illumination est considéré comme étant constant au cours du temps. Une variation contrôlé de ce déphasage entre deux enregistrements d'hologrammes successifs va permettre d'isoler une partie de l'information contenue dans les hologrammes [43]. Si on note  $\phi$  la phase relative entre l'onde de référence et l'onde diffractée par l'objet, le champ total au niveau de la caméra s'écrit :

$$E_H(x, y) = E_R(x, y)e^{i\phi} + E_S(x, y) \quad (\text{I.42})$$

L'intensité enregistrée par le capteur devient alors :

$$I_H(x, y)^{(\phi)} = I_R + I_S(x, y) + e^{i\phi} E_R(x, y)E_S^*(x, y) + e^{-i\phi} E_R^*(x, y)E_S(x, y) \quad (\text{I.43})$$

Considérons que l'on impose un déphasage de  $\frac{\pi}{2}$  entre deux enregistrements sur une série de 4 images successives (technique dites de l'holographie *4-phases*), on obtient 4 images différentes noté  $I_H^{(k\pi/2)}$  où  $k$  est un entier allant de 0 à 3. La combinaison linéaire suivante de ces 4 images donne l'hologramme  $I_H$  :

$$I_H = \frac{1}{4} \left[ \left( I_H^{(0)} - I_H^{(\pi)} \right) + i \left( I_H^{(\pi/2)} - I_H^{(3\pi/2)} \right) \right] \quad (\text{I.44})$$

$$= E_R^* E_S \quad (\text{I.45})$$

Le résultat de cette combinaison linéaire isole l'ordre +1 de la diffraction, qui contient l'onde diffractée par l'objet. Nous avons utilisé dans nos expériences essentiellement l'holographie *4-phases*. Cette technique peut être généralisé à n'importe quelle série d'hologrammes. Dans le cas d'un décalage à  $K$  phases, on impose un déphasage de  $\phi_k = \frac{2\pi k}{K}$  avec  $k$  un entier variant de 0 à  $K - 1$  entre deux enregistrements, sur une série de  $K$  images successives. On

obtient  $K$  images différentes noté  $I_H(x, y)^{(\phi_k)}$ . La combinaison linéaire permettant d'isoler l'ordre +1 de diffraction s'écrit alors :

$$I_H = \frac{1}{K} \sum_{k=0}^{K-1} e^{i\phi_k} I_H^{(\phi_k)} \quad (\text{I.46})$$

$$= \frac{1}{K} \underbrace{\left[ \sum_{k=0}^{K-1} e^{\frac{4i\pi k}{K}} \right]}_{=0} (I_R + I_S) + \frac{1}{K} \underbrace{\left[ \sum_{k=0}^{K-1} e^{\frac{4i\pi k}{K}} \right]}_{=0} E_R E_S^* + E_R^* E_S \quad (\text{I.47})$$

$$= E_R^* E_S \quad (\text{I.48})$$

L'avantage de cette technique est qu'elle fonctionne quelque soit la géométrie du système optique. Son inconvénient majeur est qu'il est nécessaire d'enregistrer plusieurs images par hologramme, ce qui diminue fortement la vitesse d'acquisition.

### I.C.2 Mise en oeuvre expérimentale

L'utilisation de cette technique nécessite de contrôler parfaitement la phase relative entre l'onde de référence et l'onde signal. Une première méthode est de faire varier le chemin optique de l'une des deux ondes en installant un miroir sur un PZT. On peut donc entre deux acquisitions déplacer le miroir d'une distance correspondant au déphasage souhaité. Une autre méthode est de moduler les fréquences de l'onde de référence et de l'onde signal par le biais de modulateurs acousto-optiques. Pour expliquer cette deuxième méthode, il est nécessaire de rappeler brièvement le fonctionnement d'un modulateur acousto-optique (appelé également cellule de Bragg). Dans cet appareil, une cale piézo-électrique alimentée par un signal électronique sinusoïdal de fréquence  $\nu_{AOM}$  va générer une onde sonore de même fréquence. Les variations de pressions imposées par l'onde sonore vont modifier l'indice optique dans la cellule. La cellule va alors agir comme un réseau de Bragg de pas  $\lambda_{AOM}$  sur le faisceau laser qui la traverse. La figure I.11 illustre le fonctionnement d'un modulateur acousto-optique. Le faisceau est diffracté par le réseau en plusieurs ordres de diffraction. On observe en sortie à la fois une déviation des différents ordres de diffractions et également une modification de la fréquences des ordres :

- l'ordre  $n$  sera dévié par rapport à la direction d'entrée d'un angle  $\theta_{(n)}$  défini par :

$$\theta_{(n)} = \frac{n\lambda_l}{\lambda_{AOM}} \quad (\text{I.49})$$

où  $\lambda_l$  est la fréquence du laser utilisé. L'ordre 0 n'est pas dévié de la direction d'entrée.

- la fréquence de l'ordre  $n$  est décalé de  $n \times \nu_{AOM}$ .

La figure I.12 illustre comment la combinaison de deux modulateurs acousto-optique permet de contrôler le déphasage relatif entre l'onde de référence et l'onde signal. La fréquence du laser est noté  $\nu_L$  et la fréquence d'acquisition de la caméra est égale à  $\nu_{ccd}$ . Le premier modulateur est excité à la fréquence  $\nu_{AOM_1} = 80$  Mhz, et le deuxième modulateur à la fréquence  $\nu_{AOM_2} = 80$  Mhz +  $\Delta\nu$ . Dans le cas d'une détection hétérodyne en 4-phases, On fixe  $\Delta\nu$  par la relation suivante :

$$\Delta\nu = \frac{\nu_{ccd}}{4}. \quad (I.50)$$

Au niveau de la caméra, le décalage fréquentiel entre les deux faisceaux est égale à  $\Delta\nu$ . On observe donc un battement des franges d'interférences à la fréquence  $\nu_{ccd}/4$ . Le décalage de phase entre deux images successive est donc égale à  $2\pi/4$ , et ce décalage effectue un cycle toutes les 4 images. On peut donc appliquer l'algorithme de l'équation I.44 pour former les hologrammes.

Ainsi en sortie la fréquence des ordres  $\pm 1$  sera respectivement  $\nu_l \pm \nu_{AOM}$ .

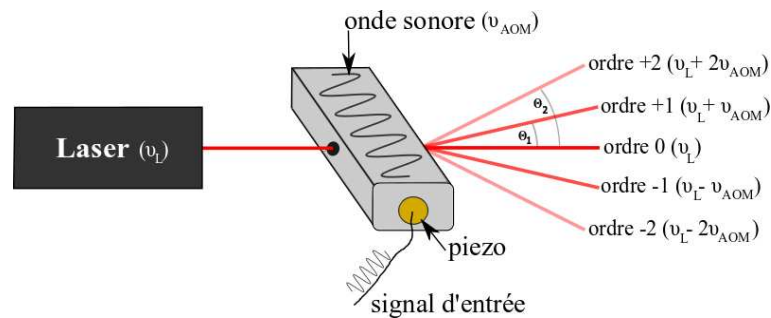


FIGURE I.11 – *Fonctionnement d'un modulateur acousto-optique.*

Pour alimenter les modulateurs acousto-optique afin de fixer précisément un décalage fréquentiel de  $\Delta\nu$  au cours du temps, on utilise le circuit électronique présenté sur la figure I.13. La fréquence d'utilisation optimale des nos modulateurs étant 80 MHz, on utilise un quartz oscillant à 100 MHz, et un synthétiseur numérique. On règle la fréquence de sortie du synthétiseur sur  $20 \text{ MHz} + \Delta\nu$  et on utilise également la sortie 10 MHz, que l'on va doubler par un doubleur de fréquence analogique. De cette façon, on obtient deux signaux, l'un à 20 MHz et l'autre à  $20 \text{ MHz} + \Delta\nu$  parfaitement synchronisés. On mélange ces deux signaux avec le signal à 100 MHz dans deux mélangeurs distincts. A la sortie des mélangeurs, on obtient deux signaux de fréquence fondamentale 80 MHz pour l'un et  $80 \text{ MHz} + \Delta\nu$  pour l'autre, plus toutes les harmoniques à  $80 \pm n \times 20 \text{ MHz}$ . On filtre ces signaux dans des filtres passe-bandes centrés sur 80 MHz, et de largeur spectrale inférieure à 20 MHz pour supprimer les harmoniques. On amplifie finalement les deux signaux pour alimenter les modulateurs acousto-optiques.

### I.C.3 Observation d'un objet vibrant en holographie à décalage de phase : visualisation des harmoniques de la vibration

Lorsqu'on analyse un objet immobile en holographie digitale, illuminé par un faisceau laser de fréquence  $\nu_L$ , la fréquence de l'onde signal  $E_S$  diffractée par l'objet reste égale à  $\nu_L$ . Dans le cas où l'objet est en mouvement, l'effet Doppler associé à ce mouvement modifie la fréquence de l'onde signal. Dans le cas particulier d'un objet en vibration à la fréquence  $\nu_A$ , le signal se décompose en un signal fondamental à la fréquences  $\nu_L$  et des harmoniques aux fréquences  $\nu_L \pm n \times \nu_A$  [49]. Si l'on souhaite étudier la nature du mouvement de l'objet, par exemple mesurer la fréquence ou l'amplitude de vibration, il est intéressant de pouvoir sélectionner une fréquence d'étude afin d'imager séparément les différents modes de vibrations. De nombreuses publications rapportent l'utilisation de l'holographie à décalage de phase pour l'étude de



vibration [50–62]. C’est également dans ce but que notre équipe a développé une technique d’holographie à décalage fréquentiel, utilisant des modulateurs acousto-optiques, permettant d’analyser séparément la phase et l’amplitude des harmoniques de vibrations [63–65]. Les résultats obtenus ont faits l’objet de plusieurs publications consultables dans la section suivante (I.C.4). Les principaux résultats y seront résumés. Les expériences mentionnées dans ces publications ont été réalisées avant mon arrivée au laboratoire. J’ai néanmoins pu participer à l’analyse des données et à la rédaction de certaines de ces publications. Comme ces résultats expérimentaux n’ont pas été réalisés dans ce travail de thèse, je citerai seulement les articles et je résumerai les principaux résultats démontrés. Ces résultats permettent de comprendre l’expérience que j’ai pu réaliser en complément de ces publications et qui fera l’objet dans la section suivante (I.C.5).

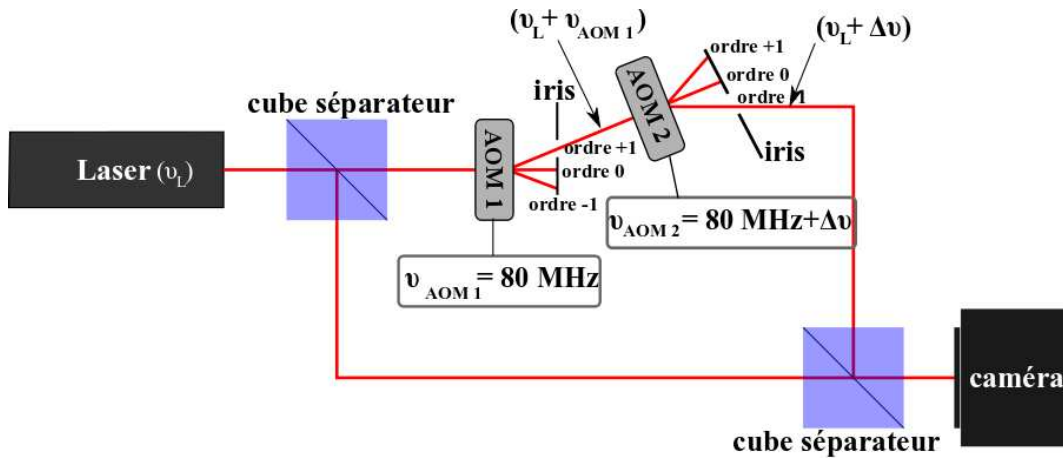


FIGURE I.12 – Dispositif d’holographie à décalage de phase utilisant 2 modulateurs acousto-optiques.

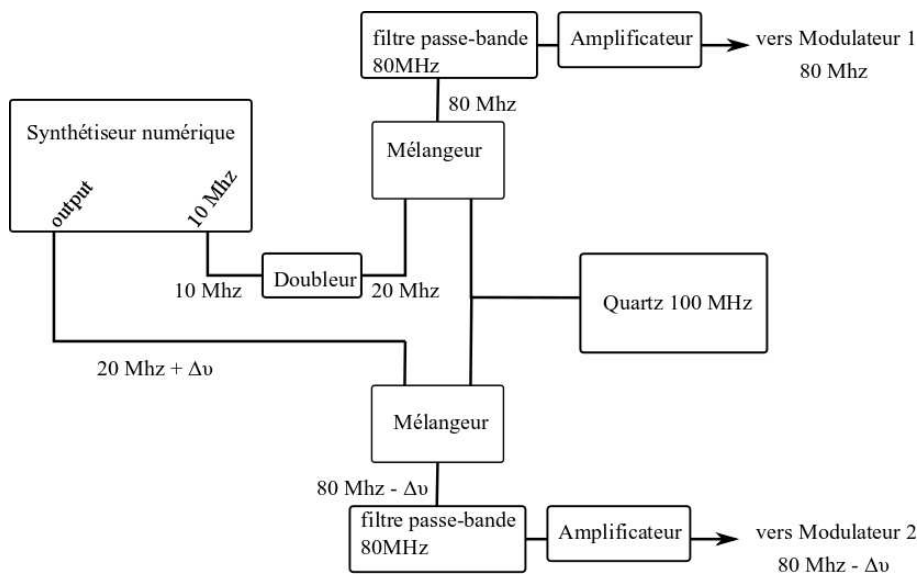


FIGURE I.13 – Circuit électronique alimentant les deux modulateurs acousto-optiques.

#### I.C.4 Publications sur le sujet et compléments

Nous avons observé une anche de clarinette en oscillation forcée en holographie digitale à décalage de phase. La lumière diffusée par l'anche en vibration se décompose spectralement en un fondamentale et ses harmoniques. En réglant la fréquence des modulateurs harmoniques, on peut imager chaque harmonique indépendamment de la fréquence fondamentale. En balayant toutes ces harmoniques, l'amplitude de la vibration peut être mesurée. Les détails de l'expérience et les résultats sont présentés les deux publications suivantes [64,65] :

- F. Joud, F. Laloë, M. Atlan, J. Hare and M. Gross. Imaging a vibrating object by Sideband Digital Holography. *Opt. Express*, vol. 17, pages 2774-2779, 2009.
- F. Joud, F. Verpillat, F. Laloë, M. Atlan, J. Hare and M. Gross. Fringe-free holographic measurements of large-amplitude vibrations. *Opt. Letters*, vol. 34, pages 3698-3700, 2009.

# Fringe-free holographic measurements of large-amplitude vibrations

F. Joud,<sup>1</sup> F. Verpillat,<sup>1</sup> F. Laloë,<sup>1</sup> M. Atlan,<sup>2</sup> J. Hare,<sup>1</sup> and M. Gross<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Kastler-Brossel, UMR 8552 CNRS, École Normale Supérieure, Université Paris 6, 24 rue Lhomond 75231 Paris Cedex 05 France

<sup>2</sup>Institut Langevin, UMR 7587 CNRS INSERM, ESPCI ParisTech, Université Paris 6, Université Paris 7, 10 rue Vauquelin, 75 231 Paris Cedex 05, France

\*Corresponding author: gross@lkb.ens.fr

Received August 19, 2009; accepted September 25, 2009;  
posted October 21, 2009 (Doc. ID 115962); published November 24, 2009

In the measurement of the amplitude of vibration of objects, holographic imaging techniques usually involve fringe counting; because of the limited resolution of the images, measurements of large amplitudes are not accessible. We demonstrate a technique that suppresses the necessity of fringe counting—frequency sideband imaging—where the order of the sideband is considered a marker of the amplitude. The measurement is completely local: no comparison with another reference point on the object is necessary. It involves a sharp variation of a signal, which makes it robust against perturbations. The method is demonstrated in an experiment made with a vibrating clarinet reed; phase modulations as large as 1000 rad have been measured.

© 2009 Optical Society of America

OCIS codes: 090.1760, 200.4880, 040.2840, 100.2000.

The observation of interference fringes in holographic methods provides accurate measurements of the amplitude of vibration of objects. Powell and Stetson [1] have shown that the fringes on the holographic reconstruction of a vibrating object correspond, after time averaging, to zeros of the Bessel function  $J_0(\Phi)$ , where  $\Phi(x,y)$  is the amplitude of phase modulation of the optical field emitted by the object at point  $x,y$ . Digital holography was introduced in 1994 by Schnars and Jüptner [2]. In 2003 Picard *et al.* [3] transposed the time averaging method to digital holography.

In a previous Letter [4], we described sideband digital holography, based on the detection of the light backscattered by a vibrating object at different sideband frequencies; the fringes for sideband  $n$  then correspond to the zeros of the  $n$ th-order Bessel function  $J_n(\Phi)$ . As in the work by Aleksoff [5] in 1971, the reference beam was frequency shifted to select one sideband  $n$ , but the use of acousto-optic modulators and numerical techniques provided much more flexibility. In [4], we showed how the comparison of dark fringes for different sideband leads to a determination of the vibration amplitude  $\Phi(x,y)$  at each point of the object. This determination is nonlocal, since it involves counting fringes from one reference point of the image to the point of interest, so that large amplitudes are not accessible.

In this Letter, we demonstrate another approach that completely eliminates the necessity of counting fringes; it gives a local measurement of the amplitude of vibration, even for large values. For any pixel of coordinate  $x,y$ , we consider the sideband order  $n$  a variable and we plot the intensity  $I$  as a function of  $n$ . One can then easily determine  $\Phi$ , since  $I(n)$  exhibits a sharp variation from maximum to zero near  $n \simeq \Phi$ . The method is robust and can easily be used even when the fringes become so narrow that they cannot be resolved, which gives immediate access to large amplitudes of vibration.

Consider a point of the object vibrating at frequency  $\nu_A$  and amplitude  $z_{\max}$ ; its displacement  $z(t)$  is

$$z(t) = z_{\max} \sin(2\pi\nu_A t). \quad (1)$$

In backscattering geometry, this corresponds to a phase modulation:

$$\varphi(t) = 4\pi z(t)/\lambda = \Phi \sin(2\pi\nu_A t), \quad (2)$$

where  $\lambda$  is the optical wavelength and  $\Phi = 4\pi z_{\max}/\lambda$ . The scattered field is then

$$E(t) = \mathcal{E}e^{i(\nu_0 t + \varphi(t))} = \mathcal{E} \sum_n J_n(\Phi) e^{i(\nu_0 + n\nu_A)t}, \quad (3)$$

where  $\mathcal{E}$  is the complex amplitude of the field,  $\nu_0$  is the frequency of the illumination optical field, and  $J_n$  is the  $n$ th-order Bessel function of the first kind;  $J_{-n}(z) = (-1)^n J_n(z)$  for integer  $n$  and real  $z$ . The scattered field is then the sum of sidebands with frequencies  $\nu_0 + n\nu_A$  and intensities  $I_n$ , given by

$$I_n(\Phi) = |\mathcal{E} J_n(\Phi)|^2. \quad (4)$$

Figure 1(a) shows the intensity of the sidebands as a function of  $n$ , assuming  $\Phi = 30.3$  rad. When  $n$  is considered a continuous variable  $n = (\nu - \nu_0)/\nu_A$  giving the Doppler frequency shift in units of  $\nu_A$ , one obtains the light gray shade corresponding to the Doppler spectrum deduced from the vibration velocity distribution. This continuous spectrum is proportional to  $[1 - (n/\Phi)^2]^{-1/2}$ , where  $n$  is confined between the values  $\pm\Phi$  that correspond to the maximum Doppler shift. The discrete spectrum has a similar behavior, remaining mostly confined between the same  $n$  values and dropping abruptly from a maximum reached close to  $n = \pm\Phi$  to almost zero. This is the key idea of our method: we measure the frequency position of this sharp variation and deduce from it the value of the vibration amplitude. This method can be seen as a discrete spectrum version of laser Doppler imaging of nonperiodic motions reported in [6,7].

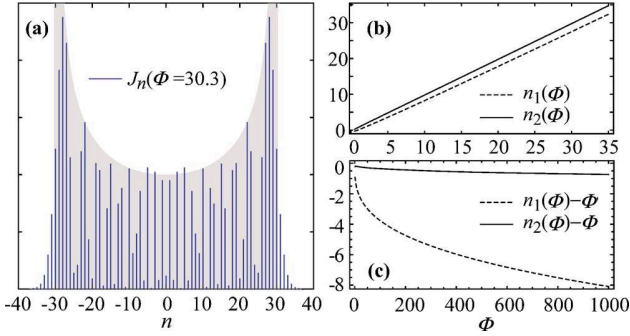


Fig. 1. (Color online) (a) Relative intensities of the sidebands as a function of  $n$  for fixed  $\Phi=30.3$  rad. The vertical lines show the intensities of the discrete  $n$  components of the real spectrum. The light gray shade shows the Doppler spectrum obtained from the vibration velocity distribution, with a continuous variable on the horizontal axis  $n=(\nu-\nu_0)/\nu_A$ . Both spectra fall abruptly beyond  $n=\pm 30.3$ , which corresponds to the Doppler shift associated with the maximum velocity. (b) The dashed line shows the values  $n_1$  as a function of  $\Phi$ , where  $n_1$  is the value of  $n$  giving the maximum intensity in the discrete spectrum; the solid line shows  $n_2$ , where  $n_2$  is the value of  $n$  for which the intensity is half the maximum, which gives a very good approximation of  $\Phi$ . (c) The dashed and solid curves, respectively, show  $n_1-\Phi$  and  $n_2-\Phi$  as a function of  $\Phi$ .

Figures 1(b) and 1(c) give more detail on this sharp variation. For each value of  $\Phi$  we calculate the value  $n_1(\Phi)$  of  $n$  that, in Eq. (4), gives the maximum intensity. To avoid the quantization noise induced by discrete variables, the calculation is made with Bessel functions of fractional order, but of course only integer values of  $n$  are relevant to the experiment. It is known [8] that  $n_1(\Phi) \approx \Phi$ , within a correction of order  $\Phi^{1/3}$ ; the dashed curves show  $n_1(\Phi)$  [Fig. 1(b)] and the difference  $n_1(\Phi)-\Phi$  [Fig. 1(c)]. To determine more precisely the location of the abrupt drop from maximum to zero, we calculate the  $n$  value  $n_2(\Phi)$  for which the intensity is half the maximum. The  $n_2(\Phi)$  and the difference  $n_2(\Phi)-\Phi$  are shown by the solid curves in Figs. 1(b) and 1(c), respectively. Clearly,  $n_2$  gives an accurate evaluation of  $\Phi$ .

The experimental setup is the same as described in [4]. As in [4], we have chosen a clarinet reed as the vibrating object to experimentally demonstrate the method. The reed, vibrating on its first flexural resonance mode at frequency  $\nu_A \sim 2100$  Hz, is illuminated at  $\lambda=650$  nm by a laser field  $E_I$  at frequency  $\nu_0$ . The CCD camera (frame frequency  $\nu_{\text{CCD}}=10$  Hz) records the interference pattern (the hologram) between the scattered light and the local oscillator beam (field  $E_{\text{LO}}$ , frequency  $\nu_{\text{LO}}$ ). Two acousto-optic modulators (Bragg cells) with frequencies  $\nu_{\text{AOM1}}$  and  $\nu_{\text{AOM2}}$  are used to adjust the frequencies  $\nu_0=\nu_L+\nu_{\text{AOM2}}$  and  $\nu_{\text{LO}}=\nu_L+\nu_{\text{AOM1}}$ ; an arbitrary sideband  $n$  can then be selected by adjusting these frequencies. A four-phase detection of sideband  $n$  is obtained by adjusting them to fulfill the relation

$$\nu_0 + n\nu_A - \nu_{\text{LO}}(n) = \nu_{\text{CCD}}/4. \quad (5)$$

We record a sequence of consecutive CCD images  $I_0, I_1, \dots, I_{M-1}$ , where  $M$  is a multiple of 4. The complex hologram  $H$  in the plane of the CCD is then

$$H = \sum_{m=0}^{M-1} j^m I_m. \quad (6)$$

From  $H$ , the images are reconstructed as in [4] by the standard convolution method [2], which provides the map of the complex field  $E(x, y, n)$  in the plane of the object. By successively adjusting the frequency  $\nu_{\text{LO}}(n)$  of the local oscillator to appropriate values, we then record the intensity images  $|E(x, y, n)|^2$  of the sidebands as a function of  $x$  and  $y$  and  $n$ . We then obtain a cube of data with three axes  $x$ ,  $y$ , and  $n$ , where  $x$  and  $y$  are expressed in units of pixels of the reconstructed image of the reed. Figure 2 shows the images obtained for  $n=0, 20, \dots, 120$  that correspond to cuts of the cube along the  $x, y$  planes. The right part of the reed ( $x > 800$ ) is clamped on the mouthpiece. The images illustrate how, when  $n$  increases, the fringes move toward regions with larger amplitudes of vibrations: no signal is obtained in regions where  $\Phi = 4\pi z_{\text{max}}/\lambda \leq n$ . This well-known property of Bessel functions allows one to get a marker on the object, signaling regions where the amplitude corresponds to  $\Phi \approx 120$  rad. Figure 3(a) displays a cut of the cube of data along the  $x, n$  horizontal plane  $y = 750$  (horizontal white dashed line in Fig. 2). The envelope of the nonzero (nonblack) part of the image provides a measurement of the amplitude of vibration in units of  $\lambda/4\pi$ . We actually obtain a direct visualization of the shape of the reed at maximal elongation, from the right part clamped on the mouthpiece to the tip on the left. The maximum amplitude correspond to  $\Phi \approx 20, 40, 60, \dots, 120$  rad. Figure 3(b) displays a transverse cut along the  $y, n$  vertical  $x=249$  plane (vertical white dashed line in Fig.

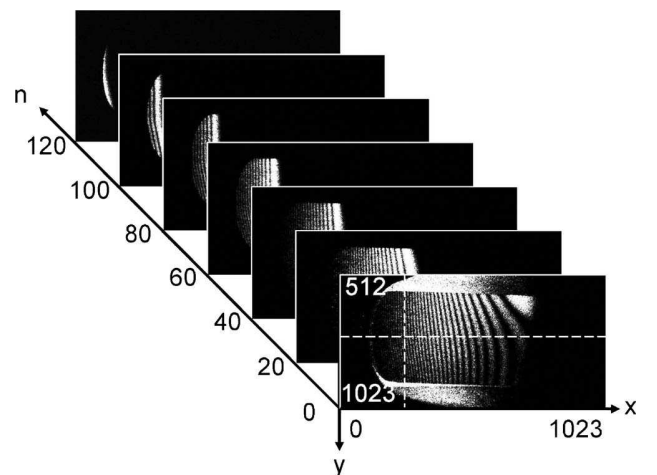


Fig. 2. Cube of data obtained from the reconstructed holographic images of a vibrating clarinet reed; sideband images with  $n=0, 20, 40, \dots, 120$  are shown in arbitrary linear scale. By choosing  $n$ , one moves the border of the illuminated region on the object, obtaining a local marker of the amplitude of vibration. The white dashed lines correspond to  $x=249$  and  $y=750$ , i.e., to the point chosen for Fig. 3.



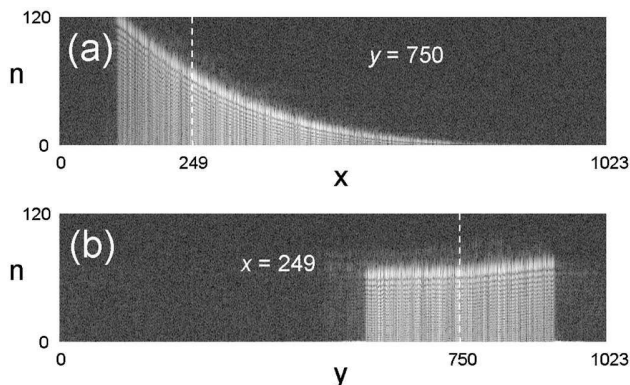


Fig. 3. Images corresponding to cuts of 3D data of the reconstructed images along the planes  $y=750$  (a) and  $x=249$  (b). (a) Deformation of the object along its axis. (b) Transverse cut with a slight vibration asymmetry. A logarithmic intensity scale is used.

2); a slight asymmetry of the reed vibration is clearly visible.

Figures 2 and 3 have been obtained by exciting the reed at the resonance frequency  $\nu_A=2123$  Hz and at moderate excitation level. The consistency of amplitude measurements obtained in this way with those obtained by fringe counting is illustrated in Fig. 3 of [4]. We have also used higher excitation amplitudes, about 10 times larger (the frequency of reed resonance is then shifted to  $\nu_A=2020$  Hz). Figure 4(a) shows the images obtained for  $n=330$ : the fringes are now completely unresolved, but the transition from zero to nonzero intensity remains very clear. With a single hologram, and without fringe counting, one obtains a clear marker of the line where  $\Phi(x,y)=330$  rad.

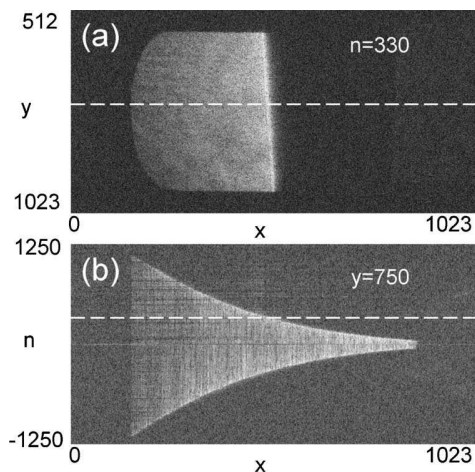


Fig. 4. (a) Image reconstructed with sideband  $n=330$ , with a large amplitude of vibration. (b) Equivalent of Fig. 3(a), but with positive and negative  $n$  values quantized by steps  $\Delta n=10$ ; one measures a maximum vibration amplitude of  $z_{\max}\approx 60$   $\mu\text{m}$ . An enlarged view of the  $n\geq 0$  part of the image is provided in supplementary material (Media 1). A logarithmic intensity scale is used.

Figure 4(b) shows the equivalent of Fig. 3(a) but with a higher excitation level, and this time for positive and negative values of  $n$ ; data range up to about  $|n|\approx 1140$ , corresponding to  $z_{\max}\approx 58.4$   $\mu\text{m}$ . Since the vibration amplitude is much larger than  $\lambda$ , the continuous approximation for  $n$  is valid, and the images of Fig. 3 can be reinterpreted in terms of the classical Doppler effect: if the signal intensity  $I_n(x,y)$  at frequency  $\nu_0+n\nu_A$  is nonzero, at some time  $t$  of the periodic motion the Doppler shift  $\nu_0+2v(x,y,t)/c$  is equal to  $n\nu_A$  ( $v$  and  $c$  are the reed and light velocities). The accuracy of the measurement of the amplitude corresponds to about one step:  $\Delta n=10$ , i.e., to  $0.5$   $\mu\text{m}$  [see Fig. 4 (Media 1)]. A fine analysis of the 3D data shows a slight asymmetry between the positive and the negative  $n$  values. In Fig. 4(b), for example, the maximum value for  $|n|$  is about 1160 for  $n>0$  and 1120 for  $n<0$ . This means that the motion of the reed is not perfectly sinusoidal and that maximum velocities (i.e., maximum Doppler shifts) are slightly different for the up and down motion of the reed. A more detailed study of the modification of the spectrum due to the superposition of several harmonic motions can be done but falls beyond the scope of this Letter.

In conclusion, taking advantage of the frequency (or the sideband order  $n$ ) of the light scattered by a vibrating object adds a new dimension to digital holography. Each pixel of the image then provides information that is completely independent of the others, which results in redundancy and robustness of the measurements. Looking at the edges of the spectrum provides an accurate determination of the vibration amplitude and avoids a cumbersome analysis of the entire data cube, giving easy access to measurements of large amplitudes of oscillation. Our method could be combined with other techniques, such as phase modulation of the reference beam [9,10], to yield information on the phase of the mechanical vibration without losing the robustness of the measurement.

## References

1. R. Powell and K. Stetson, *J. Opt. Soc. Am.* **55**, 1593 (1965).
2. U. Schnars and W. Jüptner, *Appl. Opt.* **33**, 179 (1994).
3. P. Picart, J. Leval, D. Mounier, and S. Gougeon, *Opt. Lett.* **28**, 1900 (2003).
4. F. Joud, F. Laloë, M. Atlan, J. Hare, and M. Gross, *Opt. Express* **17**, 2774 (2009).
5. C. Aleksoff, *Appl. Opt.* **10**, 1329 (1971).
6. M. Atlan and M. Gross, *Rev. Sci. Instrum.* **77**, 116103 (2006).
7. M. Atlan, M. Gross, B. Forget, T. Vitalis, A. Rancillac, and A. Dunn, *Opt. Lett.* **31**, 2762 (2006).
8. M. Abramowitz and I. Stegun, *Handbook of Mathematical Functions with Formulas, Graphs, and Mathematical Table* (Courier Dover, 1965).
9. O. Lokberg, *J. Acoust. Soc. Am.* **96**, 2244 (1994).
10. F. Zhang, J. Valera, I. Yamaguchi, M. Yokota, and G. Mills, *Opt. Rev.* **11**, 297 (2004).

### Compléments à ces publications

L'onde complexe diffusée par une anche en vibration à la fréquence  $\omega_A$  et illuminée par un faisceau laser à la fréquence  $\omega_0$  s'écrit :

$$E_S(t) = \mathcal{E} e^{i\omega_0 t} e^{i\Phi \sin(\omega_A t)} = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} E_n(t), \quad (\text{I.51})$$

$$\text{avec } E_n(t) = \mathcal{E} J_n(\Phi) e^{i(\omega_0 + n\omega_A)t} \quad (\text{I.52})$$

Dans l'équation I.51,  $\mathcal{E}$  est le signal optique réfléchi par l'anche sans vibration et  $\Phi$  est le déphasage maximal dû à la vibration :  $\Phi = 4\pi z_{max}$ , où  $z_{max}$  est l'amplitude de la vibration.  $J_n$  est la fonction de Bessel de première espèce d'ordre  $n$ .

Le spectre du signal diffusé par l'anche en vibration est élargi par effet Doppler. En effet la vitesse des différentes zones de l'anche varie au cours du temps. La figure I.14 illustre le champ de vitesse de l'anche à 4 instants différents de la période d'oscillation. En une période, la vitesse d'un point de l'anche à une position  $y$  va osciller entre les vitesses  $-v(y)$  et  $+v(y)$ . L'extrémité de l'anche va donc osciller entre les vitesses  $-v_{max}$  et  $+v_{max}$ , où  $v_{max}$  est la vitesse maximale atteinte par ce point de l'anche. Le décalage Doppler créé par un point se déplaçant à la vitesse  $v$  du récepteur éclairé par un laser de fréquence  $\omega_0$  est donné par :

$$\omega^{(v)} = \omega_0 * \frac{c}{c - v}, \quad (\text{I.53})$$

où  $c$  est la vitesse de la lumière et  $\omega^{(v)}$  est la fréquence perçue par le récepteur. Puisque le mouvement de l'anche est périodique et que le signal est intégré sur un grand nombre de périodes à chaque enregistrement, le spectre Doppler du signal émis par l'anche se discrétise. Il est le résultat de la convolution entre le spectre acoustique ( $\omega_0 \pm n\omega_A$ ) et le spectre Doppler continu créé par le champ de vitesse de l'anche (équation I.53). La figure I.15 représente le spectre du signal en fonction du champ de vitesse de l'anche.

En réglant les fréquences des deux modulateurs acousto-optiques de manière à vérifier l'équation suivante :

$$\omega_{AOM1} - \omega_{AOM2} - n\omega_A = \frac{\omega_{CCD}}{4}, \quad (\text{I.54})$$

on décale la fréquence de détection du système de  $\omega_0$  à  $\omega_0 + n\omega_A$ . De ce fait, seules les zones de l'anche qui renvoient une onde de fréquence  $\omega_0 + n\omega_A$  à un instant donné de la période d'oscillation apparaissent sur l'hologramme. A chaque fréquence de détection  $\omega_0 + n\omega_A$  est associée une vitesse  $v(n)$  comme l'illustre la figure I.15. Seuls les points de l'anche qui atteignent cette vitesse  $v(n)$  pendant un période d'oscillation vont être détectés par le système, cette zone est située entre l'extrémité de l'anche et une certaine distance  $y(n)$  comme l'illustre la figure I.16. La figure I.17(a) montre une reconstruction d'une anche en vibration obtenue pour  $n = 330$ . On voit clairement (partie blanche de l'anche) la zone générant ce décalage Doppler.

Le champ de vitesse de l'anche étant borné par les vitesses  $-v_{max}$  et  $+v_{max}$ , le spectre discret du signal émis par l'anche en vibration est lui aussi borné dans l'intervalle de fréquence  $[\omega_0 - \Phi\omega_A, \omega_0 + \Phi\omega_A]$  [65]. L'amplitude des harmoniques chute brutalement à zéro aux alentours des fréquences  $\omega_0 \pm \Phi\omega_A$ . On peut donc mesurer le déphase  $\Phi$  de la vibration en détectant l'ordre  $n$  à partir duquel on ne détecte plus de signal. Le déphasage  $\Phi$  permet d'évaluer l'amplitude réelle de la vibration  $z_{max}$ . Cette méthode permet donc de mesurer

des amplitudes d'oscillation beaucoup grande que la longueur d'onde du laser, et ce sans compter le défilement de franges d'interférences.

Cette méthode permet également de reconstruire le mouvement global de l'oscillation comme le montre la figure I.17 extraite des publications. On peut ainsi par exemple détecter des dissymétries dans l'oscillation comme on peut le voir sur la figure I.17(a).

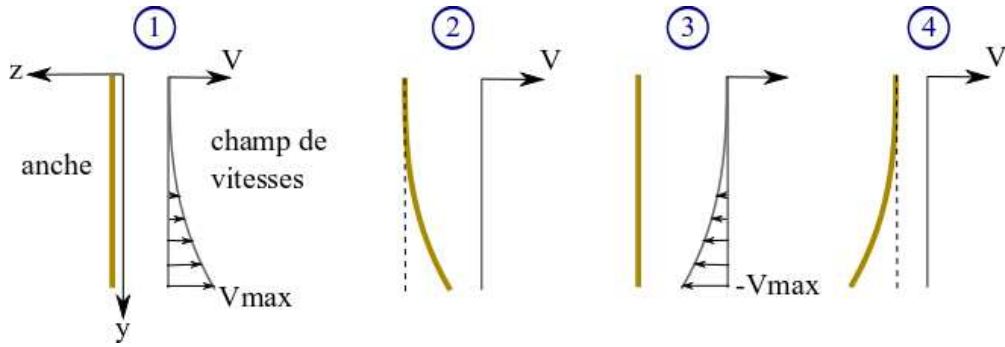


FIGURE I.14 – Positions de l'anche et champ de vitesse associés à 4 instants différents d'une période d'oscillation. Aux instants 1 et 3, l'anche est en position neutre, la vitesse de l'extrémité est alors maximale. Aux instants 2 et 4, l'anche atteint son amplitude maximale de vibration, la vitesse est alors nulle.

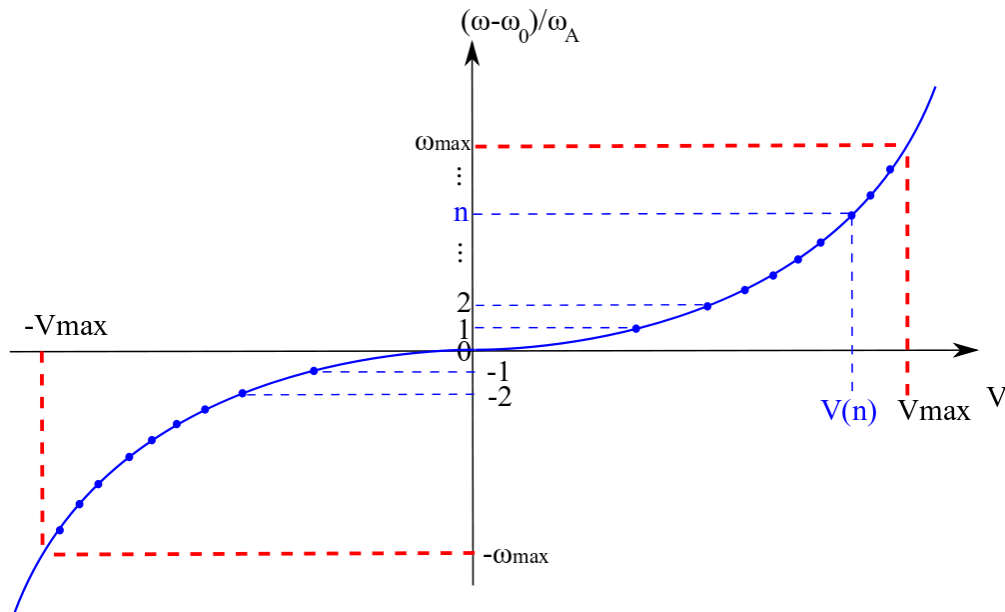


FIGURE I.15 – Décalage Doppler associé au champ de vitesses de l'anche en vibration.

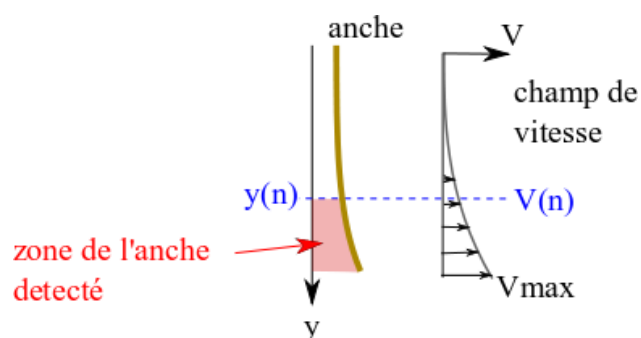


FIGURE I.16 – Zone de l'anche visible sur l'hologramme à la fréquence de détection  $\omega^{(n)}$ . Seuls les points situés entre  $y(n)$  et l'extrémité de l'anche (zone en rouge) atteignent pendant une période d'oscillation la vitesse  $v(n)$  générant un décalage Doppler à la fréquence  $\omega^{(n)}$ .

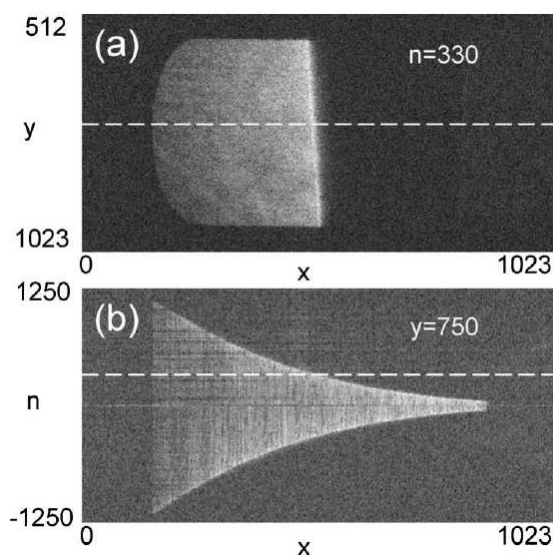


FIGURE I.17 – (a) Reconstruction de l'anche en échelle logarithmique pour  $n = 330$  d'une anche en vibration à 2020 Hz. L'échelle en X et Y est en pixels. On observe une légère dissymétrie de l'oscillation (de part et d'autre de la ligne blanche en pointillés). (b) Empilement des reconstructions des harmoniques de rang  $n = -1250$  à  $n = 1250$ . On observe une perte du signal pour  $n \simeq 1160$ , ce qui correspond à une amplitude de vibration de  $z_{max} = 60\mu m$ .



### I.C.5 Holographie à décalage de phase en illumination stroboscopique

Le dispositif présenté dans les publications précédentes ne permet pas de reconstruire l'objet à un instant donné de l'oscillation. Dans ce but j'ai développé un dispositif dérivé du montage précédent. L'idée est de réaliser une illumination stroboscopique synchronisée sur l'oscillation. En décalant la fréquence de détection, comme expliqué dans la section précédente, il est possible de détecter tous les harmoniques de rang  $n$  générées par effet Doppler afin de reconstruire l'objet.

Le montage optique utilisé pour l'enregistrement des hologrammes et le circuit électronique contrôlant les modulateurs acousto-optiques sont présentés sur la figure I.18. Le montage optique est le même que celui présenté dans la section précédente. La partie électronique est modifiée pour réaliser l'illumination stroboscopique de l'anche. La figure I.19 illustre la synchronisation des différents signaux sur la période d'oscillation de l'anche. Le générateur de fonction (SG 1) qui alimente le haut-parleur est utilisé comme base temporelle du système. Le haut-parleur fait vibrer l'anche à 2143 Hz. Un deuxième synthétiseur (SG 2) envoie à la fois un signal sinusoïdal à 20 MHz et un signal TTL à 10 MHz que l'on double dans un doubleur de fréquence. Un générateur de pulse carré synchronisé sur le signal TTL de SG1 émet un signal carré de durée  $\delta t$  à chaque période d'oscillation de l'anche. On utilise deux portes logiques NAND afin de laisser passer les signaux à 20 MHz uniquement pendant la durée  $\delta t$  du signal carré. On mélange ensuite ces signaux avec un signal sinusoïdal à 100 MHz pour obtenir les signaux à 80 MHz nécessaires à l'alimentation des acousto-optiques. La largeur du signal carré  $\delta t$  fixe la durée d'illumination de l'anche. Dans notre expérience, nous avons fixé  $\delta t = 15\% \times T_A \simeq 70 \mu s$ , où  $T_A$  est la période de l'oscillation ( $T_A = 2\pi/\omega_A$ ). Nous expliquerons ce choix dans la suite. Pour balayer les différentes positions de la vibration, on règle le retard du signal carré noté  $t_d$  entre 0 et  $T_A$ . Pendant la durée  $\delta t$  du signal carré, les modulateurs AOM 1 et 2 sont activés, l'anche est illuminée et l'onde de référence est envoyée sur la caméra. En dehors, les modulateurs sont désactivés et les faisceaux qui les traversent ne sont pas déviés et sont donc coupés en sortie par les iris.

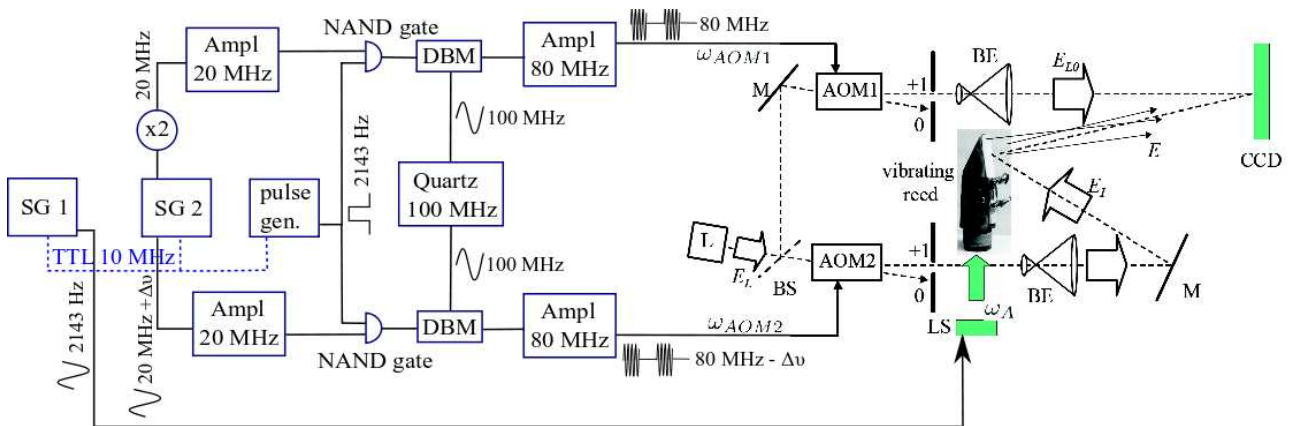


FIGURE I.18 – *SG* : synthétiseur numérique, *DBM* : mixeur de fréquence, *NAND* : porte logique, *L* : laser, *AOM* : modulateurs acousto-optiques, *M* : miroirs, *BS* : cube séparateur de faisceau, *BE* : agrandisseur de faisceau, *LS* : haut-parleur excitant l'anche de clarinette à la fréquence  $\omega_A/2\pi$ , *CCD* : camera.

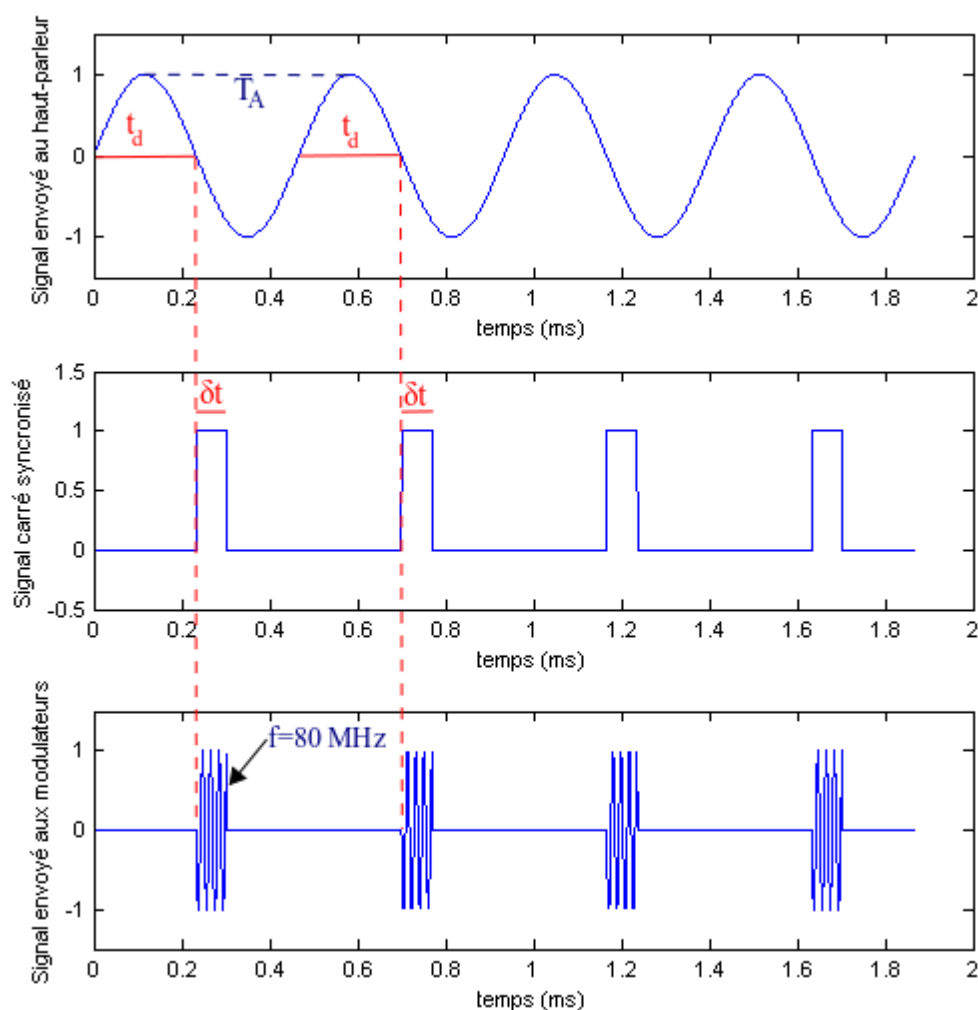


FIGURE I.19 – (en haut) signal sinusoïdal de fréquence 2143 Hz envoyé au haut-parleur. (au milieu) signal carré émis par le synthétiseur SG 2. (en bas) Signal envoyé aux modulateurs acousto-optiques.

Dans ce dispositif, l'objet en vibration est illuminé à un instant donné de la période d'oscillation, instant auquel est associé un unique champ de vitesse. Ce champ de vitesse ne va générer qu'une partie du spectre Doppler. Si l'anche est illuminée lorsqu'elle se rapproche du détecteur, seules les harmoniques de rang  $n$  positifs sont générées, et inversement lorsque l'anche s'éloigne du détecteur. Contrairement à l'expérience précédente dans laquelle le signal était intégré pendant toute la période d'oscillation (figure I.16), on observe pour chaque fréquence de détection  $\omega^{(n)}$  un signal uniquement sur une zone étroite de l'anche (figure I.20). Ceci s'explique par le fait qu'à la fréquence de détection  $\omega^{(n)}$  et à l'instant donné  $t_d$  auquel l'anche est illuminée, seule la zone ayant pour vitesse  $v(n)$  est détectée. La largeur de la zone détectée dépend fortement du temps d'exposition  $\delta t$  choisi. En effet la largeur de la bande de fréquence mesurable, notée  $\delta\omega$  et l'intervalle de temps  $\delta t$  sont liés par un principe d'incertitude tel que  $\delta t \times \delta\omega \sim 1$ . Pour illustrer cette relation et justifier le réglage

du paramètre  $\delta t$ , nous avons simulé numériquement le spectre Doppler détecté en fonction de la durée d'exposition  $\delta t$  et du retard  $t_d$ . La figure I.21 montre l'intensité des harmoniques de rang  $n$ , noté  $|A_{n,x,\delta x}|^2$  tel que :

$$E(t) = \mathcal{E} \sum_n A_{n,x,\delta x}(\Phi) e^{i\omega^{(n)}t}. \quad (\text{I.55})$$

Le terme  $A_{n,x,\delta x}$  est l'amplitude de l'harmonique de rang  $n$ , calculée pour un retard  $t_d = x \times T_A$  et une durée d'exposition  $\delta t = \delta x \times T_A$ . La figure I.21 (a) représente le spectre sans illumination stroboscopique (i.e.  $\delta t = 1$ ). Les figures I.21(b), (c) et (d) montrent respectivement les spectres obtenus pour  $\delta x = 0,2, 0,1$  et  $0,05$ . Sur ces spectres,  $\text{Phi} = 50$ , et  $x$  varie de  $0,25$  à  $0,75$ . On observe pour  $\delta x = 0,2$  que la forme du spectre détecté dépend du moment de l'illumination ( $x \times T_A$ ). Il est large pour  $x = 0,45$  ou  $x = 0,55$ , ce qui correspond aux instants de forte variation du champ de vitesse, et étroit pour  $x = 0,25$  et  $x = 0,75$  lorsque le champ de vitesse varie peu. Avec une durée d'illumination plus courte telle que  $\delta x = 0,05$ , on observe que le spectre est large et ne dépend pas de l'instant de l'illumination. La durée de l'illumination est trop courte pour définir clairement le décalage Doppler. Le spectre obtenu pour  $\delta x = 0,1$  semble indiquer que la valeur optimale est proche de  $0,1$ . Nous avons réglé la valeur de  $\delta t$  ( $= \delta x \times T_A$ ) égale à  $0,15$  pour obtenir les résultats suivants.

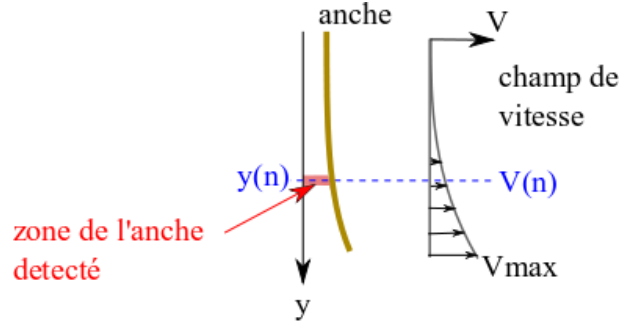


FIGURE I.20 – Zone de l'anche visible sur l'hologramme à la fréquence de détection  $\omega^{(n)}$  en illumination stroboscopique.

Pour obtenir les résultats présentés sur les figures I.22 et I.23, nous avons fait varier  $t_d$  de  $0$  à  $T_A$  par pas de  $10\% \times T_A$ . Pour chaque valeur de  $t_d$ , la fréquence de détection est décalée aux harmoniques de rang  $n = -100$  à  $n = 100$  en réglant les fréquences des acousto-optiques de manière à vérifier la relation suivante :

$$\omega_{AOM1} - \omega_{AOM2} - n\omega_A = \frac{\omega_{CCD}}{4}, \quad (\text{I.56})$$

pour  $n$  compris entre  $-100$  et  $100$ , avec  $\omega_{CCD} = 2\pi \times 12,5$  Hz. Nous avons enregistré 4 hologrammes pour chaque valeur de  $n$  et appliqué l'algorithme de démodulation 4-phases (équation I.44) pour les reconstruire. La figure I.22 montre 9 reconstructions en échelle logarithmique de l'anche en vibration pour  $t_d = 0$ ,  $t_d = 30\%T_A$  et  $t_d = 50\%T_A$  (respectivement de haut en bas) et pour  $n = -60$ ,  $n = 0$  et  $n = +60$  (respectivement de gauche à droite). La partie de l'anche fixée au support est à droite de l'image. On observe pour  $t_d = 0\%$  un signal uniquement sur une raie étroite de l'anche pour  $n = +60$ , et pas de

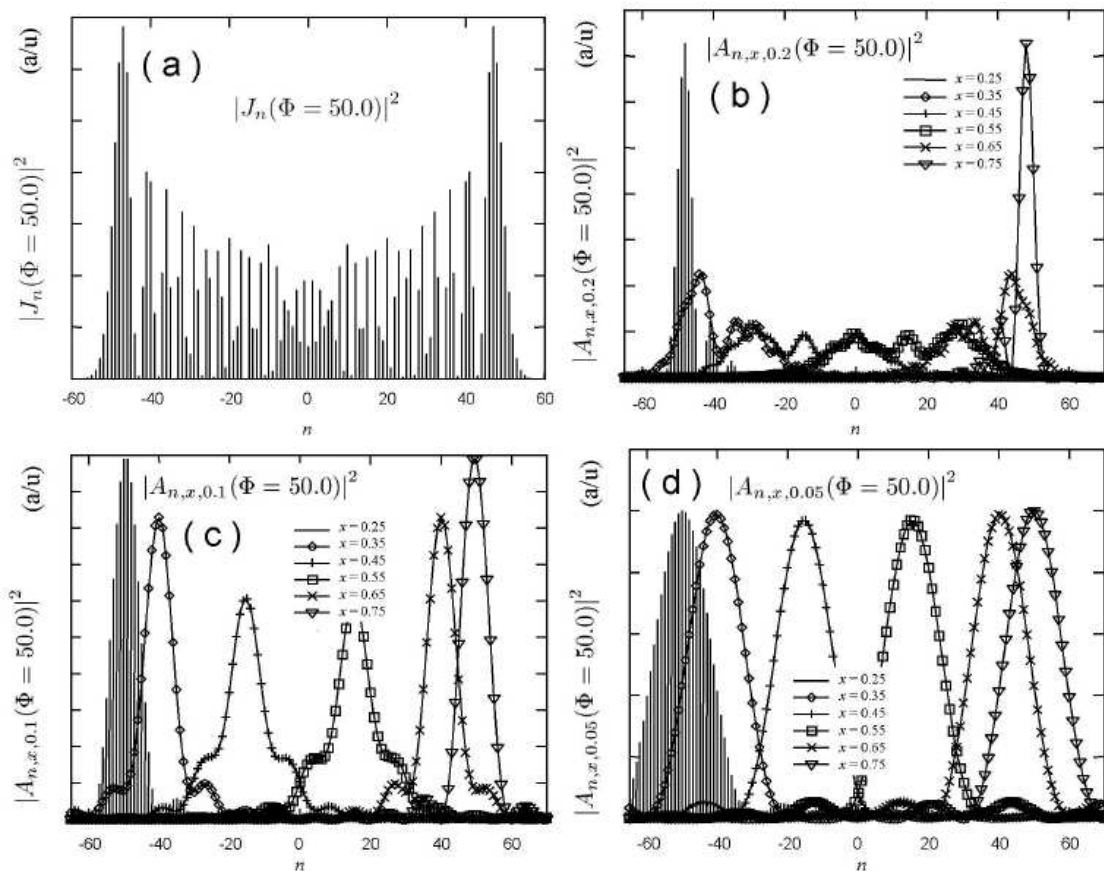


FIGURE I.21 – Simulations numériques de la densité spectrale  $|A_{n,x,\delta x}|^2$  du champ détecté en fonction du rang harmonique  $n$  sans (a) et avec (b-c-d) illumination stroboscopique. Ces courbes sont obtenus pour différentes durées d'illumination stroboscopique  $\delta t = \delta x \times T_A$  ( $\delta x = 0,2$  (b),  $\delta x = 0,1$  (c) et  $\delta x = 0,05$  (d)), et pour différents instants d'illumination  $t_d = x \times T_A$ . La déphasage maximal  $\Phi$  de chaque spectre est égale à 50.

signal pour  $n$  négatif. Ceci nous indique qu'à l'instant  $t_d = 0$ , l'anche à une vitesse positive (vers le détecteur). On peut également mesurer la vitesse instantanée  $v(60)$  de la zone éclairée sur l'anche à  $n = +60$  :

$$v(60) = c \left( 1 - \frac{\omega_0}{\omega_0 + 60 \omega_A} \right) \simeq 8 \times 10^{-2} \text{ m.s}^{-1} \quad (\text{I.57})$$

En  $t_d = 30\%$ , on observe un signal uniforme sur l'anche au rang  $n = 0$ , qui signifie que la vitesse de l'anche est nulle à cet instant. L'anche est donc dans une position d'amplitude maximale de l'oscillation. En  $t_d = 50\%$  on observe une raie étroite en  $n = -60$ , l'anche s'éloigne du détecteur.

On peut ainsi suivre le champ de vitesse de l'anche pendant une période. Nous avons fait varier  $t_d$  par pas de 10% de  $T_A$  pour obtenir un film de 10 images par périodes. La figure I.23 montre le champ de vitesse à ces différents instants. Pour obtenir ces images, on empile les reconstructions des ordres  $n = -100$  à  $n = 100$  pour chaque valeur de  $t_d$ . Les positions successives de l'anche peuvent être reconstruite en intégrant ces vitesses.

Cette expérience permet de démontrer qu'il est possible de reconstruire les différentes

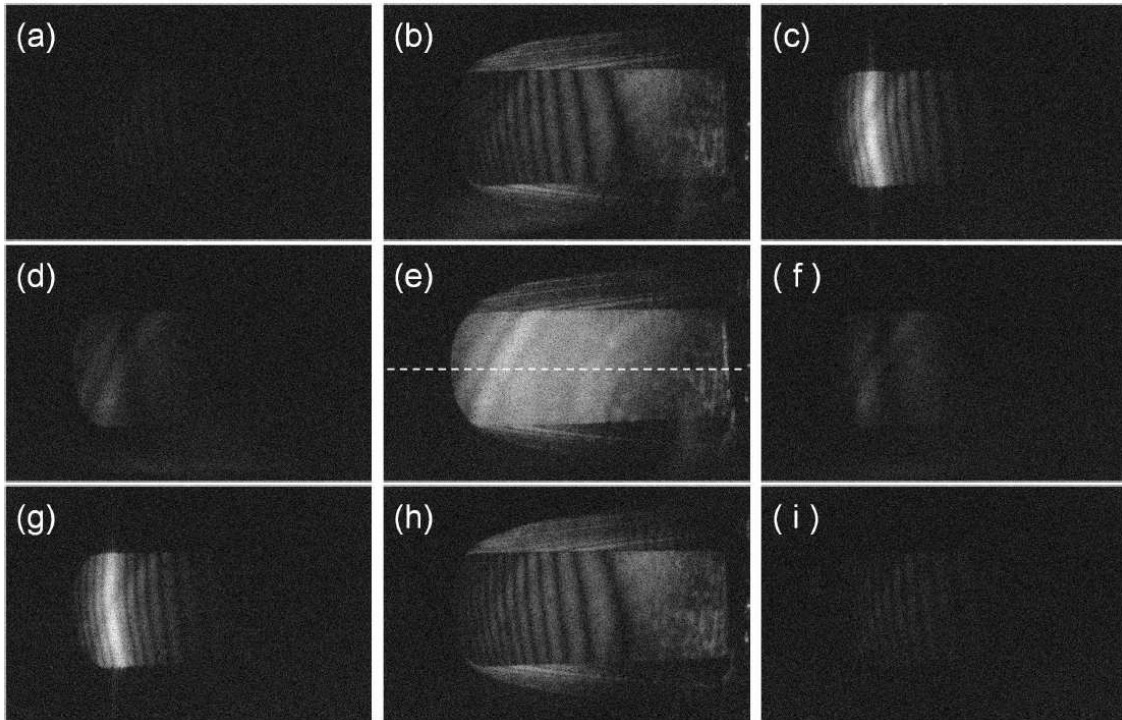


FIGURE I.22 – *Reconstruction de l'intensité du champ en échelle logarithmique pour  $t_d = 0$  (a,b,c),  $30\%T_A$  (d,e,f) et  $50\%T_A$  (g,h,i) et pour  $n = -60$  (a,d,g),  $0$  (b,e,h) et  $+60$  (c,f,i).*

positions de l'objet en oscillation en synchronisant à la fois l'illumination et le signal envoyé vers les modulateurs acousto-optiques sur la fréquence d'excitation de l'anche. Ceci a été démontré dans le cas d'une oscillation sinusoïdale simple. Cette technique permettrait dans le cas d'une oscillation plus complexe (type aile de papillon) ou dans le cas de deux oscillateurs couplés de déterminer si l'oscillation se réalise en phase ou en opposition de phase. Ceci ne peut pas être déterminé sans l'apport de l'illumination stroboscopique. Néanmoins, les deux inconvénients principaux à cette technique sont :

- d'une part, le réglage de la durée d'illumination  $\delta t$  qui nécessite un compromis entre quantité de signal et finesse de la décomposition du mouvement.
- d'autre part, la quantité d'images à acquérir pour réaliser cette décomposition. Pour obtenir les résultats précédents, il faut enregistrer, pour chaque valeurs de  $t_d$ , 4 images par harmoniques, allant du rang  $-100$  à  $+100$ . Soit un total de  $10 \times 4 \times 201 = 8040$  images. La fréquence d'acquisition de la caméra étant de  $12.5$  Hz, l'enregistrement total nécessite environ 12 minutes, alors que la période de l'oscillation est de  $466 \mu s$ . Il faut ajouter à cela le temps nécessaire au calcul de reconstruction des hologrammes ainsi que le temps pris par l'ordinateur de contrôle pour changer la fréquence des synthétiseurs numériques au cours de l'acquisition. Le temps total est en réalité de l'ordre d'une heure pour réaliser ce film de 10 images. Toutes ces opérations d'acquisitions des données et de reconstructions sont totalement automatisées et contrôlées par un seul ordinateur.

L'observation d'objet en vibration en holographie stroboscopique a été rapporté par Leval et al. [66]. Leval a réalisé une illumination stroboscopique de manière mécanique, ce qui a limité la technique à l'observation de vibration à basses fréquences ( $< 5$  kHz). L'apport de notre montage par rapport aux techniques existantes est l'utilisation des

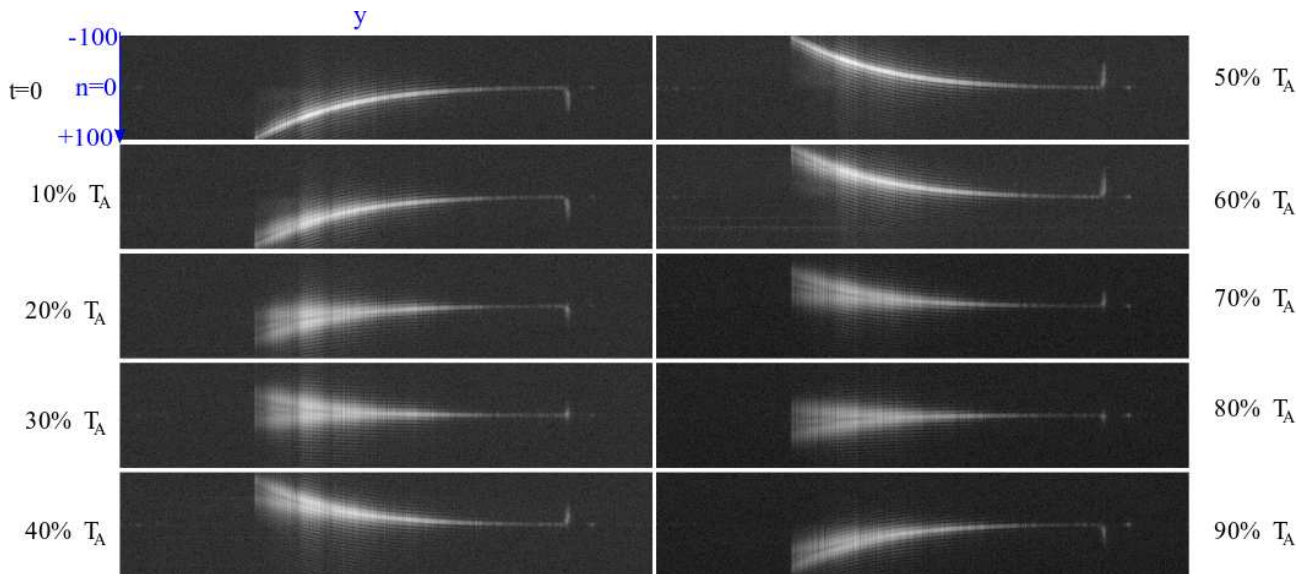


FIGURE I.23 – Positions successives de l'anche sur une période  $T_A$ . Ces images sont obtenues en prenant la section dans le plan  $X = 268$  (ligne blanche en pointillés de la figure I.22) de l'empilement des images reconstruites pour  $n = -100$  à  $n = 100$ .

modulateurs acousto-optique pour réaliser à la fois l'holographie à décalage de phase et l'illumination stroboscopique. Ces modulateurs permettent non seulement d'atteindre des durées d'illuminations plus courtes et donc l'étude de vibration à plus haute fréquence, mais aussi de facilement automatiser l'acquisition et la reconstruction des données.

## Conclusion du chapitre 1

Dans cette section, nous avons rappelé comment se forme un hologramme sur une plaque photographique, puis nous avons expliqué comment former une image virtuelle à partir de l'information contenue dans l'hologramme. Nous avons notamment vu comment la géométrie hors-axe permet de séparer les différents ordres de diffractions de l'hologramme lors de la restitution, ce qui permet d'isoler l'information sur l'objet étudié. L'holographie digitale a ensuite été présentée. L'intérêt majeur du numérique est la possibilité d'observer un objet au cours du temps, ce qui n'est pas réalisable avec un système classique sur plaque photographique. La géométrie hors-axe en holographie digitale permet en calculant la transformée de Fourier des hologrammes numériques de séparer spatialement les ordres de diffraction dans l'espace des fréquences spatiales (espace de Fourier). Un filtrage numérique dans cet espace permet d'isoler l'information sur le champ complexe diffracté par l'objet d'étude. Deux méthodes de calculs pour la reconstruction des hologrammes sont présentées. La première, utilisant l'approximation de Fresnel permet de reconstruire le champ diffracté par l'objet en une seule transformée de Fourier, mais est néanmoins limité en terme de distance de propagation. La seconde consiste à calculer le spectre angulaire de l'hologramme par une première transformée de Fourier, puis de propager ce spectre dans l'espace de Fourier et enfin de calculer la transformée inverse pour obtenir l'hologramme propagé. Cette technique permet de propager le champ complexe sur n'importe quelle distance, mais nécessite un temps de calculs deux fois plus long comparé à la première méthode. Enfin la technique de l'holographie digitale à décalage de phase via l'utilisation de modulateurs acousto-optiques a été présentée. Une application de cette technique à l'étude d'objet en vibration développée par notre équipe est détaillé à la fin de ce chapitre.

L'étude d'objet en vibration en holographie digitale n'entre pas directement dans le sujet de cette thèse. Cette expérience m'a néanmoins permis de me familiariser avec les techniques d'holographie digitale lors de mon arrivée dans l'équipe de recherche. Ce travail annexe m'a rendu plus autonome lors de la mise en place du montage expérimental de microscopie holographique et m'a surtout permis de cibler un obstacle important à l'holographie digitale : le temps de calcul nécessaire à la reconstruction des hologrammes. En effet, notre équipe avait pour habitude au début de ma thèse de reconstruire les hologrammes via des algorithmes écrits en langage C sur des PC équipés de processeurs multi-cœurs. Cette méthode à priori « rapide » ne permettait néanmoins pas à reconstruire les hologrammes en temps réel. L'objectif de ce projet de thèse étant de suivre des nanoparticules en mouvement en holographie digitale, ce qui implique d'enregistrer de longues séquences d'images et de les reconstruire pour analyser le mouvement des objets observés. J'ai donc travaillé pendant cette thèse sur un moyen d'accélérer la reconstruction des hologrammes afin de disposer d'un outil de calcul plus confortable pour la suite du projet. Ce développement fait l'objet du chapitre 3. Étant donné que le logiciel développé est spécialisé pour la microscopie holographique, il est nécessaire de présenter tout d'abord le montage expérimental de microscopie utilisé pour ce projet. Ceci fait l'objet du chapitre 2.

---

## Développement du microscope holographique pour le suivi en 3D de nanoparticules d'or

---

Le projet à l'origine de ce travail de thèse était de créer un montage optique permettant de localiser et de suivre en trois dimensions et dans le temps des nanoparticules d'or en mouvement. Avant de développer ce montage optique, il était nécessaire d'estimer à la fois l'intensité du signal diffusé par des nanobilles d'or et la vitesse de diffusion de ces particules. Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord rappeler quelques résultats sur la diffusion de lumière par une particule et sur le mouvement brownien. Ces résultats nous ont permis de développer un microscope holographique adapté à cette problématique. Ce montage expérimental est détaillé dans la dernière section de ce chapitre.

### Sommaire

---

<b>II.A</b>	<b>Diffusion de lumière par une nanoparticule d'or . . . . .</b>	<b>45</b>
II.A.1	Diffusion de Rayleigh et Diffusion de Mie . . . . .	45
II.A.1.a	Indice optique de l'or . . . . .	47
II.A.1.b	Modèle de diffusion de Rayleigh . . . . .	47
II.A.1.c	Modèle de diffusion de Mie . . . . .	49
II.A.2	Estimation du signal collecté par un objectif de microscope. . .	50
II.A.3	Discussion sur la nécessité d'utiliser un montage combinant géométrie hors-axe et imagerie en champ noir . . . . .	51
II.A.3.a	Etat de l'art sur la localisation de particules micrométriques et nanométriques en holographie digitale	51
II.A.3.b	Première approche : filtrage de l'illumination derrière l'objectif de microscope . . . . .	53
II.A.3.c	Deuxième approche : filtrage de l'illumination à l'entrée de l'objectif de microscope . . . . .	54
<b>II.B</b>	<b>Mouvement brownien d'une nanoparticule dans un fluide . .</b>	<b>56</b>
<b>II.C</b>	<b>Réalisation du montage de microscopie holographique. . . . .</b>	<b>58</b>
II.C.1	Choix d'un laser à faible longueur de cohérence . . . . .	58



II.C.2	Alignement du bras de référence . . . . .	59
II.C.3	Alignement du bras d'illumination . . . . .	61
II.C.4	Enregistrement des images . . . . .	61
II.C.5	Grossissement optique du montage . . . . .	62

---

## II.A Diffusion de lumière par une nanoparticule d'or

Les nanoparticules d'or sont des agrégats sphériques d'atomes d'or formés généralement par une réaction chimique entre le chlorure d'or et le citrate de sodium [67, 68]. Leur croissance contrôlée permet d'obtenir des agrégats typiquement 1 à 200 nm avec une dispersion d'environ 5% (voir figure II.1). Les nanoparticules d'or sont des marqueurs non-

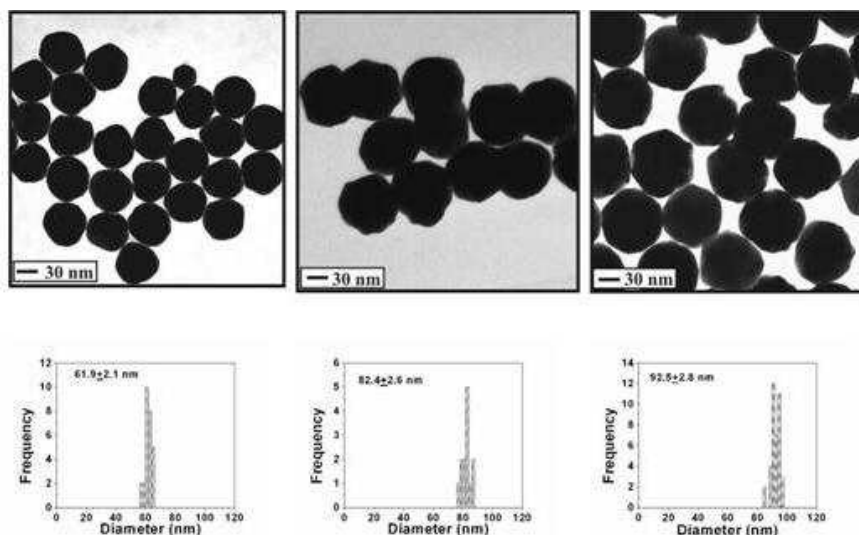


FIGURE II.1 – Images de nanobilles d'or allant de 60 à 90 nm de diamètres et histogrammes de distribution de taille (Image prise sur le site du fabricant Nanopartz©).

fluorescents. Lorsqu'elles sont illuminées par un faisceau laser, une partie de l'énergie du faisceau est diffusée. Le signal collecté par l'objectif de microscope qui nous permet de les localiser est uniquement constitué de cette lumière diffusée. Dans cette section, on rappellera le principe de la diffusion d'une particule dans un milieu, et on donnera les ordres de grandeurs d'efficacité de diffusion attendus pour nos nanoparticules d'or.

### II.A.1 Diffusion de Rayleigh et Diffusion de Mie

Lorsqu'un faisceau lumineux de longueur d'onde  $\lambda$  se propageant dans un milieu d'indice optique  $m$  rencontre une particule d'indice optique  $n$ , une partie de l'énergie lumineuse est diffusée dans le milieu ou absorbée par la particule. L'efficacité de l'absorption et la diffusion ainsi que l'angle solide dans lequel la lumière est diffusée dépendent principalement de 5 facteurs [21] :

- $a$ , le rayon des particules,
- $\lambda$ , la longueur d'onde de la lumière ,
- $n$ , l'indice optique complexe de ces particules à la longueur d'onde  $\lambda$  ( $n = n_0 - i\chi$ ),
- $m$ , l'indice optique du milieu contenant ces particules à la longueur d'onde  $\lambda$ ,
- la polarisation de la lumière incidente.

En notant l'intensité du faisceau incident  $I_0$ , l'intensité  $I_{dif}$  (figure II.2) diffusée par la particule

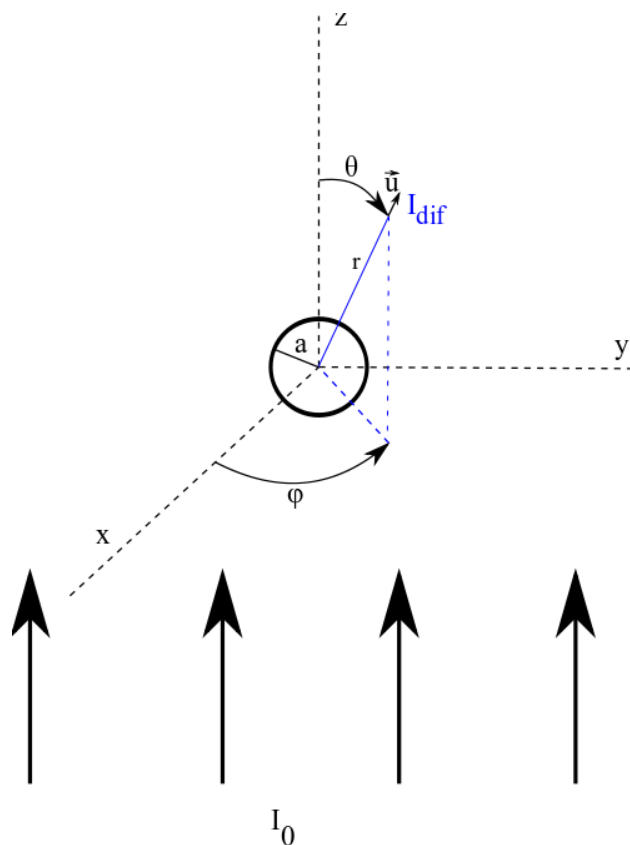


FIGURE II.2 – Diffusion de la lumière par une particule de rayon  $a$ . La lumière incidente arrive par le bas.

– dans la direction du vecteur unitaire  $\vec{u}$  défini par les coordonnées :

$$\vec{u} = \begin{pmatrix} 1 \\ \theta \\ \varphi \end{pmatrix} \quad (\text{II.1})$$

– et à la distance  $r$  de la particule est donnée par l'équation suivante :

$$I_{dif} = \frac{F(\theta, \varphi)}{k^2 r^2} I_0, \quad (\text{II.2})$$

où  $k = 2\pi/\lambda$  et  $F$  est la « fonction de phase » de la diffusion. Le rapport  $F/k^2$  est homogène à une aire, ce qui définit en intégrant  $F/k^2$  sur l'ensemble des directions de l'espace une aire  $C_{dif}$  appelée **section efficace de diffusion**.

$$C_{dif} = \frac{1}{k^2} \int F(\theta, \varphi) \sin \theta \, d\theta d\varphi. \quad (\text{II.3})$$

On appelle  $G = \pi a^2$  la section efficace géométrique de la particule. Cette grandeur nous permet de définir le **coefficient d'efficacité de diffusion**  $Q_{dif}$  :

$$Q_{dif} = \frac{C_{dif}}{G}. \quad (\text{II.4})$$

La quantité totale d'énergie lumineuse  $W_{dif}$  émise dans toutes les directions de l'espace par diffusion est égale à :

$$W_{dif} = C_{dif}I_0 = GQ_{dif}I_0. \quad (\text{II.5})$$

Une autre fraction de l'énergie incidente est absorbée par la particule. On peut de la même manière définir une section efficace d'absorption  $C_{abs}$  ainsi qu'un coefficient d'efficacité d'absorption  $Q_{abs}$ . La somme de la diffusion et de l'absorption définit le section efficace d'extinction :

$$Q_{ext} = Q_{abs} + Q_{dif} \quad (\text{II.6})$$

Il existe plusieurs modèles permettant de calculer ces sections efficaces ainsi que la fonction de phase  $F(\theta, \varphi)$ . Parmi eux, deux modèles sont adaptés au calcul de la diffusion par une nanobille d'or sphérique :

1. **le modèle de Rayleigh** [21, 69] qui permet de calculer ces coefficients dans le cas d'une particule unique petite devant la longueur d'onde d'illumination.
2. **le modèle de Mie** [21, 70] dans le cas d'une particule sphérique de taille arbitraire.

### II.A.1.a Indice optique de l'or

Il est nécessaire de connaître l'indice optique complexe ( $n = n_0 - i\chi$ ) de l'or à la longueur d'onde de notre laser afin de calculer les coefficient d'efficacité de diffusion et d'absorption. L'indice optique complexe de l'or a été mesuré sur une large gamme de longueurs d'onde par Palik [71] et Johnson [72]. La figure II.3 donne la partie réelle  $n_0$  et imaginaire  $\chi$  de l'indice de l'or. La valeur de l'indice optique à la longueur d'onde de notre laser,  $\lambda = 660$  nm, est donnée dans le tableau ci-dessous :

$\lambda$	660 nm
$n_0$	0.14
$\chi$	3.70

### II.A.1.b Modèle de diffusion de Rayleigh

Le modèle de diffusion de Rayleigh consiste à considérer la particule comme un dipôle oscillant à la fréquence du champ électrique d'illumination et à calculer son rayonnement. Il s'applique aux conditions suivantes :

$$\text{a) } a \ll \frac{\lambda}{2\pi}$$

$$\text{b) } |n| \cdot a \ll \frac{\lambda}{2\pi}$$

Ces conditions reviennent à dire que le modèle est valable si le rayon de la particule est petit devant la longueur d'onde « dans la particule ( $\lambda/m$ ) ». Nous avons utilisé des nanobilles d'or de 25 à 50 nm de rayon dans nos expériences. Ces tailles sont inférieures à la longueur d'onde utilisée (laser visible à  $\lambda = 660$  nm), mais ne peuvent pas être considérées comme négligeables devant  $\lambda$ . La diffusion par nos nanobilles d'or se situe donc à la limite de ce modèle. Nous avons néanmoins calculé l'efficacité de diffusion par ce modèle simple afin de comparer les résultats aux valeurs données par le modèle de Mie. Le modèle de Rayleigh

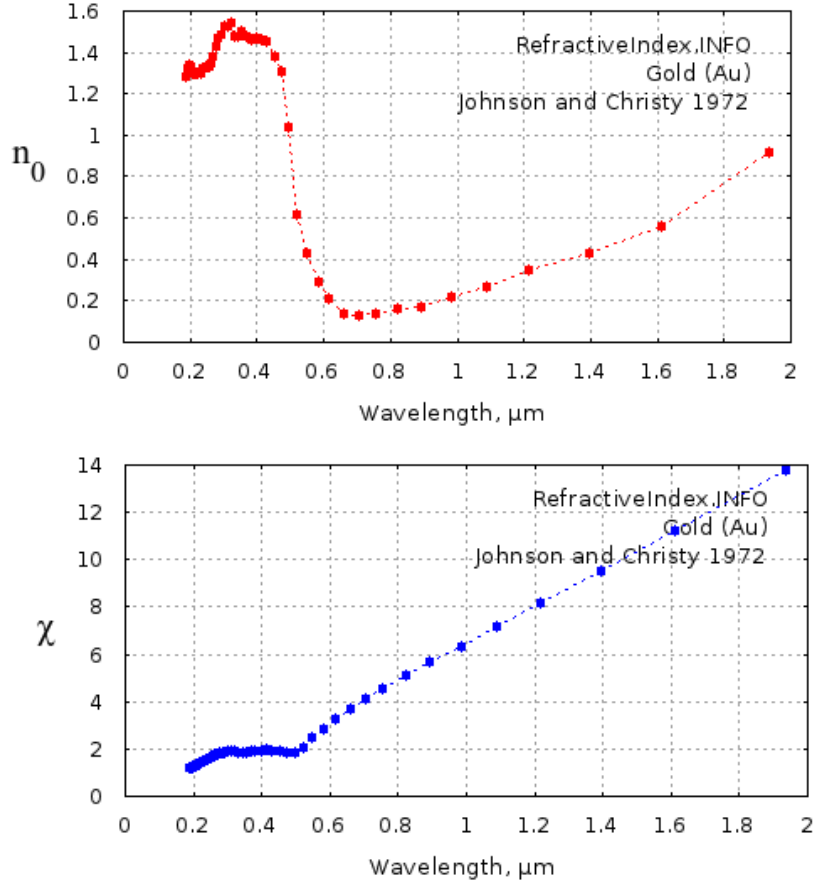


FIGURE II.3 – *Indice optique complexe de l'or dans le domaine visible et proche infrarouge. en haut : partie réelle de  $n$ . en bas : partie imaginaire de  $n$ .*

permet d'exprimer simplement les coefficient d'absorptions et de diffusions en fonctions des paramètres listés précédemment.

$$C_{dif} = \pi a^2 Q_{dif} = \frac{8}{3} \pi k^4 \left| \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} a^3 \right|^2 \quad (\text{II.7})$$

$$C_{abs} = \pi a^2 Q_{abs} = 4 \pi k \text{Re} \left( i a^3 \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \quad (\text{II.8})$$

où  $k = 2\pi m/\lambda$ . Ces équations sont valables dans le cas d'une lumière non polarisée. Nous remarquons que la section efficace de diffusion  $C_{dif}$  dépend du rayon  $a$  de la particule à la puissance 6. La taille des particules est donc un paramètre essentiel dans ce genre d'expérience étant son influence sur le signal diffusé. Le tableau suivant donne la valeur de  $C_{dif}$  pour des nanobilles d'or de différentes tailles dans l'eau ( $m = 1.33$ ) illuminé par un faisceau laser à 660 nm :

diamètre de la nanobille (nm)	$C_{dif}$ ( $\mu\text{m}^2$ )
100	$5.3 \cdot 10^{-3}$
60	$2.5 \cdot 10^{-4}$
40	$2.2 \cdot 10^{-5}$
20	$3.4 \cdot 10^{-7}$

### II.A.1.c Modèle de diffusion de Mie

Le modèle de diffusion de Mie permet de calculer les coefficients d'extinctions d'une particule sphérique de taille arbitraire. On appelle néanmoins « régime de diffusion de Mie » la diffusion par des particule de taille proche de la longueur d'onde. La diffusion de lumière par des nanobilles d'or de 100 nm se situe dans ce régime. L'explication détaillée de la théorie de Mie n'entre pas dans le cadre de ce manuscrit de thèse. Nous allons simplement rappeler les résultats nous concernant :

$$C_{ext} = \pi a^2 Q_{ext} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{p=1}^{\infty} (2p+1) \mathcal{R}e(a_p + b_p), \quad (\text{II.9})$$

$$C_{dif} = \pi a^2 Q_{dif} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{p=1}^{\infty} (2p+1) (|a_p|^2 + |b_p|^2), \quad (\text{II.10})$$

$$C_{abs} = C_{ext} - C_{dif}, \quad (\text{II.11})$$

Les termes  $a_p$  et  $b_p$  sont décrits par les deux équations suivantes :

$$a_p = \frac{\psi_p'(nka)\psi_p(ka) - n\psi_p(nka)\psi_p'(ka)}{\psi_p'(nka)\zeta_p(ka) - n\psi_p(nka)\zeta_p'(ka)} \quad (\text{II.12})$$

$$b_p = \frac{n\psi_p'(nka)\psi_p(ka) - \psi_p(nka)\psi_p'(ka)}{n\psi_p'(nka)\zeta_p(ka) - \psi_p(nka)\zeta_p'(ka)} \quad (\text{II.13})$$

où  $\psi_p$  et  $\zeta_p$  sont les fonctions de Riccati-Bessel d'ordre  $p$ . Le développement de ces calculs montrent également que la section efficace de diffusion varie comme la puissance 6 du rayon pour des particules nanométriques [21]. Nous avons utilisé pour ces calculs de diffusions de Mie un logiciel en libre accès sur internet développé par l'« Oregon Medical Laser Center » :

-[http://omlc.ogi.edu/calc/mie\\_calc.html](http://omlc.ogi.edu/calc/mie_calc.html)

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

diamètre de la nanobille (nm)	$C_{dif}$ ( $\mu\text{m}^2$ )
100	$1.5 \cdot 10^{-2}$
60	$4.8 \cdot 10^{-4}$
40	$3.6 \cdot 10^{-5}$
20	$5.1 \cdot 10^{-7}$

Ces valeurs sont comparables à celles calculées par le modèle de diffusion de Rayleigh (section précédente II.A.1.b). On remarque que les valeurs calculées par la méthode de Mie ou de Rayleigh sont plus proches pour les petits diamètres (20 et 40 nm). Cette tendance est attendue car les billes de 60 et 100 nm sont à la limite des conditions de Rayleigh. Pour cette raison on utilisera les valeurs calculées par le modèle de Mie pour estimer le signal de diffusion collecté par un objectif de microscope (voir section suivant). Le calculateur de Mie permet également d'obtenir la fonction de phase  $F(\theta, \varphi)$  de l'équation II.2 permettant de calculer l'intensité de diffusion dans un direction particulière de l'espace. La figure II.4 montre la fonction de phase dans le cas de la diffusion par un bille de 100 nm pour 3 états de polarisations différents : non-polarisée, perpendiculaire à la direction de propagation de la

lumière incidente, et parallèle à cette direction. Comme nous le verrons dans la suite, nous avons utilisé un objectif à champ noir qui bloque la lumière arrivant sous une ouverture numérique de 0.2 ( $\simeq 11^\circ$  dans l'air) et collecte la lumière arrivant entre les ouvertures 0,2 et 0,5 (soit  $30^\circ$ ). La diffusion par des billes de 100 nm ou moins est « quasiment isotrope » dans le sens où l'énergie diffusée n'est pas essentiellement concentrée dans la direction de l'onde incidente comme c'est le cas pour des particules de taille supérieure au micron. Cette répartition de l'énergie diffusée est plutôt homogène dans les différentes directions de l'espace. De ce fait notre objectif à champ noir (qui élimine le cône de lumière compris entre  $0^\circ$  et  $11^\circ$ ) ne vas pas bloquer l'essentiel du signal.

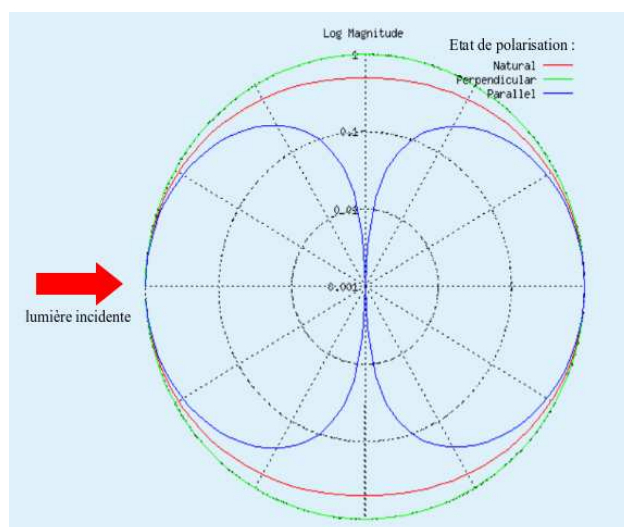


FIGURE II.4 – Fonction de phase (en échelle logarithmique) de la diffusion d'un faisceau laser à 660 nm par une nanoparticule de 100 nm de diamètre dans l'eau. Le faisceau incident arrive par la gauche. *En vert* : polarisation perpendiculaire au faisceau incident, *En bleu* : polarisation parallèle, *En rouge* : lumière non-polarisée (ou naturelle).

## II.A.2 Estimation du signal collecté par un objectif de microscope.

Le calcul théorique de la section efficace de diffusion permet d'estimer le nombre de photons diffusés  $N_{dif}$  pouvant être collectés par un objectif de microscope :

$$N_{dif} = \frac{N_i C_{dif} \eta}{C_i}, \quad (II.14)$$

où  $N_i$  est le nombre de photon par seconde du faisceau d'illumination,  $C_{dif}$  est la section efficace de diffusion,  $C_i$  la section du faisceau d'illumination au niveau de la particule, et  $\eta$  le ratio entre l'angle solide défini par l'ouverture numérique de l'objectif et l'angle solide définissant tout l'espace. La prise en compte de l'ouverture numérique de l'objectif par ce simple ratio est valable dans notre expérience car on peut faire l'approximation que la répartition de l'énergie diffusée par nos particules d'or est quasi-isotrope. Le calcul exact imposera d'intégrer l'intensité diffusée  $I_{dif}(\theta, \varphi) = I_0 \times F(\theta, \varphi)/k^2 r^2$  entre 0 et l'angle maximal collecté par l'objectif, mais ne vas pas changer significativement notre estimation de la section efficace. Nous cherchons à estimer l'ordre de grandeur de cette

section efficace plutôt que sa valeur exacte.  $N_i$  se calcule en connaissant la puissance du faisceau d'illumination  $P_i$  :

$$N_i = \frac{P_i \lambda}{hc}. \quad (\text{II.15})$$

Dans notre expérience,  $P_i \simeq 80$  mW, soit  $N_i = 2.7 \cdot 10^{17}$  photons par seconde. L'efficacité de collection  $\eta$  est d'environ 8% pour un objectif d'ouverture numérique 0.5, et nous avons mesuré le *waist* de notre faisceau d'illumination à  $200 \mu\text{m}$ , soit  $C_i = 4 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$ . Le tableau ci-dessous donne le ratio entre le nombre de photons collectés par seconde et le nombre de photons incidents ( $N_{dif}/N_i$ ) pour différentes tailles de nanoparticules avec les paramètres donnés précédemment :

diamètre de la nanobille (nm)	$N_{dif}/N_i$
100	$3.0 \cdot 10^{-8}$
60	$9.6 \cdot 10^{-10}$
40	$7.2 \cdot 10^{-11}$
20	$1.0 \cdot 10^{-12}$

### II.A.3 Discussion sur la nécessité d'utiliser un montage combinant géométrie hors-axe et imagerie en champ noir

#### II.A.3.a Etat de l'art sur la localisation de particules micrométriques et nanométriques en holographie digitale

Les calculs précédents sur l'estimation du signal de diffusion montrent clairement que la capacité de détecter une nanoparticule dépend essentiellement de sa taille, car l'efficacité de diffusion dépend du rayon de la particule à la puissance 6. La très faible efficacité attendue pour des particules de 100 nm ou moins nous a amené à concevoir un montage différent des ceux qui existaient pour la localisation de particules de taille micrométrique par microscopie holographique [13–18, 20]. Ces différents résultats ont été obtenus en holographie « dans l'axe », où le faisceau d'illumination sert aussi de faisceau de référence. Dans ce type d'expérimentation, un objectif standard de grande ouverture numérique (par exemple, l'utilisation d'un objectif 100x, d'ouverture 1.4 [15], voir la figure II.5) collecte à la fois la lumière diffusée et le faisceau d'illumination. Une caméra CCD derrière l'objectif enregistre la superposition du faisceau d'illumination avec la lumière diffusée par les particules. L'efficacité de diffusion d'une particule micrométrique est telle que l'intensité du signal diffusé n'est pas négligeable devant l'intensité du faisceau d'illumination. De ce fait il est possible, en ajustant l'intensité du faisceau d'illumination, de détecter l'interférence entre la lumière diffusée et le faisceau d'illumination sans atteindre la saturation du capteur. L'utilisation d'objectifs à grande ouverture permet d'atteindre des résolutions axiales et latérales de l'ordre de quelques nanomètres.

Si la dynamique des capteurs CCD actuels permet de détecter l'interférence créée par la diffusion de lumière dans le cas de particule micrométrique, cette efficacité de diffusion est très nettement inférieure dans notre cas, où l'on souhaite suivre des particules d'or de diamètre inférieur ou égal à 100 nm. La détection de la lumière diffusée par les particules nécessite alors d'augmenter la puissance de l'illumination. Par exemple, pour atteindre le même niveau de sensibilité entre la détection d'une bille de  $1 \mu\text{m}$  et la détection d'une bille de 100 nm, il faut augmenter la puissance d'illumination d'un facteur  $10^3$ . La dynamique des capteurs



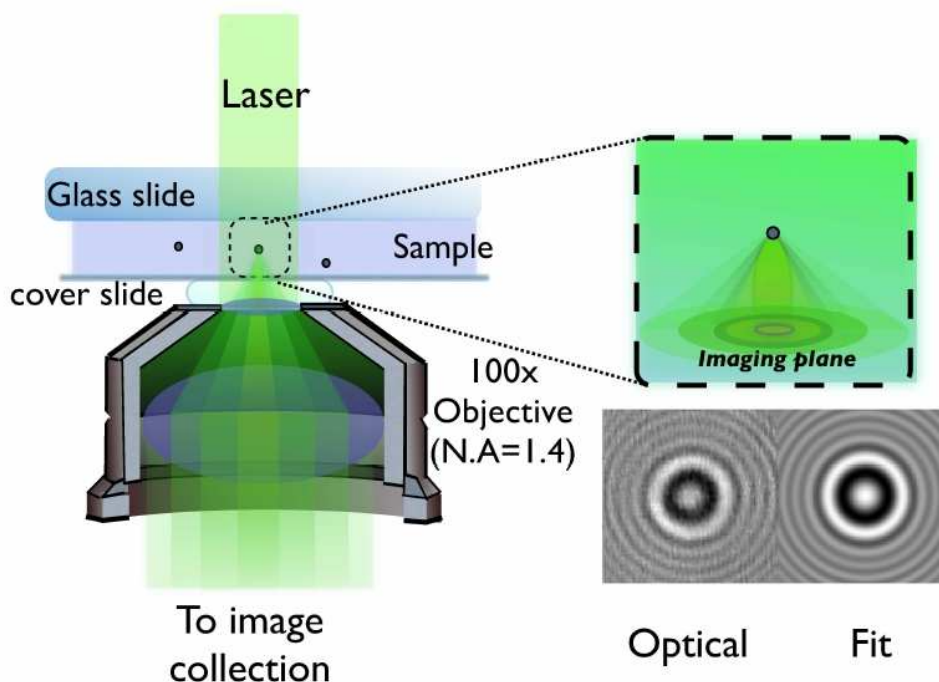


FIGURE II.5 – Schéma d'un montage optique d'holographie in-line (figurant sur l'article de Cheong et al. [13]). L'objectif enregistre l'interférence entre la diffusion des particules et la partie non-diffusée du faisceau d'illumination.

CCD n'est alors plus suffisante pour enregistrer l'interférence sans atteindre la saturation du capteur avec un montage d'holographie « dans l'axe ». La détection de nanoparticules en holographie digitale est cependant possible si la lumière diffusée est isolée du faisceau d'illumination. Notre équipe de recherche a démontré la possibilité de localiser des nanobilles d'or de 40 à 200 nm en holographie digitale « hors-axe » en utilisant une illumination en réflexion totale (TIRF) [22, 25]. La figure II.6 tirée de l'article de Warnasooriya et al. [25] illustre un des montages développés au laboratoire au début de ma thèse. Ce type de configuration apporte plusieurs avantages :

- seule la lumière diffusée est collectée par l'objectif, évitant ainsi la saturation du capteur CCD ;
- l'intensité de l'onde d'illumination et de l'onde de référence peuvent être ajustées indépendamment ;
- la géométrie hors-axe permet d'atteindre des niveaux de bruits inférieurs à ceux atteints en holographie « dans l'axe » ;
- l'illumination en réflexion totale permet d'utiliser des objectifs de grande ouverture numérique.

Cependant l'inconvénient majeur de cette configuration est que l'illumination forme une onde stationnaire due aux réflexions sur les parois du prisme. L'intensité de l'illumination n'est alors plus homogène le long de l'axe  $z$ . L'intensité du signal diffusé par une particule en mouvement est alors dépendante de sa position sur l'axe  $Z$ . Notre objectif étant de suivre une particule se déplaçant dans les 3 dimensions, nous avons opté pour une utilisation d'un objectif en champ noir afin d'éviter cet inconvénient.

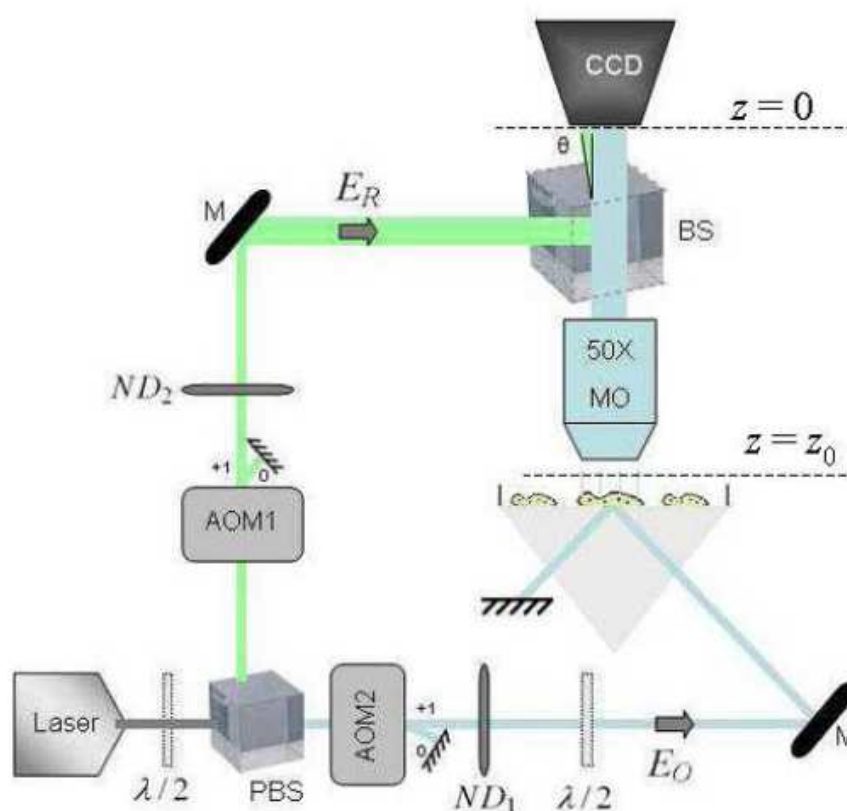


FIGURE II.6 – Schéma du montage optique figurant sur l'article de Warnasooriya [25]. L'illumination en réflexion totale est réalisée par le prisme situé sous l'échantillon. AOM : modulateurs acousto-optique, ND : filtre de densité, PBS : cube séparateur polarisant, BS : cube séparateur.

### II.A.3.b Première approche : filtrage de l'illumination derrière l'objectif de microscope

Nous avons tout d'abord souhaité garder une géométrie où le faisceau d'illumination est aligné sur l'axe optique et focalisé sur l'échantillon pour éviter les problèmes d'onde stationnaire de la configuration TIRF. Notre première approche pour séparer la lumière d'illumination du signal diffusé par les nanoparticules a été d'utiliser un objectif de microscope standard et de placer un masque opaque au niveau de la pupille de sortie pour couper la lumière d'illumination. Cette configuration est inspirée de la technique utilisée par Dubois et Grosfils [73] pour l'imagerie de particules en holographie digitale. La figure II.7 illustre ce dispositif. Ce dispositif nous a semblé présenter l'avantage de pouvoir utiliser un objectif de grande ouverture numérique afin d'augmenter le signal collecté. Cependant lors de la mise en place de ce dispositif, nous avons pu observer son inconvénient majeur : une partie de l'énergie du faisceau d'illumination est diffusée par le masque, qui est ensuite réfléchi en partie par la face arrière de l'objectif. Nous avons constaté que même si la réflexion sur la face arrière de l'objectif est de l'ordre de quelques pour-cents de l'intensité d'illumination, cette réflexion parasite est beaucoup plus intense que l'intensité du signal diffusé par les

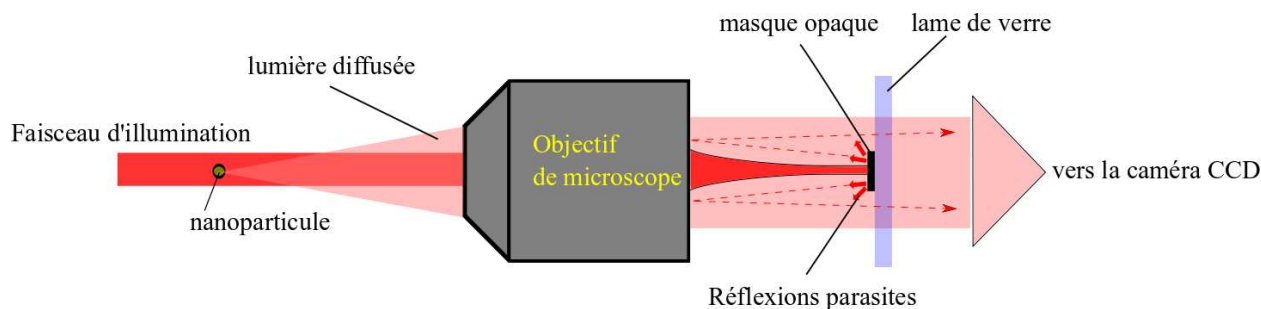


FIGURE II.7 – Schéma de la première configuration testée pour le suivi de nanoparticules en 3D. Le faisceau d'illumination est focalisé sur le masque opaque situé au milieu d'une lame de verre transparente. La lumière diffusée par la particule est collectée par l'objectif puis envoyée sur la caméra. Cette configuration est limitée par la lumière diffusée par le masque puis réfléchi par la face arrière de l'objectif. L'intensité du faisceau d'illumination étant très grande devant l'intensité diffusée par la particule, cette lumière parasite n'est pas négligeable et gêne considérablement l'enregistrement des hologrammes.

nanoparticules (qui est de l'ordre de  $10^{-8}$  inférieure à l'intensité d'illumination). Nous en avons conclu qu'il est nécessaire d'éliminer la lumière d'illumination en amont de l'objectif de microscope. Ce dispositif est présenté dans la section suivante.

### II.A.3.c Deuxième approche : filtrage de l'illumination à l'entrée de l'objectif de microscope

Nous avons donc choisi d'utiliser un objectif en réflexion (ou « Cassegrain ») dont le fonctionnement est expliqué sur la figure II.8. L'objectif (Edmund©, série ReflX, ouverture numérique 0.5, agrandissement 36x) présente un masque opaque au centre de la pupille d'entrée. Il collecte uniquement la lumière comprise entre les angles solides d'ouverture numérique 0.2 et 0.5 et bloque complètement la partie centrale. La lumière collectée est réfléchi sur un miroir parabolique (MP) puis par un miroir sphérique (MS) situé derrière le masque. Le faisceau d'illumination est totalement bloqué en le focalisant sur le masque. Nous avons constaté que dans cette configuration, aucune réflexion parasite due à l'illumination n'est détectée sur la caméra. L'inconvénient majeur de cet objectif est sa faible ouverture numérique. Nous avons néanmoins opté pour cette solution. La totalité du montage optique sera présenté dans la suite de ce chapitre.

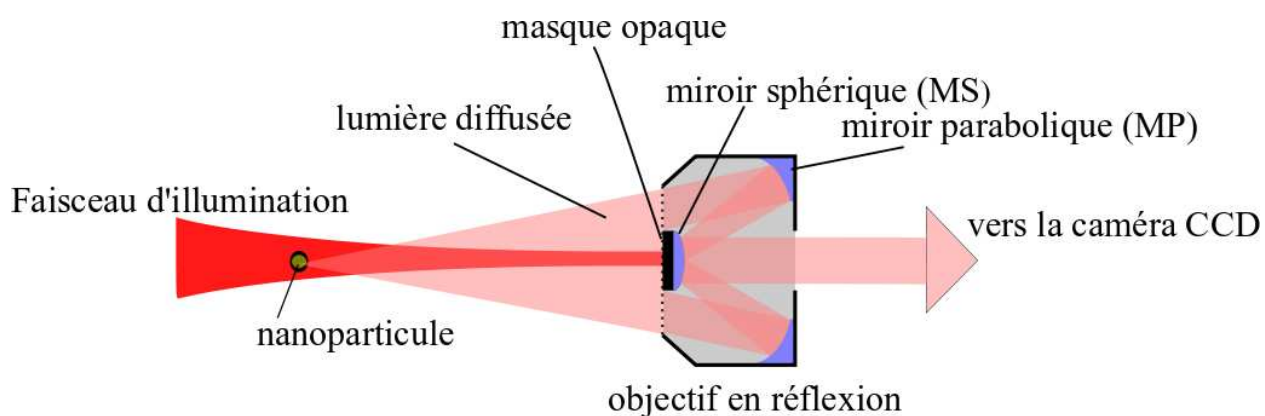


FIGURE II.8 – Schéma de l'objectif en réflexion utilisé dans notre système. Le faisceau d'illumination est focalisé sur le masque opaque situé au centre de la pupille d'entrée de l'objectif. La lumière diffusée par la particule est réfléchiée par le miroir parabolique (MP) puis réfléchiée une seconde fois par le miroir sphérique vers la caméra.



FIGURE II.9 – Objectif en réflexion utilisé.

## II.B Mouvement brownien d'une nanoparticule dans un fluide

Notre premier objectif dans ce projet de thèse était de pouvoir suivre une bille d'or de 100 nm en mouvement brownien dans l'eau, avant d'étudier la diffusion dans des milieux plus complexes. L'intérêt de cette observation est que les lois qui décrivent la diffusion brownienne d'une particule dans l'eau est connue ; cette base théorique permet de vérifier la fiabilité du suivi réalisé par notre microscope et d'en évaluer les performances. Le mouvement brownien est la description mathématique de la trajectoire aléatoire de la particule soumise aux chocs avec les molécules du fluide environnant. Ce mouvement aléatoire est caractérisé par un coefficient de diffusion  $D$ , dont la valeur est donnée par la formule d'Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a}, \quad (\text{II.16})$$

où  $k_B$  est la constante de Boltzmann,  $T$  la température du fluide,  $\eta$  la viscosité dynamique du fluide et  $a$  le rayon de la particule. Ce coefficient de diffusion permet de calculer le libre parcourt moyen de la particule pendant un intervalle de temps  $\Delta t$  (figure II.10) :

$$L^{1D} = \sqrt{2D\Delta t} \quad (\text{en 1 dimension}) \quad (\text{II.17})$$

$$L^{2D} = \sqrt{4D\Delta t} \quad (\text{en 2 dimensions}) \quad (\text{II.18})$$

$$L^{3D} = \sqrt{6D\Delta t} \quad (\text{en 3 dimensions}) \quad (\text{II.19})$$

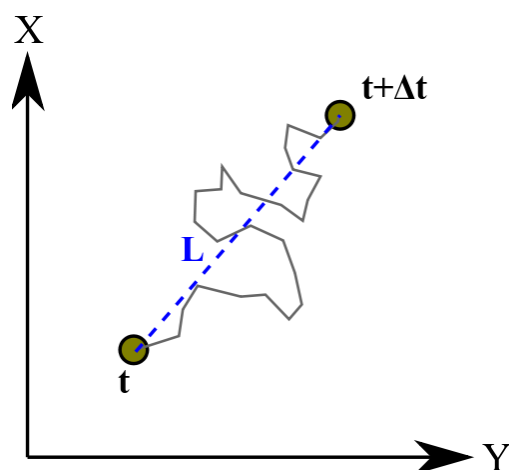


FIGURE II.10 – Diffusion aléatoire en 2 dimensions d'une particule pendant  $\Delta t$ . La ligne en pointillés bleus représente le libre parcourt moyen pendant l'intervalle de temps  $\Delta t$ .

Le caractère brownien de la diffusion d'une particule peut être mis en évidence en traçant la courbe de « Mean-Squared Displacement » (MSD) (ou déplacement quadratique moyen) à partir de la trajectoire observée de la particule. Les points de cette courbe sont calculés de la manière suivante :

$$\text{MSD}(\Delta t) = \langle [\vec{r}(t + \Delta t) - \vec{r}(t)]^2 \rangle \quad (\text{II.20})$$

où  $\vec{r}$  est la position de la particule ( $\vec{r} = (x, y, z)$ ) et  $\langle \dots \rangle$  est la moyenne temporelle. La courbe représentant ces points en fonction du temps est donc une droite de pente  $2n_d D$  où

$n_d$  est la dimension. La figure II.11(a) montre une trajectoire en 3 dimensions de 200 points d'une particule de 100 nm dans l'eau, simulée sous Matlab. L'intervalle de temps  $\Delta t$  entre 2 positions est égal à 40 ms, ce qui correspond à la fréquence d'acquisition des images de notre caméra. Cette simulation est réalisée en calculant le coefficient de diffusion  $D$  par la formule d'Einstein, en prenant comme paramètre une température  $T = 20^\circ\text{C}$  et une viscosité de l'eau  $\eta = 1.0\text{ mPa.s}$ . Le tableau suivant donne la valeur du coefficient de diffusion  $D$ , ainsi que le libre parcourt moyen en 3 dimensions pendant  $\Delta t = 40\text{ ms}$ .

diamètre de la nanobille (nm)	$D$ ( $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ )	$L$ ( $\mu\text{m}$ )
100	4.2	0.58

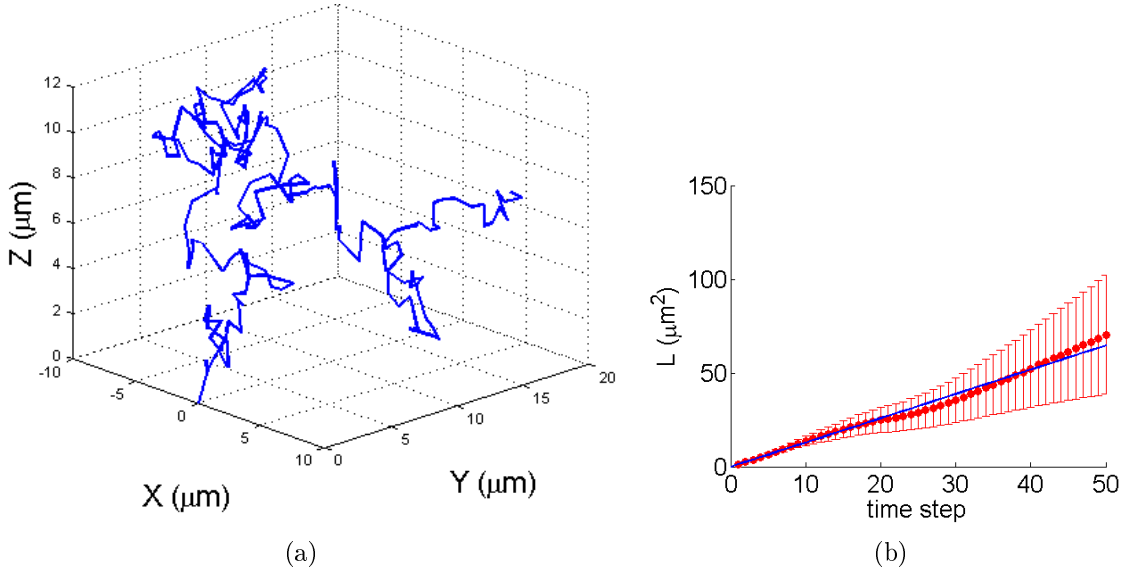


FIGURE II.11 – (a) Simulation d'une trajectoire de 200 positions en 3 dimensions d'une bille d'or de 100 nm dans l'eau. L'intervalle de temps entre 2 positions est égal à 40 ms. (b) (en rouge) courbe de déplacement quadratique moyen (MSD) correspondant à la trajectoire simulée, et barre d'erreur associée calculée par la formule de Qian. La régression linéaire est tracée en bleue.

La figure II.11(b) montre la MSD calculée sur les  $N = 200$  points de la trajectoire par la formule suivante :

$$\text{MSD}(n \cdot \Delta t) = \frac{1}{N - n} \left( \sum_{i=1}^{n-N} (x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2 + (z_{i+n} - z_i)^2 \right). \quad (\text{II.21})$$

Tout d'abord, la linéarité de la MSD permet de confirmer le caractère brownien de la diffusion. On observe pour les rangs  $n$  élevés une distribution des points de la MSD plus bruitée et un accroissement des barres d'erreurs : plus  $n$  est grand, plus le nombre de points intervenant dans le calcul de la MSD est réduit. Par exemple pour  $n = 1$ , le point  $\text{MSD}(1)$  est calculé en moyennant sur  $N-1$  intervalles de temps, alors que pour  $n = N - 1$ , la moyenne est calculée sur seulement 2 termes. Les points de la MSD n'ont donc plus de sens physique au delà d'un certain rang. Sur une trajectoire individuelle, on peut considérer que seul le

premier quart de points de la MSD a une signification [74]. La taille des barres d'erreurs, noté  $\text{Err}(n)$  a été calculée par Qian et al. [75] :

$$\text{Err}(n) = \sqrt{MSD(n)^2 \times F} \quad (\text{II.22})$$

où :

$$F = \begin{cases} \frac{4n^2(N-n)+2*(N-n)+n-n^3}{6n(N-n)^2} & \text{pour } N - n \geq n, \\ 1 + \frac{(N-n)^3-4n(N-n)+4n-(N-n)}{6n(N-n)^2} & \text{pour } N - n \leq n. \end{cases} \quad (\text{II.23})$$

(Cette expression théorique ne prend en compte que la diminution du nombre de termes pris en compte dans le calcul des points de la MSD lorsque  $n$  augmente, mais ne prend pas en compte l'erreur sur la localisation de la particule). La valeur du coefficient  $D$  est mesurée en réalisant une régression linéaire  $y = a + bt$  (voir figure II.11(b)), où la pente  $b$  est égale à  $6D$  (puisque nous étudions ici une trajectoire en 3 dimensions). La pente de la droite (figure II.11(b)) est égale à :  $4.1 \pm 0.2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ . On retrouve donc la valeur théorique prédite par la formule d'Einstein. L'étude des courbes de déplacement quadratique moyen est donc un outil qui va nous permettre d'évaluer la performance de notre microscope holographique.

## II.C Réalisation du montage de microscopie holographique.

Dans ce chapitre nous avons tout d'abord discuté de la diffusion de lumière par une nanoparticule. Cette lumière diffusée constitue le signal permettant de localiser ces particules. Après avoir estimé l'ordre de grandeur de ce signal, nous avons imaginé une configuration utilisant un objectif en champ noir permettant d'isoler cette lumière diffusée du faisceau d'illumination en minimisant les réflexions parasites. Nous avons ensuite estimé la vitesse de ces particules en calculant le coefficient de diffusion par la formule d'Einstein. L'estimation de la vitesse des particules est importante pour prévoir d'une part le déplacement d'une nanoparticule pendant le temps d'acquisition de la caméra, et d'autre part le nombre de positions enregistrable d'une particule avant qu'elle quitte le champ de vision. Nous reviendrons sur cet aspect après avoir présenté le montage optique. Le microscope holographique est schématisé sur la figure II.12. La figure II.13 montre deux photographies du dispositif expérimental.

### II.C.1 Choix d'un laser à faible longueur de cohérence

Les résultats précédemment publiés par notre équipe [22,25] sur la localisation de particules d'or ont été obtenus avec un laser vert à 532 nm. Cette longueur d'onde a été choisie pour être le plus proche possible de la longueur d'onde de résonance plasmon des nanobilles d'or (520 nm) [76], ce qui maximise l'efficacité de diffusion. D'autre part les travaux de Dubois et al. [77, 78] ont montré que l'utilisation de lumière partiellement cohérente améliore la qualité des reconstructions en holographie digitale. En lumière faiblement cohérente, les interférences créées par les réflexions parasites le long du chemin optique sont éliminées. L'utilisation de source type LED faiblement cohérente temporellement ou de verre dépoli réduisant la cohérence spatiale d'un faisceau laser ont été réalisés par Dubois et al. en holographie, améliorant clairement la qualité des images reconstruites. Les sources de type LED ont

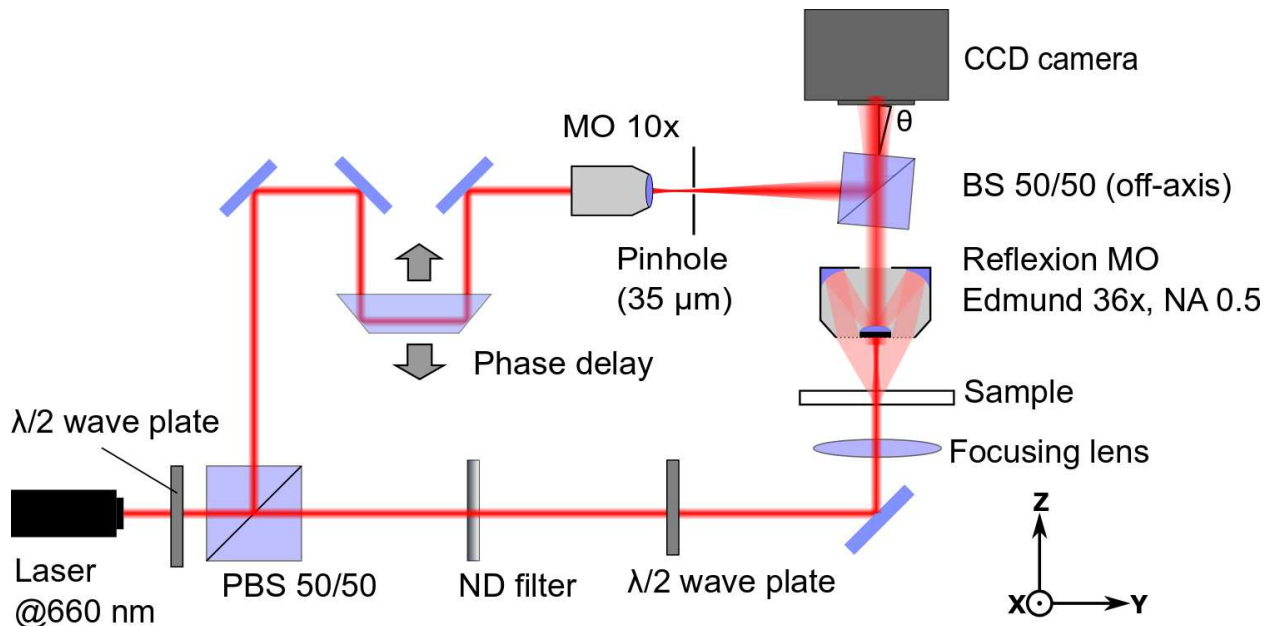


FIGURE II.12 – Schéma de notre montage optique. (les explications sont données dans cette section)

l'inconvénient de délivrer des puissances très faible comparée au laser. En tenant compte de ces critères de longueur d'onde et de cohérence, nous avons donc choisi d'utiliser un laser à faible longueur de cohérence Crystalaser DPSS (diode pumped solid state laser) émettant à 660 nm, et de puissance 100 mW. Ce laser est un compromis entre puissance et cohérence. En effet la grande puissance du laser permet d'obtenir un signal diffusé par les nanobilles plus important, d'autant plus que l'utilisation de l'objectif en champ noir ne nous limite pas en puissance d'illumination. En revanche, le laser est faiblement cohérent uniquement temporellement et non pas spatialement. Il émet un mode transverse  $TEM_{00}$  cohérent sur environ  $500 \mu\text{m}$ . Cette longueur de cohérence a été mesurée sur un interféromètre de type Michelson. La figure II.14 montre le contraste des franges d'interférences en fonction de la différence de chemin optique entre les deux bras de l'interféromètre. Nous avons constaté que la longueur de cohérence mesurée correspond à la valeur donnée par le constructeur. Nous avons choisi ce laser à 660 nm car nous n'avons pas trouvé sur le marché de laser à 532 nm ayant les mêmes caractéristiques en terme de longueur de cohérence. De ce fait, la longueur d'onde choisie est plus éloignée de la résonance plasmon, mais est tout de même située dans un domaine de bonne efficacité de diffusion des billes d'or. Cette faible longueur de cohérence permet d'éliminer les interférences parasites dues aux défauts du montage. En particulier toutes les réflexions multiples entre les différents dioptres des éléments optiques sont éliminées car les chemins optiques de ces faisceaux parasites diffèrent du chemin optique principal de plus de  $500 \mu\text{m}$ .

### II.C.2 Alignement du bras de référence

Le faisceau laser est séparé en deux par un cube séparateur polarisant (figure II.12). Le faisceau étant polarisé rectilignement à la sortie du laser, une lame demi-onde placée devant le cube permet d'ajuster le ratio de puissance entre le faisceau transmis et le faisceau réfléchi



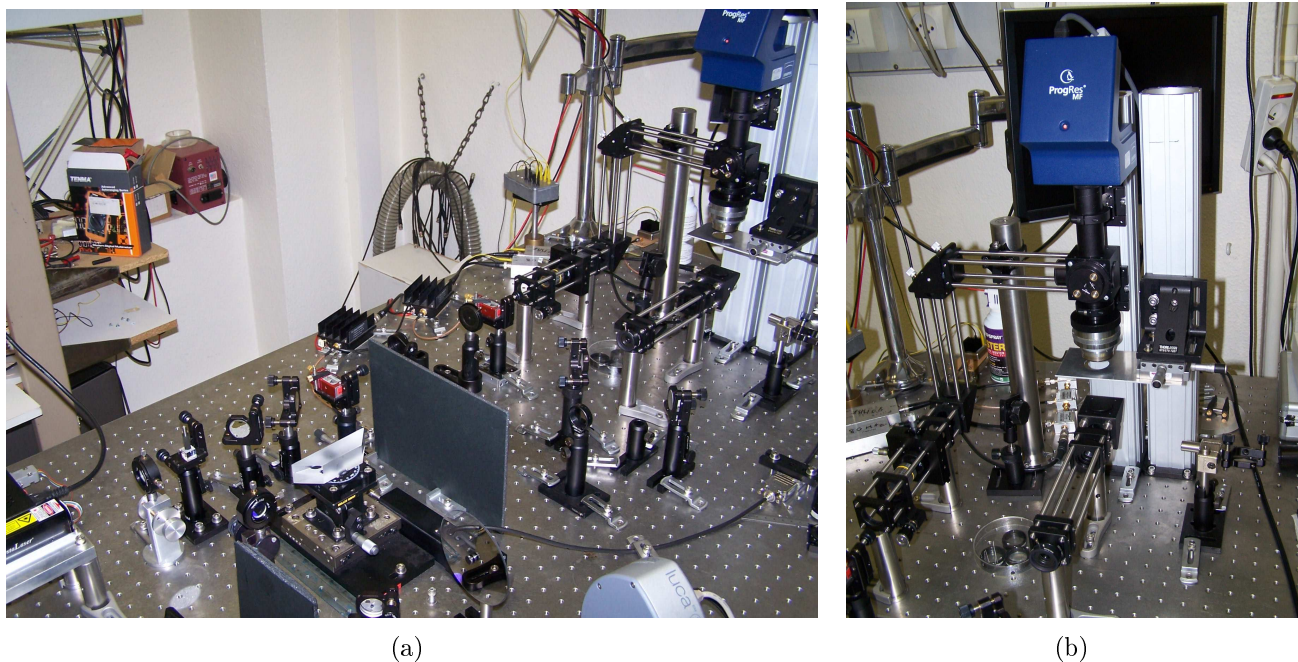


FIGURE II.13 – (a) Photographie de l'ensemble du dispositif. On peut voir deux modulateurs acousto-optiques sur le dispositif. Ces modulateurs n'ont pas été utilisés pour des raisons de vitesses de diffusion des nanobilles, comme expliqué dans le texte. Nous n'avons donc pas schématisé ces modulateurs dans le figure II.12 pour cette raison. (b) Photographie centrée sur l'objectif. On peut voir au centre de la photographie, de bas en haut, le porte échantillon sur une platine de translation, l'objectif en réflexion, le bloc contenant le cube séparateur en géométrie hors-axe, et la caméra.

par le cube. Le faisceau de référence passe par un prisme de Dove placé sur une plateforme de translation micrométrique permettant d'ajuster la longueur du bras de référence. La différence de chemin optique entre les faisceaux d'illumination et de référence doit être inférieure à la longueur de cohérence du laser pour former l'hologramme. Le faisceau de référence est ensuite filtré spatialement au travers d'un pinhole de  $35\ \mu\text{m}$  pour obtenir une illumination plus homogène. Le faisceau est focalisé par un objectif Olympus 10x sur le pinhole pour maximiser la puissance transmise. Nous avons fait le choix de ne pas utiliser de lentilles derrière le filtre spatial pour collimater le faisceau filtré pour ne pas ajouter de surface supplémentaire pouvant altérer l'homogénéité de l'intensité. L'onde de référence derrière le pinhole est donc une onde sphérique divergente. La distance entre le pinhole et la caméra est ajustée de manière à obtenir au niveau de la caméra une tache d'Airy environ 2 fois plus grande que la taille du capteur CCD. De cette manière l'intensité du faisceau de référence est quasiment homogène sur le capteur CCD. Le faisceau de référence élargi est envoyé sur la caméra par réflexion sur un cube séparateur non-polarisant, incliné de quelques degrés pour obtenir la géométrie hors-axe. Ce cube est enfermé dans une monture le protégeant de la poussière.

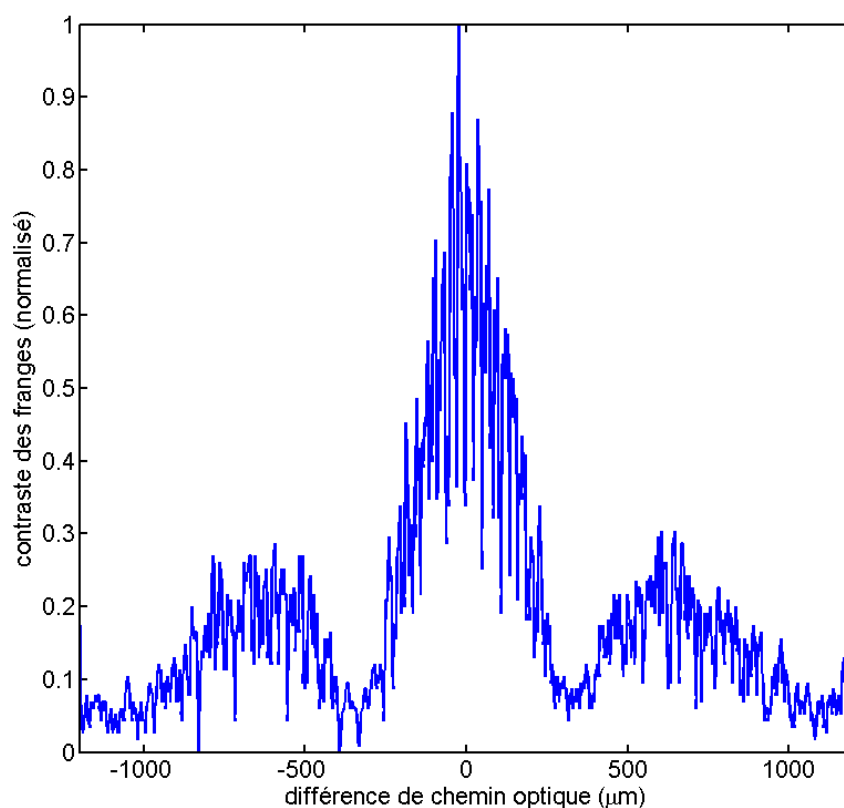


FIGURE II.14 – *Contraste des franges d'interférences en fonction de la différence de chemin optique obtenue avec notre laser.*

### II.C.3 Alignement du bras d'illumination

Le faisceau d'illumination passe au travers d'un filtre de densité pour en ajuster la puissance. Il est ensuite focalisé sur l'échantillon par une lentille plano-convexe de focale égale à 12 cm. Nous utilisons une lentille de longue focale car la distance de travail de l'objectif en réflexion est de 8.6 mm. Le faisceau d'illumination ne doit donc pas être trop divergent entre l'échantillon et le masque de l'objectif pour être totalement bloqué, ce qui justifie l'utilisation d'une lentille de longue focale. Au niveau de l'échantillon, la taille du *waist* est d'environ  $200 \mu\text{m}$  et la puissance est de l'ordre de  $250 \text{ W/cm}^2$ . La lumière collectée par l'objectif est envoyée sur la caméra à travers le cube séparateur non-polarisant.

### II.C.4 Enregistrement des images

Nous avons utilisé deux caméras différentes sur ce montage. Tout d'abord, nous disposons d'une caméra Jenoptik©ProgRes MF enregistrant des images de  $1024 \times 1024$  pixels en 12 bits à la fréquence de 13 images par secondes. Nous l'avons ensuite remplacée par une caméra Andor©Luca R, permettant d'acquérir des images en  $512 \times 512$  en 16 bits à la fréquence de 22 images par secondes. L'intérêt d'utiliser la caméra Andor est de doubler le nombre de positions reconstruites lors du suivi des nanoparticules. Le temps d'exposition des images

choisi est égal à 1 ms, dans le but de limiter un maximum l'effet de flou dû au déplacement des particules pendant l'enregistrement. Plus de détails sur l'effet du déplacement des particules pendant l'enregistrement sont données dans la section suivante. Les caméras sont contrôlées par un programme écrit en C (qui fait l'objet du chapitre suivant).

### II.C.5 Grossissement optique du montage

Le grossissement optique est un paramètre qui doit être connu avant de reconstruire les hologrammes. Ce facteur permet d'établir la largeur d'un pixel conjuguée par l'objectif de microscope. Comme le montre la figure explicative II.15, l'objectif conjugue le plan situé à la distance de travail sur le plan du capteur CCD. L'objet situé dans ce plan est agrandi par l'objectif puis digitalisé par le capteur CCD. Le facteur de grossissement  $M$  permet de calculer la taille des pixels « virtuels »  $d'_{pix}$  au niveau du plan objet en connaissant la taille réelle des pixels du capteurs  $d_{pix}$  par la relation suivante :

$$M = \frac{d_{pix}}{d'_{pix}}. \quad (II.24)$$

Cette calibration est effectuée en imageant une mire USAF (voir II.16). Cette mire présente des barres verticales et horizontales de différentes tailles et identifiables par des numéros présents sur la mire. L'image de cette mire par l'objectif de microscope a permis de calculer un facteur de grossissement égal à **50**. La taille des pixels est de  $6.45 \mu\text{m}$  pour la caméra ProgRes MF, et de  $8 \mu\text{m}$  pour la caméra Luca R, ce qui donne respectivement une taille de pixels « virtuels » de 129 nm et 160 nm.

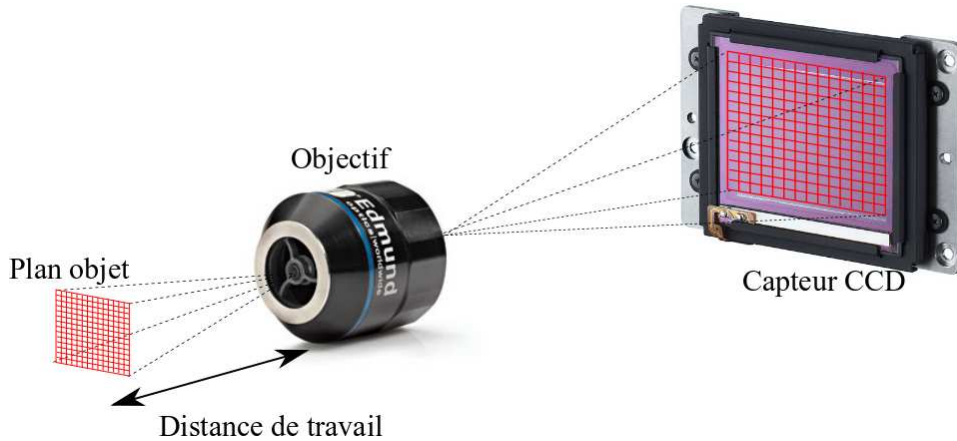


FIGURE II.15 – Conjugaison du plan objet au capteur CCD par l'objectif de microscope. L'objet est digitalisé sur une matrice de pixels « virtuels » de taille  $d'_{pix}$  égale à la taille réelle des pixels du capteurs CCD divisé par le grossissement du système.

La taille des pixels « virtuels »  $d'_{pix}$  permet également d'estimer la distance parcourue par une nanoparticule de taille connue pendant  $\delta t$  le temps d'exposition et  $\Delta t$  le temps d'acquisition entre 2 images imposés par la caméra. Le coefficient de diffusion  $D$  calculé par la formule d'Einstein (voir section II.B) permet de calculer le libre parcourt moyen (sur un axe) pendant un temps donné :

$$L = \sqrt{2D\Delta t}. \quad (II.25)$$

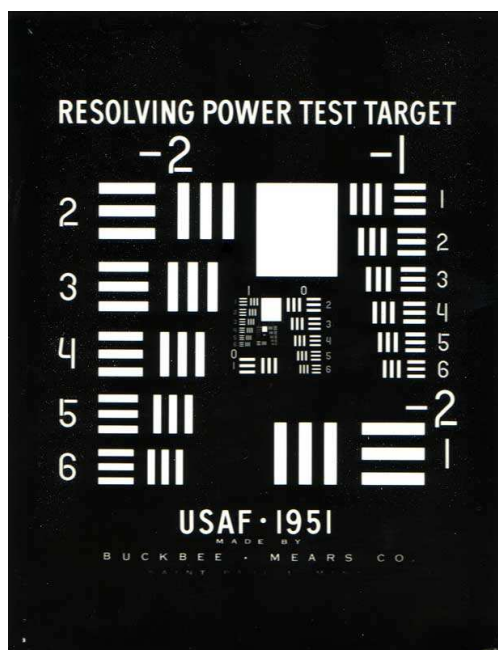


FIGURE II.16 – Mire de calibration USAF.

Le tableau suivant donne ce déplacement pendant un temps d'exposition  $\delta t$  de 1 ms et une durée d'acquisition  $\Delta t$  de 44 ms (qui correspond à la caméra Andor Luca R) pour deux tailles de nanobilles en diffusion dans l'eau.

diamètre de la nanobille (nm)	$L(\delta t)$ (nm)	$L(\Delta t)$ (nm)
100	91	600
50	130	860

Il est intéressant de comparer ces déplacements moyens à la taille des pixels virtuels ( $d'_{pix} = 160$  nm) calculée précédemment. On constate qu'entre deux images, une bille de 100 nm parcourt 600 nm, soit environ 4 pixels. Une bille de 50 nm en parcourt environ 5 en moyenne. Ceci a un impact important sur le choix d'utiliser ou non la technique du décalage de phase présenté dans le chapitre précédents. L'holographie à décalage de phase nécessite de calculer une combinaison linéaire sur 4 images consécutives. Etant donné que les nanoparticules étudiées se déplacent de plusieurs pixels entre chaque image, il ne nous a pas semblé possible d'obtenir une localisation précise de la particule avec cette méthode. **Nous avons donc choisi de ne pas utiliser le décalage de phase pour le suivi des particules en mouvements.** D'autre part, on constate que le déplacement moyen des nanobilles de 100 et 50 nm pendant le temps d'exposition  $\delta t$  est inférieur à la taille d'un pixel. L'effet de flou créé par le déplacement de la particule pendant l'exposition sera donc très limité.

## Conclusion du chapitre 2

Nous avons dans ce chapitre tout d'abord détaillé deux propriétés des nanoparticules d'or, qui sont essentielles pour la conception du microscope holographique :

1. **la diffusion de lumière.** Nous avons rappelé la théorie de diffusion de lumière par des particules sphériques de Rayleigh et de Mie dans le but d'estimer la quantité de signal pouvant être collectée. Nous en avons déduit qu'il est nécessaire d'observer ces nanoparticules par un montage optique en champ noir. Nous avons décidé d'utiliser un objectif en réflexion pour éliminer parfaitement le faisceau d'illumination et ne conserver que la lumière diffusée par les particules.
2. **le mouvement brownien des nanoparticules.** Le déplacement moyen d'une nanobille pendant le temps d'acquisition des images a été calculé par la formule d'Einstein et comparé à la taille des pixels de l'hologramme. Nous en avons déduit que dans le cas de suivi de particule de l'ordre de 100 nm dans l'eau, les vitesses sont telles qu'il n'est pas possible d'utiliser la méthode de décalage de phase. Nous allons donc utiliser seulement la géométrie hors-axe.

Ces études préliminaires nous ont orientés vers un montage optique combinant la microscopie en champ noir et la géométrie hors-axe, détaillé à la fin du chapitre. Dans la suite nous allons expliquer notre méthode numérique de reconstruction des hologrammes par le biais d'un logiciel parallélisant les calculs sur une carte graphique.

---

### Développement d'un algorithme de reconstruction rapide pour la microscopie holographique

---

Dans ce chapitre nous allons présenter le travail réalisé sur l'algorithme de reconstruction des hologrammes. L'idée a été de paralléliser les calculs sur les processeurs d'une carte graphique en utilisant les outils de programmation Nvidia CUDA ©. Dans un premier temps, nous allons expliquer le principe de la parallélisation des calculs, et nous verrons pourquoi cette technique est particulièrement adaptée à la reconstruction des hologrammes numériques. On présentera les étapes de reconstructions avant d'entrer plus en détail sur la programmation. Ce travail a abouti à la réalisation d'un logiciel capable de reconstruire les hologrammes à une vitesse environ 100 fois supérieure à la méthode précédente (algorithme en C sur processeurs multi-cœurs), ce qui permet de visualiser des images reconstruites en temps réel. L'efficacité des cartes graphiques pour la reconstruction en holographie digitale a été démontrée en 2008 par Shimobaba et al. [79]. Son utilisation en holographie a été rapportée dans plusieurs publications ces dernières années [80–82]. La nouveauté de notre travail est de démontrer pour la première fois la faisabilité de reconstruire les images en temps réel en microscopie holographique, et également sous certaines conditions de réaliser un suivi 3D d'une nanoparticule en temps réel.

## III.A Technique de parallélisation des calculs sur une carte graphique

### III.A.1 Présentation d'une carte graphique

Une carte graphique est une unité annexe de l'ordinateur qui a pour but d'envoyer vers l'écran les données chargées sur sa mémoire. Une carte graphique possède sa propre mémoire vive (RAM) et ses propres processeurs. Son rôle est de soulager le processeur principal de l'ordinateur en prenant en compte les calculs nécessaires à l'affichage. Les grandes performances en terme de vitesse de calculs démontrées par ces cartes graphiques ont amené les constructeurs à développer des bibliothèques de programmation permettant d'utiliser ces cartes graphiques pour du calcul scientifique, indépendamment des fonctions d'affichage. Nous avons choisi de travailler avec les bibliothèques CUDA, développées par Nvidia ©, permettant de programmer ces cartes en langage de programmation C. La première version de cette bibliothèque a été distribuée en 2007, depuis un très grand nombre d'articles scientifiques mentionnant l'utilisation de CUDA ont été publiés.



FIGURE III.1 – Carte graphique Nvidia Geforce GTX470 utilisée pour reconstruire nos hologrammes

La carte graphique que nous avons utilisée est Geforce GTX470, qui dispose de 448 processeurs à 600 MHz et d'une mémoire de 1Gbits. Les 448 processeurs fonctionnant simultanément, la puissance de calcul disponible est de 1088 GFLOPS. Un FLOPS est l'unité de mesure standard de vitesse de calcul d'un système informatique, l'acronyme FLOP étant les initiales de « **F**loating point **O**perations **P**er **S**econd », ce qui indique le nombre d'opération standard (addition ou multiplication) que peut réaliser le système sur des variable réelle à virgule flottante. Ces opérations sont beaucoup plus longue a réaliser sur des variables à virgules flottantes que sur des entiers. GFLOPS signifie Giga FLOPS soit  $10^9$  FLOPS. Cette puissance de calcul est donc beaucoup plus importante que celle d'un processeur classique multi-coeurs récent. En comparaison, la puissance d'un processeur six cœurs type Intel I7 de dernière génération est d'environ 100 GFLOPS (figure III.2).

### III.A.2 Parallélisation des calculs

La parallélisation d'un calcul informatique consiste à décomposer la quantité totale d'opérations à effectuer sur plusieurs unités de calcul indépendantes (processeurs de l'unité

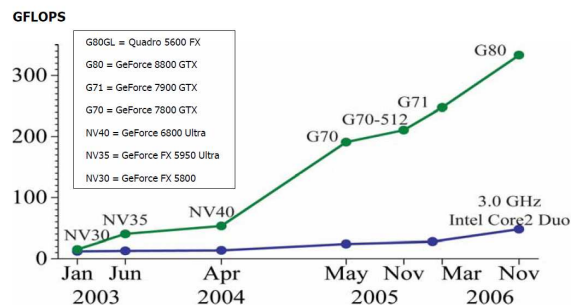


FIGURE III.2 – Evolution de la puissance de calculs des cartes graphiques (GPU) depuis 2003 comparée à celle des processeurs classiques.

centrale ou processeurs de la carte graphique). Les différentes opérations de reconstruction des hologrammes sont principalement des opérations pouvant être réalisées sur tous les pixels de l'hologramme simultanément (par exemple la multiplication de l'hologramme par une matrice de phase, ou une transformée de Fourier). Ce type d'opération est donc parfaitement adapté à la parallélisation. La parallélisation d'un algorithme sur une carte graphique se décompose en 3 étapes que nous allons détailler rapidement :

1. les données sont copiées sur la mémoire interne de la carte graphique. Dans un souci d'optimisation, il convient de charger un maximum de données nécessaire au calcul sur cette mémoire et d'éviter les aller-retour avec la mémoire vive de l'unité centrale car les temps de transfert ne sont pas négligeables devant les temps de calculs.
2. Pour chaque opération à effectuer, on décompose les images (qui sont des matrices réelles ou complexes) en *blocks* (voir figure III.3). Chaque *block* est attribué à un processeur de la carte, qui va effectuer une liste d'opérations (ou *threads*) sur la partie de l'image définie par le *block*. Les processeurs de la carte effectuent les calculs sur les *blocks* simultanément, on divise donc le temps de calcul par le nombre de processeurs de la carte (mais on doit tenir compte du temps de transfert de données vers la carte pour obtenir véritablement le facteur d'accélération).
3. les résultats des calculs peuvent être soit copiés vers la mémoire de l'unité centrale, soit directement envoyés sur l'écran via l'utilisation de bibliothèques d'affichage OpenGL.

Ce procédé a été utilisé pour tous les calculs de reconstructions que nous allons présenter dans la suite de ce chapitre. Nous n'allons pas donner plus de détails au niveau de la programmation car ils ne font pas directement l'objet de ce travail de thèse. Néanmoins le développement de ce logiciel a nécessité une part importante de ma deuxième année de thèse, et les résultats obtenus en terme de vitesse de reconstruction ont eu un impact fort pour notre équipe de recherche et celles avec lesquelles nous collaborons. Nous avons publié en 2011 un article démontrant la possibilité de reconstruire les hologrammes en temps réel sur une expérience de vibrométrie utilisant l'holographie digitale. Cette reconstruction a été réalisée par un algorithme similaire à celui expliqué dans ce chapitre. Cette publication est consultable en annexe IV.D de ce manuscrit.

- B. Samson, F. Verpillat, M. Gross and M. Atlan. Video-rate laser Doppler vibrometry by heterodyne holography. *Optics letters*, vol. 36, 1449-1451, 2011.



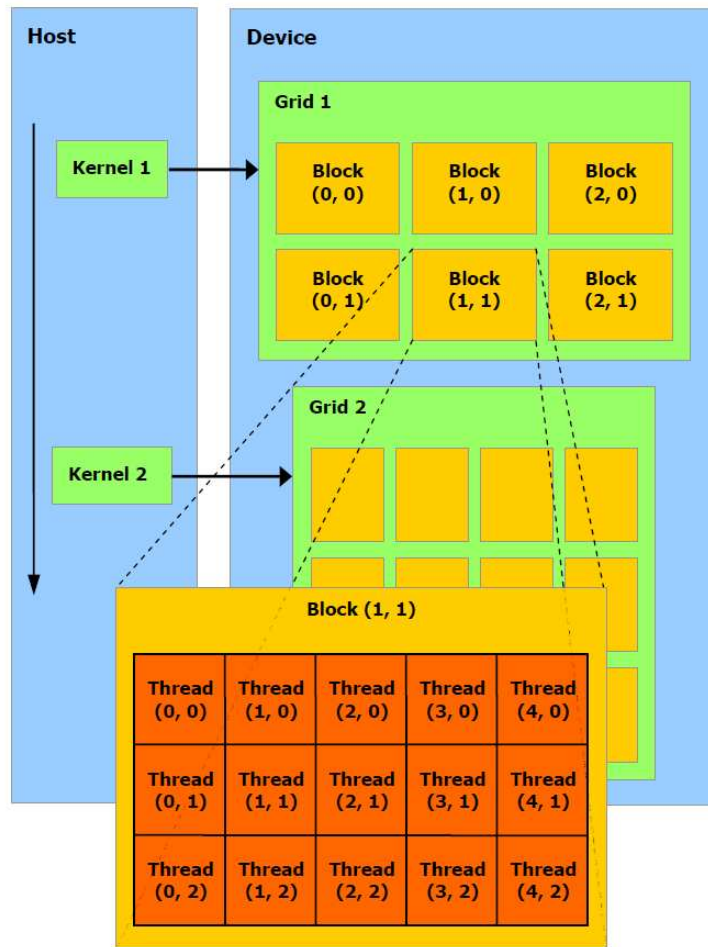


FIGURE III.3 – Architecture de programmation sur une carte graphique. Lorsque la carte doit effectuer une opération (kernel en programmation CUDA) sur une matrice de données, ces données sont réparties en block, eux-mêmes divisés en threads (un thread étant une opération effectuée sur un seul pixel de la matrice de données). Chaque block est attribué à un processeur de la carte graphique, qui va effectuer les threads contenus dans ce block.

## III.B Algorithme de reconstruction des hologrammes

### III.B.1 Dispositif optique

Le schéma général du microscope holographique en transmission est illustré sur la figure III.4. Les différents éléments du montage ont été présentés dans le chapitre précédent, nous allons dans cette section discuter plus en détail de la formation des images sur la caméra et la propagation des hologrammes. Le faisceau d'illumination, l'axe optique de l'objectif et le centre de la caméra sont alignés sur un même axe ( $OZ$ ). Le plan du capteur CCD ( $C$ ) est conjugué à un plan ( $P$ ) situé dans l'échantillon par l'objectif de microscope. La distance entre la pupille arrière de l'objectif de microscope et le capteur CCD est notée  $d$ . L'hologramme enregistré par le capteur CCD est l'image du plan ( $P$ ) situé dans l'échantillon. La reconstruction de l'échantillon s'effectue en propageant le champ complexe situé dans le plan ( $P$ ). Cette propagation étant calculée entre deux plans situés dans le même milieu, il n'y a pas de déformation des fronts d'ondes. Il s'agit de calculer une simple propagation « free-space » à partir du plan ( $P$ ). L'algorithme de reconstruction de l'échantillon en 3D se réalise en deux étapes illustrées sur la figure III.5 que nous allons détailler dans la suite de ce chapitre :

1. Dans un premier temps, l'hologramme dans le plan ( $P$ ) conjugué au capteur est reconstruit (flèche verte de la figure III.5). On utilise une astuce qui consiste à reconstruire d'abord l'hologramme dans le plan de la pupille arrière de l'objectif de microscope par la méthode de Fresnel. Cette étape permet de corriger à la fois la sphéricité du front d'onde à la sortie de l'objectif, et l'effet de la géométrie hors-axe.
2. Dans un second temps, on reconstruit le volume de l'échantillon par propagations successives à partir du plan ( $P$ ) en utilisant la méthode du spectre angulaire (flèches rouge de la figure III.5)

### III.B.2 Première étape de la reconstruction : reconstruction du plan conjugué au capteur

#### III.B.2.a Effet de l'objectif de microscope sur le champ optique

La première étape de la reconstruction consiste à reconstruire le champ complexe  $E_P$  dans le plan ( $P$ ) à partir de l'hologramme. Nous avons vu au chapitre 1 comment isoler dans l'hologramme, grâce à la géométrie hors-axe, l'ordre de diffraction contenant le champ complexe provenant de l'échantillon. Le résultat de cette opération nous donne une matrice complexe  $E_C$  qui est la propagation du champ complexe diffracté par l'échantillon jusqu'au capteur CCD. Dans le cas de la microscopie par holographie digitale, le champ complexe  $E_C$  obtenu n'est pas la propagation directe entre l'échantillon et le capteur CCD, mais la propagation à travers l'objectif de microscope du champ complexe  $E_P$  dans plan ( $P$ ) jusqu'au plan du capteur. Etant donné que ces plans sont conjugués, les motifs d'intensités dans les plans ( $C$ ) et ( $P$ ) sont similaires ( $I_C \propto I_P$ ). Cependant il faut tenir compte de quatre paramètres qui différencie les matrices complexes  $E_P$  et  $E_C$ .

- le facteur d'agrandissement de l'objectif
- le filtrage passe-bas des fréquences spatiales dû à l'ouverture numérique limité de l'objectif

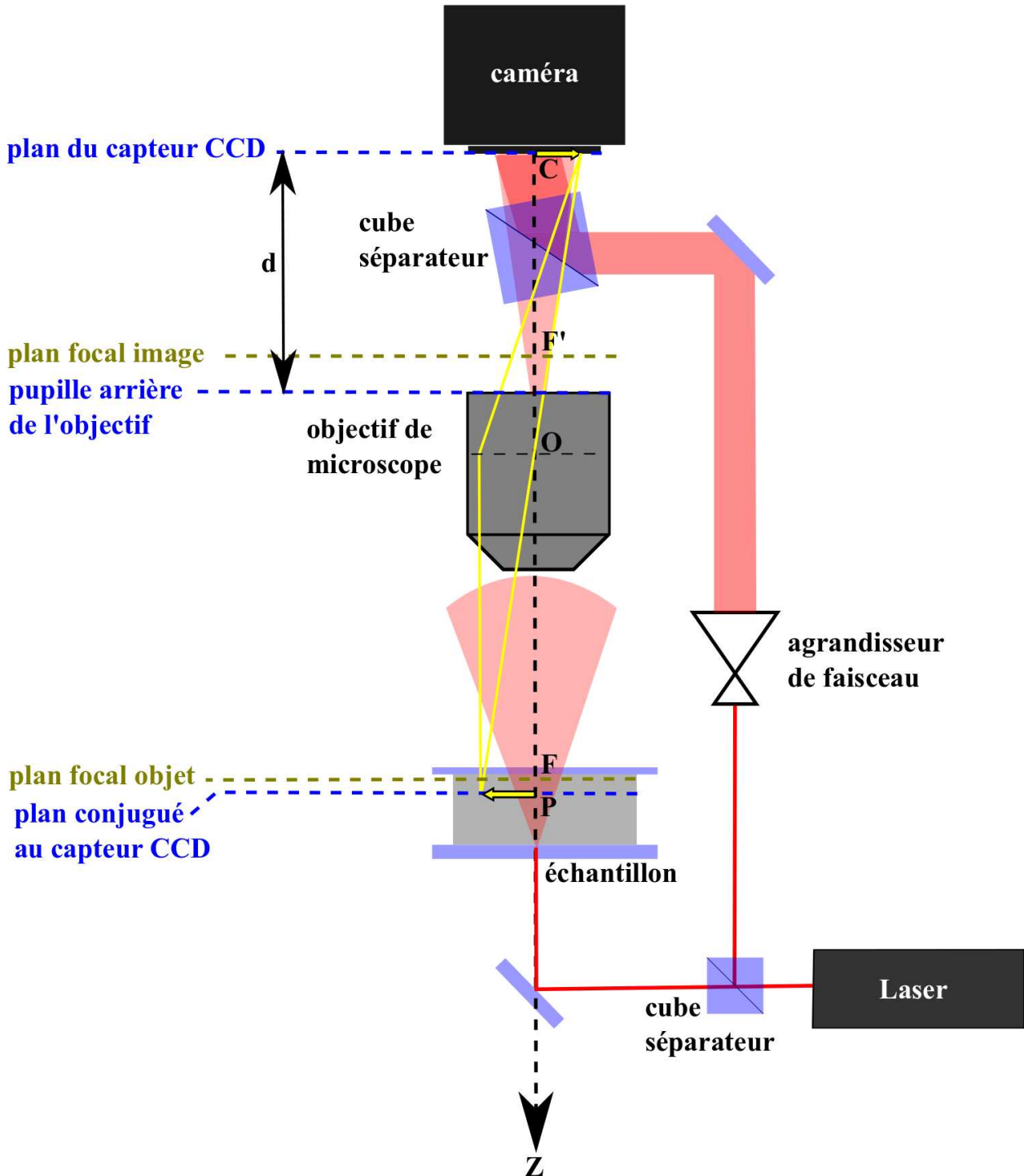


FIGURE III.4 – Schéma de principe d'un microscope holographique digital

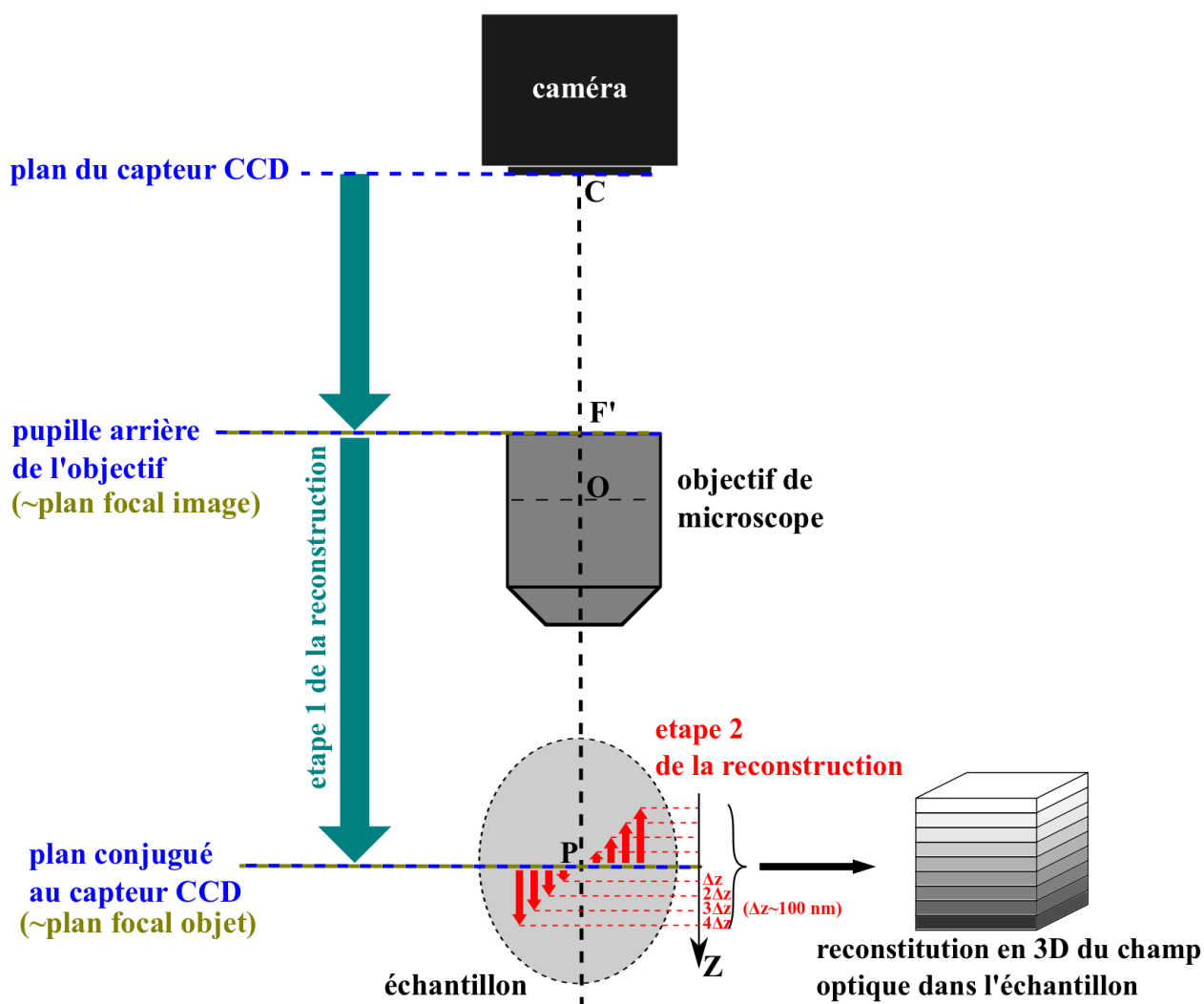


FIGURE III.5 – Étapes de reconstruction des hologrammes. La première étape consiste à reconstruire le champ optique dans le plan  $P$  en passant par la reconstruction dans le plan de la pupille arrière de l'objectif ce qui permet simultanément de corriger le désalignement de la géométrie hors-axe et la sphéricité du front d'onde due à l'objectif. La seconde étape consiste à propager le champ optique dans le plan  $P$  par pas successif dans la direction de l'axe  $z$  pour obtenir une carte en 3 dimensions du champ optique diffusé par l'échantillon. Nous avons superposé sur cette figure le plan de la pupille arrière de l'objectif avec le plan focal arrière et le plan focal objet avec le plan conjugué au capteur car ces plans sont quasiment confondus avec l'objectif que nous avons utilisé.

- le décalage angulaire dû à la géométrie hors-axe
- la déformation du front d'onde à la sortie de l'objectif

### III.B.2.b Le facteur d'agrandissement de l'objectif

Comme nous l'avons vu au chapitre 2, l'image du plan ( $P$ ) est agrandie par l'objectif d'un facteur  $M$ . Le champ complexe  $E_C$  est échantillonné sur un capteur de  $N \times N$  pixels de taille  $d_{pix}$ . Le champ complexe  $E_P$  conjugué à  $E_C$  est donc échantillonné sur une matrice de pixels ayant pour taille  $d_{pix}$  :

$$d_{pix} = \frac{d_{pix}}{M}. \quad (III.1)$$

Ce facteur de grandissement a été mesuré à l'aide d'une mire de calibration.

### III.B.2.c Le filtrage passe-bas des fréquences spatiales dû à l'ouverture numérique limitée de l'objectif

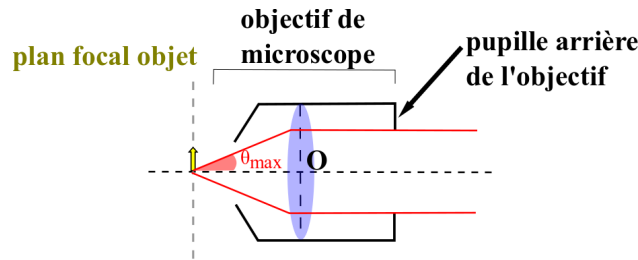


FIGURE III.6 – Représentation schématique de l'objectif de microscope. Les rayons tracés en rouge sont les rayons les plus inclinés par rapport à l'axe optique pouvant être collectés par l'objectif.

Comme l'illustre la figure III.6, l'ouverture numérique (ou  $NA$  de l'anglais *Numerical Aperture*) est définie par :

$$NA = n \sin(\theta_{max}), \quad (III.2)$$

où  $n$  est l'indice optique du milieu entre l'échantillon et l'objectif et  $\theta_{max}$  le demi-angle maximal que peut faire un rayon avec l'axe optique pour être collecté par l'objectif. Cet angle maximal définit la fréquence spatiale maximale qui peut être collectée par l'objectif :  $\nu_c = \lambda^{-1} \sin(\theta_{max})$ . Toutes les fréquences spatiales contenues dans le champ complexe diffracté par l'échantillon qui sont supérieures à cette fréquence de coupure sont éliminées par l'objectif. L'objectif agit donc comme un filtre passe-bas de fréquence de coupure  $\nu_c$  entre l'objet et l'image.

### III.B.2.d Correction du décalage angulaire et de la déformation du front d'onde par la propagation de l'hologramme dans le plan de la pupille arrière de l'objectif.

Comme l'illustre la figure III.7, une onde plane  $\mathcal{E}$  envoyée à l'entrée d'un objectif de microscope est focalisée en un point dans le plan focal arrière de l'objectif, puis se propage

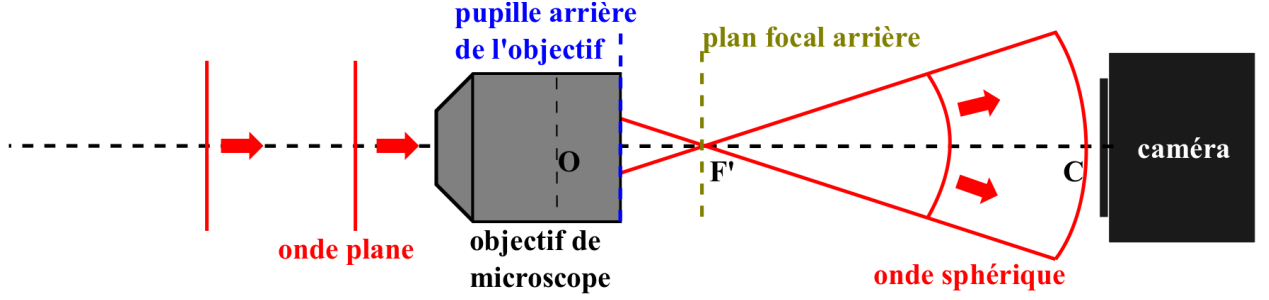


FIGURE III.7 – Déformation du front d'onde à travers un objectif de microscope

depuis ce point source sous la forme d'une onde sphérique. Au niveau de la caméra située à une distance  $d$  du plan focal arrière, le front d'onde mesuré est celui de l'onde plane  $\mathcal{E}$  multiplié par une matrice de phase quadratique  $\Phi(d)$  de la forme suivante :

$$\Phi(d)(x, y) = e^{ik(x^2+y^2)/2d}. \quad (\text{III.3})$$

L'objectif de microscope ajoute donc une phase sphérique au champ optique diffusé par l'échantillon. Ce facteur de phase doit être corrigé sur le champ complexe enregistré par le capteur ( $E_C$ ) pour obtenir l'expression correcte du champ complexe  $E_P$  dans le plan  $P$  conjugué au capteur. Une façon de corriger cette sphéricité est de propager l'hologramme dans le plan focal arrière  $F'$  de l'objectif de microscope. Dans ce plan, le front d'onde n'est pas déformé. Ce plan focal arrière d'un objectif de microscope est généralement quasiment confondu avec le plan de la pupille arrière. Cette hypothèse se vérifie avec les objectifs de grandes ouvertures et avec l'objectif en réflexion que nous avons utilisé. C'est pourquoi on considère dans la suite que ces plans sont confondus. L'astuce que nous utilisons est donc dans un premier temps de propager l'hologramme dans le plan de la pupille arrière de l'objectif. Nous utilisons pour réaliser cette propagation la méthode de Fresnel (à une FFT) présentée au chapitre 1 à la section I.B.3.a. L'hologramme brut enregistré par la caméra est une matrice réelle notée  $H_{x,y}$ , où  $x$  et  $y$  sont des entiers allant de 1 à 512. En reprenant l'équation I.33 du chapitre 1, la propagation s'effectue en calculant la transformée de Fourier de  $H_{x,y}$  multiplié par la matrice de phase  $e^{ik(x^2+y^2)/2d}$ , où  $d$  correspond à la distance entre la caméra et la pupille arrière de l'objectif :

$$\tilde{H}_{k_x, k_y} = \mathcal{F}[H_{x,y} \times e^{ik(x^2+y^2)/2d}]. \quad (\text{III.4})$$

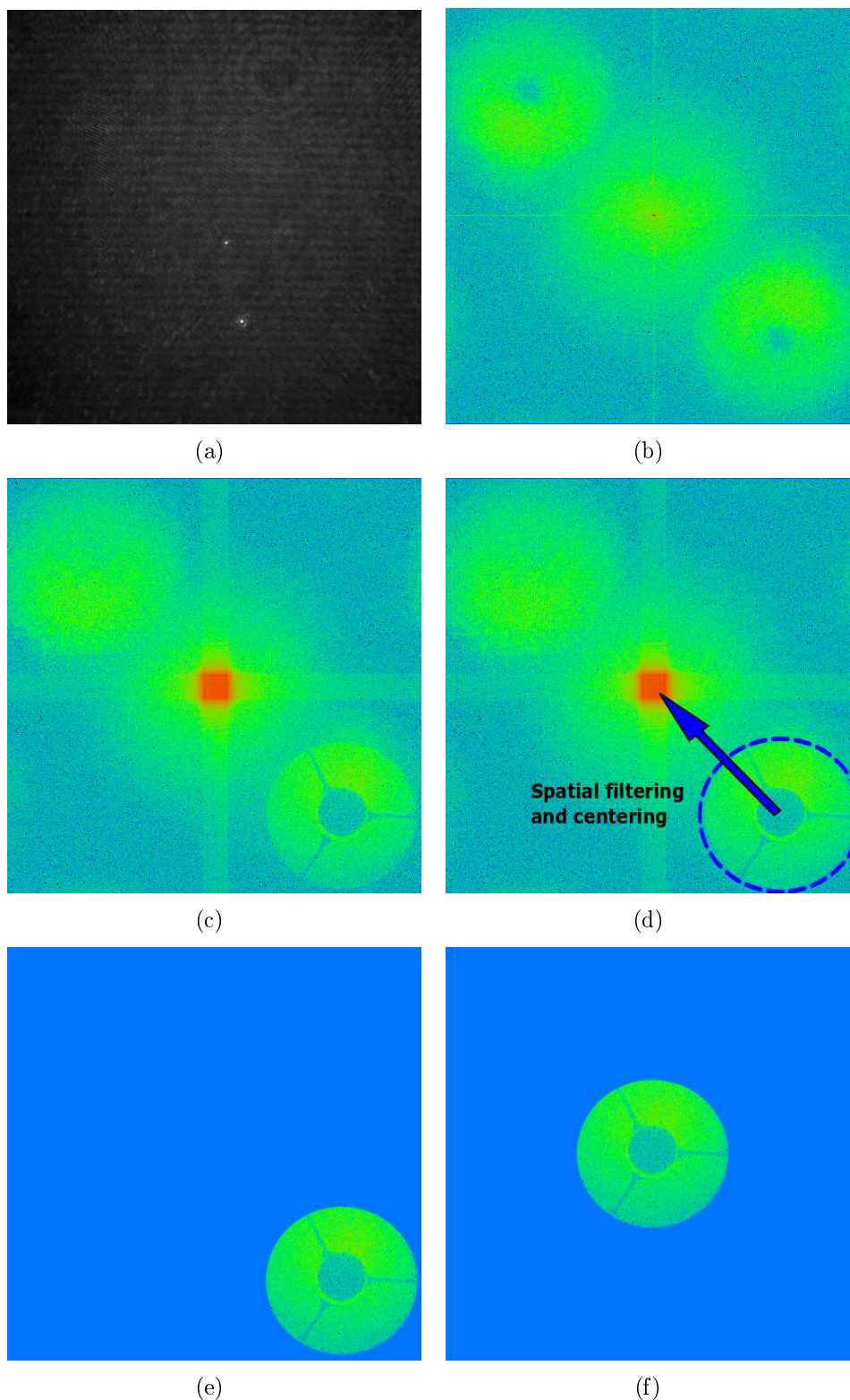


FIGURE III.8 – (a) Hologramme de nanobilles de 100 nm en diffusion dans l'eau. (b) Transformée de Fourier de l'hologramme. (c) Propagation de l'hologramme dans le plan focal arrière de l'objectif par la méthode de Fresnel. (d) Représentation du masque de filtrage numérique réalisé sur la propagation dans le plan focal arrière de l'objectif. (e) Étape de filtrage numérique. Seul les pixels à l'intérieur du masque sont conservés. Les pixels à l'extérieur sont fixés à zéros. (f) Centrage de la partie filtrée au centre du plan de Fourier. Cette étape permet de supprimer la fréquence spatiale ajoutée au signal par la géométrie hors-axe.

Un des modes de reconstruction de notre logiciel permet d'afficher en temps réel le résultat de la propagation à une FFT sur une distance ajustable  $d$ . La figure III.8(a) montre un hologramme de nanoparticules en mouvement brownien dans l'eau enregistré par la caméra. L'image III.8(b) représente la transformée de Fourier de l'hologramme en (a) en échelle logarithmique (les faibles intensités sont en bleu et les plus hautes en rouge). On observe au centre les termes de l'équation d'interférence d'ordre 0 et les termes d'ordres  $+1$  (en bas à droite) et  $-1$  (en haut à gauche) séparés spatialement dans le plan de Fourier par l'effet de la géométrie hors-axe. L'image III.8(c) correspond à la propagation de l'hologramme dans le plan de la pupille arrière de l'objectif. On observe clairement sur l'ordre  $+1$  les bords nets de la pupille ainsi que le masque de champ noir au centre de l'objectif. La propagation de l'hologramme dans le plan de la pupille arrière permet de filtrer précisément l'ordre  $+1$  de diffraction [83]. En effet nous savons que toute l'information sur le champ optique diffusé par l'échantillon passe au travers de l'objectif de microscope. Cela signifie que tous les pixels d'intérêts permettant de reconstruire l'échantillon sont contenus dans l'image de la pupille arrière de l'objectif. Cette image étant nette dans le plan focal arrière, ceci permet de définir un masque de filtrage numérique circulaire isolant uniquement les pixels d'intérêts du reste de l'image. Ce masque est représenté par le cercle bleu sur la figure III.8(d). Les pixels situés en dehors de cette zone sont fixés à zéro, comme illustré sur la figure III.8(e). La partie filtrée est ensuite translatée (figure III.8(f)) au centre de la matrice pour supprimer la fréquence spatiale ajoutée par la géométrie hors-axe du montage.

La matrice complexe obtenue après les opérations de filtrage numérique et de centrage représente la transformée de Fourier du champ optique diffusé par l'échantillon au niveau du capteur, noté  $\tilde{E}_C$ . Ce terme est isolé des autres ordres de diffraction de l'équation générale de l'holographie. De plus, le décalage angulaire et la sphéricité du front d'onde sont corrigés. Le filtrage et ces corrections de phase permettent d'obtenir par le calcul de la transformée de Fourier inverse de  $\tilde{E}_C$  une matrice  $E_C$  qui est l'image agrandie du champ optique au niveau du plan focal objet de l'objectif, noté  $E_P$  :

$$\tilde{E}_C \xrightarrow{FFT^{-1}} E_C \xrightarrow{\times 1/M} E_P. \quad (\text{III.5})$$

La figure III.9 montre à gauche l'hologramme brut  $H$  tel qu'il est enregistré par la caméra et à droite l'amplitude du champ  $E_P$  qui résulte de ces transformations. Cette première étape de la reconstruction permet d'obtenir le champ complexe diffusé par l'échantillon au niveau du plan focal objet de l'objectif de microscope. Ce plan focal ( $P$  sur les figures III.4 et III.5) est situé dans l'échantillon. La reconstruction en trois dimensions de l'objet est obtenue en propageant ce champ pas successifs dans la direction de l'axe optique. Cette seconde étape de reconstruction est détaillée dans la section suivante.

La correction de la déformation du front d'onde due à l'objectif de microscope est un sujet abordé dans de nombreuses publications. Le groupe de C. Depeursinge a développé pour l'imagerie à contraste de phase une méthode purement numérique de correction des aberrations [10,84–86]. Cette méthode nécessite la reconnaissance dans l'image reconstruite d'une zone de phase uniforme, ce qui impose de travailler avec des objets relativement plats. Dans notre configuration utilisant un objectif en réflexion, il n'est pas possible de définir une zone « plate » de référence pour calibrer la phase. Mann et al. [87] ont proposé de corriger le front d'onde en utilisant un objectif identique à celui d'imagerie sur le bras de référence. De cette manière les effets de phases entre les deux bras se compensent. Notre technique



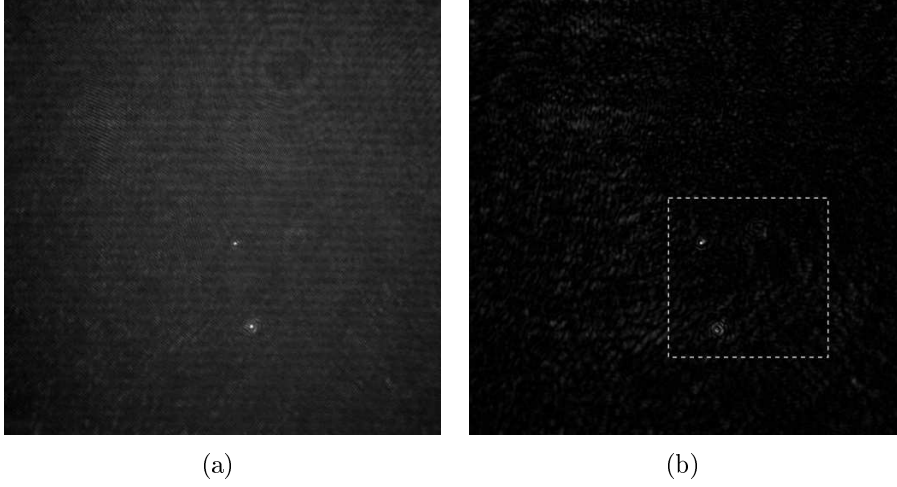


FIGURE III.9 – (a) Hologramme de nanobilles d'or enregistré par la caméra. (b) Amplitude du champ complexe  $E_P$  obtenu après les étapes de correction des effets de phases et filtrage décrites dans ce paragraphe. Ce champ complexe sert de base à la reconstruction de l'échantillon en trois dimensions par propagation successives.

de propagation de l'hologramme dans le plan de la pupille arrière de l'objectif apporte des résultats similaires sans l'utilisation d'un deuxième objectif.

### Complément sur l'influence de la sphéricité de l'onde de référence

Le paramètre  $d$  permettant de propager l'hologramme dans le plan de la pupille arrière de l'objectif correspond réellement à la distance entre cette pupille et la caméra dans le cas où **l'onde de référence est une onde plane**. Dans notre montage optique, l'onde de référence est filtrée par un iris, puis se propage de cet iris vers la caméra. Notre onde de référence est donc également une onde sphérique, de courbure  $d'$ , telle que  $d'$  est la distance entre l'iris et la caméra. L'onde de référence  $E_R$  au niveau de la caméra est de la forme suivante :

$$E_R(x, y) \propto E_R \times e^{ik(x^2+y^2)/2d'}, \quad (\text{III.6})$$

alors que l'onde provenant du microscope a la forme suivante :

$$E_S(x, y) \propto E_S \times e^{ik(x^2+y^2)/2d}. \quad (\text{III.7})$$

L'interférence entre ces deux ondes faisant intervenir les termes croisés  $E_S E_R^*$  et  $E_S^* E_R$ , il en résulte que l'hologramme  $H$  s'écrit :

$$H \propto I_R + I_S + E_R E_S^* e^{ik(x^2+y^2)/2d''} + E_R^* E_S e^{ik(x^2+y^2)/2d''} \quad (\text{III.8})$$

où le paramètre  $d''$  est défini par :

$$\frac{1}{d''} = \frac{1}{d} - \frac{1}{d'} \quad (\text{III.9})$$

On peut donc corriger la sphéricité de l'onde à la sortie de l'objectif en propageant l'hologramme dans le plan de la pupille arrière de l'objectif, même si l'onde de référence n'est pas plane. La valeur du paramètre  $d''$  qui permet de propager l'hologramme dans le plan de cette pupille ne correspond alors pas physiquement à la distance entre l'objectif et la caméra.

### III.B.3 Deuxième étape : reconstruction de l'échantillon en 3D par propagations successives

La seconde étape de notre algorithme consiste à reconstruire l'échantillon en trois dimensions en propageant par pas successifs le champ optique dans le plan focal de l'objectif (plan  $P$ ) dans la direction de l'axe optique (le long de l'axe  $Z$ ). Les distances de propagation nécessaires pour balayer tout l'échantillon sont de l'ordre de la dizaine de microns, ce qui est petit devant la largeur totale du champ d'observation du microscope, on utilise donc la méthode de propagation du spectre angulaire présenté au chapitre 1 au paragraphe I.B.3.b. Le principe est illustré sur la figure III.10. Pour propager le champ complexe  $E_P$  d'une distance  $z$ , notre algorithme calcule la transformée de Fourier (FFT) de la matrice complexe  $E_P(x, y)$  pour obtenir son spectre angulaire  $A_p(k_x, k_y)(= \tilde{E}_P)$ , puis multiplie le spectre angulaire par la matrice de propagation  $\Psi_z(k_x, k_y)$  dont l'expression est donnée par la formule suivante :

$$Psi_z(k_x, k_y) = e^{i\sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}z}, \quad (\text{III.10})$$

où

$$k = \frac{2\pi n}{\lambda}, \quad k_x = \frac{2\pi(x - 256)}{512d'_{pix}}, \quad k_y = \frac{2\pi(y - 256)}{512d'_{pix}}. \quad (\text{III.11})$$

Le paramètre  $n$  est l'indice du milieu dans laquelle on effectue la propagation,  $\lambda$  est la longueur d'onde du laser, et  $d'_{pix}$  est la taille des pixels dans le plan focal objet, ce qui correspond à la taille réelle des pixels de la caméra divisée par le grossissement du système. Les expressions données de  $k_x$  et  $k_y$  sont valables dans le cas où les hologrammes sont des matrices de  $512 \times 512$  pixels. Le produit de cette multiplication est le spectre angulaire  $A_z(k_x, k_y)$  du champ complexe dans le plan de propagation :

$$A_z(k_x, k_y) = A_p(k_x, k_y) \times \Psi_z(k_x, k_y) \quad (\text{III.12})$$

Finalement la transformée de Fourier inverse ( $FFT^{-1}$ ) du spectre angulaire  $A_z$  est calculée pour obtenir le champ complexe propagé dans le plan de propagation. Cette étape est répétée en variant la distance  $z$  pour obtenir plan par plan une cartographie en trois dimensions du champ complexe diffusé par l'échantillon.

La figure III.12 montre la propagation du champ  $E_P$  de la figure III.11 à différentes profondeurs ( $-4, 0, 4, 8$  et  $12 \mu\text{m}$ ). Nous avons réalisé un zoom sur la région définie par le carré en pointillés blancs de la figure III.11. Les images sur la première ligne montrent le module du champ complexe. Les images en bas montrent le module du champ en échelle logarithmique représenté en surface 3D. On observe sur ces reconstructions 3 nanoparticules situés à des profondeurs différentes. Ceci prouve qu'il est donc possible de reconstruire en trois dimensions l'échantillon à partir du champ complexe  $E_P$  dans le plan focal de l'objectif.

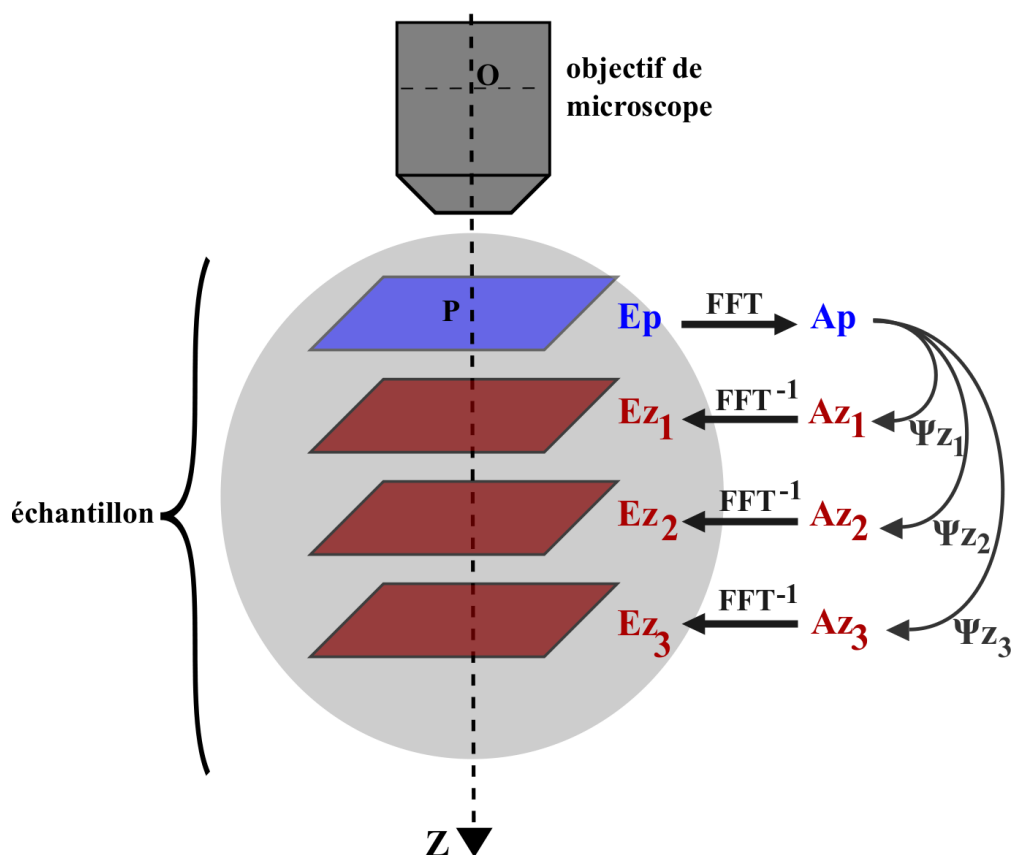


FIGURE III.10 – Reconstruction en 3D de l'objet par propagation pas à pas le long de l'axe Z du champ complexe  $E_P$ . Le champ est propagé par la méthode du spectre angulaire.

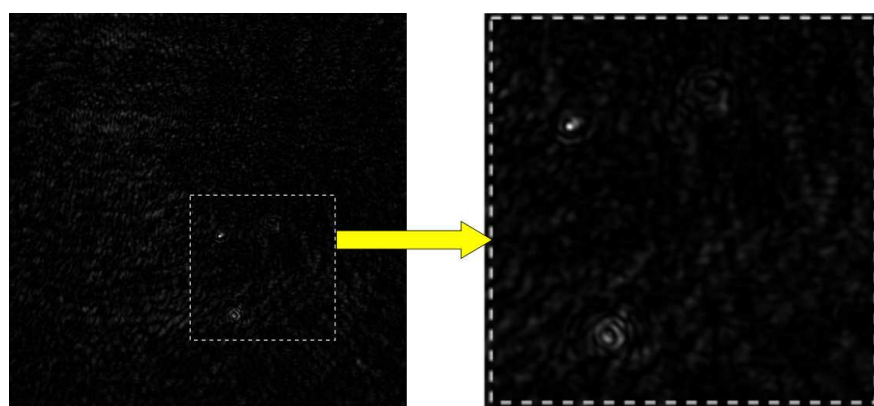


FIGURE III.11 – Zoom de l'hologramme  $E_P$  sur la région d'intérêt où sont situées les billes d'or de 100 nm.

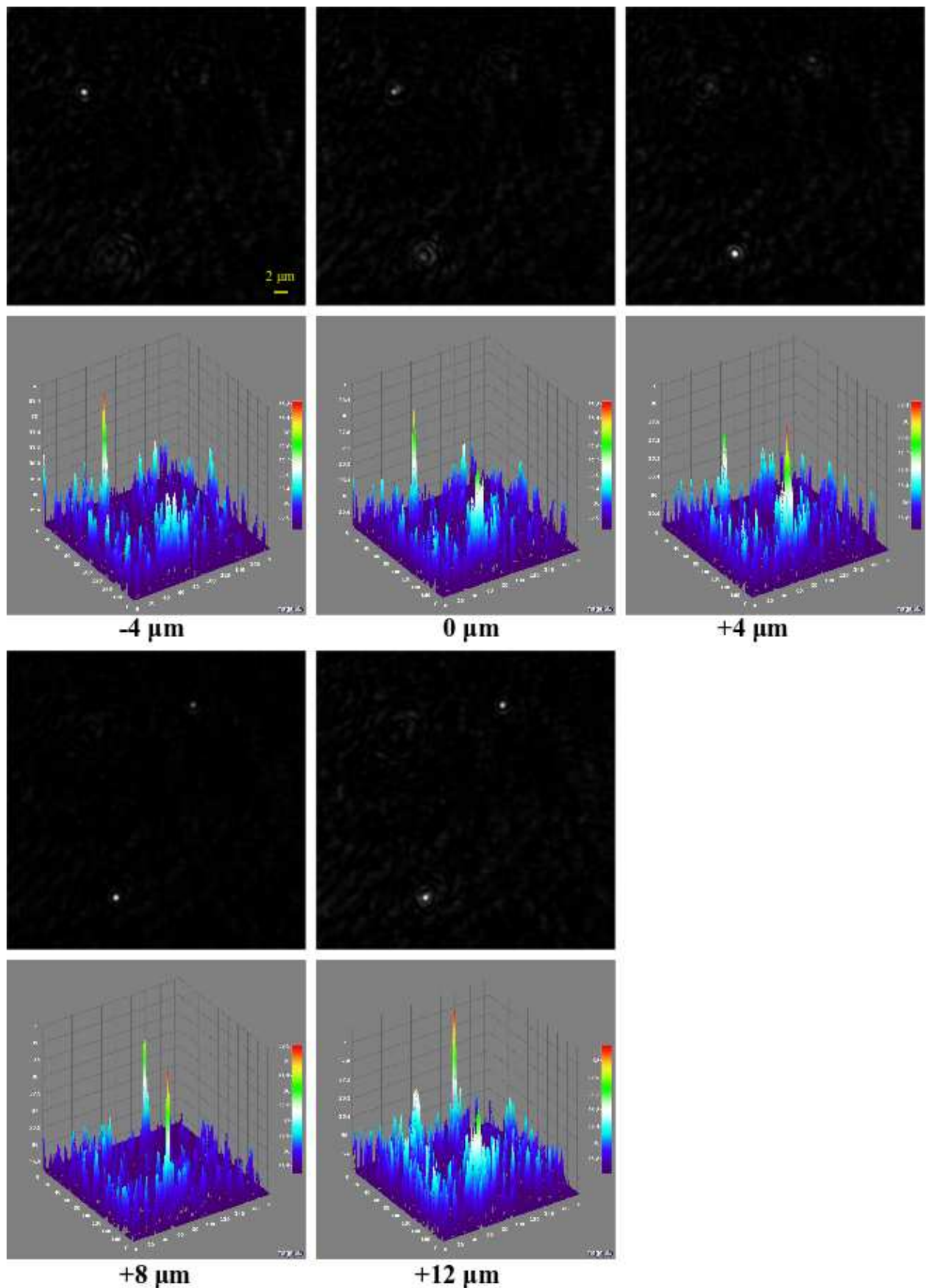


FIGURE III.12 – Propagation de la zone d'intérêt définie sur la figure III.11 à différentes profondeurs ( $-4$ ,  $0$ ,  $4$ ,  $8$  et  $12 \mu\text{m}$ ). Les images de la colonne de gauche montrent le module du champ complexe. Les images à droites montrent le module du champ en échelle logarithmique représenté en surface 3D.

### III.B.4 Résumé du processus de reconstruction

Nous allons rappeler brièvement dans ce paragraphe les différentes étapes de la reconstruction (voir figure III.13) présentées précédemment.

1. Les hologrammes  $H(x, y)$  enregistrés par la caméra sont des matrices réelles de  $512 \times 512$  pixels. Ces hologrammes sont transférés sur la mémoire interne de la carte graphique.
2. Les hologrammes sont propagés dans le plan focal arrière de l'objectif (qui est confondu avec le plan de la pupille arrière de l'objectif). Pour réaliser cette opération, l'hologramme  $H(x, y)$  est d'abord multiplié par une matrice de phase quadratique de la forme  $e^{ik(x^2+y^2)/2d}$ , où le paramètre  $d$  correspond à la distance objectif-caméra, puis on calcule la transformée de Fourier du produit. On obtient l'hologramme  $\tilde{H}(k_x, k_z)$  qui est la propagation de l'hologramme par la méthode de Fresnel dans le plan de la pupille arrière de l'objectif.
3. La matrice  $\tilde{H}(k_x, k_y)$  contient les 3 ordres de l'équation générale d'interférence. Ces ordres sont séparés spatialement dans ce plan de Fourier grâce à la configuration hors-axe du système. On isole l'ordre +1 par un filtrage numérique pour ne garder que l'information sur le champ optique diffusé par l'échantillon. La partie filtrée est ensuite centrée au milieu de l'espace de Fourier pour supprimer la fréquence spatiale ajoutée par la géométrie hors-axe. On obtient alors une matrice  $\tilde{E}_P$  qui est la transformée de Fourier du champ optique  $E_P$  dans le plan focal objet.
4. On calcule la transformée de Fourier inverse de  $\tilde{E}_P$  pour obtenir le champ complexe diffusé par l'échantillon dans le plan focal de l'objectif de microscope, noté  $E_P$ . Ce champ sert de plan de départ pour reconstruire le volume par propagation pas à pas.
5. On calcule  $A_0$  le spectre angulaire de  $E_P$  par une transformée de Fourier directe. **remarque :** à ce point que les matrices  $A_0$  et  $\tilde{E}_P$  sont identiques, nous pouvons donc faire l'économie de deux transformées de Fourier (l'une inverse à l'étape 4, l'autre directe à l'étape 5).
6. Le spectre angulaire  $A_0$  est multiplié dans l'espace de Fourier par une matrice  $\Psi_z$  correspondant à une propagation d'une distance  $z$ . On obtient le spectre angulaire  $A_z = A_0 \times \Psi_z$
7. Le champ complexe propagé d'une distance  $z$  est obtenu par le calcul de la transformée de Fourier inverse de  $A_z$ .
8. On répète les étapes 6 et 7 en variant la distance de propagation  $z$ . Pour obtenir un cube de données, nous fixons un pas de propagation  $\Delta z$  de typiquement 100 nm et nous propagons le champ pas-à-pas sur des distances  $n \times \Delta z$ , où  $n$  est un entier.

### III.C Amélioration de la vitesse de reconstruction

Dans cette section nous allons comparer la vitesse de reconstruction des hologrammes lorsque le calcul est réalisé sur la carte graphique ou sur le processeur de l'unité centrale. Le tableau III.14 résume les temps nécessaires à la reconstruction d'un cube de données de  $512 \times 512 \times 500$  pixels stocké sur la mémoire vive. La reconstruction de ce volume nécessite de calculer 500 propagations successives du champ depuis le plan focal. L'algorithme réalise au total 501 FFT, 1 FFT pour propager l'hologramme dans le plan de la pupille arrière de

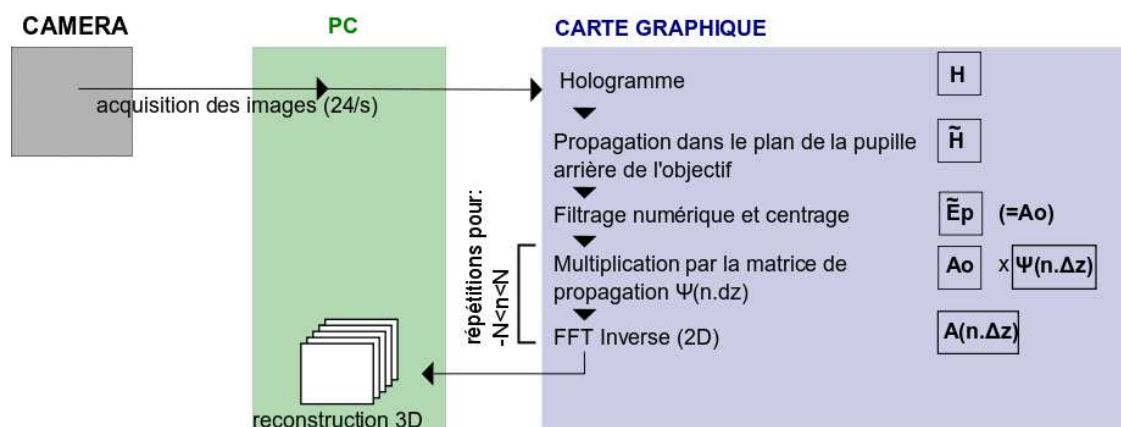


FIGURE III.13 – Schéma du processus de reconstruction.

	durée total de la reconstruction	temps requis pour une propagation
Calcul sur l'unité centrale	60 s	120 ms
Calcul sur la carte graphique	0,5 s	4 ms

FIGURE III.14 – Temps de calcul nécessaire à la reconstruction d'un cube de donnée de  $512 \times 512 \times 500$  pixels (colonne de gauche) et d'une seule propagation (colonne de droite).

l'objectif, et 500 FFT inverses pour réaliser les étapes de propagation dans l'échantillon. La taille du cube de donnée final est de 512 Mo.

Nous avons donc gagné un facteur 120 sur la vitesse de reconstruction dans le cas où le cube de donnée est stocké sur la mémoire vive. Si ce cube est enregistré entièrement sur le disque dur, le temps nécessaire est d'environ 5 s (étant donné la vitesse d'écriture des disques de 100 Mo/s). Dans ce cas nous gagnons un facteur 12. Cependant il n'est pas nécessaire de sauver entièrement la reconstruction en 3D sur le disque dur pour localiser les nanoparticules.



# CHAPITRE IV

---

## Résultats expérimentaux

---

Nous allons dans ce chapitre présenter les résultats expérimentaux de suivi de nanoparticules en trois dimensions obtenus avec ce montage optique. Nous avons tout d'abord étudié des nanoparticules fixes (section IV.A) afin d'évaluer la précision de localisation et la profondeur de champ de notre montage optique, puis des nanoparticules en diffusion brownienne dans l'eau (section IV.B) ou injectées dans des cellules vivantes (section IV.C). Dans chacun de ces cas, nous commencerons par décrire les échantillons utilisés, puis nous présenterons les reconstructions obtenues. Notre méthode de localisation sera ensuite décrite.



## IV.A Observation de nanoparticules de 100 nm fixées dans un gel

### IV.A.1 Description de l'échantillon

Dans un premier temps nous avons observé des nanobilles d'or de 100 nm de diamètre dans un gel d'agarose (figure IV.1). Cette première étude nous a permis d'étudier le profil tridimensionnel du champ diffusé par une bille de 100 nm, dans le but de développer un algorithme de suivi automatique. Le gel a été réalisé en mélangeant 1% en masse d'agarose avec de l'eau distillée chauffée à 80 °C. Une solution de nanobille d'or dans de l'eau est mélangée au gel d'agarose avant le durcissement du gel lors de son refroidissement.

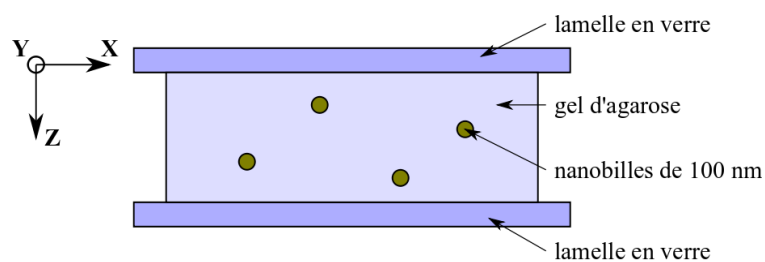


FIGURE IV.1 – Échantillon de nanobilles d'or de 100 nm immobilisées dans un gel d'agarose.

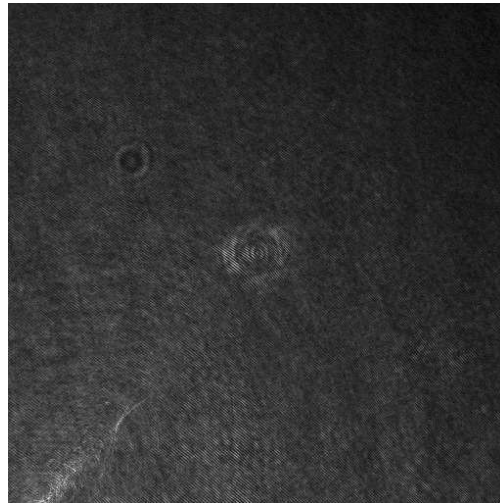


FIGURE IV.2 – Exemple d'hologramme obtenu avec l'échantillon de la figure IV.1. On distingue au milieu de l'hologramme une nanoparticule hors-focus.

### IV.A.2 Reconstructions des hologrammes

La figure IV.2 montre un hologramme enregistré en imageant ce gel d'agarose. Le temps d'exposition de cet hologramme est égal à 1 ms. On distingue au centre de l'image la signature d'une nanoparticule de 100 nm hors-focus. La reconstruction de l'hologramme en 3D nous permet de retrouver le profil de l'intensité du champ diffusé par cette bille. La figure IV.3 montre (à gauche au milieu) la reconstitution en 3D de l'intensité du champ diffusé par

la nanobille. Cette image à été réalisée en superposant les propagations entre  $-200\ \mu\text{m}$  et  $200\ \mu\text{m}$  du champ dans le plan focal par pas de  $1\ \mu\text{m}$ . Le rendu 3D est obtenu par le plugin *3D-viewer* du logiciel ImageJ. La colonne de droite montre l'intensité du champ en échelle logarithmique à différentes profondeurs :  $Z = 0, 10\ \mu\text{m}, 20\ \mu\text{m}, 30\ \mu\text{m}$  et  $40\ \mu\text{m}$ . Cette reconstruction en 3D permet de retrouver les coordonnées du point où l'intensité du champ est maximale, qui correspond à la position de la nanoparticule. La procédure de localisation est détaillée dans le paragraphe suivant.

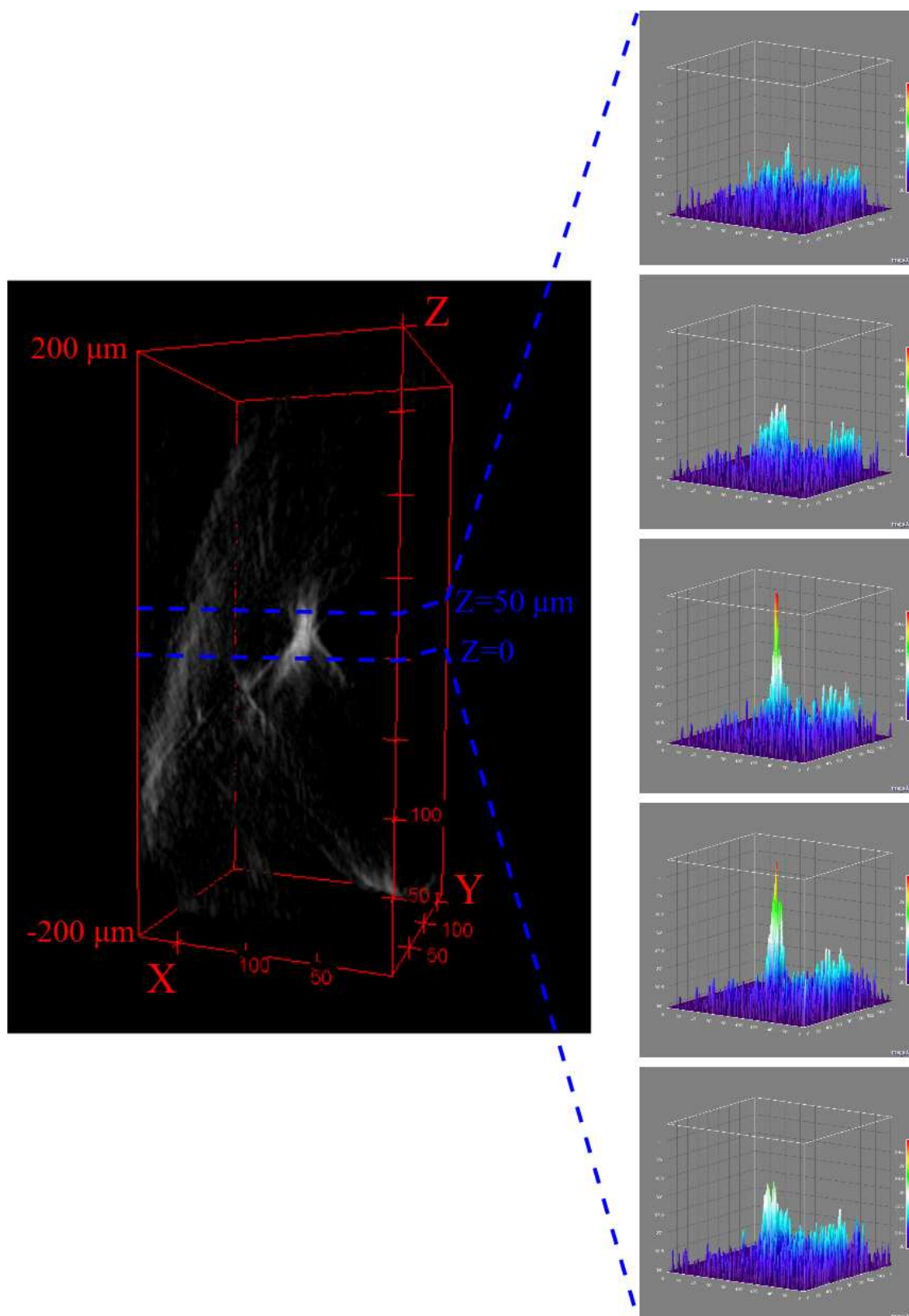


FIGURE IV.3 – **à gauche** : Reconstruction en 3D de l'intensité du champ diffusé par une nanoparticule de 100 nm dans un gel d'agarose. Cette image a été réalisée en superposant les propagations entre  $-200 \mu\text{m}$  et  $200 \mu\text{m}$  du champ dans le plan focal. Les échelles selon X et Y sont en pixels (la largeur d'un pixel étant égale à 160 nm). L'échelle selon Z est en micron. **à droite** : Intensité du champ en échelle logarithmique pour différentes profondeurs de propagation : de bas en haut,  $Z = 0, 10 \mu\text{m}, 20 \mu\text{m}, 30 \mu\text{m}$  et  $40 \mu\text{m}$ .

### IV.A.3 Algorithme de localisation

A partir d'un hologramme, nous pouvons reconstituer une cartographie en 3 dimensions du champ lumineux diffusé par les nanoparticules d'or. Nous obtenons comme le montre la figure IV.3 une matrice 3D de voxels ayant pour taille :  $d'_{pix}$  selon les axes  $X$  et  $Y$  et  $\Delta z$  selon l'axe  $Z$ , où  $d'_{pix}$  est la taille des pixels du capteur CCD divisée par le grossissement et  $\Delta z$  est le pas de propagation selon l'axe  $Z$ . Dans le cas où plusieurs billes sont dans la zone cartographiée, les maximums locaux de l'intensité du champ correspondent aux positions des nanoparticules. Nous avons ajouté à l'algorithme de reconstruction présenté au chapitre II une méthode de localisation des nanoparticules dont le principe repose sur la recherche des ces maximums locaux. Notre algorithme de localisation s'effectue en deux temps :

1. Trouver le voxel où l'intensité du champ est maximale.
2. Affiner ensuite la position en réalisant un ajustement du profil de l'intensité selon les axes  $X, Y$  et  $Z$ .

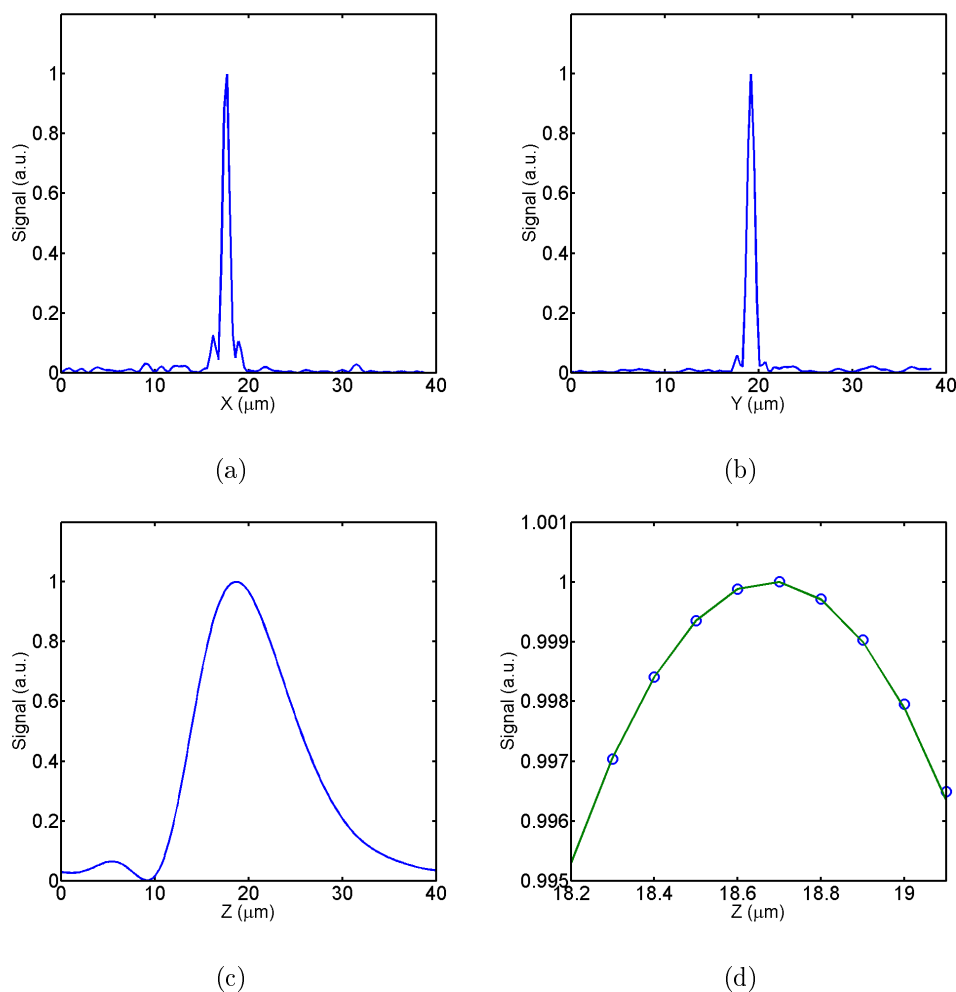


FIGURE IV.4 – Profil de l'intensité du champ reconstruit autour d'une nanoparticule de 100 nm le long de l'axe  $X$  (a),  $Y$  (b),  $Z$  (c). La courbe (d) et un zoom sur le sommet de la courbe (c).

La figure IV.4 montrent l'intensité du champ autour du maximum selon les axes  $X$  (a),  $Y$  (b),  $Z$  (c) et un zoom sur le maximum du profil selon  $Z$  (d). La largeur à mi-hauteur du profil de l'intensité est de  $1\ \mu\text{m}$  latéralement (selon  $X$  et  $Y$ ) et de  $12\ \mu\text{m}$  selon l'axe  $Z$ . On observe que le profil selon l'axe  $Z$  n'est pas parfaitement gaussien. Cette déformation optique est due aux aberrations créées par l'échantillon. Les figures IV.5(a) et (b) montrent le profil selon  $Z$  d'une bille à différentes profondeurs, obtenu en translatant l'échantillon dans la direction  $Z$ . Le profil de l'intensité ne varie quasiment pas en fonction de la profondeur. La déformation est présente sur tous les profils présentés. Comme nous le verrons dans la suite, nous avons calculé la position de la nanoparticule en tenant compte du sommet de la courbe d'intensité pour nous affranchir de cette déformation. Les mesures présentées dans la suite de ce paragraphe montrent que cette méthode donne une position fiable de la nanoparticule. Nous avons comparé ces profils d'intensités à des simulations de la PSF (« Point Spread Function ») du système. Ces simulations ont été réalisés avec le logiciel « PSF Lab ». Ce calcul est basé sur l'article de Nasse et al. [88]. La figure IV.6 montre l'intensité lumineuse simulée dans les plans  $X - Y$  (a) et  $X - Z$  (b). La largeur à mi-hauteur de la PSF dans les directions  $X$  et  $Y$  est d'environ  $1\ \mu\text{m}$ , ce qui correspond à la valeur mesurée sur nos reconstructions. La largeur à mi-hauteur de la PSF simulée selon l'axe  $Z$  est égale à  $8\ \mu\text{m}$ . Cette simulation ne tient pas compte des aberrations optiques de l'objectif, c'est pourquoi notre profil d'intensité selon  $Z$  mesuré est plus large.

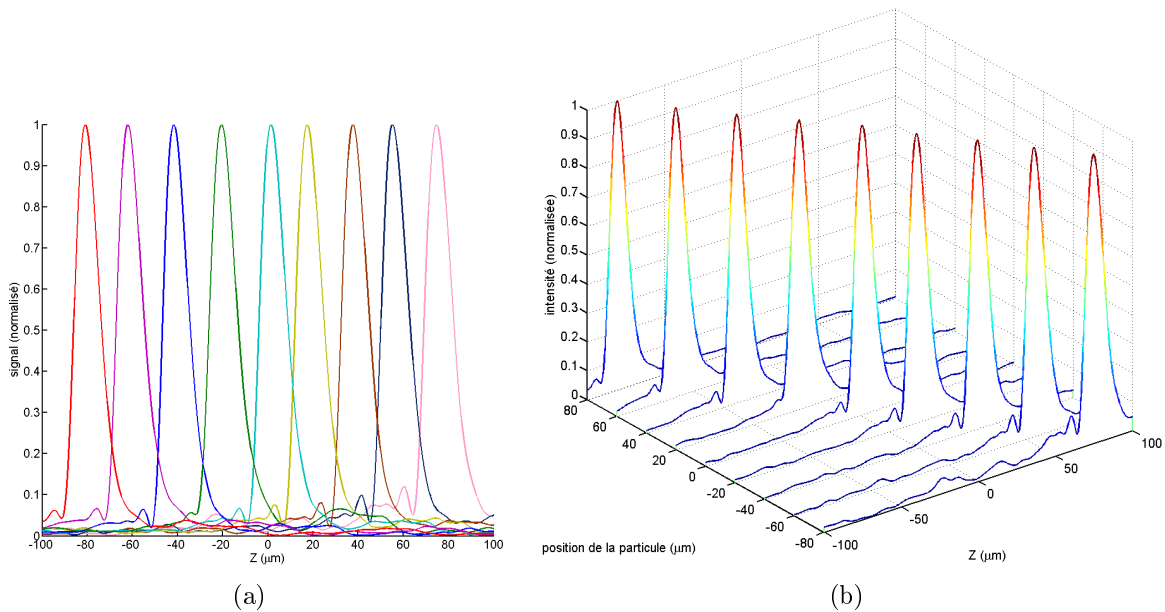


FIGURE IV.5 – Profil de l'intensité selon l'axe  $Z$  d'une nanoparticule de  $100\ \text{nm}$  à différentes profondeurs (de  $-80$  à  $80\ \mu\text{m}$  par pas de  $20\ \mu\text{m}$ ).

Pour déterminer la position de la particule dans les directions  $X$  et  $Y$  avec une précision inférieure à la taille du pixel, notre algorithme réalise automatiquement un ajustement gaussien sur le pixel d'intensité maximale et sur les deux pixels adjacents. Pour affiner la position le long de l'axe  $Z$ , nous avons choisi de réaliser un ajustement du sommet de la PSF par un polynôme d'ordre 2. Ce polynôme est calculé sur trois points : le pixel d'intensité maximale et les pixels de rang  $i + 2$  et  $i - 2$  (ce choix est arbitraire, l'ajustement polynomial sur les points  $i \pm 1$  ne change pas la coordonnée en  $Z$  obtenue). Cet ajustement permet de

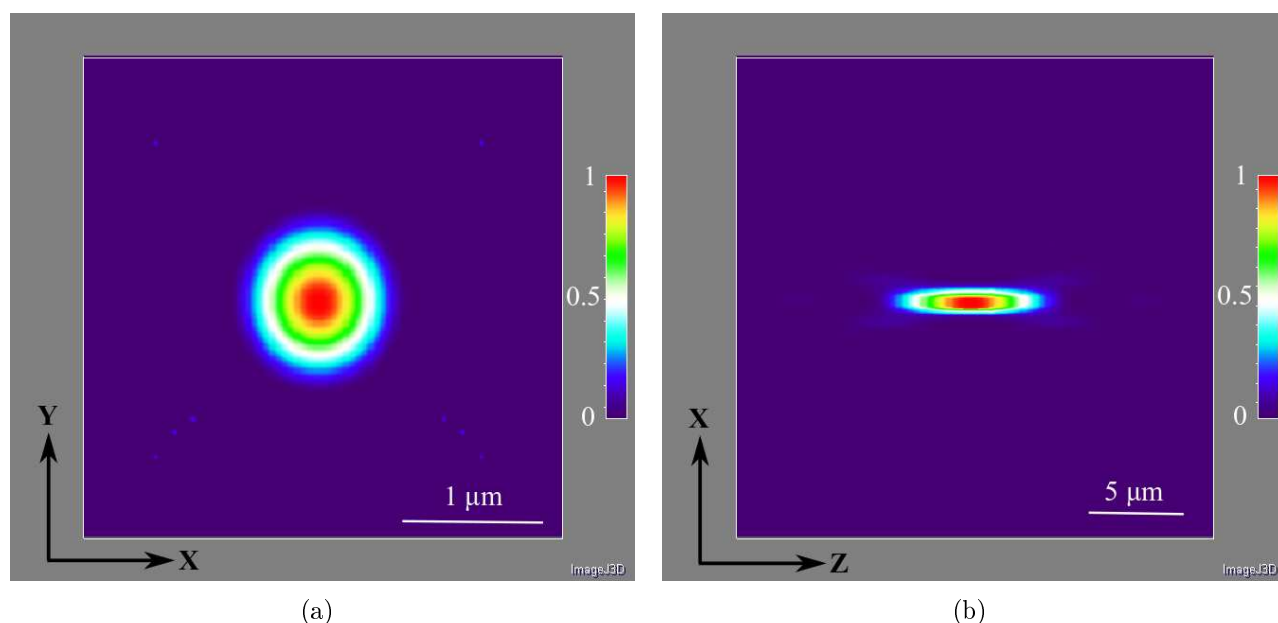


FIGURE IV.6 – Simulation de la PSF de l'objectif utilisé sur le montage optique dans le plan  $XY$  perpendiculaire à l'axe optique (a), et  $XZ$  parallèle à l'axe optique (b).

s'affranchir d'une possible déformation de la PSF due aux aberrations ou de la superposition de la PSF de la particule étudiée avec la PSF d'une autre particule à proximité. L'élaboration d'une autre méthode d'ajustement prenant en compte plus de points est beaucoup plus compliqué à programmer en langage CUDA et ralentirait le processus de localisation. C'est pourquoi nous avons opté pour cette méthode utilisant 3 pixels dans chaque direction de l'espace.

#### IV.A.4 Évaluation de la précision de localisation et de la profondeur de champ

Nous avons ensuite réalisé des mesures de la précision de localisation des nanoparticules à différentes profondeurs. Nous avons sélectionné dans le gel d'agarose une nanoparticule de 100 nm que nous avons placée dans le plan focal de l'objectif. La précision de localisation a été mesurée de la manière suivante :

1. une série de 200 hologrammes de la particule est enregistrée. Chaque hologramme est obtenu avec un temps d'exposition de 1 ms,
2. la position de la nanoparticule est ensuite déterminée pour chaque hologramme en utilisant l'algorithme présenté dans le paragraphe précédent,
3. la précision de localisation est obtenue en calculant la déviation standard des coordonnées autour de la position moyenne de la nanoparticule.

La figure IV.7 montre les coordonnées calculées de la particule à partir des 200 hologrammes. La déviation standard mesurée est égale à 3 nm selon  $X$  et  $Y$ , et égale à 150 nm pour la coordonnée en  $Z$ . L'échantillon est ensuite déplacé le long de l'axe  $Z$  par pas de  $20\ \mu\text{m}$  comme l'illustre la figure IV.8(a) pour augmenter la distance entre la nanoparticule et le plan focal. A chaque nouvelle position de l'échantillon, une nouvelle série

de 200 hologrammes est enregistrée et les 200 coordonnées de la même nanoparticule sont calculées ainsi que la déviation standard selon les 3 axes. Les figures IV.9(a) et (b) montrent l'évolution de la précision de localisation selon les axes  $X$ ,  $Y$  et  $Z$  en fonction de la distance entre la nanoparticule et le plan focal de l'objectif. Nous observons que :

- la précision de localisation selon  $X$  et  $Y$  reste quasiment constante et égale à 3 nm lorsque la distance entre la particule et le plan focal est comprise entre  $-200$  et  $+200 \mu\text{m}$ . Au delà de  $200 \mu\text{m}$ , on observe que la précision de localisation chute (se traduisant par une augmentation brutale de la déviation standard des 200 positions calculées). Au delà de  $400 \mu\text{m}$  de part et d'autre du plan focal, il n'est plus possible de localiser la particule car le niveau du signal diffusé par la particule devient inférieur au niveau de bruit.
- la précision de localisation mesurée selon  $Z$  est égale à 150 nm lorsque la particule est située dans le plan focal (point d'abscisse 0 sur la figure IV.9(b)). Cette précision s'améliore lorsque la particule est situé à une distance de  $20 \mu\text{m}$  à  $200 \mu\text{m}$  en valeur absolue du plan focal. La précision de localisation est alors égale à 70 nm. La dégradation de la précision de localisation observable lorsque la particule est dans le plan focal s'explique par le fait que l'image de la particule dans ce cas est nette sur la caméra. Les franges d'interférences que forment cette image avec l'onde de référence sur l'hologramme sont donc étalées sur un très faible nombre de pixels au niveau de l'image de la particule. La qualité de la reconstruction en est alors dégradée. Ce phénomène est un résultat attendu par la théorie, une démonstration a été donnée par C.Fournier et al. [89].
- la précision de localisation selon  $Z$  chute également au delà d'une distance de  $200 \mu\text{m}$  en valeur absolue du plan focal.

Cette expérience sur des nanoparticules d'or fixées dans un gel nous ont permis tout d'abord d'élaborer un algorithme de localisation automatique des particules, puis d'évaluer la précision de localisation du système. Nous avons observé que notre système est capable de localiser une nanoparticule d'or de 100 nm avec une précision de 3 nm sur sa position latérale (dans le plan  $X - Y$ ) et d'environ 70 nm sur sa position axiale ( $Z$ ) sur une profondeur allant de  $-200$  à  $+200 \mu\text{m}$  du plan focal de l'objectif.

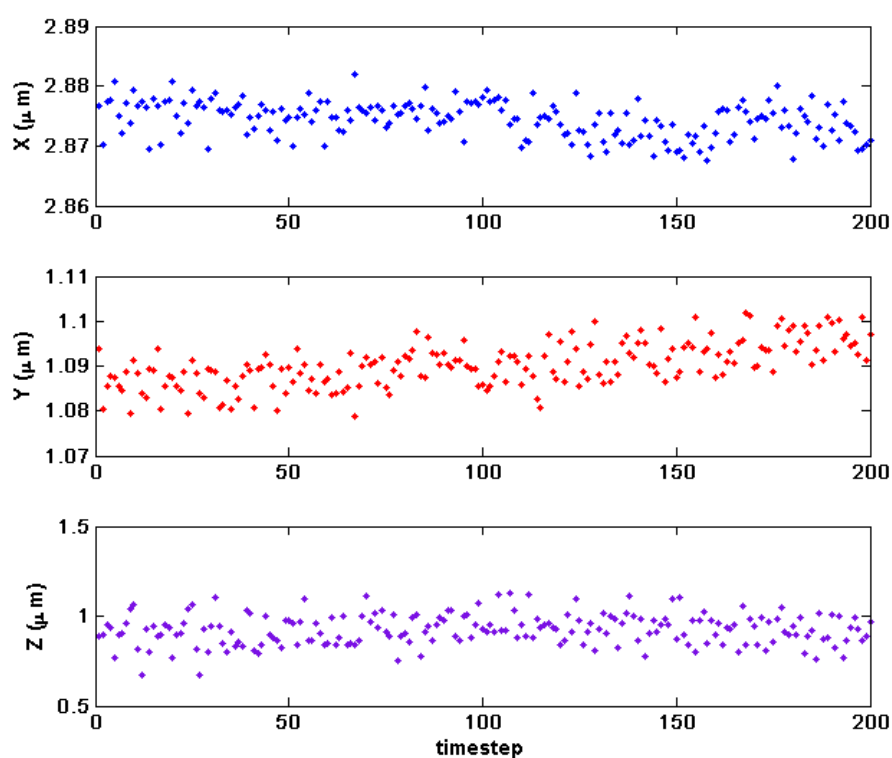


FIGURE IV.7 – Coordonnées de la particule d'or de 100 nm à partir des 200 différentes mesures successives par notre algorithme de localisation. La particule choisie est située à  $1\ \mu\text{m}$  du plan focal de l'objectif. La déviation standard des coordonnées en  $X$  et  $Y$  donne une précision de localisation de 3 nm, et de 150 nm dans la direction de l'axe  $Z$ .



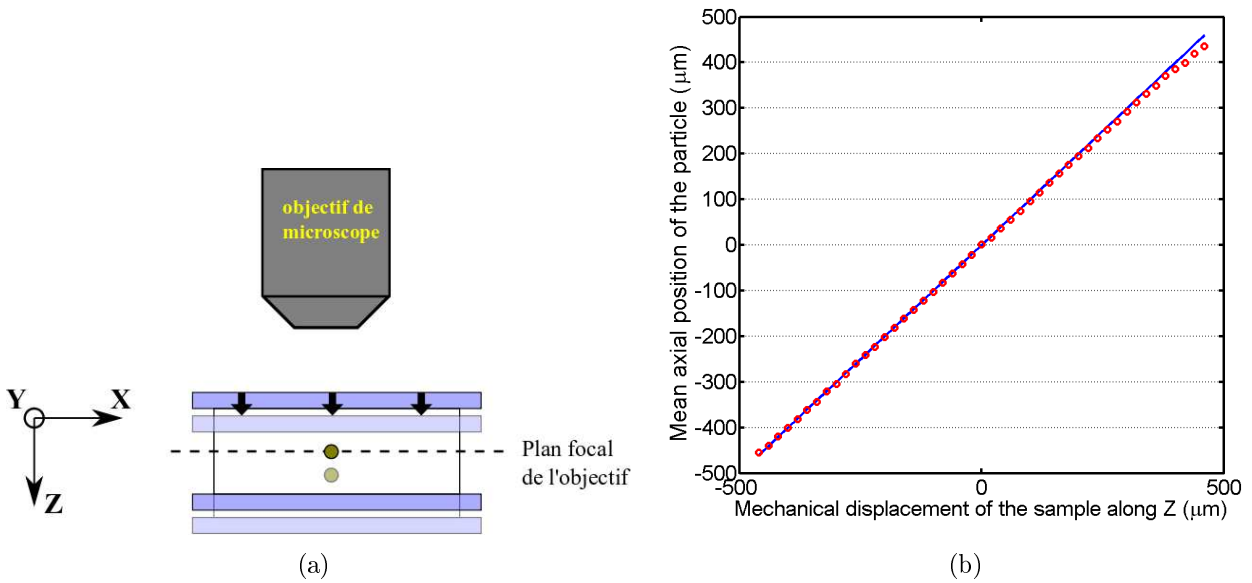


FIGURE IV.8 – (a) Schématisation de l'expérience décrite dans ce paragraphe, destinée à évaluer la précision de localisation d'une nanoparticule fixe lorsque la distance entre la particule et le plan focal varie. L'échantillon est déplacé par pas de 20 μm dans la direction de l'axe Z. (b) Position moyenne de la nanoparticule calculée par notre algorithme comparée au déplacement réel de l'échantillon.

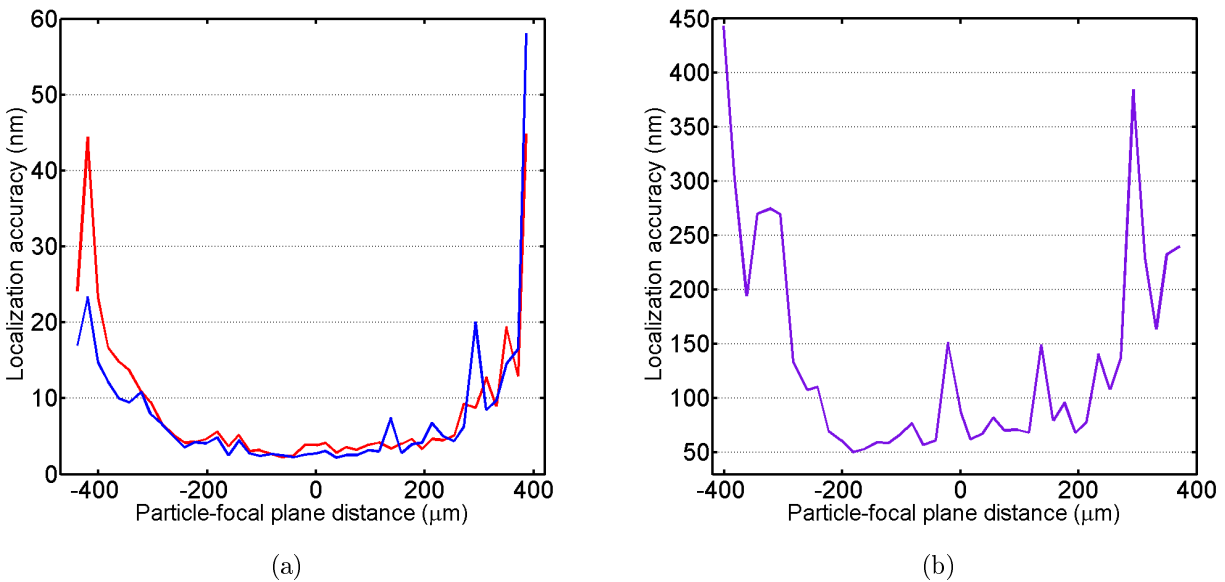


FIGURE IV.9 – Précision de localisation d'une nanoparticule d'or de 100 nm en fonction de la distance entre la particule et le plan focal de l'objectif, selon les directions X (a, courbe bleue) et Y (a, courbe rouge), et Z (b).

## IV.B Suivi de nanoparticules de 100 nm en diffusion Brownienne dans l'eau

Dans cette section, nous allons décrire les expériences de suivi de nanoparticules en mouvement brownien dans l'eau. Nous commencerons par décrire l'échantillon, puis nous présenterons des exemples de trajectoires de nanoparticules reconstruites à l'aide de notre algorithme. Nous discuterons ensuite de la manière dont nous pouvons extraire de ces trajectoires des informations quantitatives sur la diffusion.

### IV.B.1 Description de l'échantillon

Nous avons utilisé une solution des nanoparticules d'or de 50 nm de rayon dans l'eau, de concentration  $5 \cdot 10^3$  particules/mm<sup>3</sup>, dans une chambre d'observation de  $17 \times 3.8 \times 0.4$  mm (Ibidi©cell-chamber). La concentration choisie permet de limiter le nombre de particules observées simultanément dans le champ de vue. La dispersion sur le rayon des particules utilisée est telle que  $r = 50 \pm 2$  nm. La température de l'eau est fixée à  $T = 20^\circ\text{C}$ . A cette température, la viscosité dynamique de l'eau est de 1.0 mPa.s. Par conséquent le coefficient de diffusion  $D$  attendu est égal à  $4.2 \pm 0.2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ . Le temps d'exposition de la caméra est fixé à  $\delta t = 1$  ms. Pendant ce temps d'exposition le libre parcours moyen dans une dimension d'une telle particule est de 90 nm, ce qui est inférieur à la taille des pixels agrandis  $d''_{pix}$ , égale à 220 nm. Nous avons enregistré des séries d'hologrammes de  $512 \times 512$  pixels à une fréquence d'acquisition de 22.5 Hz.

### IV.B.2 Reconstructions des hologrammes

Les figures IV.10(a) et (b) montrent des trajectoires en trois dimensions reconstruites de nanoparticules en diffusion brownienne dans l'eau obtenues par notre algorithme. Pour obtenir ces trajectoires, nous avons ajouté dans notre programme une étape de soustraction du fond lumineux. Cette étape consiste à supprimer sur chaque hologramme la moyenne des 10 hologrammes précédents. Le déplacement moyen estimé dans une direction pendant la période d'acquisition de 44 ms est de 620 nm, ce qui correspond à environ 3 pixels. Le déplacement des particules est suffisamment grand entre deux images pour que cette méthode n'altère pas le signal des particules. Cette méthode de soustraction du fond lumineux n'est plus applicable dans le cas de particules fixes ou plus lentes, car elle supprime le signal. Les figures IV.11(a), (b) et (c) montrent la reconstruction d'un hologramme sans et avec la soustraction du fond lumineux, ainsi que le profil de l'intensité suivant l'axe X d'une nanoparticule. Nous observons d'une part que le signal n'est pas altéré par cette opération car la valeur maximale de l'intensité au niveau de la bille est égale à  $10^{17}$  sur les deux courbes, et que le niveau moyen du fond lumineux passe d'environ  $10^{15}$  (courbe bleue) à  $10^{14}$  (courbe rouge). Nous améliorons notre rapport signal sur bruit d'un facteur 10 grâce à cette opération.

Les trajectoires 3D de la figure IV.10 sont obtenues en reconstruisant pour chaque hologramme un volume de  $112 \times 112 \times 2.4 \mu\text{m}$  (soit  $512 \times 512 \times 24$  pixels) autour de la position précédente de la particule. La distance moyenne parcourue par la bille le long de l'axe  $Z$  étant d'environ 600 nm, c'est pourquoi 24 propagations de  $0,1 \mu\text{m}$  du champ (12 de part et d'autre de la position précédente) sont suffisantes pour déterminer les nouvelles

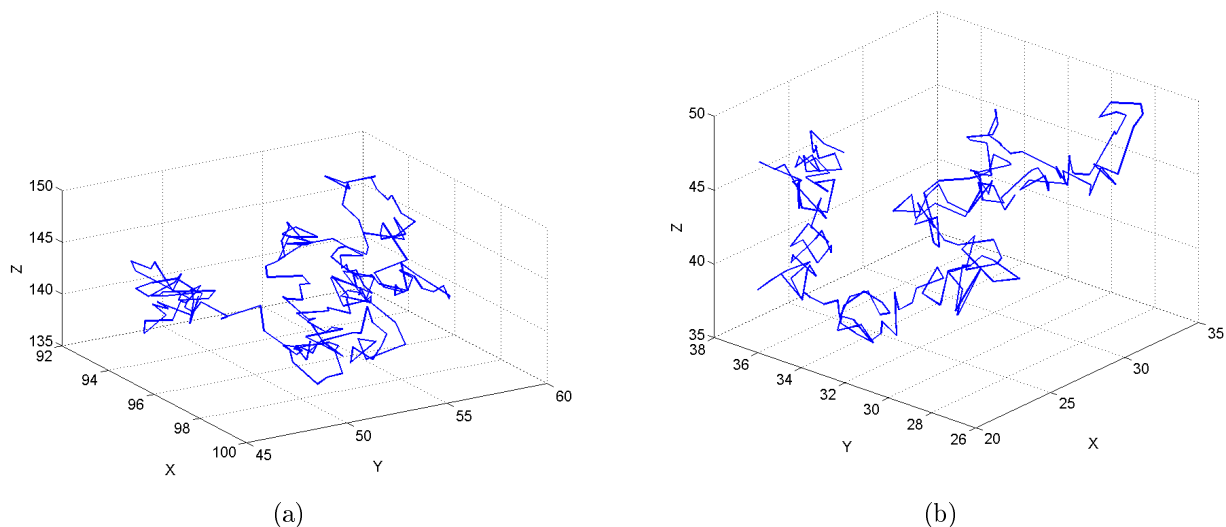


FIGURE IV.10 – Trajectoires en 3 dimensions de nanoparticules d'or de 100 nm en diffusion brownienne dans l'eau, reconstruites à partir de deux séries de 200 hologrammes. L'échelle des trois axes est en micromètre. Le plan focal de l'objectif a été fixé au niveau de l'interface verre-air de la première lame de verre. Les particules sont donc à une hauteur de 145  $\mu\text{m}$  (a) et 50  $\mu\text{m}$  (b) du plan focal.

coordonnées de la particule. La reconstruction de ce cube de données prend 33 ms par notre algorithme, ce qui est inférieur à la période d'acquisition de 44 ms. Le suivi en 3D d'une nanoparticule est donc réalisable en temps réel. Nous pouvons également localiser plusieurs particules sur un même hologramme comme le montre la figure IV.12. Pour obtenir cette figure, nous avons reconstruit simultanément la trajectoires de 3 nanoparticules de 100 nm à partir d'une même série de 200 hologrammes. Ce suivi nécessite de reconstruire un volume de  $512 \times 512 \times 400$  pixels pour chaque image. Le temps de calcul nécessaire est alors égale à 0,5 s. Le suivi de particules multiples à différentes profondeurs doit donc être réalisé postérieurement à l'acquisition sur notre montage, contrairement au cas de nanoparticule unique.

Nous avons présenté dans cette section des trajectoires de 200 points, ce qui représente 10 secondes d'observation. Nous arrivons en général à suivre une particule sur quelques centaines de points avant qu'une erreur se produise dans le suivi : notre algorithme fonctionnant sur la recherche d'un maximum local dans un volume autour des coordonnées précédentes, certains évènements conduisent à une erreur de localisation. Les deux évènements les plus courants provoquant une erreur dans le suivi sont lorsque la particule étudiée passe à proximité d'une autre ou d'une impureté présente dans le milieu. Les champs diffusés par les deux particules ou par l'impureté sont cohérents, et leur superposition peut conduire à une erreur dans la recherche du maximum local à cet instant. Ces expériences prouvent la possibilité de suivre des nanoparticules d'or de 100 nm en diffusion à des profondeurs allant jusqu'à 200  $\mu\text{m}$  du plan de netteté de l'objectif, et de reconstruire leur trajectoire en 3D.

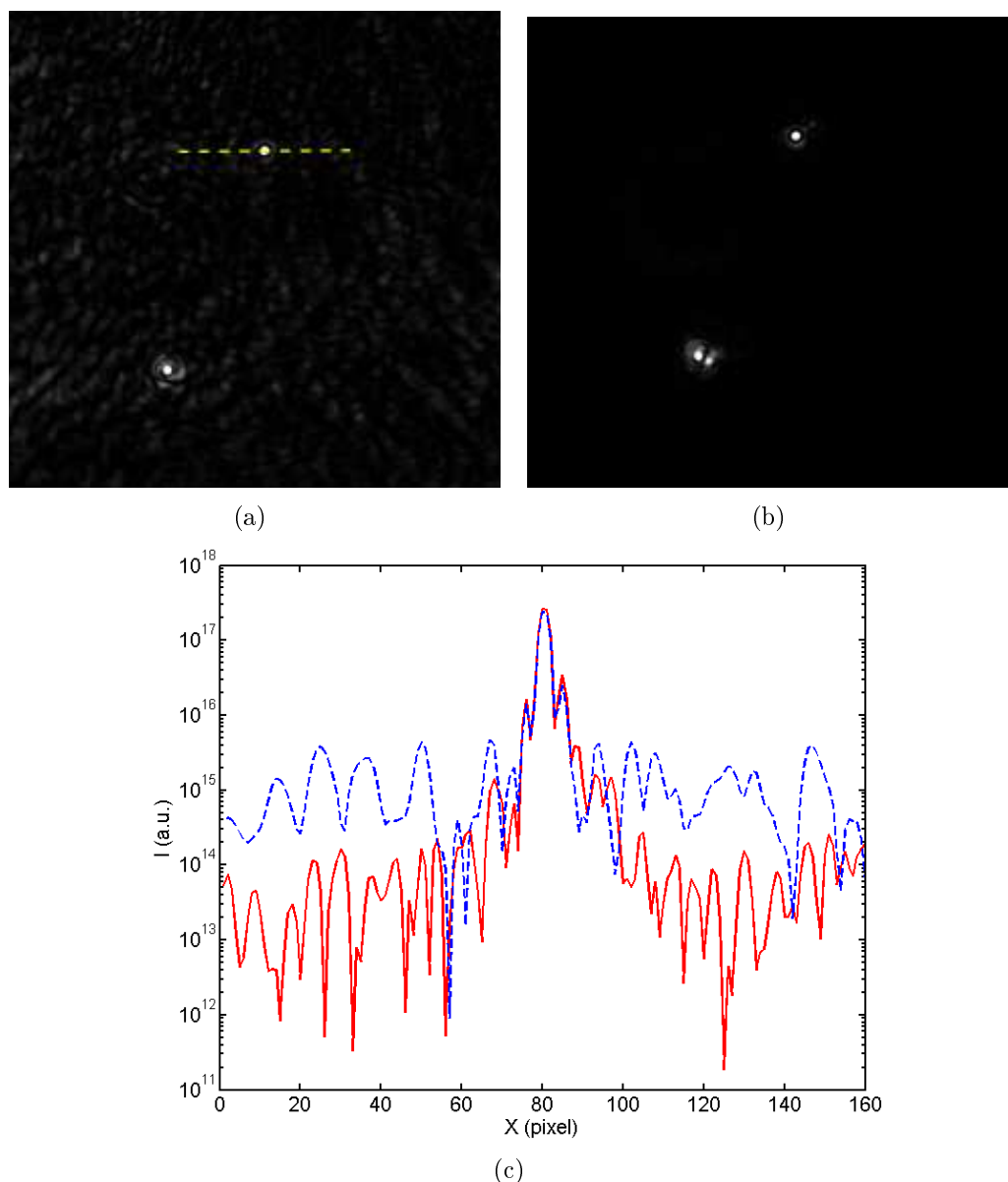


FIGURE IV.11 – *En haut : images reconstruites de nanoparticule de 100 nm dans l'eau respectivement sans (a) et avec (b) soustraction du bruit de fond. En bas : profil de l'intensité en échelle logarithmique le long de la ligne en pointillés jaune, sans (en bleu) et avec (en rouge) soustraction du bruit de fond.*

### IV.B.3 Etude quantitative des trajectoires reconstruites

Nous avons tout d'abord mis en évidence le caractère brownien de cette diffusion en calculant la courbe de déplacement quadratique moyen (MSD) à trois dimensions, dont nous rappelons l'expression donnée au chapitre 2 :

$$\text{MSD}(n \cdot \Delta t) = \frac{1}{N - n} \left( \sum_{i=1}^{n-N} (x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2 + (z_{i+n} - z_i)^2 \right). \quad (\text{IV.1})$$

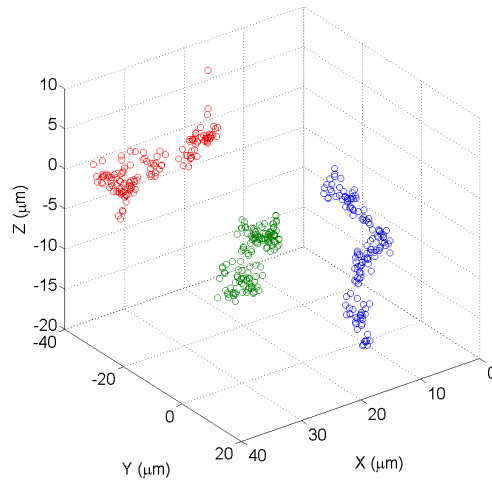


FIGURE IV.12 – Trajectoires 3D de trois nanoparticules en diffusion brownienne, reconstruites à partir de 200 hologrammes. Le plan focal de l’objectif a été fixé au niveau du plan  $Z = 0$ , à  $150 \mu\text{m}$  de la première lame de verre.

Pour un mouvement brownien de coefficient de diffusion  $D$ , les points de la courbe MSD forment théoriquement une droite de pente  $2dD$ , où  $d$  est la dimension de l’espace considéré. Les figures IV.13(a-b-c-d) montrent la MSD de la trajectoire de la figure IV.10(a), respectivement en 3D (a), et selon les axes  $X$  (b),  $Y$  (c) et  $Z$  (d). Les barres d’erreurs sont tracées en bleues et un ajustement linéaire pondéré par les barres d’erreur est tracé en rouge. Ces quatre courbes montrent que le déplacement quadratique moyen obtenu à partir des trajectoires expérimentales dépend linéairement du temps, ce qui confirme le caractère brownien du mouvement. L’ajustement linéaire de la courbe permet de déterminer le coefficient de diffusion des nanoparticules dans l’eau. Le tableau ci-dessous donne la valeur du coefficient de diffusion  $D$  déterminé à partir des figures IV.13(a-b-c-d) :

3D	$D = 4,1 \pm 0,6 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
$X$	$D = 4,5 \pm 0,2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
$Y$	$D = 3,8 \pm 0,2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
$Z$	$D = 3,8 \pm 0,2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$

On retrouve des valeurs proches de la valeur théorique  $D = 4,2 \pm 0,2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  calculée par la formule d’Einstein.

Nous avons comparé les coefficients de diffusion obtenus à partir d’une trajectoire unique avec la valeur obtenue à partir d’une moyenne de 10 trajectoires de 200 points chacune. La figure IV.14 montrent le résultat de la moyenne des courbes de MSD en 3D,  $X$ ,  $Y$  et  $Z$ , ainsi que les ajustements linéaires correspondant. Cette figure est obtenue en moyennant les 10 courbes de MSD, ce qui est différent de calculer la MSD des 10 trajectoires mises bout-à-bout. Les barres d’erreurs des 10 MSD sont égales car elles dépendent du nombre de points total de chaque trajectoire, qui est égale à 200. La moyenne des 10 MSD ne modifie donc pas la taille des barres d’erreurs. Les coefficients de diffusions obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

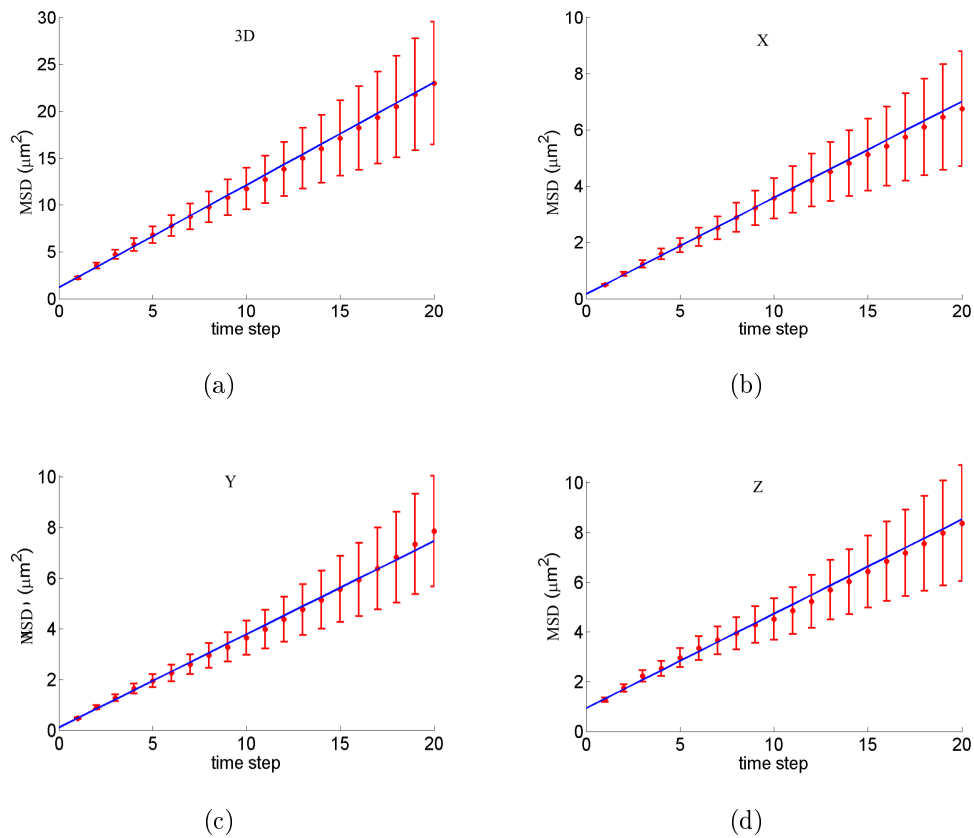


FIGURE IV.13 – Courbes de déplacement quadratique moyen (MSD) obtenues à partir d'une trajectoire de 200 points d'une nanoparticule de 100 nm dans l'eau. (a) : 3D, (b) : selon X, (c) : Y, (d) : Z. Les points de la courbe sont en rouge, ainsi que les barres d'erreurs. La ligne bleue est un ajustement linéaire pondéré par les barres d'erreurs.

$$\begin{array}{l|l}
 3D & D = 4,1 \pm 0,1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1} \\
 X & D = 3,9 \pm 0,06 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1} \\
 Y & D = 4,2 \pm 0,1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1} \\
 Z & D = 4,3 \pm 0,1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}
 \end{array}$$

Nous observons que les valeurs obtenues sont plus proche de la valeur théorique attendue, ainsi qu'une diminution de l'incertitude qui est proche de la limite théorique due à la dispersion du rayon des particules. Nous avons choisi de réaliser un ajustement linéaire pondéré par les barres d'erreurs sur les 20 premiers points des trajectoires (soit 10% du nombre de points total de chaque trajectoire). Il est usuel d'utiliser les premiers 10% des points lors de l'analyse de courbe MSD étant donné l'accroissement rapide des barres d'erreurs au delà de ces 10% (voir Savin et al. [90]). X. Michalet [91] a récemment montré d'un point de vu théorique que l'ajustement pondéré n'est pas la meilleure méthode. La meilleure valeur de la pente peut être obtenue en calculant un ajustement non-pondéré sur un nombre optimal de points, qui dépend de l'erreur de localisation et du nombre total de points de la trajectoires. Nous n'avons pas utilisé la méthode de X. Michalet dans notre étude. Néanmoins nous avons comparé notre méthode d'ajustement pondéré avec des ajustement non-pondéré sur un nombre de points variables et nous avons constaté que les valeurs de la pente obtenues

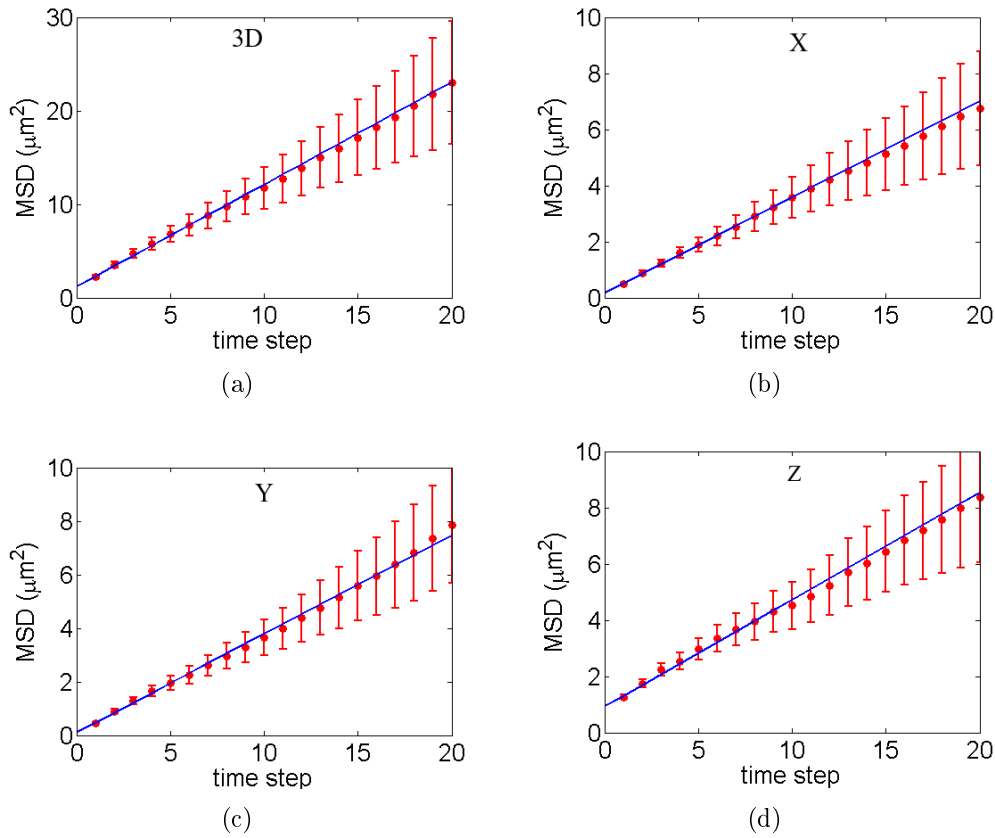


FIGURE IV.14 – Moyenne de 10 MSD obtenues à partir de trajectoire de 200 points. (a) : 3D, (b) : selon X, (c) : Y, (d) : Z. Les points de la courbe sont en rouge, ainsi que les barres d'erreurs. La ligne bleue représente l'ajustement linéaire pondéré par les barres d'erreurs.

par ces différentes méthodes restent très proches. La figure IV.15 montre une courbe MSD d'une trajectoire de 200 points au total, ainsi que 4 ajustements différents : non-pondéré sur les 5, 6 et 7 premiers points et pondéré sur les 20 premiers. Les valeurs du coefficient  $D$  obtenues sont respectivement  $4,0 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ,  $4,0 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ,  $4,1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  et  $3,9 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ . Nous constatons donc que le choix de la méthode n'a que très peu d'influence sur la valeur de la pente mesurée. Notre objectif était dans cette thèse de démontrer la faisabilité de suivre une nanoparticule d'or en mouvement brownien par holographie digitale, et non pas de proposer une nouvelle méthode précise de mesure de coefficient de diffusion. En conclusion, les résultats expérimentaux mettent en évidence la faisabilité du suivi sur des durées de quelques dizaines de secondes et permettent d'en évaluer le coefficient de la diffusion. Les résultats obtenus sur le suivi de particules en mouvement brownien ont été publiés en 2011 dans l'article suivant (consultable en annexe IV.D) :

- F. Verpillat, F. Joud, P. Desbiolles and M. Gross, Dark-field digital holographic microscopy for 3D-tracking of gold nanoparticles. Optics Express, volume 19, 26044-26055, 2011.

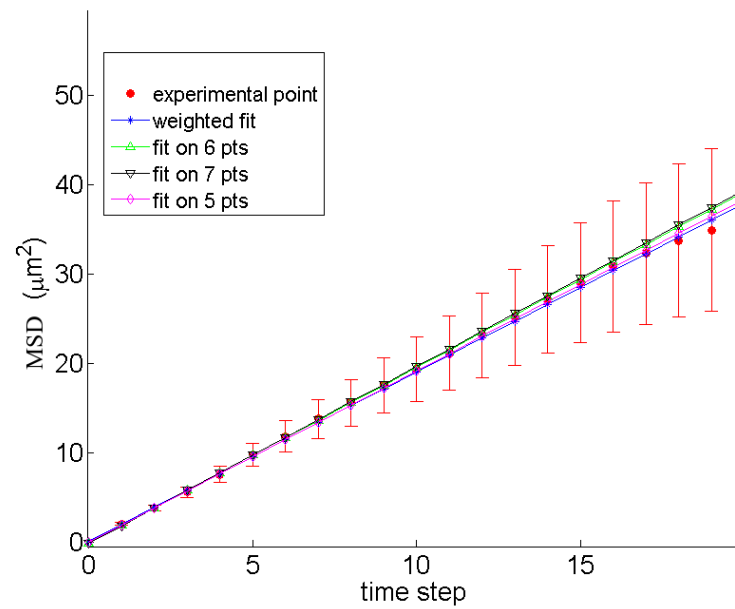


FIGURE IV.15 – *Comparison de 4 méthode d'ajustement d'une courbe MSD.*



## IV.C Résultat préliminaire d'observation de nanoparticules dans des cellules vivantes

Dans cette section nous exposons les résultats préliminaires obtenus sur le suivi de nanoparticules à l'intérieur du cytoplasme de cellules vivantes. L'objectif est d'arriver à fixer les nanoparticules sur les moteurs moléculaires présent dans la cellule afin d'étudier les mécanisme de transport et les différents modes de diffusion dans une cellule. Les difficultés majeures rencontrées lors de ces expériences ont été tout d'abord de se familiariser avec la manipulation de cellules vivantes, puis de trouver la meilleur technique pour faire pénétrer les nanoparticules à l'intérieur de cellules vivantes, et enfin de distinguer les nanoparticules des autres éléments diffusant présents dans une cellule. Nous n'avons pas réussi à mener les expérimentations jusqu'au suivi de particules fixée sur des moteurs moléculaires étant donné ces obstacles et les contraintes de temps. Nous allons donc présenter dans cette section quelques résultats très préliminaires de suivi intra-cellulaire de particule, ce qui nous permettra dans la suite de discuter des limites de notre approche.

### IV.C.1 Adaptation du montage sur un microscope à fluorescence inversé

Nous avons choisi pour réaliser ces expériences de travailler avec des cellules « HeLa ». Cette lignée cellulaire provient d'un prélèvement d'un cancer du col de l'utérus sur la patiente « Henrietta Lacks », décédée en 1951. Cette lignée présente l'avantage d'être immortelle due à sa nature cancéreuse, c'est-à-dire de se diviser sans interruption par cycle d'environ 24 heures. Les cellules HeLa sont la lignée la plus ancienne et la plus utilisée en biologie cellulaire. Les cellules sont cultivées dans un milieu de culture (DMEM) leur apportant les nutriments nécessaires à leur développement dans des flacons stériles et gardés dans des incubateurs. La membrane de ces cellules forme naturellement des liaisons avec les parois des flacons lorsqu'elles se déposent au fond par sédimentation. La figure IV.16(a) montre une image de cellules HeLa obtenues en lumière blanche avec un objectif 40x. La figure IV.16(b) est un schéma d'une cellule HeLa, en suspension et étalée sur la paroi du flacon. La culture de ces cellules impose de diviser leurs concentrations tous les 3 jours environ lorsqu'elles sont à « confluence », c'est-à-dire lorsqu'elles occupent entre 90 et 100 % de la surface du flacon. On casse les liens formés entre la membrane et la paroi par l'action de la trypsine, qui est une enzyme digestive, afin de détacher l'ensemble des cellules. On prélève une partie du milieu contenant les cellules « nageantes » que l'on dilue dans un nouveau flacon stérile.

Une cellule étalée sur la surface a une largeur d'environ  $20 \mu\text{m}$  et une hauteur d'environ  $3 \mu\text{m}$ . Le cytoplasme d'une cellule est globalement transparent et son indice optique peut être considéré comme égale à celui de l'eau (1,33). Néanmoins, le cytoplasme contient un ensemble de structures (vésicules, appareil de Golgi...) qui diffusent la lumière incidente. Nous avons observé dans les expériences menées précédemment par Fadwa Joud [25] que la diffusion de ces structures n'est pas négligeable devant le signal émis par les nanoparticules d'or et qu'il n'est pas évident de faire la distinction entre les nanoparticules d'or et ces structures sur les images reconstruites. Dans le but de faire plus facilement cette distinction, nous avons voulu associer deux types d'imagerie des nanoparticules : l'holographie digitale et la fluorescence. En associant nos nanoparticules à des molécules fluorescentes, la comparaison

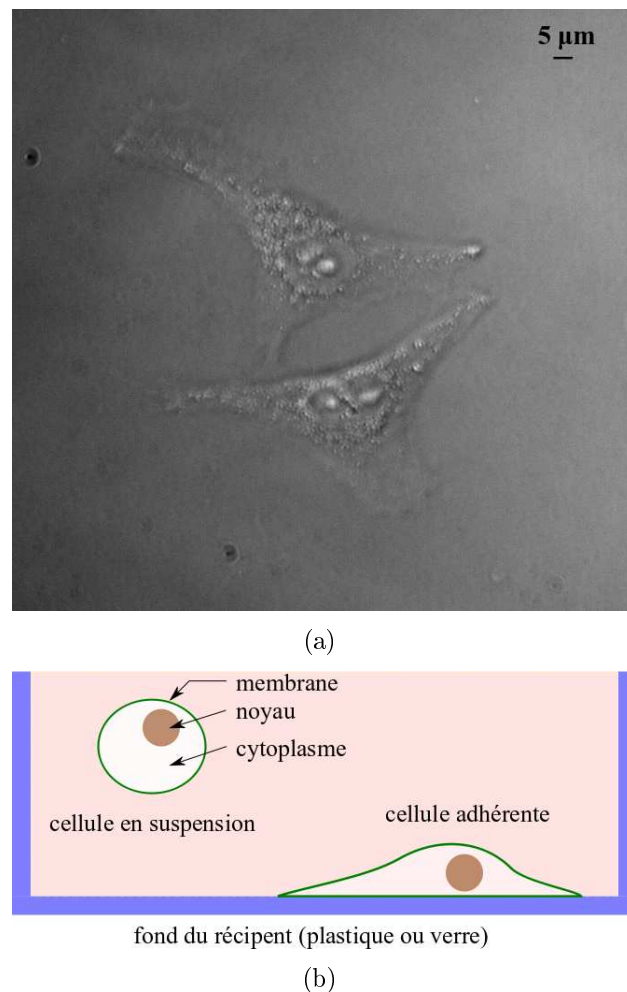


FIGURE IV.16 – (a) Image de cellules HeLa prise en lumière blanche avec un objectif 40×. (b) Schéma de cellules en suspension et adhérente sur la paroi (ou lame de verre).

entre les hologrammes reconstruits et les images de fluorescence peuvent permettre de distinguer nos marqueurs parmi les autres éléments diffusant de la lumière. Nous avons donc choisi de modifier le montage présenté au chapitre 2 afin d'adapter le dispositif sur un microscope de fluorescence inversé. Les figures IV.17 et IV.18 montrent respectivement une représentation du nouveau montage ainsi qu'une photographie de l'ensemble. Ce nouveau montage nous permet de basculer entre les deux type d'imagerie simplement en plaçant ou non le filtre dichroïque dans le chemin optique, sans déplacer l'échantillon. Dans la suite, nous avons utilisé des nanoparticules de 50 nm et 100 nm de diamètre, fonctionnalisées en surface par des molécules de NeutrAvidine. La NeutrAvidine a une très forte affinité avec une autre protéine : la biotine. Nous avons utilisé des fluorophores GFP (de l'anglais « Green Fluorescent Protein ») présentant un pic d'absorption vers 475 nm et un pic d'émission à 509 nm, formant des complexes avec la biotine. L'interaction forte biotine-NeutrAvidine permet d'attacher ces fluorophores sur nos nanoparticules d'or. Le nombre moyen de sites pouvant former des liaisons avec la biotine est de l'ordre 50 pour les particules de 50 nm et de 200 pour les particules de 100 nm (données fournies par le fabricant). La figure IV.19(a) illustre le processus de fonctionnalisation des nanoparticules. La figure IV.19(b) montre une image en

fluorescence de nanoparticules de 100 nm fonctionnalisées à la GFP, en diffusion dans l'eau. Dans la suite de ce chapitre nous allons présenter deux approches différentes pour injecter ces nanoparticules d'or à l'intérieur de cellules vivantes et nous présenterons les résultats préliminaires obtenus.

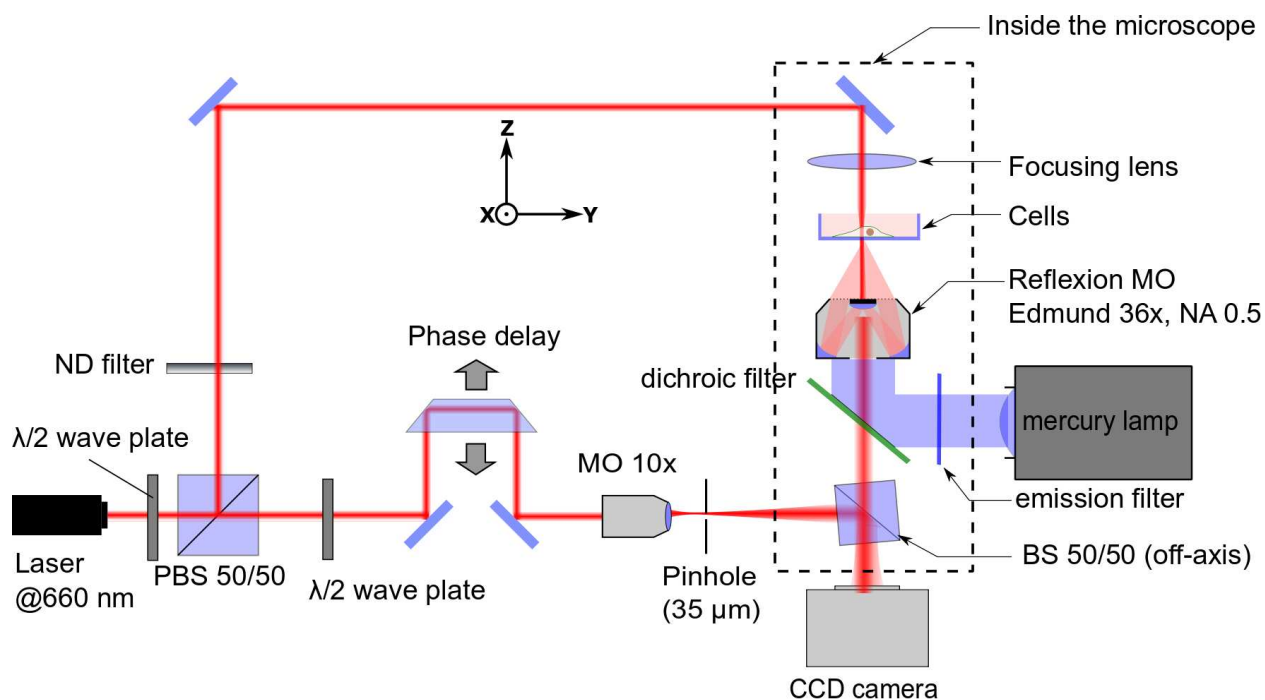


FIGURE IV.17 – Schéma du montage optique intégré sur un microscope de fluorescence inversé. Photographie du montage.

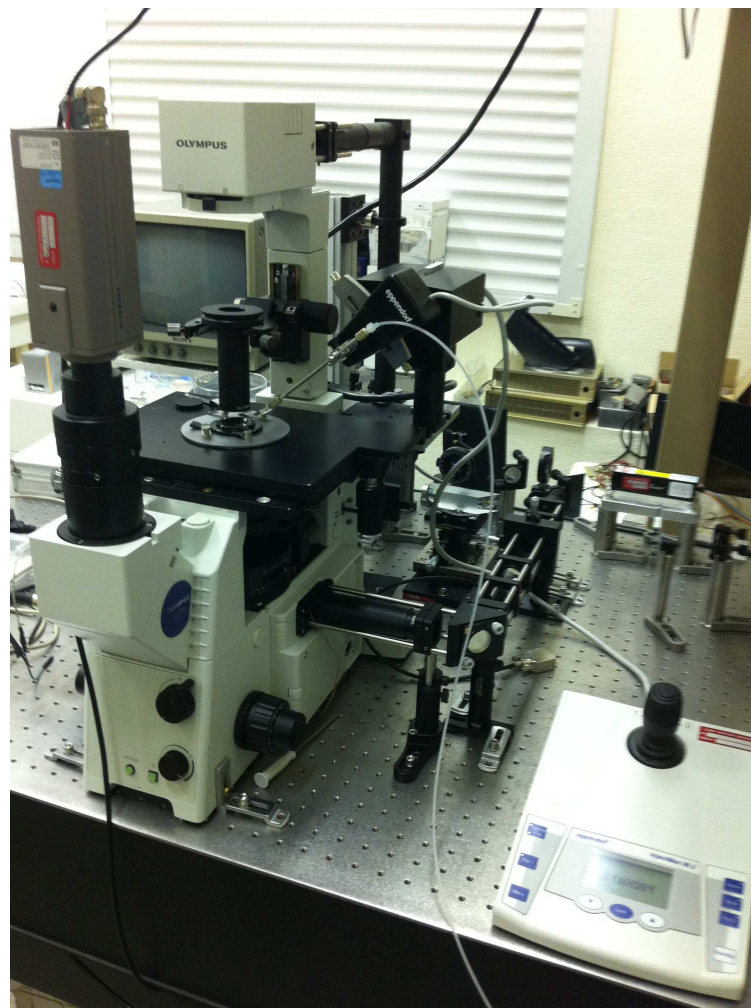


FIGURE IV.18 – Photographie du montage.

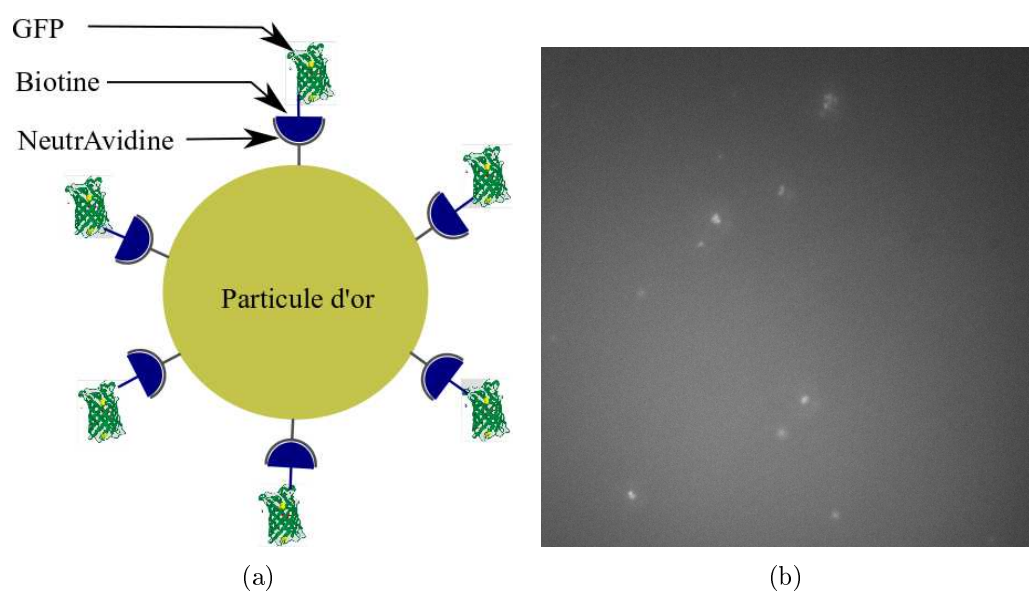


FIGURE IV.19 – (a) Schéma des complexes nanoparticule-GFP. (b) Image de fluorescence de nanoparticules d'or de 100 nm fonctionnalisées avec des molécules de GFP en diffusion dans l'eau.

### IV.C.2 Pinocytose

Nous avons dans un premier temps tenté d'utiliser un mécanisme de pinocytose forcée pour injecter nos particules. La pinocytose est un mécanisme naturel d'absorption de liquide extra-cellulaire par invagination de la membrane cellulaire. Les gouttelettes de liquide ainsi formées sont ensuite transportées sous forme de vésicules jusqu'aux lysosomes. Ce mécanisme permet à la cellule d'assimiler des molécules présentes autour de la cellule dans le liquide extra-cellulaire. Ce mécanisme peut être forcé pour injecter des molécules dans le cytoplasme. Le procédé a été développé par Okada et al. [92] puis Park et al. [93]. La figure IV.20 illustre les différentes étapes du procédé :

- les cellules sont placées dans un milieu hypertonique contenant les nanoparticules d'or à injecter IV.20(A). La différence de pression osmotique déclenche un flux d'eau vers l'extérieur. La cellule compense la perte d'eau en absorbant le liquide extra-cellulaire par une accélération de son activité de pinocytose IV.20(B).
- Les cellules sont ensuite plongées dans un milieu hypotonique. Le choc osmotique fait éclater les vésicules formées IV.20(C) pour libérer leur contenu dans le cytoplasme IV.20(D).

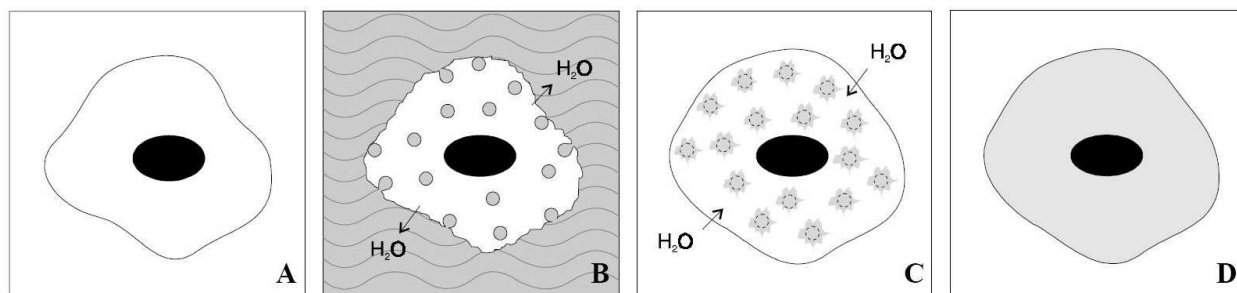


FIGURE IV.20 – *Principe de l'injection par pinocytose forcée. (A) les cellules sont placées dans un milieu hypertonique contenant les nanoparticules d'or à injecter. La différence de pression osmotique déclenche un flux d'eau vers l'extérieur, la cellule compense la perte d'eau en absorbant le liquide extra-cellulaire par pinocytose (B). Les cellules sont ensuite plongées dans un milieu hypotonique, le choc osmotique fait éclater les vésicules formées (C) pour libérer leur contenu dans le cytoplasme (D).*

La taille limite des objets pouvant pénétrer la cellule par pinocytose n'est pas clairement défini. Néanmoins les vésicules formées par ce processus ne dépasse pas 80 nm de diamètre. Nous avons donc tenté l'expérience avec des nanoparticules d'or de 50 nm sans connaître a priori l'efficacité du procédé. La figure IV.21(a) montre une image en lumière blanche de cellules HeLa après pinocytose en présence de nanoparticules de 50 nm obtenue avec l'objectif dark-field 36x. La figure IV.21(b) montre l'intensité du champ lumineux obtenue par la reconstruction des hologrammes. La figure IV.21(c) est la superposition des 2 images précédentes.

On observe une superposition entre les particules visibles en lumière blanche avec l'objectif à champ noir avec sur l'image holographique les pics d'intensité du champ diffusé. En comparaison avec la figure IV.16, les particules sont clairement visibles sur ces deux images. La majorité des nanoparticules visibles sur cette figure sont en fait immobiles et posées sur la lame de verre. En déroulant le film des images enregistrées, nous avons pu distinguer quelques

particules mobiles à l'intérieur des cytoplasmes. L'une d'elles est indiquée par une flèche jaune sur la figure IV.21(c). Néanmoins, même après plusieurs minutes d'observation, ces particules mobiles ne se sont pas déplacées significativement dans le cytoplasme. Nous n'avons observé qu'une vibration très locale. Deux explications peuvent être données pour expliquer pourquoi les nanoparticules ne se déplacent pas : soit la vésicule formée par pinocytose contenant la particule n'a pas éclaté lors du choc osmotique, soit la particule est coincée dans le cytosquelette de la cellule. La figure IV.22 montre le suivi 3D de cette particule pendant 200 points. On remarque que le déplacement selon  $X$  et  $Y$  est 10 fois inférieur au déplacement en  $Z$ . Nous ne savons pas à quoi est due cette si grande différence. L'étude quantitative de la MSD nous donne un coefficient de diffusion  $D$  identique selon  $X$  et  $Y$  égal à  $0,025 \pm 0,005 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ . Le coefficient de diffusion selon  $Z$  est égal à  $0,26 \pm 0,01 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ . Nous ne pouvons pas vraiment donner du sens à ces informations quantitatives car il est très difficile de discerner les nanoparticules uniques des agrégats. L'étude des courbes MSD impose de connaître a priori la taille de l'objet suivi pour étudier sa diffusion. Ces premières expériences se sont donc avérées décevantes, car d'une part nous ne sommes pas certains de l'efficacité de la pinocytose pour des particules de cette taille, d'autre part les particules qui semblent être à l'intérieur du cytoplasme sont visiblement coincées dans les vésicules ou par le cytosquelette, enfin nous ne pouvons pas faire la distinction entre particule unique et agrégats. Nous n'avons pas obtenus d'images de fluorescence confirmant que les objets observés sont des billes d'or de 50 nanomètres. L'une des explications les plus probables est que nous avons certainement détruit les liaisons entre l'or et la NeutrAvidine à force de soniquer la solution pour lutter contre la formation d'agrégats. La section suivante traitera de l'autre approche tentée : l'injection de particule par des micro-capillaires.

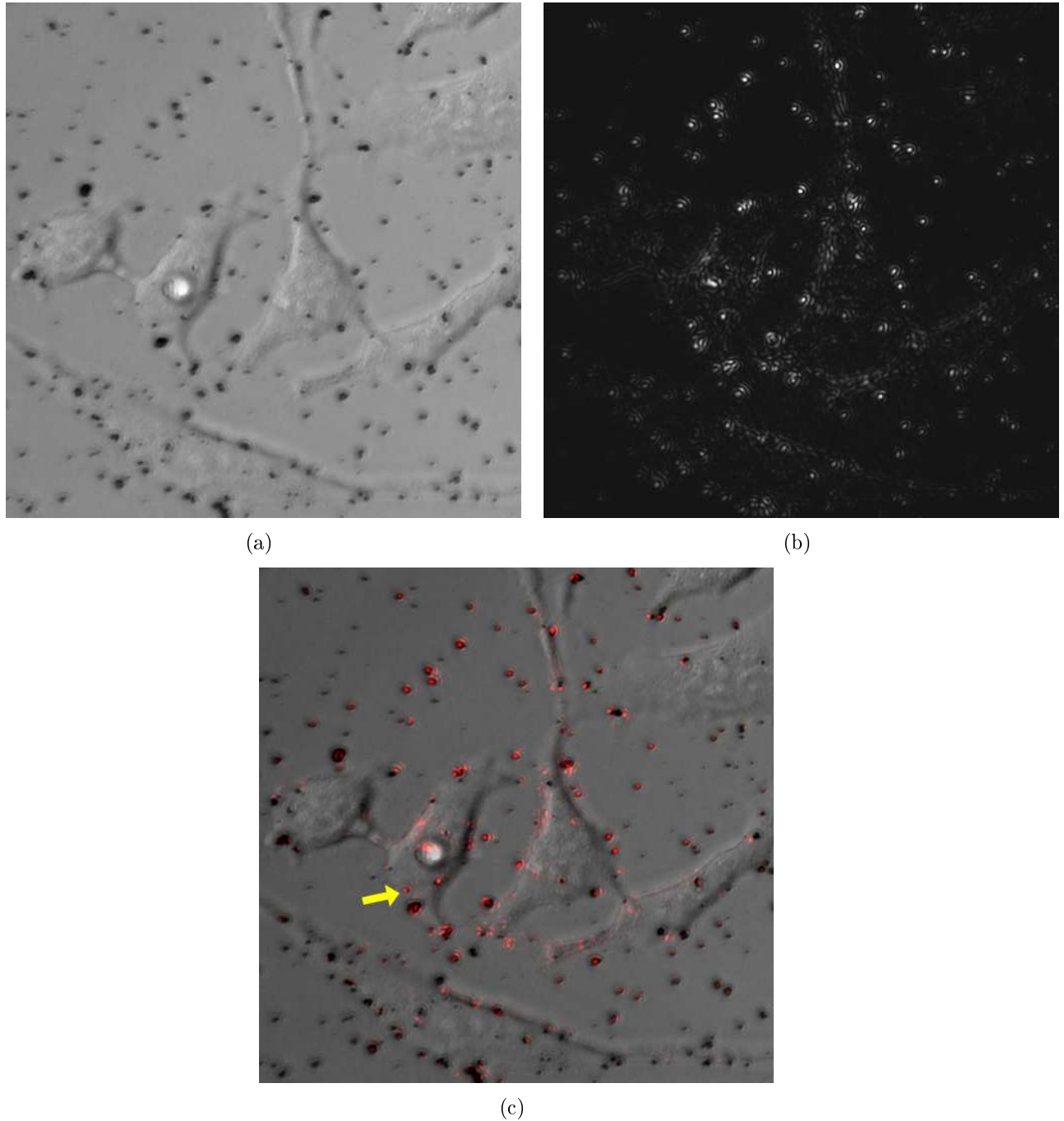


FIGURE IV.21 – (a) Cellules *Hela* en présence de nanoparticules d'or de 50 nm après l'injection de particules par pinocytose. (b) Reconstruction des hologrammes en intensité. (c) Image composite montrant la superposition des pics d'intensité de l'image holographique avec les particules visibles en lumière blanche.



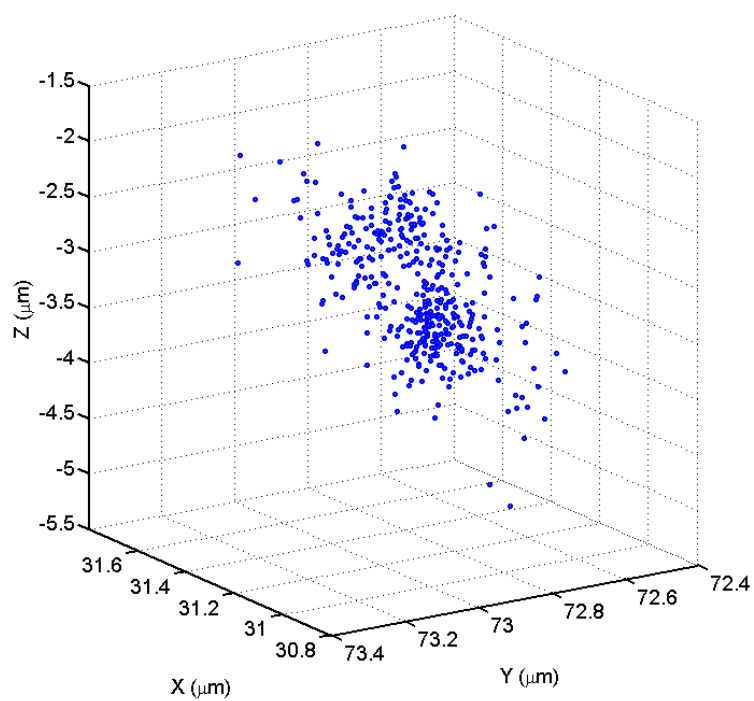


FIGURE IV.22 – *Trajectoire 3D de 200 points d'une particule de 50 nm à l'intérieur du cytoplasme (particule indiquée par une flèche jaune sur la figure IV.21(c))*

### IV.C.3 Micro-injection

Les expériences réalisées en injectant les nanoparticules d'or par pinocytose n'ont pas permis d'observer la diffusion de ces particules dans le cytoplasme. Nous avons tenté une autre série d'expériences en utilisant un dispositif de micro-injection. Le système est visible sur les figures IV.17 et IV.23(a). Le principe est d'utiliser des capillaires en verre préalablement chauffés puis étirés pour obtenir une pointe de quelques microns (voir la figure IV.23(b)). Ces capillaires contenant une solution de nanoparticules sont placés sur un bras articulé qui permet d'injecter précisément et individuellement les cellules. L'opération d'injection se réalise in-situ en visualisant directement la pointe au microscope. Nous avons préféré utiliser des nanoparticules d'or de 100 nm marquées à la GFP au lieu des particules de 50 nm pour leur plus fort signal de fluorescence.

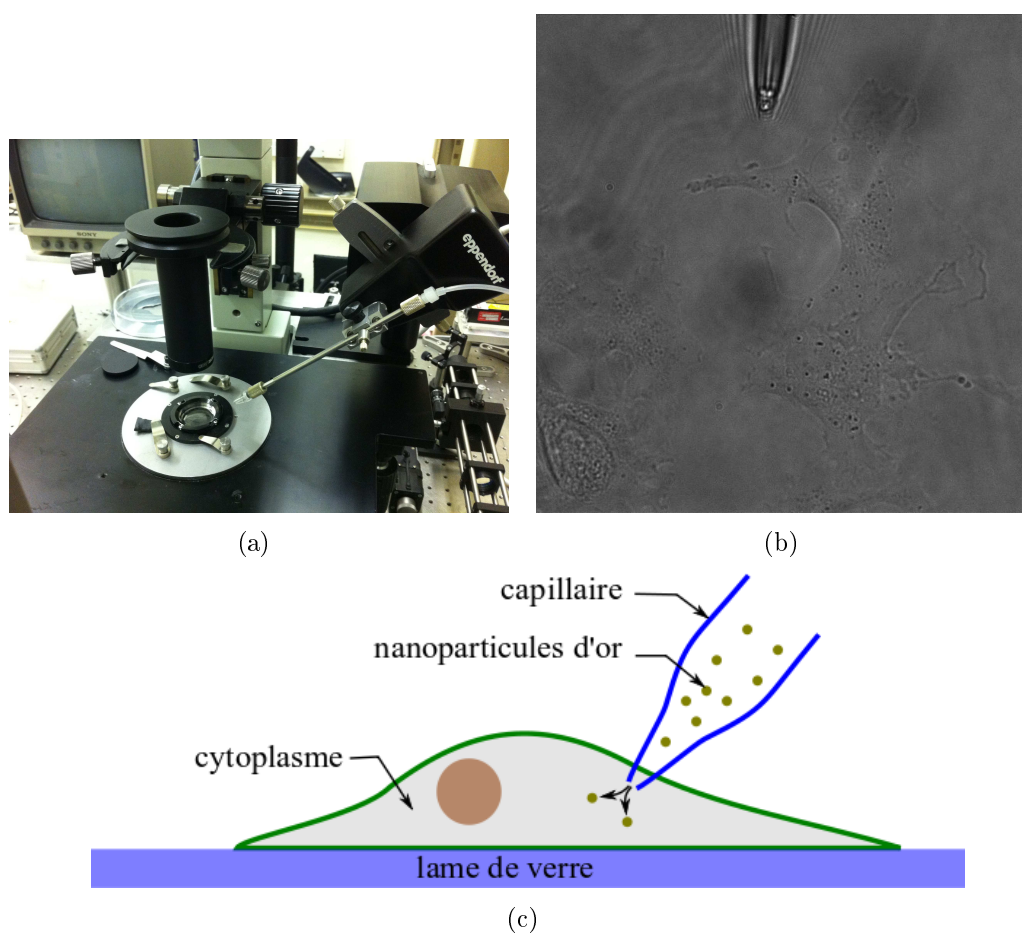


FIGURE IV.23 – (a) Photographie du bras articulé du dispositif d'injection. (b) Image de la pointe du capillaire en verre au-dessus d'une cellule, prise en lumière blanche avec un objectif 60x. (c) Schéma de l'opération d'injection trans-membranaire de nanoparticules.

La figure IV.24(a) montre une cellule injectée. L'image est obtenue en lumière blanche en illumination dark-field. On peut observer au centre de l'image un signal à l'endroit de l'injection. La figure IV.24(b) montre la même cellule en lumière blanche avec une objectif 60x. Nous avons superposé cette image avec le signal de fluorescence (en vert) sur la figure IV.24(c). Le signal de fluorescence (tache verte au centre) dans la cellule à l'endroit où a été

réalisée l'injection met en évidence la présence de nanoparticules marquées à la GFP dans le cytoplasme. En revanche, il n'est pas possible de déterminer s'il s'agit d'une nanoparticule ou d'un agrégat de nanoparticules. La reconstruction holographique de cette cellule montre également un pic d'intensité dans le cytoplasme sur le même site que le signal de fluorescence. Cette comparaison avec l'image de fluorescence permet d'apporter une preuve supplémentaire en complément des résultats obtenus par F. Joud [25] sur la possibilité de localiser une nanoparticule d'or (dans ce cas de 100 nm) en un seul hologramme exposé pendant 1 ms à l'intérieur d'une cellule. La combinaison de l'holographie digitale et de la microscopie en fluorescence permet de faire la distinction entre le signal diffusé par les particules d'or et la diffusion naturelle par les différentes structures internes de la cellule. Malheureusement, comme dans la section précédente, nous n'avons pas observé de mouvement significatif des particules injectées dans le cytoplasme, même après plusieurs minutes. Ceci confirmerait notre hypothèse que les particules sont coincées dans le cytosquelette de la cellule. Nous n'avons donc pas pu extraire d'information sur la diffusion des particules à l'intérieur du cytoplasme. Au vu des résultats décevants obtenus pendant ces expériences, nous allons dans le paragraphe suivant faire le bilan de nos résultats et discuter des différents points à améliorer pour espérer parvenir au suivi de nanoparticules en milieu biologique par holographie digitale.

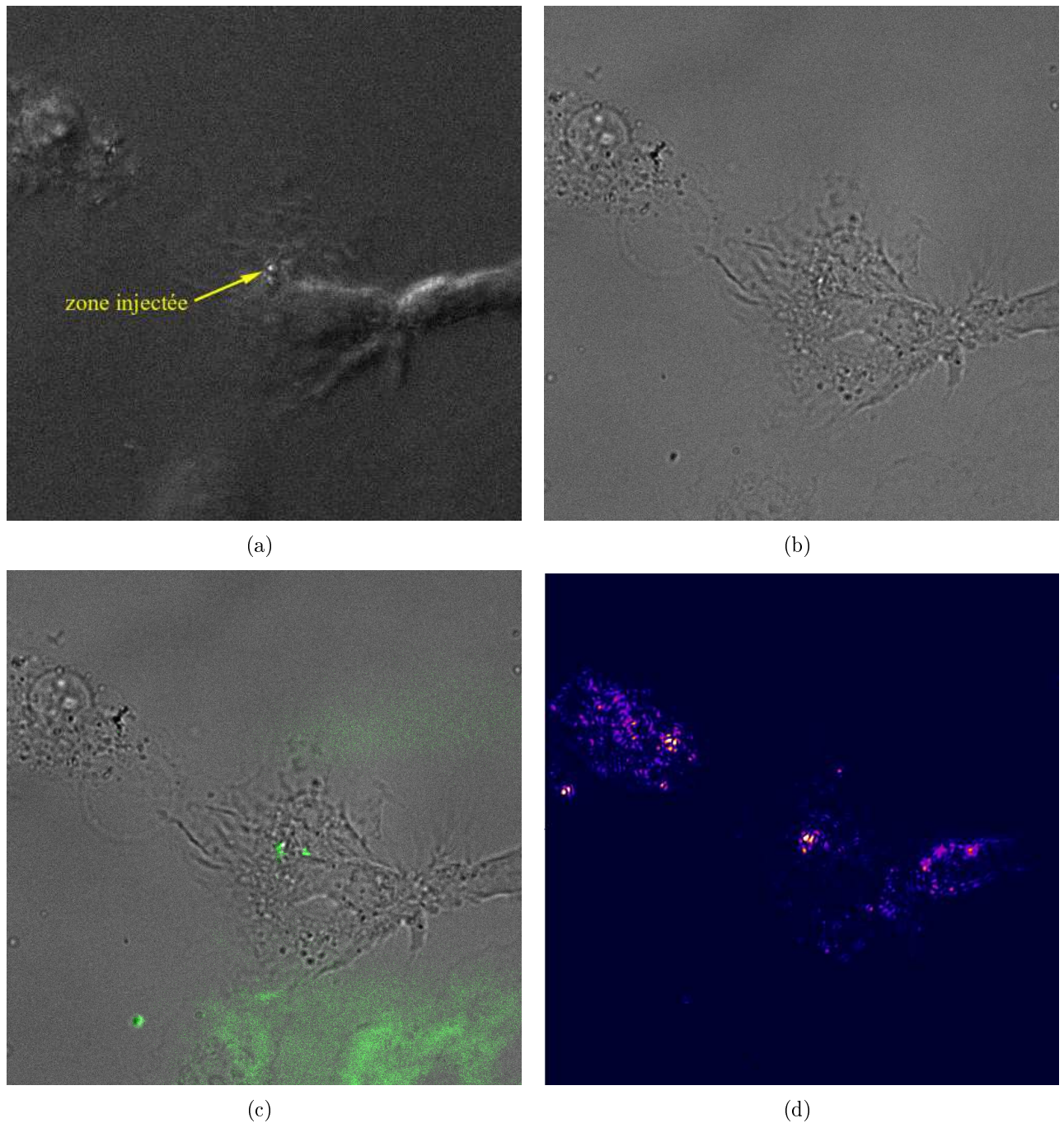


FIGURE IV.24 – (a) Image en microscopie en fond noir d'une cellule après l'injection de nanoparticules d'or. On peut distinguer au centre de l'image (zone indiquée par la flèche jaune) le signal d'une ou d'un agrégat de nanoparticules dans le cytoplasme à l'endroit où nous avons réalisé l'injection. (b) Image de la même cellule en lumière blanche. (c) Superposition de l'image en lumière blanche et du signal de fluorescence. La présence du signal de fluorescence à l'endroit de l'injection confirme la présence de nanoparticules dans le cytoplasme. (d) Intensité du champ diffusé obtenue par reconstruction des hologrammes. L'imagerie holographique met également en évidence la présence de nanoparticules à l'endroit de l'injection.

## IV.D Critiques, limites et perspectives

Dans cette section, nous avons présenté les résultats expérimentaux obtenus avec notre technique de suivi 3D par holographie digitale. Tout d'abord nous avons démontré qu'il est possible de suivre en trois dimensions une particule d'or de 100 nm en diffusion brownienne dans l'eau, avec un temps d'exposition de seulement 1 ms par hologramme. Cette particule peut être suivie sur une profondeur d'environ 200  $\mu\text{m}$  de part et d'autre du plan de netteté de l'objectif. Ce suivi peut être réalisé en temps réel dans le cas d'une particule unique grâce à notre algorithme de localisation développé sur une carte graphique. Notre algorithme permet également de suivre plusieurs particules à partir de la même série d'hologramme en réalisant les reconstructions après l'acquisition. La résolution obtenue est de 3 nm latéralement (dans les directions  $X$  et  $Y$ ) et environ 70 nm dans la direction de l'axe optique ( $Z$ ). Étant donné que le signal diffusé par nos nanoparticules est huit ordres de grandeurs inférieur à l'intensité d'illumination, nous avons choisi d'utiliser un objectif en réflexion afin d'éviter la saturation de la caméra. La faible ouverture numérique cet objectif ( $\text{NA}=0,5$ ) ne nous permet pas d'atteindre les résolutions obtenues en holographie « in-line » sur le suivi de particules micrométriques [13–16]. Ces publications rapportent des résolutions de 20 nm dans la direction de l'axe optique, obtenues avec des objectif de grande ouverture numérique ( $\text{NA}=1,4$ ). La forte décroissance de l'intensité diffusée par les particules en fonction de leur taille (loi en  $r^6$ ) impose de filtrer le signal de diffusion du faisceau d'illumination dans le cas du suivi des particules de taille inférieure au micron. Nous avons donc fait le choix d'utiliser un objectif en réflexion malgré sa faible ouverture numérique. Nous avons pu mettre en évidence la nature brownienne de la diffusion et mesurer la valeur du coefficient de diffusion à partir des trajectoires reconstruites. La précision de localisation obtenue reste néanmoins comparable avec d'autres techniques récentes de suivi 3D, notamment avec des techniques de super-résolution : Huang et al. [2] ont rapporté une précision de 25 nm selon  $X$  et  $Y$  et 50 nm selon  $Z$  pour le suivi 3D de quantum dots en microscopie STORM. En microscopie PALM, des précisions de localisation allant de 10 à 75 nm ont été obtenues [4, 5]. Pavani et al. ont atteint une précision de 10 nm dans les trois directions en utilisant une technique dite de « double helix PSF microscopy » [7]. Ces précisions de localisations sont atteintes avec des fluorophores ou des quantum dots, donc des objets nettement plus petit que nos particules d'or. La force de notre technique est la profondeur de champ utilisable sur laquelle la résolution reste constante. Notre montage permet de suivre une particule dans un volume d'environ  $100 \times 100 \times 400 \mu\text{m}$  alors que les techniques mentionnées précédemment ont une profondeur de champ de quelques microns seulement. Nous avons voulu ensuite appliquer notre technique au suivi de particules dans le cytoplasme de cellules vivantes. Nous sommes heurté à de nouvelles contraintes imposées par la biologie. Il a fallu tout d'abord se familiariser avec la culture cellulaire, puis adapter le montage optique sur un microscope inversé plus adapté à l'observation de cellules. Nous avons expérimenté deux techniques d'injection de nanoparticules : tout d'abord en forçant le mécanisme de pinocytose de la cellule, puis par injection trans-membranaire. Les résultats de ces expérimentations se sont avérés décevants car aucune des deux techniques ne nous a permis d'observer une diffusion significative de nos particules dans le cytoplasme. Les particules semblent coincées par le cytosquelette. Nous avons pu tout de même détecter ces particules à l'intérieur du cytoplasme. La comparaison des images holographiques et des images de fluorescences prouve cependant la possibilité de localiser une nanoparticule de 100 nm dans une cellule vivante.

---

Il semble que nous devons travailler avec des nanoparticules plus petites pour observer une diffusion intra-cellulaire. L'intensité du signal diffusée par les particules risque alors d'être inférieur à la diffusion naturelle de la cellule. La taille limite des particules observables semble être 40 nm d'après les expériences réalisées par notre équipe. Une possibilité pour espérer détecter de particules de taille inférieure à 40 nm serait d'utiliser la technique d'holographie *sideband* vue au chapitre 1 [64,65] combinée au montage microscopique. L'idée serait d'utiliser des nanoparticules magnétiques auxquelles nous imposerions un mouvement de vibration de quelques nanomètres, par le biais d'un champ magnétique oscillant, qui viendrait s'ajouter au mouvement brownien. La détection holographique décalée à la fréquence Doppler de vibration des particules magnétiques permettrait de s'affranchir de la diffusion naturelle de la cellule, qui elle ne vibre pas, et donc de gagner en sensibilité.



Pendant cette thèse, nous avons réalisé un montage de microscopie holographique utilisant une illumination en champ noir dans le but de suivre en 3 dimensions des nanoparticules d'or en diffusion.

- Le montage actuel est capable de suivre des nanoparticules de 100 nm en diffusion brownienne dans l'eau à partir d'hologrammes enregistrés pendant seulement 1 ms d'exposition. La technique peut donc être utilisée pour l'observation des phénomènes rapides.
- La sensibilité du dispositif permet de détecter des objets ayant une efficacité de diffusion  $10^{-8}$  fois inférieure à la puissance d'illumination, ce qui n'est pas réalisable avec les montages d'holographie digitale *in-line* existants auparavant.
- Le logiciel de reconstruction développé spécialement pour ce projet en utilisant la technologie CUDA nous a permis de gagner un facteur 120 sur la vitesse de reconstruction des hologrammes numériques. Celui-ci permet d'afficher les hologrammes propagés ou de localiser une nanoparticule dans un volume de  $100 \times 100 \times 400 \mu\text{m}$  en temps réel.
- Notre algorithme de localisation automatique permet de suivre une particule sur typiquement 200 à 500 points. Cette durée peut être améliorée en améliorant la méthode d'ajustement et en ajoutant une procédure permettant de retrouver la cible en cas de perte sur quelques points.
- La précision de localisation de notre dispositif pour des billes de 100 nm est de 3 nm perpendiculairement à l'axe optique, et de 70 nm dans la direction de l'axe optique. Ces précisions sont comparables à celles atteintes en super-résolution. Cette précision pourrait être améliorée en utilisant un objectif de plus grande ouverture numérique. L'avantage de notre dispositif est que notre précision de localisation est uniforme dans tout le volume d'observation. La profondeur sur laquelle nous sommes capable de localiser les particules sans déplacer le plan focal est environ 100 fois supérieure au technique de microscopie de fluorescence.

Nous avons ensuite tenté d'appliquer cette technique au suivi de nanoparticules d'or à l'intérieur de cellules vivantes. Nous sommes actuellement capables de détecter des nanoparticules de 50 et 100 nm dans le cytoplasme de cellules vivantes, et de confirmer (pour les cas des billes de 100 nm) leur détection en superposant aux reconstructions des images de fluorescence. Cependant il semble que les particules soient piégées par le cytosquelette



des cellules, c'est pourquoi nous n'avons pas pu observer de diffusion intra-cellulaire sur des distances significatives. Cet effet de piégeage pourrait être étudié en faisant varier la taille des particules et en utilisant d'autres types de cellules. Nous n'avons pas réalisé d'étude de diffusion dans des milieux encombrés pour confirmer le modèle de Condamin [38]. Ce type d'expérience nécessite d'établir une collaboration avec une équipe de matière molle pour réaliser ces milieux. Étant donné notre proximité avec l'équipe « Optique et Biologie » du laboratoire, nous avons plutôt privilégié les expériences sur la diffusion intra-cellulaire. Une autre application envisagée en biologie est l'étude du mouvement caractéristique du parasite merozoïde, responsable de la transmission de la malaria, à la surface des globules rouges avant l'infection [94].

Les expériences menées sur des cellules n'exploitent pas totalement la profondeur de champ de ce montage : la hauteur d'une cellule étalée sur une lame de verre est inférieure à  $5\ \mu\text{m}$ , alors que le dispositif peut suivre une particule sur une profondeur de  $400\ \mu\text{m}$ . L'utilisation de ce dispositif sur des expériences de matière molle permettrait d'utiliser la totalité de cette profondeur de champ. Nous avons déjà commencé à observer des colloïdes elliptiques en diffusion. Le but est d'établir le couplage entre la rotation des colloïdes et leur mouvement de translation. Ce couplage semble être différent selon que la particule diffuse à l'interface ou à l'intérieur du fluide. Ce type d'expérience nécessite de localiser les colloïdes non plus par reconstruction du volume mais par un fit du motif d'interférence directement calculé sur les hologrammes, de façon à déterminer la position et l'orientation des colloïdes elliptiques.

Une autre application envisagée de ce montage est d'utiliser le mouvement brownien des nanoparticules d'or pour sonder le champ proche de nanostructures (type nano-antenne) [95]. La reconstruction du champ diffusé par les particules métalliques explorant le volume autour de la structure permettra d'établir la cartographie du champ proche. Ce concept de reconstruction par exploration aléatoire a déjà été validé en microscopie STORM (Stochastic Reconstruction Microscopy) avec des fluorophores [96].

- [1] S.J. Lord, H.D. Lee, and WE Moerner. Single-molecule spectroscopy and imaging of biomolecules in living cells. *Analytical chemistry*, 82(6) :2192–2203, 2010.
- [2] B. Huang, W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 319(5864) :810–813, 2008.
- [3] I. Izeddin, M. El Beheiry, J. Andilla, D. Ciepielewski, X. Darzacq, and M. Dahan. Psf shaping using adaptive optics for three-dimensional single-molecule super-resolution imaging and tracking. *Optics Express*, 20(5) :4957–4967, 2012.
- [4] M.F. Juette, T.J. Gould, M.D. Lessard, M.J. Mlodzianoski, B.S. Nagpure, B.T. Bennett, S.T. Hess, and J. Bewersdorf. Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples. *Nature Methods*, 5(6) :527–529, 2008.
- [5] S. Ram, P. Prabhat, J. Chao, E. Sally Ward, and R.J. Ober. High accuracy 3d quantum dot tracking with multifocal plane microscopy for the study of fast intracellular dynamics in live cells. *Biophysical journal*, 95(12) :6025–6043, 2008.
- [6] J. Bewersdorf, B.T. Bennett, and K.L. Knight. H2ax chromatin structures and their response to dna damage revealed by 4pi microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(48) :18137–18142, 2006.
- [7] S.R.P. Pavani, M.A. Thompson, J.S. Biteen, S.J. Lord, N. Liu, R.J. Twieg, R. Piestun, and WE Moerner. Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9) :2995, 2009.
- [8] Matthieu Debailleul, Bertrand Simon, Vincent Georges, Olivier Haeberlé, and Vincent Lauer. Holographic microscopy and diffractive microtomography of transparent samples. *Measurement Science and Technology*, 19(7) :074009, July 2008.
- [9] C.J. Mann, L. Yu, and M.K. Kim. Movies of cellular and sub-cellular motion by digital holographic microscopy. *Biomed. Eng. Online*, 5(1) :21, 2006.
- [10] T. Colomb, J. Kühn, F. Charrière, C. Depeursinge, P. Marquet, and N. Aspert. Total aberrations compensation in digital holographic microscopy with a reference conjugated hologram. *Optics Express*, 14(10) :4300–4306, 2006.

- [11] F. Dubois, C. Yourassowsky, N. Callens, C. Minetti, and P. Queeckers. Applications of digital holographic microscopes with partially spatial coherence sources. In *Journal of Physics : Conference Series*, volume 139, page 012027. IOP Publishing, 2008.
- [12] B. Kemper and G. von Bally. Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection. *Applied optics*, 47(4) :A52–A61, 2008.
- [13] Fook Chiong Cheong, Bo Sun, Rémi Dreyfus, Jesse Amato-Grill, Ke Xiao, Lisa Dixon, and David G Grier. Flow visualization and flow cytometry with holographic video microscopy. *Optics express*, 17(15) :13071–9, July 2009.
- [14] F.C. Cheong, S. Duarte, S.H. Lee, and D.G. Grier. Holographic microrheology of polysaccharides from streptococcus mutans biofilms. *Rheologica Acta*, 48(1) :109–115, 2009.
- [15] Fook Chiong Cheong, Bhaskar Jyoti Krishnatreya, and David G Grier. Strategies for three-dimensional particle tracking with holographic video microscopy. *Optics express*, 18(13) :13563–73, June 2010.
- [16] W Xu, M H Jericho, H J Kreuzer, and I a Meinertzhagen. Tracking particles in four dimensions with in-line holographic microscopy. *Optics letters*, 28(3) :164–6, February 2003.
- [17] J. Sheng, E. Malkiel, and J. Katz. Digital holographic microscope for measuring three-dimensional particle distributions and motions. *Applied optics*, 45(16) :3893–3901, 2006.
- [18] Sang-Hyuk Lee, Yohai Roichman, Gi-Ra Yi, Shin-Hyun Kim, Seung-Man Yang, Alfons van Blaaderen, Peter van Oostrum, and David G Grier. Characterizing and tracking single colloidal particles with video holographic microscopy. *Optics express*, 15(26) :18275–82, December 2007.
- [19] Sang-Hyuk Lee and David G Grier. Holographic microscopy of holographically trapped three-dimensional structures. *Optics express*, 15(4) :1505–12, February 2007.
- [20] Michael Speidel, Lars Friedrich, and Alexander Rohrbach. Interferometric 3D tracking of several particles in a scanning laser focus. *Optics express*, 17(2) :1003–15, January 2009.
- [21] H.C. Hulst and HC Van De Hulst. *Light scattering by small particles*. Dover Pubns, 1957.
- [22] M. Atlan, M. Gross, P. Desbiolles, É. Absil, G. Tessier, and M. Coppey-Moisan. Heterodyne holographic microscopy of gold particles. *Optics letters*, 33(5) :500–502, 2008.
- [23] E.N. Leith and J. Upatnieks. Reconstructed wavefronts and communication theory. *JOSA*, 52(10) :1123–1128, 1962.
- [24] E CuChe, P Marquet, and C Depeursinge. Spatial filtering for zero-order and twin-image elimination in digital off-axis holography. *Applied optics*, 39(23) :4070–5, August 2000.
- [25] N. Warnasooriya, F. Joud, P. Bun, G. Tessier, M. Coppey-Moisan, P. Desbiolles, M. Atlan, M. Abboud, and M. Gross. Imaging gold nanoparticles in living cell environments using heterodyne digital holographic microscopy. *Optics Express*, 18(4) :3264–3273, 2010.

- [26] F. Joud, N. Warnasooriya, P. Bun, F. Verpillat, S.Y. Suck, G. Tessier, M. Atlan, P. Desbiolles, M. Coppey-Moisan, M. Abboud, et al. 3d exploration of light scattering from live cells in the presence of gold nanomarkers using holographic microscopy. *3D Research*, 2(1) :1–8, 2011.
- [27] P.K. Jain, K.S. Lee, I.H. El-Sayed, and M.A. El-Sayed. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition : applications in biological imaging and biomedicine. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(14) :7238–7248, 2006.
- [28] U. Kreibig and M. Vollmer. Optical properties of metal clusters. 1995.
- [29] S. van de Linde, A. Löschberger, T. Klein, M. Heidebreder, S. Wolter, M. Heilemann, and M. Sauer. Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nature Protocols*, 6(7) :991–1009, 2011.
- [30] C.W. Lee, E.H. Lin, J.Y. Cheng, and P.K. Wei. Study of gold nanoparticles and live cells interactions by using planar evanescent wave excitation. *Journal of biomedical optics*, 14 :021005, 2009.
- [31] R.A. Sperling, P.R. Gil, F. Zhang, M. Zanella, and W.J. Parak. Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 37(9) :1896–1908, 2008.
- [32] D. Lasne, G.A. Blab, S. Berciaud, M. Heine, L. Groc, D. Choquet, L. Cognet, and B. Lounis. Single nanoparticle photothermal tracking (snapt) of 5-nm gold beads in live cells. *Biophysical journal*, 91(12) :4598–4604, 2006.
- [33] D. Boyer, P. Tamarat, A. Maali, B. Lounis, and M. Orrit. Photothermal imaging of nanometer-sized metal particles among scatterers. *Science*, 297(5584) :1160–1163, 2002.
- [34] L. Cognet, C. Tardin, D. Boyer, D. Choquet, P. Tamarat, and B. Lounis. Single metallic nanoparticle imaging for protein detection in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20) :11350, 2003.
- [35] I.H. El-Sayed, X. Huang, and M.A. El-Sayed. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-egfr antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics : applications in oral cancer. *Nano letters*, 5(5) :829–834, 2005.
- [36] G.F. Paciotti, L. Myer, D. Weinreich, D. Goia, N. Pavel, R.E. McLaughlin, and L. Tamarkin. Colloidal gold : a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug delivery*, 11(3) :169–183, 2004.
- [37] S. Courty, C. Luccardini, Y. Bellaïche, G. Cappello, and M. Dahan. Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging. *Nano letters*, 6(7) :1491–1495, 2006.
- [38] S. Condamin, O Bénichou, V Tejedor, R Voituriez, and J Klafter. First-passage times in complex scale-invariant media. *Nature*, 450(7166) :77–80, November 2007.
- [39] D. Gabor et al. A new microscopic principle. *Nature*, 161(4098) :777–778, 1948.
- [40] JN Butters and JA Leendertz. Speckle pattern and holographic techniques in engineering metrology. *Optics & Laser Technology*, 3(1) :26–30, 1971.
- [41] Emmett N. Leith and Juris Upatnieks. Microscopy by Wavefront Reconstruction. *Journal of the Optical Society of America*, 55(5) :569\_1, May 1965.
- [42] J.W. Goodman. *Introduction to Fourier optics*. Roberts & Company Publishers, 2005.

- [43] J. Mertz. *Introduction to optical microscopy*. Roberts, 2010.
- [44] J.W. Goodman and RW Lawrence. Digital image formation from electronically detected holograms. *Applied physics letters*, 11(3) :77–79, 1967.
- [45] U Schnars and W Jüptner. Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction. *Applied optics*, 33(2) :179–81, January 1994.
- [46] L. Yu and M.K. Kim. Wavelength-scanning digital interference holography for tomographic three-dimensional imaging by use of the angular spectrum method. *Optics letters*, 30(16) :2092–2094, 2005.
- [47] I Yamaguchi and T Zhang. Phase-shifting digital holography. *Optics letters*, 22(16) :1268–70, August 1997.
- [48] T Zhang and I Yamaguchi. Three-dimensional microscopy with phase-shifting digital holography. *Optics letters*, 23(15) :1221–3, August 1998.
- [49] R.L. Powell and K.A. Stetson. Interferometric vibration analysis by wavefront reconstruction. *J. Opt. Soc. Am*, 55(12) :1593–1598, 1965.
- [50] F. Pinard, B. Laine, and H. Vach. Musical quality assessment of clarinet reeds using optical holography. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 113 :1736, 2003.
- [51] F. Zhang, J.D.R. Valera, I. Yamaguchi, M. Yokota, and G. Mills. Vibration Analysis by Phase Shifting Digital Holography. *Optical Review*, 11(5) :297–299, 2004.
- [52] N. Demoli and D. Vukicevic. Detection of hidden stationary deformations of vibrating surfaces by use of time-averaged digital holographic interferometry. *Optics letters*, 29(20) :2423–2425, 2004.
- [53] P. Picart, J. Leval, J.C. Pascal, J.P. Boileau, M. Grill, J.M. Breteau, B. Gautier, and S. Gillet. 2d full field vibration analysis with multiplexed digital holograms. *Optics Express*, 13(22) :8882–8892, 2005.
- [54] N. Demoli and I. Demoli. Dynamic modal characterization of musical instruments using digital holography. *Optics express*, 13(13) :4812–4817, 2005.
- [55] N. Demoli. Real-time monitoring of vibration fringe patterns by optical reconstruction of digital holograms : mode beating detection. *Optics Express*, 14(6) :2117–2122, 2006.
- [56] A. Asundi, V.R. Singh, et al. Time-averaged in-line digital holographic interferometry for vibration analysis. *Applied optics*, 45(11) :2391–2395, 2006.
- [57] V.R. Singh, J. Miao, Z. Wang, G. Hegde, and A. Asundi. Dynamic characterization of mems diaphragm using time averaged in-line digital holography. *Optics Communications*, 280(2) :285–290, 2007.
- [58] P. Picart, J. Leval, F. Piquet, J.P. Boileau, T. Guimezanes, and J.P. Dalmont. Tracking high amplitude auto-oscillations with digital fresnel holograms. *Optics Express*, 15(13) :8263–8274, 2007.
- [59] Y. Fu, H. Shi, and H. Miao. Vibration measurement of a miniature component by high-speed image-plane digital holographic microscopy. *Applied optics*, 48(11) :1990–1997, 2009.
- [60] U.P. Kumar, Y. Kalyani, N.K. Mohan, and M.P. Kothiyal. Time-average tv holography for vibration fringe analysis. *Applied optics*, 48(16) :3094–3101, 2009.

- [61] P. Picart, J. Leval, D. Mounier, and S. Gougeon. Some opportunities for vibration analysis with time averaging in digital fresnel holography. *Applied optics*, 44(3) :337–343, 2005.
- [62] CC Aleksoff. Temporally modulated holography. *Applied Optics*, 10(6) :1329–1341, 1971.
- [63] M. Gross, P. Goy, and M. Al-Koussa. Shot-noise detection of ultrasound-tagged photons in ultrasound-modulated optical imaging. *Optics letters*, 28(24) :2482–2484, 2003.
- [64] F Joud, F Laloë, M Atlan, J Hare, and M Gross. Imaging a vibrating object by Sideband Digital Holography. *Optics express*, 17(4) :2774–9, February 2009.
- [65] F. Joud, F. Verpillat, F. Laloë, M. Atlan, J. Hare, and M. Gross. Fringe-free holographic measurements of large-amplitude vibrations. *Optics letters*, 34(23) :3698–3700, 2009.
- [66] J. Leval, P. Picart, J.P. Boileau, and J.C. Pascal. Full-field vibrometry with digital fresnel holography. *Applied optics*, 44(27) :5763–5772, 2005.
- [67] G. Frens. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature*, 241(105) :20–22, 1973.
- [68] M.C. Daniel, D. Astruc, et al. Gold nanoparticles : assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews-Columbus*, 104(1) :293, 2004.
- [69] A. Ishimaru. *Wave propagation and scattering in random media*, volume 12. Wiley-IEEE Press, 1999.
- [70] G. Mie. *Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen*, volume 330. Wiley Online Library, 1908.
- [71] E.D. Palik and G. Ghosh. Handbook of optical constants of solids. 3, 1998.
- [72] P.B. Johnson and RW Christy. Optical constants of the noble metals. *Physical Review B*, 6(12) :4370, 1972.
- [73] Frank Dubois and Patrick Grosfils. Dark-field digital holographic microscopy to investigate objects that are nanosized or smaller than the optical resolution. *Optics letters*, 33(22) :2605–7, November 2008.
- [74] M.J. Saxton. Single-particle tracking : the distribution of diffusion coefficients. *Biophysical journal*, 72(4) :1744–1753, 1997.
- [75] H. Qian, M.P. Sheetz, and E.L. Elson. Single particle tracking. analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophysical journal*, 60(4) :910–921, 1991.
- [76] MA Van Dijk, AL Tchegotareva, M. Orrit, M. Lippitz, S. Berciaud, D. Lasne, L. Cognet, and B. Lounis. Absorption and scattering microscopy of single metal nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 8(30) :3486–3495, 2006.
- [77] F. Dubois, L. Joannes, and J.C. Legros. Improved three-dimensional imaging with a digital holography microscope with a source of partial spatial coherence. *Applied optics*, 38(34) :7085–7094, 1999.
- [78] Frank Dubois, Maria-Luisa Novella Requena, Christophe Minetti, Olivier Monnom, and Eric Istasse. Partial spatial coherence effects in digital holographic microscopy with a laser source. *Applied optics*, 43(5) :1131–9, February 2004.

- [79] Tomoyoshi Shimobaba, Yoshikuni Sato, Junya Miura, Mai Takenouchi, and Tomoyoshi Ito. Real-time digital holographic microscopy using the graphic processing unit. *Optics express*, 16(16) :11776–81, August 2008.
- [80] Hoonjong Kang, Fahri Yaraş, and Levent Onural. Graphics processing unit accelerated computation of digital holograms. *Applied optics*, 48(34) :H137–43, December 2009.
- [81] L. Ahrenberg, A.J. Page, B.M. Hennelly, J.B. McDonald, and T.J. Naughton. Using commodity graphics hardware for real-time digital hologram view-reconstruction. *Display Technology, Journal of*, 5(4) :111–119, 2009.
- [82] Nitesh Pandey, Damien P. Kelly, Thomas J. Naughton, and Bryan M. Hennelly. Speed up of Fresnel transforms for digital holography using pre-computed chirp and GPU processing. *Proceedings of SPIE*, 1 :744205–744205–11, 2009.
- [83] E CuChe, F Bevilacqua, and C Depeursinge. Digital holography for quantitative phase-contrast imaging. *Optics letters*, 24(5) :291–3, March 1999.
- [84] T. Colomb, E. CuChe, F. Charrière, J. Kühn, N. Aspert, F. Montfort, P. Marquet, and C. Depeursinge. Automatic procedure for aberration compensation in digital holographic microscopy and applications to specimen shape compensation. *Applied optics*, 45(5) :851–863, 2006.
- [85] T. Colomb, F. Montfort, J. Kühn, N. Aspert, E. CuChe, A. Marian, F. Charrière, S. Bourquin, P. Marquet, and C. Depeursinge. Numerical parametric lens for shifting, magnification, and complete aberration compensation in digital holographic microscopy. *JOSA A*, 23(12) :3177–3190, 2006.
- [86] F. Montfort, F. Charrière, T. Colomb, E. CuChe, P. Marquet, and C. Depeursinge. Purely numerical compensation for microscope objective phase curvature in digital holographic microscopy : influence of digital phase mask position. *JOSA A*, 23(11) :2944–2953, 2006.
- [87] Christopher Mann, Lingfeng Yu, Chun-Min Lo, and Myung Kim. High-resolution quantitative phase-contrast microscopy by digital holography. *Optics express*, 13(22) :8693–8, October 2005.
- [88] M.J. Nasse and J.C. Woehl. Realistic modeling of the illumination point spread function in confocal scanning optical microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A*, 27(2) :295–302, 2010.
- [89] C. Fournier, L. Denis, and T. Fournel. On the single point resolution of on-axis digital holography. *JOSA A*, 27(8) :1856–1862, 2010.
- [90] T. Savin and P.S. Doyle. Static and dynamic errors in particle tracking microrheology. *Biophysical journal*, 88(1) :623–638, 2005.
- [91] X. Michalet. Mean square displacement analysis of single-particle trajectories with localization error : Brownian motion in an isotropic medium. *Physical Review E*, 82(4) :041914, 2010.
- [92] C.Y. Okada, M. Rechsteiner, et al. Introduction of macromolecules into cultured mammalian cells by osmotic lysis of pinocytic vesicles. *Cell*, 29(1) :33, 1982.
- [93] R.D. Park, P.C. Sullivan, and B. Storrie. Hypertonic sucrose inhibition of endocytic transport suggests multiple early endocytic compartments. *Journal of cellular physiology*, 135(3) :443–450, 1988.

- 
- [94] M. Abkarian, G. Massiera, L. Berry, M. Roques, and C. Braun-Breton. A novel mechanism for egress of malarial parasites from red blood cells. *Blood*, 117(15) :4118–4124, 2011.
- [95] SY Suck, S. Collin, N. Bardou, Y.D. Wilde, and G. Tessier. Imaging the three-dimensional scattering pattern of plasmonic nanodisk chains by digital heterodyne holography. *Optics Letters*, 36(6) :849–851, 2011.
- [96] M.J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (storm). *Nature methods*, 3(10) :793–796, 2006.





---

## Table des figures

---

I.1	Dispositif d'enregistrement d'un hologramme sur une plaque photographique. L'onde de référence $E_R$ se propage le long de l'axe $z$ et interfère avec la lumière diffractée par l'objet $E_S$ sur la plaque photographique. . . . .	11
I.2	Relecture de l'hologramme développé. L'hologramme est illuminé par une onde de référence identique à celle utilisée lors de l'enregistrement. La diffraction à travers l'hologramme donne trois ondes, l'ordre 0 qui est une onde plane proportionnelle à l'onde de référence, l'ordre 1 restituant l'objet et l'ordre -1 qui est son complexe conjugué. Ces trois ordres sont superposés le long de l'axe optique en holographie dans l'axe. . . . .	12
I.3	Dispositif d'enregistrement d'un hologramme en géométrie hors-axe sur une plaque photographique. L'onde de référence $E_R$ se propage dans une direction faisant un angle $\theta_R$ avec l'axe optique. L'objet est illuminé par une onde d'illumination $E_I$ . . . . .	13
I.4	Relecture de l'hologramme en géométrie hors-axe. L'hologramme est illuminé par l'onde d'illumination. La diffraction à travers l'hologramme donne à nouveau trois ondes qui se propagent dans des direction différentes. Dans cette géométrie, les 3 ordres sont spatialement séparés. . . . .	13
I.5	représentation du spectre de l'hologramme dans le domaine de Fourier le long de l'axe $k_x$ . . . . .	15
I.6	Dispositif d'enregistrement d'un hologramme. Pour que des interférences se forment au niveau du support d'enregistrement, il faut que la différence de chemin optique entre l'onde de référence (chemin bleu) et l'onde signal (chemin vert) soit inférieure à la longueur de cohérence $l_c$ du laser. . . . .	16

I.7	(a) hologramme de nanobilles d'or obtenu en holographie digitale hors-axe . (b) Spectre de l'hologramme obtenu en calculant la transformée de Fourier de (a). On observe la séparation des 3 ordres de diffraction dans l'espace des fréquences spatiales : l'ordre 0 au centre, l'ordre $-1$ en bas à gauche et l'ordre $+1$ en haut à droite centré sur la fréquence spatiale $(+k \sin(\theta_R), +k \sin(\theta_R))$ correspondant à l'angle $\theta_R$ de la géométrie hors-axe. Le cercle en pointillé blanc représente le masque du filtre numérique utilisé pour isoler l'ordre $+1$ . (c) Spectre de l'hologramme après le filtrage numérique. (d) Centrage de la partie filtré au centre de l'espace de Fourier.	18
I.8	Représentation schématique d'un capteur CCD. On néglige ici l'espacement entre les pixels. . . . .	19
I.9	Echantillonnage de la fréquence spatiale de coupure. Le capteur enregistre 2 points par périodes. . . . .	20
I.10	Représentation schématique des différentes étapes de la reconstruction des hologrammes par la méthodes du spectre angulaire. . . . .	24
I.11	Fonctionnement d'un modulateur acousto-optique. . . . .	27
I.12	Dispositif d'holographie à décalage de phase utilisant 2 modulateurs acousto-optiques. . . . .	28
I.13	Circuit électronique alimentant les deux modulateurs acousto-optiques. . .	28
I.14	Positions de l'anche et champ de vitesse associés à 4 instants différents d'une période d'oscillation. Aux instants 1 et 3, l'anche est en position neutre, la vitesse de l'extrémité est alors maximale. Aux instants 2 et 4, l'anche atteint son amplitude maximale de vibration, la vitesse est alors nulle. . . . .	34
I.15	Décalage Doppler associé au champ de vitesses de l'anche en vibration. . .	34
I.16	Zone de l'anche visible sur l'hologramme à la fréquence de détection $\omega^{(n)}$ . Seuls les points situés entre $y(n)$ et l'extrémité de l'anche (zone en rouge) atteignent pendant une période d'oscillation la vitesse $v(n)$ générant un décalage Doppler à la fréquence $\omega^{(n)}$ . . . . .	35
I.17	(a) Reconstruction de l'anche en échelle logarithmique pour $n = 330$ d'une anche en vibration à 2020 Hz. L'échelle en X et Y est en pixels. On observe une légère dissymétrie de l'oscillation (de part et d'autre de la ligne blanche en pointillés). (b) Empilement des reconstructions des harmoniques de rang $n = -1250$ à $n = 1250$ . On observe une perte du signal pour $n \simeq 1160$ , ce qui correspond à une amplitude de vibration de $z_{max} = 60\mu\text{m}$ . . . . .	35
I.18	SG : synthétiseur numérique, DBM : mixeur de fréquence, NAND : porte logique, L : laser, AOM : modulateurs acousto-optiques, M : miroirs, BS : cube séparateur de faisceau, BE : agrandisseur de faisceau, LS : haut-parleur excitant l'anche de clarinette à la fréquence $\omega_A/2\pi$ , CCD : camera. . . . .	36
I.19	(en haut) signal sinusoïdal de fréquence 2143 Hz envoyé au haut-parleur. (au milieu) signal carré émis par le synthétiseur SG 2. (en bas) Signal envoyé aux modulateurs acousto-optiques. . . . .	37
I.20	Zone de l'anche visible sur l'hologramme à la fréquence de détection $\omega^{(n)}$ en illumination stroboscopique. . . . .	38

I.21	Simulations numériques de la densité spectrale $ A_{n,x,\delta x} ^2$ du champ détecté en fonction du rang harmonique $n$ sans <b>(a)</b> et avec <b>(b-c-d)</b> illumination stroboscopique. Ces courbes sont obtenus pour différentes durées d'illumination stroboscopique $\delta t = \delta x \times T_A$ ( $\delta x = 0, 2$ <b>(b)</b> , $\delta x = 0, 1$ <b>(c)</b> et $\delta x = 0, 05$ <b>(d)</b> ), et pour différents instants d'illumination $t_d = x \times /T_A$ . La déphasage maximal $\Phi$ de chaque spectre est égale à 50. . . . .	39
I.22	Reconstruction de l'intensité du champ en échelle logarithmique pour $t_d = 0$ (a,b,c), $30\%T_A$ (d,e,f) et $50\%T_A$ (g,h,i) et pour $n = -60$ (a,d,g), $0$ (b,e,h) et $+60$ (c,f,i). . . . .	40
I.23	Positions successives de l'anche sur une période $T_A$ . Ces images sont obtenues en prenant la section dans le plan $X = 268$ (ligne blanche en pointillés de la figure I.22) de l'empilement des images reconstruites pour $n = -100$ à $n = 100$ . . . . .	41
II.1	Images de nanobilles d'or allant de 60 à 90 nm de diamètres et histogrammes de distribution de taille (Image prise sur le site du fabricant Nanopartz©). . . . .	45
II.2	Diffusion de la lumière par une particule de rayon $a$ . La lumière incidente arrive par le bas. . . . .	46
II.3	Indice optique complexe de l'or dans le domaine visible et proche infrarouge. en haut : partie réelle de $n$ . en bas : partie imaginaire de $n$ . . . . .	48
II.4	Fonction de phase (en échelle logarithmique) de la diffusion d'un faisceau laser à 660 nm par un nanoparticule de 100 nm de diamètre dans l'eau. Le faisceau incident arrive par la gauche. <b>En vert</b> : polarisation perpendiculaire au faisceau incident, <b>En bleu</b> : polarisation parallèle, <b>En rouge</b> : lumière non-polarisée (ou naturelle). . . . .	50
II.5	Schéma d'un montage optique d'holographie in-line (figurant sur l'article de Cheong et al. [13]). L'objectif enregistre l'interférence entre la diffusion des particules et la partie non-diffusée du faisceau d'illumination. . . . .	52
II.6	Schéma du montage optique figurant sur l'article de Warnasooriya [25]. L'illumination en réflexion totale est réalisée par le prisme situé sous l'échantillon. AOM : modulateurs acousto-optique, ND : filtre de densité, PBS : cube séparateur polarisant, BS : cube séparateur. . . . .	53
II.7	Schéma de la première configuration testée pour le suivi de nanoparticules en 3D. Le faisceau d'illumination est focalisé sur le masque opaque situé au milieu d'une lame de verre transparente. La lumière diffusée par la particule est collectée par l'objectif puis envoyée sur la caméra. Cette configuration est limitée par la lumière diffusée par le masque puis réfléchi par la face arrière de l'objectif. L'intensité du faisceau d'illumination étant très grande devant l'intensité diffusée par la particule, cette lumière parasite n'est pas négligeable et gêne considérablement l'enregistrement des hologrammes. . . . .	54
II.8	Schéma de l'objectif en réflexion utilisé dans notre système. Le faisceau d'illumination est focalisé sur le masque opaque situé au centre de la pupille d'entrée de l'objectif. La lumière diffusée par la particule est réfléchi par le miroir parabolique (MP) puis réfléchi une seconde fois par le miroir sphérique vers la caméra. . . . .	55
II.9	Objectif en réflexion utilisé. . . . .	55

II.10	Diffusion aléatoire en 2 dimensions d'une particule pendant $\Delta t$ . La ligne en pointillés bleus représente le libre parcours moyen pendant l'intervalle de temps $\Delta t$ . . . . .	56
II.11	<b>(a)</b> Simulation d'une trajectoire de 200 positions en 3 dimensions d'une bille d'or de 100 nm dans l'eau. L'intervalle de temps entre 2 positions est égal à 40 ms. <b>(b)</b> (en rouge) courbe de déplacement quadratique moyen (MSD) correspondant à la trajectoire simulée, et barre d'erreur associée calculée par la formule de Qian. La régression linéaire est tracée en bleue. . . . .	57
II.12	Schéma de notre montage optique. (les explications sont données dans cette section) . . . . .	59
II.13	<b>(a)</b> Photographie de l'ensemble du dispositif. On peut voir deux modulateurs acousto-optiques sur le dispositif. Ces modulateurs n'ont pas été utilisés pour des raisons de vitesses de diffusion des nanobilles, comme expliqué dans le texte. Nous n'avons donc pas schématisé ces modulateurs dans le figure II.12 pour cette raison. <b>(b)</b> Photographie centrée sur l'objectif. On peut voir au centre de la photographie, de bas en haut, le porte échantillon sur une platine de translation, l'objectif en réflexion, le bloc contenant le cube séparateur en géométrie hors-axe, et la caméra. . . . .	60
II.14	Contraste des franges d'interférences en fonction de la différence de chemin optique obtenue avec notre laser. . . . .	61
II.15	Conjugaison du plan objet au capteur CCD par l'objectif de microscope. L'objet est digitalisé sur une matrice de pixels « virtuels » de taille $d'_{pix}$ égale à la taille réelle des pixels du capteurs CCD divisé par le grossissement du système. . . . .	62
II.16	Mire de calibration USAF. . . . .	63
III.1	Carte graphique Nvidia Geforce GTX470 utilisée pour reconstruire nos hologrammes . . . . .	66
III.2	Evolution de la puissance de calculs des cartes graphiques (GPU) depuis 2003 comparée à celle des processeurs classiques. . . . .	67
III.3	Architecture de programmation sur une carte graphique. Lorsque la carte doit effectuer une opération ( <i>kernel</i> en programmation CUDA) sur une matrice de données, ces données sont réparties en <i>block</i> , eux-même divisés en <i>threads</i> (un thread étant une opération effectuée sur un seul pixel de la matrice de données). Chaque <i>block</i> est attribué à un processeur de la carte graphique, qui va effectuer les <i>threads</i> contenus dans ce block. . . . .	68
III.4	Schéma de principe d'un microscope holographique digital . . . . .	70

III.5	Étapes de reconstruction des hologrammes. La première étape consiste à reconstruire le champ optique dans le plan $P$ en passant par la reconstruction dans le plan de la pupille arrière de l'objectif ce qui permet simultanément de corriger le désalignement de la géométrie hors-axe et la sphéricité du front d'onde due à l'objectif. La seconde étape consiste à propager le champ optique dans le plan $P$ par pas successif dans la direction de l'axe $z$ pour obtenir une carte en 3 dimensions du champ optique diffusé par l'échantillon. Nous avons superposé sur cette figure le plan de la pupille arrière de l'objectif avec le plan focal arrière et le plan focal objet avec le plan conjugué au capteur car ces plans sont quasiment confondus avec l'objectif que nous avons utilisé. . . . .	71
III.6	Représentation schématique de l'objectif de microscope. Les rayons tracés en rouge sont les rayons les plus inclinés par rapport à l'axe optique pouvant être collectés par l'objectif. . . . .	72
III.7	Déformation du front d'onde à travers un objectif de microscope . . . . .	73
III.8	(a) Hologramme de nanobilles de 100 nm en diffusion dans l'eau. (b) Transformée de Fourier de l'hologramme. (c) Propagation de l'hologramme dans le plan focal arrière de l'objectif par la méthode de Fresnel. (d) Représentation du masque de filtrage numérique réalisé sur la propagation dans le plan focal arrière de l'objectif. (e) Étape de filtrage numérique. Seul les pixels à l'intérieur du masque sont conservés. Les pixels à l'extérieur sont fixés à zéros. (f) Centrage de la partie filtrée au centre du plan de Fourier. Cette étape permet de supprimer la fréquence spatiale ajoutée au signal par la géométrie hors-axe. . . . .	74
III.9	(a) Hologramme de nanobilles d'or enregistré par la caméra. (b) Amplitude du champ complexe $E_P$ obtenu après les étapes de correction des effets de phases et filtrage décrites dans ce paragraphe. Ce champ complexe sert de base à la reconstruction de l'échantillon en trois dimensions par propagation successives. . . . .	76
III.10	Reconstruction en 3D de l'objet par propagation pas à pas le long de l'axe $Z$ du champ complexe $E_P$ . Le champ est propagé par la méthode du spectre angulaire. . . . .	78
III.11	Zoom de l'hologramme $E_P$ sur la région d'intérêt où sont situées les billes d'or de 100 nm. . . . .	78
III.12	Propagation de la zone d'intérêt définie sur la figure III.11 à différentes profondeurs ( $-4, 0, 4, 8$ et $12\mu\text{m}$ ). Les images de la colonne de gauche montrent le module du champ complexe. Les images à droites montrent le module du champ en échelle logarithmique représenté en surface 3D. . . .	79
III.13	Schéma du processus de reconstruction. . . . .	81
III.14	Temps de calcul nécessaire à la reconstruction d'un cube de donnée de $512 \times 512 \times 500$ pixels (colonne de gauche) et d'une seule propagation (colonne de droite). . . . .	81
IV.1	Échantillon de nanobilles d'or de 100 nm immobilisées dans un gel d'agarose. 84	
IV.2	Exemple d'hologramme obtenu avec l'échantillon de la figure IV.1. On distingue au milieu de l'hologramme une nanoparticule hors-focus. . . . .	84

IV.3	<p><b>à gauche</b> : Reconstruction en 3D de l'intensité du champ diffusé par une nanoparticule de 100 nm dans un gel d'agarose. Cette image a été réalisée en superposant les propagations entre <math>-200 \mu\text{m}</math> et <math>200 \mu\text{m}</math> du champ dans le plan focal. Les échelles selon <math>X</math> et <math>Y</math> sont en pixels (la largeur d'un pixel étant égale à 160 nm). L'échelle selon <math>Z</math> est en micron. <b>à droite</b> : Intensité du champ en échelle logarithmique pour différentes profondeurs de propagation : de bas en haut, <math>Z = 0, 10 \mu\text{m}, 20 \mu\text{m}, 30 \mu\text{m}</math> et <math>40 \mu\text{m}</math>. . .</p>	86
IV.4	<p>Profil de l'intensité du champ reconstruit autour d'une nanoparticule de 100 nm le long de l'axe <math>X</math> (<b>a</b>), <math>Y</math> (<b>b</b>), <math>Z</math> (<b>c</b>). La courbe (<b>d</b>) et un zoom sur le sommet de la courbe (<b>c</b>). . . . .</p>	87
IV.5	<p>Profil de l'intensité selon l'axe <math>Z</math> d'une nanoparticule de 100 nm à différentes profondeurs (de <math>-80</math> à <math>80 \mu\text{m}</math> par pas de <math>20 \mu\text{m}</math>). . . . .</p>	88
IV.6	<p>Simulation de la PSF de l'objectif utilisé sur le montage optique dans le plan <math>XY</math> perpendiculaire à l'axe optique (<b>a</b>), et <math>XZ</math> parallèle à l'axe optique (<b>b</b>). . . . .</p>	89
IV.7	<p>Coordonnées de la particule d'or de 100 nm à partir des 200 différentes mesures successives par notre algorithme de localisation. La particule choisie est située à <math>1 \mu\text{m}</math> du plan focal de l'objectif. La déviation standard des coordonnées en <math>X</math> et <math>Y</math> donne une précision de localisation de 3 nm, et de 150 nm dans la direction de l'axe <math>Z</math>. . . . .</p>	91
IV.8	<p>(<b>a</b>) Schématisation de l'expérience décrite dans ce paragraphe, destinée à évaluer la précision de localisation d'une nanoparticule fixe lorsque la distance entre la particule et le plan focal varie. L'échantillon est déplacé par pas de <math>20 \mu\text{m}</math> dans la direction de l'axe <math>Z</math>. (<b>b</b>) Position moyenne de la nanoparticule calculée par notre algorithme comparée au déplacement réel de l'échantillon. . . . .</p>	92
IV.9	<p>Précision de localisation d'une nanoparticule d'or de 100 nm en fonction de la distance entre la particule et le plan focal de l'objectif, selon les directions <math>X</math> (<b>a</b>, courbe bleue) et <math>Y</math> (<b>a</b>, courbe rouge), et <math>Z</math> (<b>b</b>). . . . .</p>	92
IV.10	<p>Trajectoires en 3 dimensions de nanoparticules d'or de 100 nm en diffusion brownienne dans l'eau, reconstruites à partir de deux séries de 200 hologrammes. L'échelle des trois axes est en micromètre. Le plan focal de l'objectif a été fixé au niveau de l'interface verre-air de la première lame de verre. Les particules sont donc à une hauteur de <math>145 \mu\text{m}</math> (<b>a</b>) et <math>50 \mu\text{m}</math> (<b>b</b>) du plan focal. . . . .</p>	94
IV.11	<p>En haut : images reconstruites de nanoparticule de 100 nm dans l'eau respectivement sans (<b>a</b>) et avec (<b>b</b>) soustraction du bruit de fond. En bas : profil de l'intensité en échelle logarithmique le long de la ligne en pointillés jaune, sans (en bleu) et avec (en rouge) soustraction du bruit de fond. . .</p>	95
IV.12	<p>Trajectoires 3D de trois nanoparticules en diffusion brownienne, reconstruites à partir de 200 hologrammes. Le plan focal de l'objectif a été fixé au niveau du plan <math>Z = 0</math>, à <math>150 \mu\text{m}</math> de la première lame de verre. .</p>	96
IV.13	<p>Courbes de déplacement quadratique moyen (MSD) obtenues à partir d'une trajectoire de 200 points d'une nanoparticule de 100 nm dans l'eau. (<b>a</b>) : 3D, (<b>b</b>) : selon <math>X</math>, (<b>c</b>) : <math>Y</math>, (<b>d</b>) : <math>Z</math>. Les points de la courbe sont en rouge, ainsi que les barres d'erreurs. La ligne bleue est un ajustement linéaire pondéré par les barres d'erreurs. . . . .</p>	97

IV.14	Moyenne de 10 MSD obtenues à partir de trajectoire de 200 points. <b>(a)</b> : 3D, <b>(b)</b> : selon $X$ , <b>(c)</b> : $Y$ , <b>(d)</b> : $Z$ . Les points de la courbe sont en rouge, ainsi que les barres d'erreurs. La ligne bleue représente l'ajustement linéaire pondéré par les barres d'erreurs. . . . .	98
IV.15	Comparaison de 4 méthode d'ajustement d'une courbe MSD. . . . .	99
IV.16	<b>(a)</b> Image de cellules HeLa prise en lumière blanche avec un objectif 40 $\times$ . <b>(b)</b> Schéma de cellules en suspension et adhérente sur la paroi (ou lame de verre). . . . .	101
IV.17	Schéma du montage optique intégrer sur un microscope de fluorescence inversé. Photographie du montage. . . . .	102
IV.18	Photographie du montage. . . . .	103
IV.19	<b>(a)</b> Schéma des complexes nanoparticule-GFP. <b>(b)</b> Image de fluorescence de nanoparticules d'or de 100 nm fonctionnalisées avec des molécules de GFP en diffusion dans l'eau. . . . .	104
IV.20	Principe de l'injection par pinocytose forcée. <b>(A)</b> les cellules sont placées dans un milieu hypertonique contenant les nanoparticules d'or à injecter. La différence de pression osmotique déclenche un flux d'eau vers l'extérieur, la cellule compense la perte d'eau en absorbant le liquide extra-cellulaire par pinocytose <b>(B)</b> . Les cellules sont ensuite plongées dans un milieu hypotonique, le choc osmotique fait éclater les vésicules formées <b>(C)</b> pour libérer leur contenu dans le cytoplasme <b>(D)</b> . . . . .	105
IV.21	<b>(a)</b> Cellules Hela en présence de nanoparticules d'or de 50 nm après l'injection de particules par pinocytose. <b>(b)</b> Reconstruction des hologrammes en intensité. <b>(c)</b> Image composite montrant la superposition des pics d'intensité de l'image holographique avec les particules visibles en lumière blanche. . . . .	107
IV.22	Trajectoire 3D de 200 points d'une particule de 50 nm à l'intérieur du cytoplasme (particule indiquée par une flèche jaune sur la figure IV.21(c))	108
IV.23	<b>(a)</b> Photographie du bras articulé du dispositif d'injection. <b>(b)</b> Image de la pointe du capillaire en verre au dessus d'une cellule, prise en lumière blanche avec un objectif 60x. <b>(c)</b> Schéma de l'opération d'injection transmembranaire de nanoparticules. . . . .	109
IV.24	<b>(a)</b> Image en microscopie en fond noir d'une cellule après l'injection de nanoparticules d'or. On peut distinguer au centre de l'image (zone indiquée par la flèche jaune) le signal d'une ou d'un agrégat de nanoparticules dans le cytoplasme à l'endroit où nous avons réalisé l'injection. <b>(b)</b> Image de la même cellule en lumière blanche. <b>(c)</b> Superposition de l'image en lumière blanche et du signal de fluorescence. La présence du signal de fluorescence à l'endroit de l'injection confirme la présence de nanoparticules dans le cytoplasme. <b>(d)</b> Intensité du champ diffusé obtenue par reconstruction des hologrammes. L'imagerie holographique met également en évidence la présence de nanoparticules à l'endroit de l'injection. . . . .	111





La liste suivante regroupe les principaux articles publiés en premier ou second auteur pendant cette thèse. Les 3 premiers présentent les résultats les plus significatifs, ils sont inclus à la suite.

- F. Verpillat, F. Joud, P. Desbiolles and M. Gross, Dark-field digital holographic microscopy for 3D-tracking of gold nanoparticles. *Optics Express*, volume 19, 26044-26055, 2011.
- B. Samson, F. Verpillat, M. Gross and M. Atlan. Video-rate laser Doppler vibrometry by heterodyne holography. *Optics letters*, vol. 36, 1449-1451, 2011.
- F. Verpillat, F. Joud, M. Atlan and M. Gross. Digital holography at shot noise level. *Journal of Display Technology*, vol. 6, 455-464, 2010.
- F. Joud, F. Verpillat, F. Laloë, M. Atlan, J. Hare and M. Gross. Fringe-free holographic measurements of large-amplitude vibrations. *Opt. Letters*, vol. 34, 3698-3700, 2009.
- F. Verpillat, F. Joud, P. Desbiolles and M. Gross. Digital holographic microscopy for 3D tracking of nanoparticles. *proceedings of Frontiers in Optics* 2011.

# Dark-field digital holographic microscopy for 3D-tracking of gold nanoparticles

F. Verpillat,<sup>1,\*</sup> F. Joud,<sup>1</sup> P. Desbiolles,<sup>1</sup> and M. Gross <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Kastler Brossel, ENS, UPMC-Paris6, CNRS UMR 8552, Paris, 75005, France

<sup>2</sup> Laboratoire Charles Coulomb, CNRS UMR 5221, Université Montpellier II, Montpellier, 34095, France

\*[frederic.verpillat@lkb.ens.fr](mailto:frederic.verpillat@lkb.ens.fr)

**Abstract:** We present a new technique that combines off-axis Digital Holography and Dark Field Microscopy to track 100nm gold particles diffusing in water. We show that a single hologram is sufficient to localize several particles in a thick sample with a localization accuracy independent of the particle position. From our measurements we reconstruct the trajectories of the particles and derive their 3D diffusion coefficient. Our results pave the way for quantitative studies of the motion of single nanoparticle in complex media.

© 2011 Optical Society of America

**OCIS codes:** (090.1995) Digital holography; (090.1760) Computer holography; (100.4999) Pattern recognition, target tracking; (180.0180) Microscopy; (290.5850) Scattering, particles.

---

## References and links

1. B. Huang, W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang, "Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy," *Science* **319**, 810 (2008).
2. J. Bewersdorf, B.T. Bennett, and K.L. Knight, "H2AX chromatin structures and their response to DNA damage revealed by 4Pi microscopy," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **103**, 18137 (2006).
3. S.R. Pavani, M.A. Thompson, J.S. Biteen, S.J. Lord, N. Liu, R.J. Twieg, R. Piestun, and W.E. Moerner, "Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **106**, 2995 (2009).
4. M.F. Juette, T.J. Gould, M.D. Lessard, M.J. Mlodzianoski, B.S. Nagpure, B.T. Bennett, S.T. Hess, and J. Bewersdorf, "Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples," *Nat. Methods* **5**, 527–529 (2008).
5. S. Ram, P. Prabhat, J. Chao, E.S. Ward, and R.J. Ober, "High Accuracy 3D Quantum Dot Tracking with Multifocal Plane Microscopy for the Study of Fast Intracellular Dynamics in Live Cells," *Biophys. J.* **95**, 6025 (2008).
6. U. Schnars and W. Jüptner, "Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction," *Appl. Opt.* **33**, 179–181 (1994).
7. E. Leith and J. Upatniek, "Wavefront Reconstruction Photography," *Phys. Today* **18**, 26 (1965).
8. H.C. van de Hulst, *Light Scattering by Small Particles*, (Dovers Publications Inc, 1957).
9. F.C. Cheong, B. Sun, R. Dreyfus, J. Amato-Grill, K. Xiao, L. Dixon, and D.G. Grier, "Flow visualization and flow cytometry with holographic video microscopy," *Opt. Express* **17**, 13071–13079 (2009).
10. F.C. Cheong, S. Duarte, S.H. Lee, and D.G. Grier, "Holographic microrheology of polysaccharides from *Streptococcus mutans* biofilms" *Rheol. Acta* **48**, 109–115 (2009).
11. F.C. Cheong, B.J. Krishnatreya, and D.G. Grier, "Strategies for three-dimensional particle tracking with holographic video microscopy," *Opt. Express* **18**, 13563–13573 (2010).
12. W. Xu, M.H. Jericho, H.J. Kreuzer, and I.A. Meinertzhagen, "Tracking particles in four dimensions with in-line holographic microscopy," *Opt. Lett.* **28**, 164–166 (2003).
13. J. Sheng, E. Malkiel, and J. Katz, "Digital holographic microscope for measuring three-dimensional particle distributions and motions," *Appl. Opt.* **45**, 3893–3901 (2006).

14. S.H Lee, Y. Roichman, G.R. Yi, S.H. Kim, S.M. Yang, A. Van Blaaderen, P. Van Oostrum, and D.G. Grier, "Characterizing and tracking single colloidal particles with video holographic microscopy," *Opt. Express* **15**, 18275–18282 (2007).
15. M. Speidel, L. Friedrich, and A. Rohrbach, "Interferometric 3D tracking of several particles in a scanning laser focus," *Opt. Express* **17**, 1003–1015 (2009).
16. E. Leith and J. Upatnieks, "Microscopy by wavefront reconstruction," *J. Opt. Soc. Am.* **55**, 569–570 (1965).
17. E. Cuque, P. Marquet, and C. Depeursinge, "Spatial filtering for zero-order and twin-image elimination in digital off-axis holography," *Appl. Opt.* **39**, 4070–4075 (2000).
18. M. Gross and M. Atlan, "Digital holography with ultimate sensitivity" *Opt. Lett.* **32**, 909–911 (2007)
19. P.K. Jain, K.S. Lee, I.H. El-Sayed, and M.A. El-Sayed, "Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine," *J. Phys. Chem. B* **110**, 7238–7248 (2006).
20. M. Atlan, M. Gross, P. Desbiolles, É. Absil, G. Tessier, and M. Coppey-Moisan, "Heterodyne holographic microscopy of gold particles," *Opt. Express* **33**, 500–502 (2008).
21. L. Cognet, C. Tardin, D. Boyer, D. Choquet, P. Tamarat, and B. Lounis, "Single metallic nanoparticle imaging for protein detection in cells," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **100**, 11350 (2003).
22. N. Warnasooriya, F. Joud, F. Bun, G. Tessier, M. Coppey-Moisan, P. Desbiolles, M. Atlan, M. Abboud, and M. Gross, "Imaging gold nanoparticles in living cell environments using heterodyne digital holographic microscopy," *Opt. Express* **18**, 3264–3273 (2010).
23. E. Shaffer, P. Marquet, and C. Depeursinge, "Real time, nanometric 3D-tracking of nanoparticles made possible by second harmonic generation digital holographic microscopy," *Opt. Express* **18**, 17392–17403 (2010).
24. F. Verpillat, F. Joud, M. Atlan, and M. Gross, "Digital holography at shot noise level," *J. Disp. Technol.* **6**, 455–464 (2010)
25. F. Dubois and P. Grosfils, "Dark-field digital holographic microscopy to investigate objects that are nanosized or smaller than the optical resolution," *Opt. Lett.* **33**, 2605–2607 (2008)
26. B. Samson, F. Verpillat, M. Gross, and M. Atlan, "Video-rate laser Doppler vibrometry by heterodyne holography," *Opt. Lett.* **36**, 1449–1451 (2011).
27. T. Shimobaba, Y. Sato, J. Miura, M. Takenouchi, and T. Ito, "Real-time digital holographic microscopy using the graphic processing unit," *Opt. Express* **16**, 11776–11780 (2008).
28. L. Ahrenberg, A.J. Page, B.M. Hennelly, J.B. McDonald, and T.J. Naughton, "Using commodity graphics hardware for realtime digital hologram view-reconstruction," *J. Disp. Technol.* **5**, 111 (2009).
29. H. Kang, F. Yaraş, and L. Onural, "Graphics processing unit accelerated computation of digital holograms," *Appl. Opt.* **38**, 137–143 (2009).
30. F. Le Clerc, L. Collot, and M. Gross, "Numerical heterodyne holography with two-dimensional photodetector arrays," *Opt. Lett.* **25**, 716–718 (2000).
31. L. Yu and M.K. Kim, "Wavelength-scanning digital interference holography for tomographic three-dimensional imaging by use of the angular spectrum method," *Opt. Lett.* **30**, 2092–2094 (2005).
32. I. Yamaguchi and T. Zhang, "Phase-shifting digital holography," *Opt. Express* **22**, 126–1270 (1997).
33. M.K. Kim, L. Yu, and C.J. Mann, "Interference techniques in digital holography," *J. Opt. A, Pure Appl. Opt.* **8**, S518–S523 (2006).
34. M. J. Nasse and J. C. Woehl, "Realistic modeling of the illumination point spread function in confocal scanning optical microscopy," *J. Opt. Soc. Am. A* **27**, 295–302 (2010).
35. PSF Lab, <http://onemolecule.chem.uwm.edu/software>.
36. C. Fournier, L. Denis, and T. Fournel, "On the single point resolution of on-axis digital holography," *J. Opt. Soc. Am. A* **27**, 1856–1862 (2010).

## 1. Introduction

The study of cellular processes at the single-molecule level is a flourishing field of research in Biology. Individual molecules labeled with sub-micron markers can now be tracked in a cellular environment, and quantitative information about their dynamics can be obtained by reconstructing their trajectory. One of the most used techniques for this purpose is single-molecule fluorescence microscopy (SMFM), which relies on a labeling with nanometer-sized fluorescent markers such as organic dyes or quantum dots. But standard SMFM provides no information on the axial position of the marker, limiting this technique to 2D tracking. Recent improvements of SMFM such as astigmatism optic [1], 4Pi microscopy [2], double-helix PSF [3], or multi-planes detection [4, 5] have made possible 3D tracking. Since the depth of field of these techniques is limited to a few microns, 3D tracking of molecules that explore larger distances in the thickness of a sample requires to continuously adjust the position of the focal plane of the microscope ob-

jective, which strongly limits the time resolution. Digital Holographic Microscopy (DHM) [6,7] circumvents this drawback. In DHM, a CCD camera records the interference pattern between the light scattered by the sample and a reference wave, and a single shot is sufficient to determine the 3D positions of scatterers embedded in a non-diffusing environment, over a depth of typically a hundred of microns.

As the scattering cross section of a particle scales as the sixth power of its radius [8], how easily and accurately a particle can be detected strongly depends on its size. Several publications demonstrate the tracking of micron-sized colloids by using in-line holography [9–15], with a localization accuracy in the nanometer range through the use of high Numerical Aperture (NA) microscope objectives. For example, with a  $100\times$  NA 1.4 oil immersion objective, Cheong et al. [10] reported lateral and axial localization accuracies of 4 and 20 nm respectively. This result was obtained with polystyrene spheres of diameter  $d = 1.5 \mu\text{m}$ , whose scattering cross section is quite large. The tracking of  $d \leq 100$  nm particles, whose scattering cross section is extremely low, is much more difficult, and, as far as we know, has not been demonstrated using in-line holography. Yet the detection of such small particles is possible using DHM in an off-axis geometry [16, 17] with a noise level as low as possible [18] and using good light scatterers, such as gold nanobeads [19]. By this way,  $d = 50$  to 200 nm gold particles embedded in an agarose gel have been detected and localized [20]. Since gold particles are not toxic for cells, they can be used as markers in biology [21], and  $d = 40$  nm gold nanobeads fixed on the membrane receptors of a living cell have been localized [22]. More recently, 3D tracking of BaTiO<sub>3</sub> particles with second harmonic generation DHM was also demonstrated [23].

Here, the main advantage of DHM, with respect to in-line holography, is the possibility to independently adjust the intensity of the illumination and reference beams in order to get the best detection sensitivity, by adjusting the reference beam intensity [24], and the largest signal, by adjusting the illumination beam intensity. Combining DHM with dark field illumination allows then to detect nanometer-sized particles, as the sample can be illuminated with an intensity as large as possible, while avoiding a saturation of the camera [20]. For example, Atlan et al. and Warnasooriya et al. uses Total Internal Reflection (TIR) to detect and localize  $d = 50$  nm and  $d = 40$  nm particles [20, 22]. But the TIR configuration used in these experiments yield a standing wave which does not allow to track moving particles : when a moving particle crosses a node, the illumination (and thus the signal) goes down to zero, and the particle is lost. Dubois et al. uses another dark field illumination configuration that focuses the illumination on a mask [25]. Since the illumination is parallel to the optical axis, no standing wave can appear, but since the illumination passes through the microscope objective, one expects parasitic reflections of the illumination beam.

In this paper, we present a Digital Holographic Microscopy technique which makes possible to track  $d = 100$  nm gold particles 3D diffusing in water. The illumination is parallel to the optical axis to prevent the formation of standing waves, and the holographic signal is collected by a NA=0.5 dark field reflecting microscope objective. With such objective, the illumination beam is masked before the microscope objective and parasitic reflections are avoided. This yields high dynamic dark field illumination, which makes possible to detect, localize and track  $d = 100$  nm particles. First we describe the setup, which combines dark-field microscopy and off-axis holography. Then we present the algorithm of reconstruction, our procedure to localize the beads, and describe how we can reach a real-time localization by performing calculations on a graphic card. Finally we show that our setup allows us to track gold nanoparticles in motion with a lateral ( $x, y$ ) resolution of  $\sim 3$  nm and an axial ( $z$ ) resolution of  $\sim 70$  nm. Since NA=0.5, the resolution (especially in  $z$ ) is lower than with NA=1.4 in-line holography [10]. We also show that the depth of field of our holographic microscope is made two orders of magnitude larger than in optical microscopy.

## 2. Digital holography setup

Our DHM experimental setup, depicted in Fig. 1, is designed to investigate the Brownian motion of 100nm diameter gold particles diffusing in a  $17 \times 3.8 \times 0.4$ mm (length  $\times$  width  $\times$  height) cell chamber (Ibidi  $\text{\textcircled{c}}$   $\mu$ -Slide) filled with water. The concentration of nanoparticles is adjusted to  $5.6 \cdot 10^3$  particles/mm<sup>3</sup> to have a few particles per field of view.

The light source is a 660nm Diode Pump Solid State laser (Crystal Laser  $\text{\textcircled{c}}$ ) with a short coherence length ( $\sim 600 \mu\text{m}$ ) to avoid parasitic interferences raising from reflexions between the optical elements. The laser beam is split into two beams by a Polarizing Beam Splitter (PBS), a half-wave plate before the PBS setting the ratio of energy between the emerging beams. The reference beam passes through a dove prism fixed on a micrometer translation stage to adjust the length of the optical path. This beam is spatially filtered through a  $35 \mu\text{m}$  diameter pinhole and then expanded as to uniformly cover the CCD chip of the camera ( $512 \times 512$  pixels, Andor Luca R  $\text{\textcircled{c}}$ ). The illumination beam is focused on the sample with a plano-convex lens of focal length 12.5 cm (waist diameter  $\sim 200 \mu\text{m}$ , laser intensity  $\sim 250 \text{ W/cm}^2$ ). The light scattered by the beads is collected in transmission with a dark-field reflecting objective (Edmund Optics  $\text{\textcircled{c}}$ , ReflX series) of NA = 0.5 and 36X magnification. A small mask on the input of the objective limits the collection of light between NA = 0.2 and NA = 0.5, so the illumination beam is totally blocked after passing through the sample. This dark-field configuration prevents the saturation of the CCD chip. A non-polarizing 50/50 beam splitter behind the objective combines the scattered light with the reference beam. The CCD camera records the interference pattern on 16bits frames with a 22.5Hz rate. The last beam-splitter is tilted by few degrees to be in off-axis configuration.

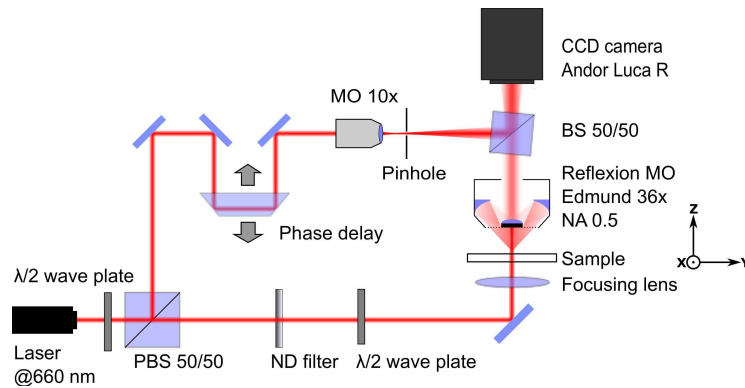


Fig. 1. Experimental setup. The sample is located in the  $X,Y$  plane.  $Z$  is the optical axis of the microscope objective

## 3. Numerical reconstruction

### 3.1. Reconstruction of the scattering field

In digital holography, the CCD sensor records an intensity  $I_{ccd}$  which is the interference of the reference beam with the light scattered by the nano-objects.  $I_{ccd}$  is thus a sum of 4 terms:

$$I_{ccd} = I_{ref} + I_{scatt} + E_{ref} \cdot E_{scatt}^* + E_{scatt} \cdot E_{ref}^* \quad (1)$$

where  $I_{ref}$  is the intensity of the reference beam,  $I_{scatt}$  the intensity of the scattered light and  $E_{ref}, E_{scatt}$  are the electric fields for the reference beam and the scattered light respectively. As

the scattering cross section of a 100 nm diameter gold particle calculated with the Rayleigh-Mie scattering model is about  $0.015 \mu\text{m}^2$  at 660 nm [8], the integration over the collection solid angle of the objective ( $0.2 \leq NA \leq 0.5$ ) gives  $I_{scatt} \simeq 3 \times 10^{-8} \times I_{illumination}$  for a single particle. Thus  $I_{scatt}$  can be neglected compared to the other terms of Eq. (1). The field  $E_{scatt}$ , the amplitude of which is about  $\sqrt{I_{scatt}}$ , contains the phase of the scattered light necessary to a 3D localization of the particle. In the Fourier space, the tilted beam splitter adds a spatial frequency on the two conjugates terms of interference, and thus the different terms of  $I_{ccd}$  are spatially separated, i.e.  $I_{ref}$  remains centered on the zero frequency of the Fourier plane while the two cross terms of interference are centered on the spatial frequency induced by the off-axis geometry.

Since 3D reconstruction is a time consuming task even using recent multi-cores processors, we developed parallel calculations on a Graphic card (Nvidia Geforce GT470, 448 cores) [26–29]. Our C++ based algorithm uses the Nvidia CUDA library to decompose the calculations on the GPUs of the card. Among the existing methods to reconstruct holograms, the most common is the convolution method described by Schnars et al. [6]. The main drawback of this method is that the pixel size of the reconstructed image depends on the distance of reconstruction, so that the image of a thick sample is distorted. Therefore this method is not convenient for 3D tracking, as the lateral scale depends on the depth of reconstruction considered. Here we chose to reconstruct the holograms with the angular spectrum method [30, 31], which, by compensating the sphericity of the signal wave, allows to reconstruct the hologram without distortion. Our algorithm can be decomposed in 6 steps :

- i. subtraction of the background:** in order to increase the signal-to-noise ratio, we subtract from the last recorded frame the average of the ten previous frames. Phase shifting holography [32] is also an effective technique for reducing noise, but the minimal delay  $\Delta t = 44$  ms between two frames, which is driven by our camera, is too long to use this technique for nanoparticle tracking. This step of calculation is performed only for particles in motion (i.e. we skipped this step for the results presented in 4.1).
- ii. numerical correction of the signal wave sphericity:** the hologram  $I_{ccd}$  is multiplied by a complex phase matrix  $M$  to compensate the sphericity induced by the microscope objective on the signal wave:

$$M(x, y, d) = \exp\left(\frac{i\pi(x^2 + y^2)}{\lambda d}\right), \quad (2)$$

where  $d$  is the local radius of curvature of the wave on the CCD plane. If the reference wave is a plane wave, this distance  $d$  is also the distance between the CCD chip and the back focal plane of the objective.

- iii. first FFT:** the direct Fourier transform of the corrected hologram is calculated using the CUDA CUFFT library:

$$\tilde{H}(k_x, k_y) = FFT[I_{ccd} \times M]. \quad (3)$$

Figure 2(a) shows the intensity  $|\tilde{H}|$  in the  $k$ -space, in logarithmic scale in the case where the background is not removed (step (i) skipped). In the middle of Fig. 2(a), the zero-order appears as a square because of the multiplication by the matrix  $M$ . The term related to  $E_{scatt}$  is in the down-right corner, centered on the spatial frequency induced by the off-axis geometry. The term related to  $E_{scatt}^*$  is centered on the conjugate frequency (top-left corner). At this step, the calculation is equivalent of the reconstruction in one FFT (convolution method) of the hologram at the distance  $d$  described in the previous step. Since the back focal plane of our microscope objective coincides with the output pupil plane, which is common for high magnification objective, we see on the down-right corner a

sharp reconstruction of the output pupil plane. If we change in step (i) the parameter  $d$  to  $-d$ , the image of the output pupil would be sharp in the top-left corner, while the term related to  $E_{scatt}$  would be blurred.

Figure 2(b) shows  $|\tilde{H}|$  in the  $k$ -space when the background is removed (step (i) performed). The zero-order term in the middle of the  $k$ -space is largely removed compare to Fig. 2(a), which reduces the recovery between the zero-order and  $E_{scatt}$ .

**iv. spatial filtering and centering:** to remove the zero-order term and replace the term related to  $E_{scatt}$  in the middle of the Fourier plane, a round numerical filter which matches with the output pupil of the objective is applied. Since the shape of the pupil is sharp in the  $k$ -space, we can isolate precisely the pixels containing the signal, minimizing the loss of information. To more precisely calibrate the radius and the center of the filter, we used a diffusive paper as a sample before performing experiments. Since the paper scatters light uniformly, all the spatial frequencies that the microscope objective can collect are recorded. Figure 2(d) shows the intensity  $|\tilde{H}|$  in logarithmic scale when the sample is replaced by a diffusing paper. We clearly see the shape of the output pupil of the objective and the dark-field mask in the center. We set the filter mask to match with the shape of the output pupil (white dotted circle in Fig. 2(d)). The filtered part is then translated into the middle of a  $512 \times 512$  calculation grid in order to compensate the off-axis shift.

**v. propagation:** the matrix obtained is multiplied by a propagation matrix  $\tilde{K}(k_x, k_y, z)$ , which is the exact form of the matrix propagation as given by Kim et al. [33]:

$$\tilde{K}(k_x, k_y, z) = \exp\left(iz \times \sqrt{k_0^2 - k_x^2 - k_y^2}\right) \quad (4)$$

where

$$k_0 = \frac{2\pi n}{\lambda}, \quad k_x = \frac{2\pi(x-256)}{512 \times \Delta_{pix}}, \quad k_y = \frac{2\pi(y-256)}{512 \times \Delta_{pix}} \quad (5)$$

to propagate the hologram by a distance  $z$  in the axial direction.  $\Delta_{pix}$  is the magnified pixel size. These equations are suited for holograms of  $512 \times 512$  pixels.

**vi. second FFT:** finally the inverse FFT is calculated.

For each hologram, the steps (v) and (vi) are repeated in order to get a stack of the scattered field at different depths, with a propagation step  $\delta z = 100$  nm:

$$H(x, y, n \cdot \delta z) = FFT^{-1} [\tilde{H}(k_x, k_y) \times \tilde{K}(k_x, k_y, n \cdot \delta z)], \quad (6)$$

where  $n$  is an integer.

An example of reconstruction is shown in Fig. 2(c). We can see a nanoparticle (1) localized in the considered plane and the intensity of the field scattered by two particles at different depths (2 and 3). The reconstruction of a  $50 \mu\text{m}$  thick volume requires to calculate one FFT to reconstruct the hologram in the output pupil plane, then to calculate 500 inverse FFTs for the slices of the stack. These 501 FFTs typically require one minute when the calculation is performed on the CPU, even with a recent multi-cores computer. We reduce this time by a factor of 30 when the calculation is parallelized on the graphic card.

### 3.2. Method of localization

Once the three dimensional map of the scattered field is calculated, the beads are localized by pointing the local maxima of the field's intensity. Figure 3 shows the field's intensity in the  $X, Y$  and  $Z$  directions. The Full Width at Half Maximum (FWHM) is about  $1 \mu\text{m}$  in lateral direction,



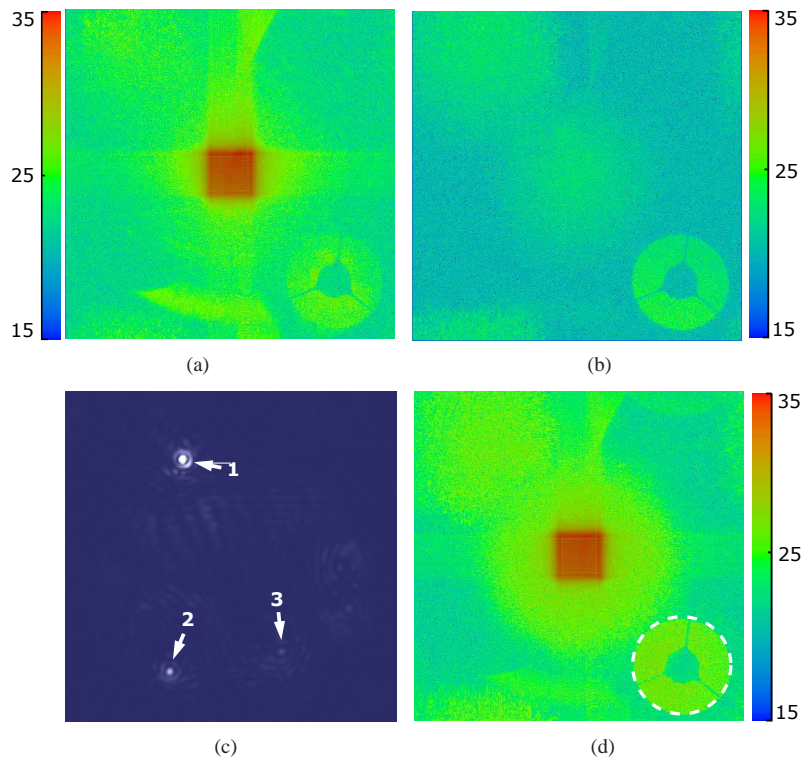


Fig. 2. a: Intensity  $|\tilde{H}(k_x, k_y)|$  in logarithmic scale. The zero-order term appears as a red square distorted by the multiplication with the phase matrix  $M$ . The term of interest is located in the down-right corner. b:  $|\tilde{H}(k_x, k_y)|$  when the average of the ten previous holograms is subtracted before calculating the FFT. The zero-order term is largely removed, so the recovery between this term and the region of interest in the down-right corner is reduced. c: Two-dimensional reconstruction at a fixed depth of the sample. A gold nanobead (1) is localized in this plan and the shape of the intensity of the field scattered by other beads at other depths (2 and 3) is visible. d: Intensity  $|\tilde{H}(k_x, k_y)|$  in logarithmic scale when the sample is replaced by a diffusive paper. The area of the output pupil of the objective is sharply defined. The white-dotted circle shows the mask of the numerical filter used for the reconstruction.

and  $14\mu\text{m}$  in the axial direction as expected for the Point Spread Function associated with our microscope objective [34, 35]. In order to reach a sub-pixel size resolution, the intensity is fitted by a Gaussian curve in  $X$  and  $Y$  using the pixel for which the intensity is maximum and the two adjacent pixels. As the intensity profile in  $Z$  is not gaussian and 10 times larger than in  $X$  and  $Y$ , we fit the maximum of the peak with a parabola using the pixel  $i$  for which the intensity is maximum and the two adjacent pixels  $i - 2$  and  $i + 2$  (Fig. 3(d)). We chose this simple localization method because programming a more elaborate fit, as T-Matrix theory based computation [9], with CUDA (programming language of the graphic card) is more complicated and would considerably slow down the process. Our method shows good performance (see Fig. 4 and Fig. 5), but a better resolution may be achieved using T-Matrix theory.

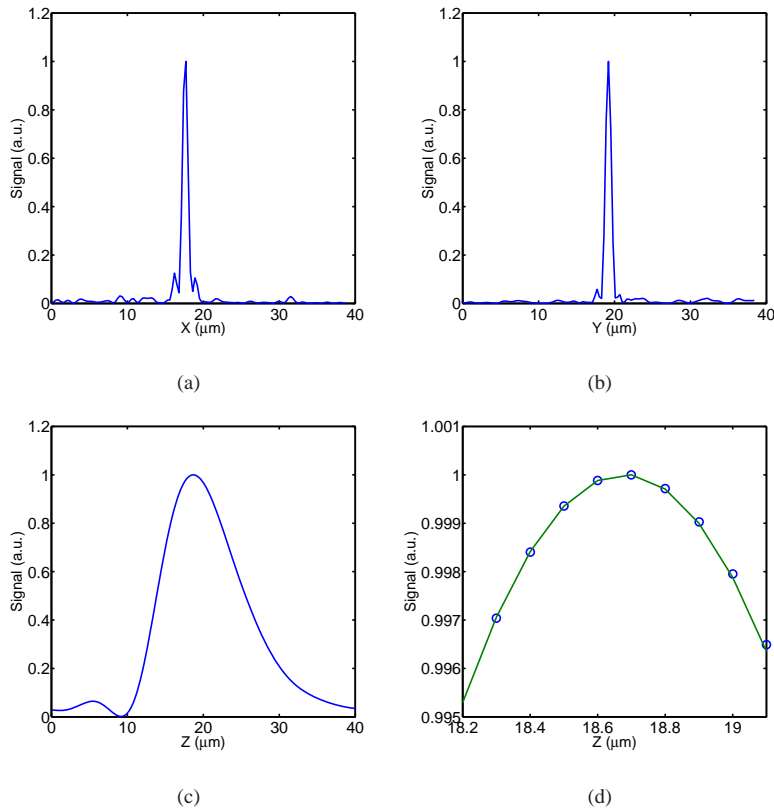


Fig. 3. PSF of the field's intensity for a 100nm nanobead, (a) in  $X$ , (b)  $Y$ , (c) and in the  $Z$  direction. (d) shows the top of the curve (c) (blue points) and the polynomial fit (green solid line).

## 4. Results

### 4.1. Embedded particles in a gel

To evaluate the lateral and axial localization accuracy of our setup, we localize a single 100 nm diameter gold particle embedded in a 1% agarose gel. The localization accuracy is evaluated by calculating the standard deviation of 200 positions of the bead obtained from successive frames, with an exposure time for each frame  $\delta t = 1$  ms. For a particle in the focal plane of the objective, we found a lateral localization accuracy of  $\sim 3$  nm and an axial localization accuracy of  $\sim 150$  nm (Fig. 4(a) and 4(b)). Then the distance between the particle and the focal plane was increased by steps of  $20 \mu\text{m}$ . For each step we recorded 200 holograms and determined the mean position of the bead as well as the lateral and axial accuracy. The Fig. 5 compares the mean axial position of the particle with the mechanical displacement along  $Z$  of the sample, which are in excellent agreement. The localization accuracy in  $X, Y$  and  $Z$  as a function of the axial position of the bead is shown in Fig. 4(a) and 4(b). While the lateral accuracy is constant ( $\sim 3$  nm) for  $|Z| < 250$  nm, the axial accuracy slightly depends on  $Z$ . It is about  $\sim 150$  nm around  $Z = 0$ , then decreases to  $\sim 70$  nm for  $|Z| < 250$  nm. This accuracy strongly increases for  $|Z| > 250 \mu\text{m}$ , and for  $Z > 400 \mu\text{m}$ , the localization of the particle is not possible because the scattered signal level reaches the noise level. The local maximum at  $Z = 0$  observed on the

axial accuracy curve (Fig. 4(b)) shows that the localization is not optimal when the gold particle is the focal plane of the objective. In this case the particle is imaged on a small area of the CCD chip, so that the interference pattern spreads on a small number of pixels, which degrades the quality of the reconstruction [36].

In the case of particle tracking, the position of the focal plane in the sample has to be fixed. To minimize the spherical aberrations due to the presence of the coverslip, the focal plane should coincide with the sample-coverslip interface. In this configuration, a moving particle cannot cross the focal plane, so that the localization accuracy remains optimal and constant over a depth of  $250\ \mu\text{m}$ , that corresponds to the part between abscissa 0 and abscissa 250 in Fig. 4(a) and 4(b). Yet tracking particles remains possible when the focal plane is set above the sample-coverslip interface as demonstrated below, as the cost of a slightly worse axial localization accuracy.

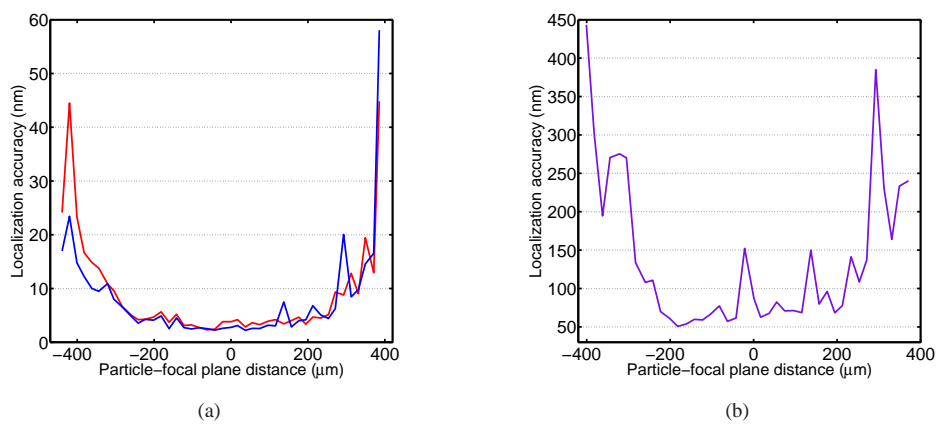


Fig. 4. Localization accuracy as a function of the distance between the bead and the focal plane. (a) Lateral localization accuracy in  $X$  (blue line) and  $Y$  (red line). (b) Axial localization accuracy.

#### 4.2. Particles in Brownian motion

We now consider gold particles in Brownian motion. According to the Stokes-Einstein equation, the diffusion coefficient  $D$  of the particles is given by:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} = 4.2 \pm 0.2\ \mu\text{m}^2\ \text{s}^{-1}, \quad (7)$$

where  $k_B$  is the Boltzmann constant,  $T$  the room temperature ( $20^\circ\text{C}$ ),  $\eta$  the viscosity of water ( $1.0\ \text{mPa}\cdot\text{s}$  at  $20^\circ\text{C}$ ) and  $r = 50 \pm 2\ \text{nm}$  the radius of the nanobead (size dispersity given by the provider BBInternational). The exposure time is  $\delta t = 1\ \text{ms}$  and the time between two frames  $\Delta t = 44\ \text{ms}$ . The mean distance traveled along one direction by a Brownian particle during  $\delta t$  is  $90\ \text{nm}$ , which is smaller than the lateral size of the magnified pixels ( $160\ \text{nm}$ ). Consequently, the signal from a particle is not blurred over several pixels during  $\delta t$ . The mean distance covered along a given axis during  $\Delta t$  is  $620\ \text{nm}$ , which corresponds to approximately 5 pixels.

As shown in Fig. 6, our method allows us to simultaneously track several particles. A volume of  $80 \times 80 \times 250\ \mu\text{m}$  ( $X \times Y \times Z$ ), i.e.  $512 \times 512 \times 400$  pixels, can be reconstructed from a single hologram, and the localization method described in the section 3.2 can be performed to localize

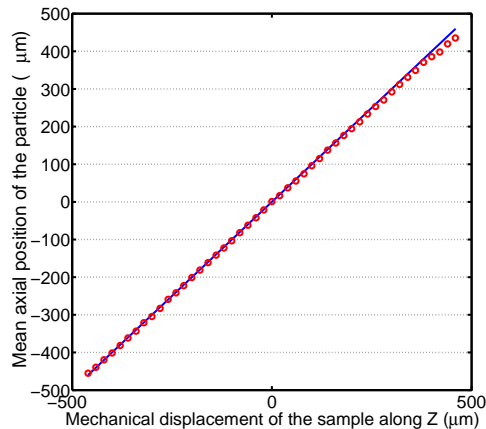


Fig. 5. Mean axial position of an embedded particle, estimated using the reconstruction algorithm, as a function of the mechanical displacement of the sample along  $Z$ .

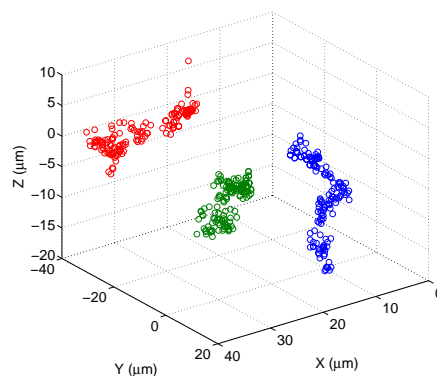


Fig. 6. 3D trajectories of 3 particles (red, green, blue) reconstructed from 200 successive frames. The focal plane ( $Z = 0$ ) was set at about  $150\ \mu\text{m}$  above the coverslip. Although this setting is not optimal for tracking a particle diffusing around the focal plane, as explained in section 4.1, trajectory reconstruction is still possible (red trajectory).

several beads with a sub-pixel accuracy. By repeating the algorithm for successive frames, we could for instance reconstruct the trajectories of 3 gold particles diffusing in water (Fig. 6). We were able to track particles during up to 10 s ( $\sim 200$  frames). Since the time needed to reconstruct a volume of  $512 \times 512 \times 400$  pixels is about 0.5 s (i.e. much larger than  $\Delta t = 44$  ms), reconstruction is necessarily a post-processing process in this case.

In contrast, when a single particle is tracked, 3D localization in a given frame requires to reconstruct only a few slices around the position of the particle in the previous frame. For a 100 nm particle, the mean distance traveled along  $Z$  during  $\Delta t$  is  $\sim 600$  nm, thus only 24 reconstructions (12 reconstructions above/below the previous position of the particle) are sufficient to find the new position of the particle. The calculation of these 24 slices from the hologram requires 33 ms, which is smaller than  $\Delta t = 44$  ms. Real-time tracking is thus possible for a single particle under the condition that reconstruction is performed fast enough, for instance by using

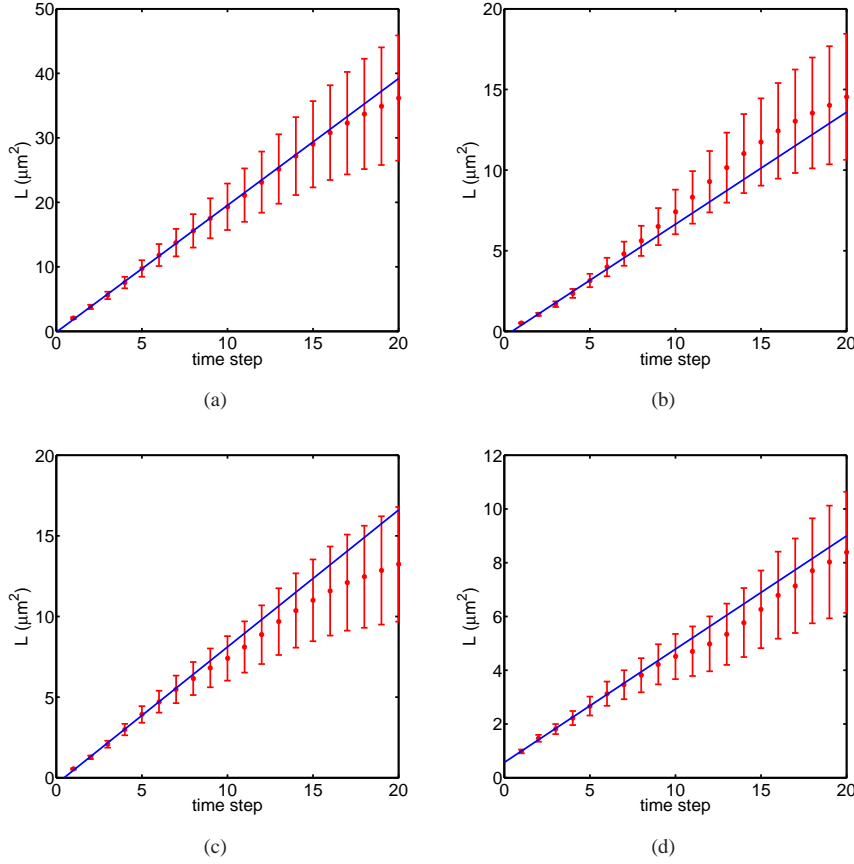


Fig. 7. Mean Square Displacement curves derived from the trajectory of a nanoparticle in Brownian motion (200 points, time step  $\Delta t = 44$  ms). (a) 3D MSD, (b) MSD along X, (c) MSD along Y and (d) MSD along Z. Blue line: linear fit over the first 6 points of the MSD.

a graphic card unit as described above.

To evidence the Brownian motion, we calculated the 3D Mean Square Displacement (MSD) of a bead from the red trajectory plotted in Fig. 6:

$$\text{MSD}(n \cdot \Delta t) = \frac{1}{N-n} \left( \sum_{i=1}^{n-N} (x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2 + (z_{i+n} - z_i)^2 \right), \quad (8)$$

where  $N = 200$  is the total number of positions, as well as the 1D MSD along the directions X, Y, and Z. For a Brownian motion with a diffusion constant  $D$ , the MSD curve depends linearly on time, and the slope of the curve is  $2^{n_d} D$ , where  $n_d = 3$  for the 3D MSD (Fig. 7(a)) and  $n_d = 1$  for 1D MSD (Fig. 7(b), (c) and (d)). As expected for a Brownian motion, experimental 3D and 1D MSD depend linearly on time, and a fit of the first six points of the curves gives  $D = 4.3 \pm 0.5 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  along X,  $D = 5.0 \pm 0.3 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  along Y,  $D = 2.9 \pm 0.5 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  along Z and  $D = 4.1 \pm 0.5 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  for the 3D motion. These values are in agreement with the theoretical value  $D = 4.2 \pm 0.2 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  predicted by Eq. (7).

## 5. Conclusion

In this paper, we show that Digital Holographic Microscopy can be used to track  $d = 100$  nm gold particles diffusing in water. As the intensity of the light scattered by such nanoparticles is height orders of magnitude smaller than that of the excitation light, we combined holography to standing wave free dark-field microscopy to completely block the illumination beam, thereby preventing a saturation of the CCD chip of the camera. A single hologram, recorded with an exposure time of only 1 ms, is sufficient to localize several particles in a  $250 \mu\text{m}$  thick sample, with a lateral ( $x, y$ ) localization accuracy of  $\sim 3$  nm and an axial ( $z$ ) localization accuracy of  $\sim 70$  nm. As our dark field microscope involves a NA=0.5 reflecting microscope objective, the resolution, especially in  $z$ , obtained here with nanoparticles ( $d = 100$  nm), is lower than the resolution reached in in-line holography using a NA=1.4 objective and micron-sized objects ( $d = 1.5 \mu\text{m}$ ) [10]. This is the cost to pay for the detection of nanometer-sized particles. We were able to reconstruct particle trajectories, evidence the Brownian nature of the motion and determine the related diffusion coefficient. The accuracy achieved by our setup is comparable with that reached with super-resolution microscopy: a localization accuracy of 20 nm in X and Y, and 50 nm in Z has been reported for fluorescence dye or quantum dots imaged with STORM microscopy using optical astigmatism [1], and an accuracy of 10 nm over a depth of  $2 \mu\text{m}$  has been reached using a double helix PSF [3]. Several results of 3D tracking of quantum dots using PALM microscopy report an axial accuracy between 10 and 75 nm, over a depth of typically  $1 \mu\text{m}$  [4, 5]. PALM and STORM microscopy reach higher 3D localization accuracies than our DHM setup, but over a depth two order of magnitude lower. This ability to track nanoparticles up to  $250 \mu\text{m}$  from the focal plane with a constant localization accuracy is the strength of DHM compare to super-resolution techniques. Our results pave the way for the use of gold nanobeads as markers in more complex media such as cellular environment.

## Acknowledgments

This work was supported by funds from the French National Research Agency (ANR SIMI 10 and ANR 3D BROM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and École normale supérieure (ENS). The authors thank Mathieu Coppey, Fred Etoc and Jasmina Dikic for their suggestions and careful reading.

# Video-rate laser Doppler vibrometry by heterodyne holography

Benjamin Samson,<sup>1</sup> Frédéric Verpillat,<sup>2</sup> Michel Gross,<sup>3</sup> and Michael Atlan<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut Langevin, Fondation Pierre-Gilles de Gennes, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7587, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U 979, Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Université Paris 7, École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles—10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

<sup>2</sup>Laboratoire Kastler-Brossel, École Normale Supérieure, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 8552, UPMC, 24 rue Lhomond, 75005 Paris, France

<sup>3</sup>Laboratoire Charles Coulomb, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5221, Université Montpellier 2, Place E. Bataillon, 34000 Montpellier, France

\*Corresponding author: [atlan@optique.espci.fr](mailto:atlan@optique.espci.fr)

Received January 21, 2011; revised March 17, 2011; accepted March 17, 2011; posted March 22, 2011 (Doc. ID 141329); published April 14, 2011

We report a demonstration video-rate heterodyne holography in off-axis configuration. Reconstruction and display of a one megapixel hologram is achieved at 24 frames per second, with a graphics processing unit. Our claims are validated with real-time screening of steady-state vibration amplitudes in a wide-field, noncontact vibrometry experiment. © 2011 Optical Society of America  
OCIS codes: 090.1995, 280.3340.

The laser Doppler method is the most common optical interferometry technique used for noncontact measurements of mechanical vibrations. Though highly effective for single-point vibration analysis, this technique is much less adapted to wide-field imaging than holography. Homodyne [1–3] and heterodyne [4–6] holographic recordings in off-axis configuration enabled reliable measurements of mechanical vibrations, but none of them allowed real-time monitoring, which is an essential feature. Matching the display rate of optically measured megapixel digital holograms with real-time imaging standards is demanding in terms of computational power. Holographic measurements are performed in a diffraction plane. Hence, image formation requires to simulate the back propagation of an optical field. Such propagation involves turning the data measured in the plane of an array detector into a reciprocal plane with at least one bi-dimensional numerical Fourier transformation, typically a fast Fourier transform (FFT). Recently, the real-time display of digital holograms with graphics processing units (GPUs) [7,8] has alleviated the issue of the high computational workload needed for such image reconstruction. Parallel computations on the GPU consistently increase the throughput with respect to CPUs for computer-generated holograms, which demonstrated the performance of GPUs in streamline image processing [9,10].

In this Letter, we report an experimental demonstration of an image acquisition scheme designed to perform video-rate image reconstruction and display from heterodyne holographic measurements on a one megapixel sensor array. Image reconstruction of steady-state vibration modes of up to 100 kHz at a rate of 24 images per second is achieved. GPU processing is shown to enable holographic reconstruction and display with three FFT calculations per recorded frame, which covers the processing throughput needs of three reconstruction approaches: the convolution, angular spectrum, and Fresnel transform methods [11].

The acquisition setup consists of an off-axis, frequency-shifting holographic scheme used to perform a multipixel heterodyne detection of optical modulation sidebands. Optical heterodyning is a process for placing information at frequencies of interest (e.g., the mechanical vibration of an object under investigation) into a useful frequency range by mixing the frequency content of the probe beam with a reference (or local oscillator, LO) beam. The optical frequency of the reference beam is shifted to generate a beat frequency of the interference pattern within the sensor bandwidth, which carries the information at the original frequency of interest. The Mach-Zehnder heterodyne interferometer used for the detection of an object field  $E$  in reflective geometry, beating against a LO field  $E_{LO}$ , is sketched in Fig. 1. The main optical radiation field is provided by a 100 mW, single-mode, doubled Nd:YAG laser (Oxxius SLIM 532) at wavelength  $\lambda = 532$  nm, and optical frequency  $\omega_L/(2\pi) = 5.6 \times 10^{14}$  Hz. The optical frequency of the LO beam is shifted by an arbitrary quantity  $\Delta\omega$ , in the low radiofrequency (RF) range ( $0 \text{ Hz} \leq \Delta\omega/(2\pi) \leq 100$  kHz) by two acousto-optic modulators (AA-electronics, MT80-A1.5-VIS). The LO field has the form  $E_{LO} = \mathcal{E}_{LO} e^{i(\omega_L + \Delta\omega)t}$ , where  $\mathcal{E}_{LO}$  is its complex amplitude. The object studied is a sheet of paper, whose lateral dimensions are  $9 \times 26$  mm, shined over  $9 \times 17$  mm. It is attached to a

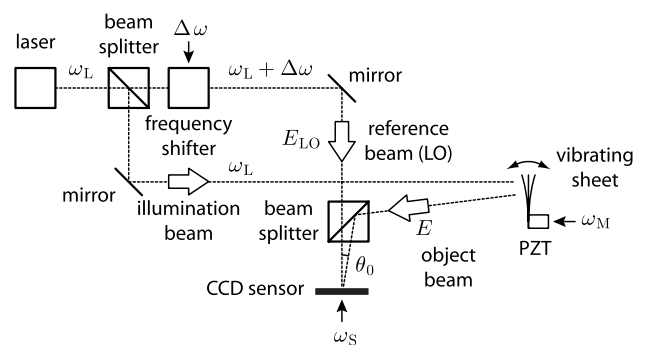


Fig. 1. Experimental image acquisition setup.



piezo-electric transducer (Thorlabs AE0505D08F), vibrating sinusoidally, driven at 10 V. Its local out of plane vibration  $z(t) = z_{\max} \sin(\omega_M t)$ , where  $z_{\max}$  is the vibration amplitude, provokes a modulation of the optical path length of the object field. It induces a local optical phase modulation of the backscattered field at the mechanical vibration frequency  $\phi(t) = \phi_0 \sin(\omega_M t)$ , where  $\phi_0 = 4\pi z_{\max}/\lambda$  is the modulation depth of the optical phase. Holographic analysis of objects in sinusoidal vibration with a frequency-shifted LO beam tuned to the  $n$ th optical modulation sideband was carried-out extensively in [4]. The frequency filtering properties of time-averaged holography were introduced in [1]. The same filtering properties were described in digital holography [12,13]. It was shown that holograms of optical sidebands could be recorded selectively by matching the frequency shift of the LO beam with the frequency of the band of interest. In the case of sinusoidal phase modulation, the hologram amplitude is of the form  $J_n(\phi_0)$ , where  $J_n$  is the  $n$ th order Bessel function of the first kind. This modulation yields fringes that correspond to local extrema of  $J_n$ . It was also shown that imaging at harmonics of the vibration frequency could enable robust assessment of vibration amplitudes, which are much greater than the optical wavelength [6]. The interference pattern  $I$  is measured with a Pike F421-B camera on a Kodak KAI-04022 interline, progressive-scan CCD sensor ( $2048 \times 2048$  pixels, pixel size  $d_{\text{px}} = 7.4 \mu\text{m}$ ). The camera is run in binning mode (an effective pixel is made of four adjacent pixels); 16bit,  $1024 \times 1024$  pixels images are sampled at  $\omega_S/(2\pi) = 24\text{Hz}$  throughout the experiments described hereafter. The RF command signals at frequencies  $\Delta\omega$ ,  $\omega_M$ , and  $\omega_S$  are phase locked. The temporal part of the object field undergoing sinusoidal phase modulation can be decomposed in a basis of Bessel functions using the Jacobi–Anger identity

$$E = \mathcal{E} e^{i\omega_L t + i\phi(t)} = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \mathcal{E} J_n(\phi_0) e^{i(\omega_L + n\omega_M)t}, \quad (1)$$

where  $\mathcal{E} J_n(\phi_0) = \mathcal{E}_n$  is the weight of the optical modulation sideband of order  $n$ , and  $\mathcal{E}$  is the complex amplitude of the field. If the frequency detuning  $\Delta\omega$  is set close to the  $n$ th modulation harmonic, i.e.,  $|\Delta\omega - n\omega_M| < \omega_S$ , and if the modulation frequency is much greater than the sampling frequency, i.e.,  $\omega_M \gg \omega_S$ , the time-averaging-induced bandpass filter of the detection process will isolate the term of order  $n$  in Eq. (1) and reject all other optical sidebands. In the sensor plane, the interference pattern of  $E$  and  $E_{\text{LO}}$  takes the form  $I(t) = |E + E_{\text{LO}}|^2 = |E|^2 + |E_{\text{LO}}|^2 + EE_{\text{LO}}^* + E^*E_{\text{LO}}$ , where  $*$  denotes the complex conjugate. The frame  $I(t)$  acquired at time  $t$  by the framegrabber is moved to a frame buffer in the GPU random-access memory by a CPU thread (Fig. 2).

To detect the heterodyne signal of interest  $EE_{\text{LO}}^* = \mathcal{E}_{\text{LO}}^* \mathcal{E}_n e^{i(n\omega_M - \Delta\omega)t}$ , a sliding four-phase temporal demodulation is performed. The intermediate frequency  $n\omega_M - \Delta\omega$  is set within the camera bandwidth to be sampled efficiently. More precisely, for an LO detuning  $\Delta\omega = n\omega_M - \omega_S/4$ , the modulation sideband  $\mathcal{E}_n$  beats at the frequency  $\omega_S/4$  (6 Hz) in  $I(t)$ . To detect it, the following quantity is formed

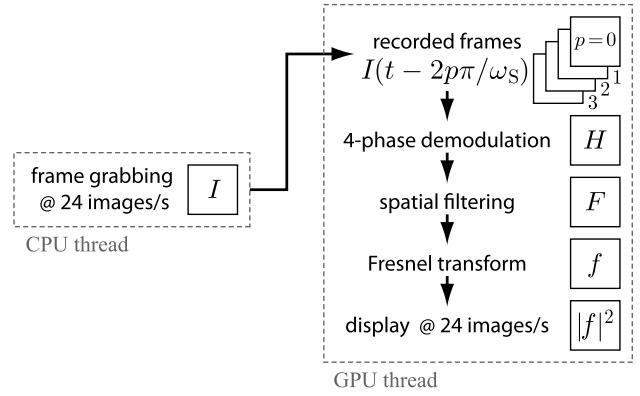


Fig. 2. Algorithmic layout of holographic rendering.

$$H(t) = \sum_{p=0}^3 I(t - 2p\pi/\omega_S) e^{ip\pi/2}. \quad (2)$$

$H$  is a complex-valued array, proportional to the diffracted field  $E$  in the sensor plane. Its calculation requires the allocation of a stack of four arrays in the GPU memory, filled with  $I(t)$ ,  $I(t - 2\pi/\omega_S)$ ,  $I(t - 4\pi/\omega_S)$ , and  $I(t - 6\pi/\omega_S)$ . Each new frame grabbed at instant  $t$ , yields a shift of the stack (Fig. 2):  $I(t)$  replaces the array  $I(t - 8\pi/\omega_S)$ .

In off-axis configuration, the spatial spectrum in the reciprocal plane  $(k_x, k_y)$  of the term  $EE_{\text{LO}}^*$  in the expression of  $I(t)$  is shifted by the projection of the wave vector difference along a transverse direction  $x$  in the sensor plane  $\Delta k_x \sim 2i\pi\theta_0/\lambda$ . Spatial filtering [14] of the time-demodulated signal  $H(t)$  in off-axis geometry is used to remove the remaining contributions of the zero-order terms  $|E|^2$  and  $|E_{\text{LO}}|^2$  and the twin-image term  $E^*E_{\text{LO}}$  to enhance the detection sensitivity. It is made by multiplying the  $(k_x, k_y)$  spectrum of  $H$  by a mask  $M$ , allowing only frequencies in the neighborhood of  $\Delta k$  to pass.

$$F(t) = \mathcal{F}^{-1}\{M\mathcal{F}\{H(t)\}\}, \quad (3)$$

where  $\mathcal{F}$  is a spatial FFT and  $\mathcal{F}^{-1}$  is an inverse spatial FFT. This operation is handled by the GPU. Only the heterodyne contribution of interest  $F(t) = \mathcal{E}_{\text{LO}}^* \mathcal{E}_n$  remains in the filtered frame.

Image rendering from  $F \propto \mathcal{E}_n$  in the sensor plane involves a scalar diffraction calculation in the Fresnel approximation, performed with a discrete Fresnel transform [15]. The hologram  $f(t)$  back propagated to the object plane is calculated by forming the FFT of the product of  $F$  with a quadratic phase map, depending on the relative curvature of the wavefronts of  $E$  and  $E_{\text{LO}}$  in the sensor plane  $(x, y)$  via a distance parameter  $\Delta z$ . This calculation is handled by the GPU.

$$f(t) = \mathcal{F}\{F(t) e^{i\pi(x^2+y^2)/(\lambda\Delta z)}\}. \quad (4)$$

Finally, the GPU calculates the quantity  $|f(t)|^2 \propto |J_n(4\pi z_{\max}/\lambda)|^2$ , which is a map in the object plane of the composition of the local vibration amplitude field  $z_{\max}$ , with the squared amplitude of the Bessel function of order  $n$ . Image brightness adjustment is also performed by the GPU. Those maps are displayed in Fig. 3



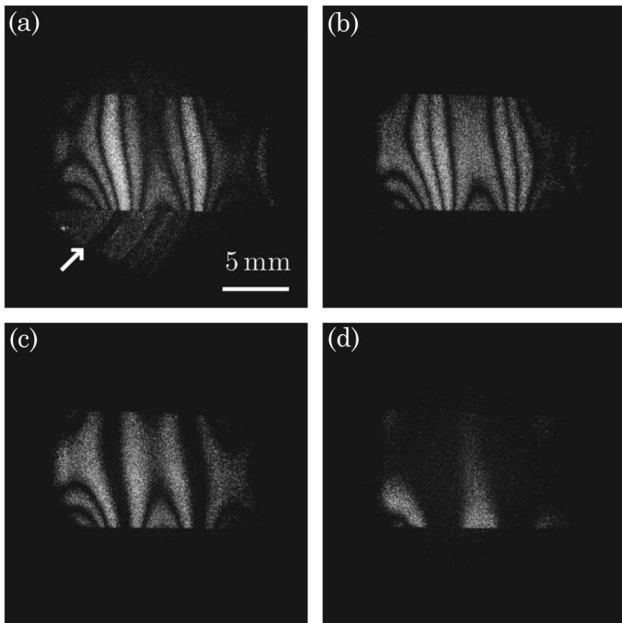


Fig. 3. Time-averaged holographic maps of the  $\omega_M/(2\pi) = 10$  kHz vibrational mode of the paper sheet for the modulation sidebands of order (a)  $n = 0$ , (b)  $n = 1$ , (c)  $n = 3$ , and (d)  $n = 7$   $1024 \times 1024$  pixels renderings. The detection sideband sweep is reported in Media 1. The first modulation sideband is screened for excitation frequencies swept from 0 to 20 kHz in Media 2 and from 0 to 100 kHz in Media 3. The effect of the Eq. (3) filter is reported in Media 4.

for the modulation sidebands of order  $n = 0$  [Fig. 3(a)],  $n = 1$  [Fig. 3(b)],  $n = 3$  [Fig. 3(c)], and  $n = 7$  [Fig. 3(d)]. Excited at  $\omega_M/(2\pi) = 10$  kHz, the paper sheet builds up a steady-state vibrational mode with rectilinear nodes and bellies oriented along  $y$ , with a mechanical wavelength of  $\sim 5$  mm. In Fig. 3(a), the nonmoving support of the object in vibration is visible (arrow). A sweep of the detection sideband is reported in Media 1. Additional vibrational patterns are screened for excitation frequencies swept from 0 to 20 kHz (Media 2) and from 0 to 100 kHz (Media 3), with a detection tuned to the first modulation sideband. The propensity of the filter of Eq. (3) to cancel-out spurious artefacts is assessed in real time in Media 4.

The image reconstruction and display algorithm was elaborated with Microsoft Visual C++ 2008 integrated development environment and NVIDIA's Compute Unified Device Architecture software development kit 3.2. FFT calculations were made with the function `cufftExecC2C0` from the CUFFT 3.2 library on single precision floating point arrays. The program was compiled and run on Microsoft Windows 7-64 bit. The computer hardware configuration was based on an ASUS P6T motherboard with a 2.67 GHz Intel core i7 920 CPU and a NVIDIA Ge-

Table 1. Benchmarks of Image Rendering Time

Array Size (pixels)	Time
$1024 \times 1024$	5.5–5.9 ms
$2048 \times 2048$	19.7–20.4 ms

Force GTX 470 GPU. Image rendering calculations  $I \rightarrow H \rightarrow F \rightarrow |f|^2$  are performed sequentially, in the main GPU thread (Fig. 2); the whole processing time of one frame is reported in Table 1. For benchmark purposes, the rendering performance of  $2048 \times 2048$  pixels recordings read out at  $\omega_S/(2\pi) = 8$  Hz is also reported in Table 1.

We have demonstrated that the detection and rendering of one megapixel heterodyne holograms can be carried-out with a refreshment rate of 24 Hz with commodity computer graphics hardware. Video-rate optical monitoring of steady-state out-of-plane vibration amplitudes was reported. This demonstration opens the way to high throughput multipixel optical heterodyne sensing in real time.

This work was funded by the Fondation Pierre-Gilles de Gennes (grant FPGG014), the Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-09-JCJC-0113), and the Région Île-de-France (C'Nano grant).

## References

1. R. L. Powell and K. A. Stetson, *J. Opt. Soc. Am.* **55**, 1593 (1965).
2. P. Picart, E. Moisson, and D. Mounier, *Appl. Opt.* **42**, 1947 (2003).
3. G. Pedrini, W. Osten, and M. E. Gusev, *Appl. Opt.* **45**, 3456 (2006).
4. C. C. Aleksoff, *Appl. Opt.* **10**, 1329 (1971).
5. F. Joud, F. Laloë, M. Atlan, J. Hare, and M. Gross, *Opt. Express* **17**, 2774 (2009).
6. F. Joud, F. Verpillat, F. Laloë, M. Atlan, J. Hare, and M. Gross, *Opt. Lett.* **34**, 3698 (2009).
7. T. Shimobaba, Y. Sato, J. Miura, M. Takenouchi, and T. Ito, *Opt. Express* **16**, 11776 (2008).
8. L. Ahrenberg, A. J. Page, B. M. Hennelly, J. B. McDonald, and T. J. Naughton, *J. Display Technol.* **5**, 111 (2009).
9. L. Ahrenberg, P. Benzie, M. Magnor, and J. Watson, *Opt. Express* **14**, 7636 (2006).
10. N. Masuda, T. Ito, T. Tanaka, A. Shiraki, and T. Sugie, *Opt. Express* **14**, 603 (2006).
11. M. K. Kim, L. Yu, and C. J. Mann, *J. Opt. A* **8**, S518 (2006).
12. P. Picart, J. Leval, D. Mounier, and S. Gougeon, *Opt. Lett.* **28**, 1900 (2003).
13. M. Atlan and M. Gross, *J. Opt. Soc. Am. A* **24**, 2701 (2007).
14. E. Cuche, P. Marquet, and C. Depeursinge, *Appl. Opt.* **39**, 4070 (2000).
15. U. Schnars, *J. Opt. Soc. Am. A* **11**, 2011 (1994).

# Digital Holography at Shot Noise Level

Frédéric Verpillat, Fadwa Joud, Michael Atlan, and Michel Gross

(Invited Paper)

**Abstract**—By a proper arrangement of a digital holography setup, that combines off-axis geometry with phase-shifting recording conditions, it is possible to reach the theoretical shot noise limit, in real-time experiments. We studied this limit, and we show that it corresponds to 1 photo-electron per pixel within the whole frame sequence that is used to reconstruct the holographic image. We also show that Monte Carlo noise synthesis onto holograms measured at high illumination levels enables accurate representation of the experimental holograms measured at very weak illumination levels. An experimental validation of these results is done.

**Index Terms**—[Author, please supply your own keywords.].

## I. INTRODUCTION

**D**EMONSTRATED by Gabor [1] in the early 1950s, the purpose of holography is to record, on a 2D detector, the phase and the amplitude of the radiation field scattered from an object under coherent illumination. The photographic film used in conventional holography is replaced by a 2D electronic detection in digital holography [2], enabling quantitative numerical analysis. Digital holography has been waiting for the recent development of computer and video technology to be experimentally demonstrated [3]. The main advantage of digital holography is that, contrary to holography with photographic plates [1], the holograms are recorded by a photodetector array, such as a charge-couple device (CCD) camera, and the image is digitally reconstructed by a computer, avoiding photographic processing [4].

Off-axis holography [5] is the oldest configuration adapted to digital holography [3], [6], [7]. In off-axis digital holography, as well as in photographic plate holography, the reference beam is angularly tilted with respect to the object observation axis. It is then possible to record, with a single hologram, the two quadratures of the object's complex field. However, the object field of view is reduced, since one must avoid the overlapping

of the image with the conjugate image alias [8]. Phase-shifting digital holography, which has been introduced later [9], records several images with a different phase for the reference beam. It is then possible to obtain the two quadratures of the field in an in-line configuration even though the conjugate image alias and the true image overlap, because aliases can be removed by taking image differences.

With the development of CCD camera technologies, digital holography became a fast-growing research field that has drawn increasing attention [10], [11]. Off-axis holography has been applied recently to particle [12] polarization [13], phase contrast [14], synthetic aperture [15], low-coherence [16], [17] photothermal [18], and microscopic [17], [19]–[21] imaging. Phase-shifting holography has been applied to 3D [22], [23], color [24], synthetic aperture [25], low-coherence [26], surface shape [27], photothermal [18], and microscopic [20]–[22], [28] imaging.

We have developed an alternative phase-shifting digital holography technique that uses a frequency shift of the reference beam to continuously shift the phase of the recorded interference pattern [29]. One of the advantages of our setup is its ability to provide accurate phase shifts that allow to suppress twin images aliases [30]. More generally, our setup can be viewed as a multi-pixel heterodyne detector that is able of recording the complex amplitude of the signal electromagnetic field  $\mathcal{E}$  in all pixels of the CCD camera in parallel. We get then the map of the field over the CCD pixels (i.e.  $\mathcal{E}(x, y)$  where  $x$  and  $y$  are the pixels coordinate). Since the field is measured on all pixels at the same time, the relative phase that is measured for different locations  $(x, y)$  is meaningful. This means that the field map  $\mathcal{E}(x, y)$  is a hologram that can be used to reconstruct the field  $\mathcal{E}$  at any location along the free-space optical propagation axis, in particular in the object plane.

Our heterodyne holographic setup has been used to perform holographic [29], and synthetic aperture [25] imaging. We have also demonstrated that our heterodyne technique used in an off-axis holographic configuration is capable of recording holograms with optimal sensitivity [31]. This means that it is possible to fully filter-off technical noise sources, that are related to the reference beam (i.e. to the zeroth-order image [32]), reaching thus, without any experimental effort, the quantum limit of noise of one photo electron per reconstructed pixel during the whole measurement time.

In the present paper we will discuss on noise in digital holography, and we will try to determine what is the ultimate noise limit both theoretically, and in actual holographic experiments in real-time. We will see that, in the theoretical ideal case, the limiting noise is the Shot Noise on the holographic reference beam. In reference to heterodyne detection, we also refer to the

Manuscript received October 06, 2009; revised February 02, 2010; accepted February 04, 2010. This work was supported by ANR (ANR-05-NANO\_031: “3D NanoBioCell” grant), and C’Nano Ile de France (“HoloHetero” grant).

F. Verpillat, F. Joud and M. Gross are with the Laboratoire Kastler Brossel, École Normale Supérieure, UMR 8552, UPMC, CNRS 75231 Paris Cedex 05; France (e-mail: frederic.verpillat@lkb.ens.fr; fadwa.joud@lkb.ens.fr; michel.gross@lkb.ens.fr).

M. Atlan is with the Fondation Pierre-Gilles de Gennes & Institut Langevin: UMR 7587 CNRS INSERM, ESPCI ParisTech, Université Paris 6, Université Paris 7, 75 231 Paris Cedex 05, France (e-mail: atlan@optique.espci.fr).

Color versions of one or more of the figures in this paper are available online at <http://ieeexplore.ieee.org>.

Digital Object Identifier 10.1109/JDT.2010.2044366

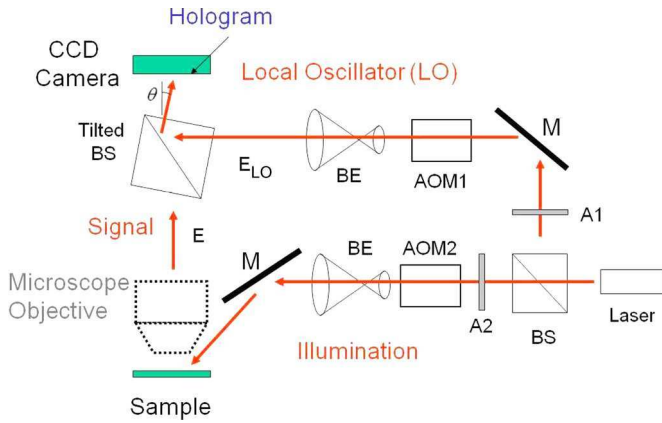


Fig. 1. Digital holography setup. AOM1 and AOM2: Acousto-optic modulators; BS: Beam splitter; BE: Beam expander; M: Mirror; A1 and A2: Attenuator;  $\theta$ : Tilt angle of the beam splitter with respect to optical axis.

reference beam as local oscillator (LO). We will see that the ultimate theoretical limiting noise can be reached in real time holographic experiments, by combining the two families of digital holography setups i.e. phase-shifting and off-axis. This combination enables to fully filter-off technical noises, mainly due to LO beam fluctuations in low-light conditions, opening the way to holography with ultimate sensitivity [31], [33].

## II. OFF-AXIS + PHASE-SHIFTING HOLOGRAPHY

In order to discuss on noise limits in digital holography, we first need to give some general information on holography principles. We will thus describe here a typical digital holographic setup, how the holographic information is obtained from recorded CCD images, and how this information is used to reconstruct holographic images in different reconstruction planes. We will consider here the case of an off-axis + phase-shifting holographic setup, able to reach the ultimate noise limit, in low-light imaging conditions, in real time.

### A. The Off-Axis + Phase Shifting Holography Setup

The holographic setup used in the following discussion, is presented on Fig. 1. We have considered here, a reflection configuration, but the discussion will be the same in case of transmission configuration.

The main optical beam (complex field  $E_L$ , optical angular frequency  $\omega_L$ ) is provided by a Sanyo (DL-7147-201) diode laser ( $\lambda = 658$  nm). It is split through a 50/50 Beam Splitter (BS) into an illumination beam ( $E_I, \omega_I$ ), and a LO beam ( $E_{LO}, \omega_{LO}$ ). The illumination intensity can be reduced with grey neutral filters. Both beams go through Acousto-Optic Modulators (AOMs) (Crystal Technology,  $\omega_{aom1,2} \simeq 80$  MHz) and only the first diffraction order is kept. In the typical experiment case considered here, the modulators are adjusted for the 4-phase heterodyne detection, but other configurations are possible (8-phases, sideband detection ...). We have thus:

$$\omega_I = \omega_L + \omega_{aom2} \quad (1)$$

$$\omega_{LO} = \omega_L + \omega_{aom1} \quad (2)$$

with:

$$\omega_I - \omega_{LO} = 2\pi f_{ccd}/4 \quad (3)$$

where  $f_{ccd}$  is the acquisition frame rate of the CCD (typically 12.5 Hz).

The beams outgoing from the AOMs are expanded by Beam Expanders BEs. The illumination beam is pointed towards the object studied. The reflected radiation ( $E, \omega = \omega_I$ ) and the LO beam are combined with a beam splitter, which is angularly tilted by typically  $1^\circ$ , in order to be in an Off-Axis holographic configuration. Light can be collected with an objective for microscopic imaging. Interferences between reflected light and LO are recorded with a digital camera (PCO Pixelfly):  $f_{ccd} = 12.5$  Hz,  $1280 \times 1024$  pixels of  $6.7 \times 6.7 \mu\text{m}$ , 12-bit.

We can notice that our Off-axis + Phase-Shifting (OPS) holographic setup, presented here, exhibits several advantages. Since we use AOMs, the amplitude, phase and frequency of both illumination and LO beams can be fully controlled. The phase errors in phase-shifting holography can thus be highly reduced [30]. By playing with the LO beam frequency, it is possible to get holographic images at sideband frequencies of a vibrating object [34], [35], or to get Laser Doppler images of a flow [36], and image by the way blood flow, in vivo [37]–[39]. The OPS holographic setup can also be used as a multi-pixel heterodyne detector able to detect, with a quite large optical étendue (product of a beam solid angular divergence by the beam area) the light scattered by a sample, and to analyze its frequency spectrum [40], [41]. This detector can be used to detect photons that are frequency shifted by an ultrasonic wave [42], [43] in order to perform Ultrasound-modulated optical tomography [44]–[49].

The OPS setup benefits of another major advantage. By recording several holograms with different phases (since we do phase shifting), we perform heterodyne detection. We benefit thus on heterodyne gain. Moreover, since the heterodyne detector is multi-pixels, it is possible to combine information on different pixels in order to extract the pertinent information on the object under study, while removing the unwanted technical noise of the LO beam. As we will show, because the setup is off-axis, the object pertinent information can be isolated from the LO beam noise. By this way, we can easily reach, in a real life holographic experiment, the theoretical noise limit, which is related to the Shot Noise of LO beam.

### B. Four Phases Detection

In order to resolve the object field information in quadrature in the CCD camera plane, we will consider, to simplify the discussion, the case of four phases holographic detection, which is commonly used in Phase Shifting digital holography [9].

Sequence of  $4n$  frames  $I_0$  to  $I_{4n-1}$  are recorded at 12.5 Hz. For each frame  $I_k$ , the signal on each pixel  $I_{k,p,q}$  (where  $k$  is the frame index, and  $p, q$  the pixel indexes along the  $x$  and  $y$  directions) is measured in Digital Count (DC) units between 0 and 4095 (since our camera is 12-bit). The  $1280 \times 1024$  matrix of pixels is truncated to a  $1024 \times 1024$  matrix for easier discrete Fourier calculations. For each frame  $k$  the optical signal is integrated over the acquisition time  $T = 1/f_{ccd}$ . The pixel signal  $I_{k,p,q}$  is thus defined by

$$I_{k,p,q} = \int_{t_k - T/2}^{t_k + T/2} dt \iint_{(p,q)} dx dy |E(x, y, t) + E_{LO}(x, y, t)|^2 \quad (4)$$

where  $\int \int_{(p,q)}$  represents the integral over the pixel  $(p, q)$  area, and  $t_k$  is the recording time of frame  $k$ . Introducing the complex representations  $\mathcal{E}$  and  $\mathcal{E}_{\text{LO}}$  of the fields  $E$  and  $E_{\text{LO}}$ , we get

$$E(x, y, t) = \mathcal{E}(x, y)e^{j\omega t} + c.c. \quad (5)$$

$$E_{\text{LO}}(x, y, t) = \mathcal{E}_{\text{LO}}(x, y)e^{j\omega_{\text{LO}}t} + c.c. \quad (6)$$

$$I_{k,p,q} = a^2 T (|\mathcal{E}_{p,q}|^2 + |\mathcal{E}_{\text{LO}}|^2 + \mathcal{E}_{p,q}\mathcal{E}_{\text{LO}}^* e^{j(\omega t - \omega_{\text{LO}})t_k} + c.c.) \quad (7)$$

where  $a$  is the pixel size. To simplify the notations in (7), we have considered that the LO field  $\mathcal{E}_{\text{LO}}$  is the same in all locations  $(x, y)$ , and that signal field  $\mathcal{E}_{p,q}$  does not vary within the pixel  $(p, q)$ . If  $\mathcal{E}_{\text{LO}}$  varies with location, one has to replace  $\mathcal{E}_{\text{LO}}$  by  $\mathcal{E}_{\text{LO},p,q}$  in (7).

The condition given in (3) imposed a phase shift of the LO beam equal to  $\pi/2$  from one frame to the next. Because of this shift, the complex hologram  $H$  is obtained by summing the sequence of  $4n$  frames  $I_0$  to  $I_{4n-1}$  with the appropriate phase coefficient

$$H = \sum_{k=0}^{4n-1} (j)^k I_k \quad (8)$$

where  $H$  is a matrix of pixels  $H_{p,q}$ . We get from (7)

$$H_{p,q} = \sum_{k=0}^{4n-1} (j)^k I_{k,p,q} = 4na^2 T \mathcal{E}_{p,q} \mathcal{E}_{\text{LO}}^* \quad (9)$$

The complex hologram  $H_{p,q}$  is thus proportional to the object field  $\mathcal{E}_{p,q}$  with a proportionality factor that involves the LO field amplitude  $\mathcal{E}_{\text{LO}}^*$ .

### C. Holographic Reconstruction of the Image of the Object

Many numerical methods can be used to reconstruct the image of the object. The most common is the convolution method that involves a single discrete Fourier Transform [6]. Here, we will use the angular spectrum method, which involves two Fourier transforms [25], [29], [50]. We have made this choice because this method keeps constant the pixel size in the calculation of the grid pixel size, which remains ever equal to the CCD pixel. It becomes then easier to discuss on noise, and noise density per unit of area.

The hologram  $H$  calculated in (8) is the hologram in the CCD plane ( $z = 0$ ). Knowing the complex hologram  $H(x, y, 0)$  in the CCD plane, the hologram  $H(x, y, z)$  in other planes ( $z \neq 0$ ) is calculated by propagating the reciprocal space hologram  $\tilde{H}(k_x, k_y)$ , which is obtained with a fast Fourier transform (FFT), from  $z = 0$  to  $z$

$$\tilde{H}(k_x, k_y, 0) = \text{FFT}[H(x, y, 0)] \quad (10)$$

To clarify the notation, we have replaced here  $H_{p,q}$  by  $H(x, y, 0)$  where  $x$  and  $y$  represent the coordinates of the pixel  $(p, q)$ . By this way, the coordinates of the reciprocal space hologram  $\tilde{H}$  are simply  $k_x$  and  $k_y$ . In the reciprocal space, the hologram  $\tilde{H}$  can be propagated very simply

$$\tilde{H}(k_x, k_y, z) = \tilde{H}(k_x, k_y, 0) \tilde{K}(k_x, k_y, z) \quad (11)$$

where  $\tilde{K}(k_x, k_y, z)$  is a phase matrix that describes the propagation from 0 to  $z$

$$\tilde{K}(k_x, k_y, z) = \exp\left(\frac{j\lambda z (k_x^2 + k_y^2)}{2\pi}\right). \quad (12)$$

The reconstructed image  $H(x, y, z)$  in  $z \neq 0$  is obtained then by reverse Fourier transformation

$$H(x, y, z) = \text{FFT}^{-1}\left[\tilde{H}(k_x, k_y, z)\right]. \quad (13)$$

In the following, we will see that the major source of noise is the shot noise on the LO, and we will show that this noise corresponds to an equivalent noise of 1 photon per pixel and per frame, on the signal beam. This LO noise, which corresponds to a fully developed speckle, is essentially Gaussian, each pixel being uncorrelated with the neighbor pixels. If one considers that the LO beam power is the same for all pixel locations (which is a very common approximation), the noise density of this speckle Gaussian noise is the same for all pixels.

In that uniform (or flat-field) LO beam approximation, all the transformations made in the holographic reconstruction (FFTs: (10) and (13), and multiplication by a phase matrix: (11)) do not change the noise distribution, and the noise density. FFTs change a Gaussian noise into another Gaussian noise, and, because of the Parseval theorem, the noise density remains the same. The phase matrix multiplication does not change the noise either, since the phase is fully random from one pixel to the next. Whatever the reconstruction plane, the Gaussian speckle noise on gets in the CCD plane, transforms into another Gaussian speckle noise, with the same noise density.

## III. THEORETICAL LIMITING NOISE

### A. Shot Noise on the CCD Pixel Signal

Since laser emission and photodetection on a CCD camera pixel are random processes, the signal that is obtained on a CCD pixel exhibits Poisson noise. The effect of this Poisson noise, which cannot be avoided, on the holographic signal and on the holographic reconstructed images, is the Ultimate Theoretical Limiting noise, which we will study here.

We can split the signal  $I_{k,p,q}$  we get for frame  $k$  and pixel  $(p, q)$  in a noiseless average component and a noise component

$$I_{k,p,q} \equiv \langle I_{k,p,q} \rangle + i_{k,p,q} \quad (14)$$

where  $\langle \rangle$  is the statistical average operator, and  $i_{k,p,q}$  the noise component. To go further in the discussion, we will use photo electrons Units to measure the signal  $I_{k,p,q}$ .

We must notice that the local oscillator signal  $\mathcal{E}_{\text{LO}}$  is large, and corresponds to a large number of photo electrons (e). In real life, this assumption is true. For example, if we adjust the power of the LO beam to be at the half maximum of the camera signal in DC unit (2048 DC in our case), the pixel signal will be about  $10^4$  e, since the ‘‘Camera Gain’’ of our camera is 4.8 e per DC. There are two consequences which simplify the analysis.

- First, the signal  $I_{k,p,q}$  exhibits a Gaussian distribution around its statistical average.



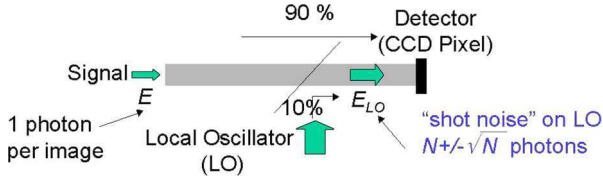


Fig. 2. 1 photon equivalent signal (accounting Heterodyne gain), and shot noise on the holographic LO beam.

- Second, both the quantization noise of the photo electron signal ( $I_{k,p,q}$  is an integer in photo electron Units), and the quantization noise of the Digital Count signal ( $I_{k,p,q}$  is an integer in DC Units) can be neglected. These approximations are valid, since the width of the  $I_{k,p,q}$  Gaussian distribution is much larger than one in both photo electron and DC Units. In the example given above,  $\langle I_{k,p,q} \rangle \simeq 10^4$ , and this width is  $\simeq 10^2$  in photo electron Units, and  $\simeq 20$  in DC Units.

One can thus consider that  $I_{k,p,q}$ ,  $\langle I_{k,p,q} \rangle$  and  $i_{k,p,q}$  are floating numbers (and not integer). Moreover,  $i_{k,p,q}$  is a zero-average random Gaussian distribution, with

$$\langle i_{k,p,q}^2 \rangle = \langle I_{k,p,q} \rangle. \quad (15)$$

To analyze the LO shot noise contribution to the holographic signal  $H_{p,q}$ , one of the most simple method is to perform Monte Carlo simulation from (14) and (15). Since  $I_{k,p,q}$  is ever large (about  $10^4$  in our experiment),  $\langle I_{k,p,q} \rangle$  can be replaced by  $I_{k,p,q}$  (that results from measurements) in the right member of (15). One has thus

$$\langle i_{k,p,q}^2 \rangle = \langle I_{k,p,q} \rangle \simeq I_{k,p,q} \quad (16)$$

Monte Carlo simulation of the noise can be done from (14) and (16).

### B. Object Field Equivalent Noise for One Frame

In order to discuss the effect of the shot noise on the heterodyne signal  $\mathcal{E}_{p,q}\mathcal{E}_{LO}^*$  of (7), let us consider the simple situation sketched on Fig. 2. A weak object field  $E$ , with 1 photon or 1 photo electron per pixel and per frame, interferes with a LO field  $E_{LO}$  with  $N$  photons, where  $N$  is large ( $N = 10^4$ , in the case of our experiment). Since the LO beam signal  $a^2T|\mathcal{E}_{LO}|^2$  is equal to  $N$  photons, and the object field signal  $a^2T|\mathcal{E}_{p,q}|^2$  is one photon, we have

$$I_{k,p,q} = N + 1 + i_{k,p,q} + a^2T\mathcal{E}_{p,q}\mathcal{E}_{LO}^*e^{i\phi} + c.c. \quad (17)$$

Note that the heterodyne signal  $\mathcal{E}_{p,q}\mathcal{E}_{LO}^*$  is much larger than  $|\mathcal{E}_{p,q}|^2$ . This is the gain effect, associated to the coherent detection of the field  $\mathcal{E}_{p,q}$ . This gain is commonly called “heterodyne gain”, and is proportional to the amplitude of the LO field  $\mathcal{E}_{LO}^*$ .

The purpose of the present discussion is to determine the effect of the noise term  $i_{k,p,q}$  of (17) on the holographic signal  $H_{p,q}$ . Since  $H_{p,q}$  involves only the heterodyne term  $\mathcal{E}_{p,q}\mathcal{E}_{LO}^*$  (see (9)) we have to compare in (17):

- the shot noise term  $i_{k,p,q}$ .
- the heterodyne term  $\mathcal{E}_{p,q}\mathcal{E}_{LO}^*$

Let us consider first the shot noise term. We have

$$\langle i_{k,p,q}^2 \rangle = \langle I_{k,p,q} \rangle = N + 1 \simeq N \quad (18)$$

The variance of the shot noise term is thus  $\sqrt{N} = 10^2$ . Since this noise is mainly related to the shot noise on the local oscillator (since  $N \gg 1$ ), one can group together, in (17), the LO beam term (i.e.,  $N$ ) with the noise term  $i_{k,p,q}$ , and consider that the LO beam signal fluctuates, the number of LO beam photons being thus “ $N \pm \sqrt{N}$ ”, as mentioned on Fig. 2.

Consider now the heterodyne beat signal. Since we have  $N$  photons on the LO beam, and 1 photon on the object beam, we get

$$a^2T|\mathcal{E}_{p,q}\mathcal{E}_{LO}^*| \equiv \left( (a^2T|\mathcal{E}_{p,q}|^2) (a^2T|\mathcal{E}_{LO}|^2) \right)^{1/2} = N^{1/2}. \quad (19)$$

The heterodyne beat signal  $\mathcal{E}_{p,q}\mathcal{E}_{LO}^*$  is thus  $\sqrt{N} = 10^2$ .

The shot noise term  $i_{k,p,q}$  is thus equal to the heterodyne signal  $\mathcal{E}_{p,q}\mathcal{E}_{LO}^*$  corresponding to 1 photon on the object field. This means that shot noise  $i_{k,p,q}$  yields an equivalent noise of 1 photon per pixel, on the object beam. This result is obtained here for 1 frame. We will show that it remains true for a sequence of  $4n$  frames, whatever  $4n$  is.

### C. Object Field Equivalent Noise for 4n Frames

Let us introduce the DC component signal  $D$ , which is similar to the heterodyne signal  $H$  given by (8), but without phase factors

$$D \equiv \sum_{k=0}^{4n-1} I_k. \quad (20)$$

The component  $D$  can be defined for each pixel  $(p, q)$  by

$$D_{p,q} \equiv \sum_{k=0}^{4n-1} I_{k,p,q}. \quad (21)$$

Since  $I_{k,p,q}$  is always large in real life (about  $10^4$  in our experiment), the shot noise term can be neglected in the calculation of  $D_{p,q}$  by (21). We have thus

$$D_{p,q} \equiv \sum_{k=0}^{4n-1} I_{k,p,q} \simeq 4na^2T (|\mathcal{E}_{p,q}|^2 + |\mathcal{E}_{LO}|^2). \quad (22)$$

We are implicitly interested by the low signal situation (i.e.  $\mathcal{E}_{p,q} \ll \mathcal{E}_{LO}$ ) because we focus on noise analysis. In that case, the  $|\mathcal{E}_{p,q}|^2$  term can be neglected in (22). This means that  $D_{p,q}$  gives a good approximation for the LO signal.

$$D_{p,q} \equiv \sum_{k=0}^{4n-1} I_{k,p,q} \simeq 4na^2T|\mathcal{E}_{LO}|^2. \quad (23)$$

We can get then the signal field  $|\mathcal{E}_{p,q}|^2$  from (9) and (23):

$$\frac{|H_{p,q}|^2}{D_{p,q}} \simeq 4na^2T|\mathcal{E}_{p,q}|^2. \quad (24)$$

where the ratio  $|H_{p,q}|^2/D_{p,q}$  is proportional to the number of frames of the sequence ( $4n$ ). This means that  $|H_{p,q}|^2/D_{p,q}$  represents the signal field  $|\mathcal{E}_{p,q}|^2$  summed over the all frames.

Let us calculate the effect of the shot noise on  $|H_{p,q}|^2/D_{p,q}$ . To calculate this effect, one can make a Monte Carlo simulation as mentioned above, but a simpler calculation can be done here. In (24), we develop  $|H_{p,q}|$  in statistical average and noise components [as done for  $I_{k,p,q}$  in (14)], while neglecting noise in  $D_{p,q}$ .

We get

$$\left\langle \frac{|H_{p,q}|^2}{D_{p,q}} \right\rangle \simeq \frac{1}{\langle D_{p,q} \rangle} \times \left( |\langle H_{p,q} \rangle|^2 + \langle |h_{p,q}|^2 \rangle + \langle \langle H_{p,q} \rangle h_{p,q}^* \rangle + \langle \langle H_{p,q}^* \rangle h_{p,q} \rangle \right) \quad (25)$$

where

$$H_{p,q} = \langle H_{p,q} \rangle + h_{p,q} \quad (26)$$

with

$$h_{p,q} = \sum_{k=0}^{4n-1} j^k i_{k,p,q} \quad (27)$$

which is the shot noise random contribution to  $H_{p,q}$ . In (25) the  $\langle \langle H_{p,q} \rangle h_{p,q}^* \rangle$  term is zero since  $h_{p,q}^*$  is random while  $\langle H_{p,q} \rangle$  is not random. The two terms  $\langle \langle H_{p,q} \rangle h_{p,q}^* \rangle$  and  $\langle \langle H_{p,q}^* \rangle h_{p,q} \rangle$  can be thus removed.

On the other hand, we get for  $|h_{p,q}|^2$

$$|h_{p,q}|^2 = \sum_{k=0}^{4n-1} |i_{k,p,q}|^2 + \sum_{k=0}^{4n-1} \sum_{k'=0, k' \neq k}^{4n-1} j^{k-k'} i_{k,p,q} i_{k',p,q}^* \quad (28)$$

Since  $i_{k,p,q}$  and  $i_{k',p,q}^*$  are uncorrelated, the  $i_{k,p,q} i_{k',p,q}^*$  terms cancel in the calculation of the statistical average of  $|h_{p,q}|^2$ . We get then from (15)

$$\langle |h_{p,q}|^2 \rangle = \sum_{k=0}^{4n-1} \langle |i_{k,p,q}|^2 \rangle = \sum_{k=0}^{4n-1} \langle I_{k,p,q} \rangle = \langle D_{p,q} \rangle \quad (29)$$

and (25) becomes

$$\left\langle \frac{|H_{p,q}|^2}{D_{p,q}} \right\rangle = \frac{\langle |H_{p,q}|^2 \rangle}{\langle D_{p,q} \rangle} + 1. \quad (30)$$

This equation means that the average detected intensity signal  $\langle |H_{p,q}|^2/D_{p,q} \rangle$  is the sum of the square of the average object field  $\langle |H_{p,q}| \rangle / \sqrt{\langle D_{p,q} \rangle}$  plus one photo-electron. Without illumination of the object, the average object field is zero, and the detected signal is 1 photo-electron. The equation establishes thus that the LO shot noise yields a signal intensity corresponding exactly 1 photo-electron per pixel whatever the number of frames  $4n$  is.

The 1 e noise floor we get here can be also interpreted as resulting from the heterodyne detection of the vacuum field fluctuations [51].

#### D. Detection Bandwidth and Noise

From a practical point of view, the holographic detected signal intensity increases linearly with the acquisition time  $4nT$  (since  $|H_{p,q}|^2/D_{p,q} \propto 4n$ ), while the noise contribution remains constant: the 1 e noise calculated by (25) corresponds to a sequence of  $4n$  frames, whatever the number  $4n$  of frames. The coherent character of holographic detection explains this paradoxical result.

The noise remains constant with time because the noise is broadband (it is a white noise), while the detection is narrow-band. The noise that is detected is proportional to the product of the exposure time, which is proportional to the acquisition time  $4nT$ , with the detection bandwidth, which is inversely proportional to  $4nT$ . It does not depend thus on  $4nT$ .

To illustrate this point, we have calculated, as a function of the exposure time  $4nT$ , the frequency response of the coherent detection made by summing the  $4n$  frames with the phase factors  $j^k$  of (8). Let us call  $\eta$  the detection efficiency for the signal field complex amplitude. We get

$$\eta(x) = \frac{1}{4nT} \sum_{k=0}^{4n-1} j^k \int_{t=kT-T/2}^{kT+T/2} e^{j2\pi xt} dt \quad (31)$$

$$= \text{sinc}(\pi x T) \times \frac{1}{4n} \sum_{k=0}^{4n-1} j^k e^{j2\pi k x T}. \quad (32)$$

Here  $x = f - f_{\text{LO}}$  is the heterodyne beat frequency;  $f$  is the optical frequency of the signal beam, and  $f_{\text{LO}}$  the frequency of the LO beam. In (31), the factor  $\text{sinc}(\pi x T)$  corresponds to the integration of the beat signal, whose frequency  $x$  is non zero, over the CCD frame finite exposure time  $T$ . The summation over the frames  $k$  of (8) yields, in (31), to sum the phase  $e^{j2\pi k T x}$  of the heterodyne beat at the beginning of each frame  $k$  with the phase factor  $j^k$ . To the end, the factor  $1/4n$  in (31) is a normalization factor that is the inverse of the number of terms within the summation over  $k$ . This  $1/4n$  factor keeps the maximum of  $|\eta(x)|$  slightly lower than 1.

We have calculated, and plotted on Fig. 3, the detection frequency spectrum  $|\eta(x)|^2$  for sequences with different number of frames  $4n$ . The heavy grey line curve corresponds to 4 frames, the solid line curve to 8 frames, and the dashed line to 16 frames. As seen, the width of the frequency response spectrum (and thus the frequency response area) is inversely proportional to the exposure time ( $(4T)^{-1}$ ,  $(8T)^{-1}$  and  $(16T)^{-1}$  respectively).

To verify the validity of (31), we have swept the frequency  $f_{\text{LO}} = \omega_{\text{LO}}/(2\pi)$  of our holographic LO by detuning the AOMs frequency (see Fig. 1), while keeping constant the illumination frequency  $f$ . We have then measured the weight  $W(x)$  of the reconstructed holographic intensity signal  $H^2$  as a function of the beat frequency  $x = f - f_{\text{LO}}$ . Fig. 4 shows the comparison of the theoretical signal  $|\eta(x)|^2$  (heavy grey line), with the experimental data  $W(x)$  (points). The agreement is excellent.

#### IV. REACHING THE THEORETICAL SHOT NOISE IN EXPERIMENT

In the previous sections, we have shown that the theoretical noise on the holographic reconstructed intensity images is 1 photo electron per pixel whatever the number of recorded frames is. We will now discuss the ability to reach this limit in real time holographic experiment. Since we consider implicitly a very weak object beam signal, the noises that must be considered are:

- read noise of the CCD camera;
- quantization noise of the camera A/D converter;
- technical noise on the LO beam;
- LO beam shot noise, which yields the theoretical noise limit.

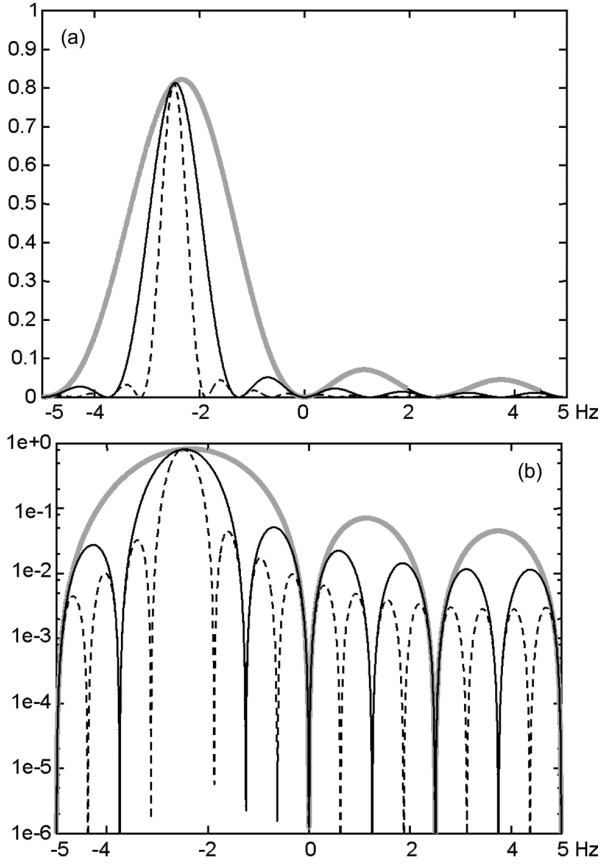


Fig. 3. Frequency response  $|\eta(x)|^2$  for heterodyne signal in intensity, as a function of the heterodyne beat frequency  $x = f - f_{LO}$  for sequences of  $4n$  frames with  $4n = 4$  (heavy grey line),  $4n = 8$  (solid black line), and  $4n = 16$  (dashed black line). Calculation is done for  $T = 0.1$  s. Vertical axis axis is  $|\eta(x)|^2$  in linear (a) and logarithmic (b) scales. Horizontal axis is  $x = f - f_{LO}$  in Hz.

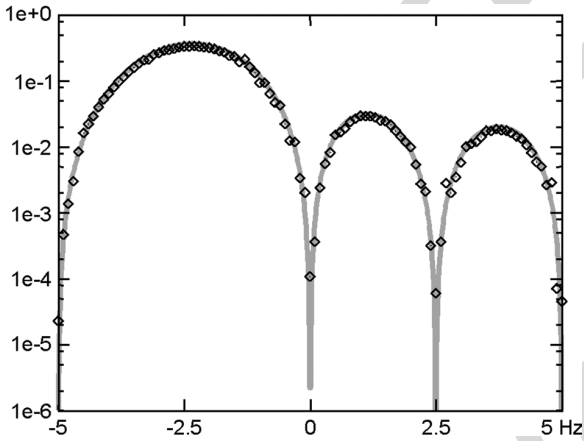


Fig. 4. Frequency response for heterodyne signal in intensity, as a function of the heterodyne beat frequency  $x = f - f_{LO}$  for a sequence of 4 frames: Theory  $|\eta(x)|^2$  (heavy grey line), and experiment  $W(x)$  (points). Calculation and experiment are done with  $T = 0.1$  s. Vertical axis axis is  $|\eta(x)|^2$  or  $W(x)$  in logarithmic scales. Horizontal axis is  $x = f - f_{LO}$  in Hz.

#### A. Technical Noise Within the $(k_x, k_y)$ Reciprocal Space

The main characteristics of our camera are given in Fig. 5. In a typical experiment, the LO beam power is adjusted in order to get 2000 DC on the A/D Converter, i.e. about  $10^4$  e on the each CCD pixel. The LO shot noise, which is about 100 e, thus much

Number of pixels	1280 (H) $\times$ 1024 (V)
Pixel size	$6.7 \times 6.7 \mu\text{m}$
Frame Rate	12.5 fps
Full Well Capacity	25 000 e
A/D Converter	12 bits: 0... 4095 DC
A/D conversion factor (Gain)	4.8 e/DC
QE @ 500 nm :	40 %
QE @ 850 nm :	6%
Read Noise	20 e
Dark Noise	3 e/sec/pix

Fig. 5. Main characteristics of the PCO pixelfly camera.

larger than the Read Noise (20 e), than the Dark Noise (3 e/s), and than the A/D converter quantization noise (4.8 e, since 1 DC corresponds to 4.8 e). The noise of the camera, which can be neglected, is thus not limiting in reaching the noise theoretical limit.

The LO beam that reaches the camera is essentially flat field (i.e. the field intensity  $|\mathcal{E}_{LO}|^2$  is the same for all the pixels). The LO beam technical noise is thus highly correlated from pixel to pixel. This is for example the case of the noise induced by the fluctuations of the main laser intensity, or by the vibrations of the mirrors within the LO beam arm. To illustrate this point, we have recorded a sequence of  $4n = 4$  frames  $I_k$  with LO beam, but without signal (i.e. without illumination of the object). We have recorded thus the hologram of the “vacuum field”. We have calculated then the complex hologram  $H$  by (8), and the reciprocal space hologram  $\tilde{H}$  by FFT [i.e., by (10)].

The reciprocal space holographic intensity  $|\tilde{H}|^2$  is displayed on Fig. 6 in arbitrary logarithm grey scale. On most of the reciprocal space (within for example circle 1),  $|\tilde{H}|^2$  corresponds to a random speckle whose average intensity is uniformly distributed along  $k_x$  and  $k_y$ . One observes nevertheless bright points within circle 2, which corresponds to  $(k_x, k_y) \simeq (0, 0)$ . These points correspond to the technical noise, which is flat field within the CCD plane  $(x, y)$ , and which has thus a low spatial frequency spread within the  $(k_x, k_y)$  reciprocal space. One see also, on the Fig. 6 image, an horizontal and a vertical bright line, which corresponds to  $k_y = 0$  and  $k_x = 0$  (zone 3 on Fig. 6). These parasitic bright lines are related to Fast Fourier Transform aliases, that are related to the discontinuity of the signal  $I_k$  and  $H$  at edge of the calculation grid, in the  $(x, y)$  space.

We have measured  $\langle |\tilde{H}|^2 \rangle$  by replacing the statistical average  $\langle \rangle$  by a spatial average over a region of the conjugate space without technical noise (i.e. over region 1). This gives a measurement of  $\langle |\tilde{H}|^2 \rangle$ , i.e. a measurement of  $\langle |H|^2 \rangle$ , since the space average of  $|\tilde{H}|^2$  and  $|H|^2$  are equal, because of the FT Parseval theorem. We have also measured  $D$  from the sequence of frames  $I_k$  (see (20)). Knowing the A/D conversion factor (4.8 e/DC), we have calculated the noise intensity  $\langle |\tilde{H}|^2 \rangle / \langle D \rangle$  in photo-electron units, and we get, within 10%, 1 photo electron per pixel, as expected theoretically for the shot noise (see (25)).

This result proves that it is possible to perform shot noise limited holography in actual experiments. Since the low spatial frequency region of the reciprocal space (region 2) must be avoided because of the technical noise, it is necessary to perform digital holography in an off-axis configuration, in order to reach the (25) shot noise limit.

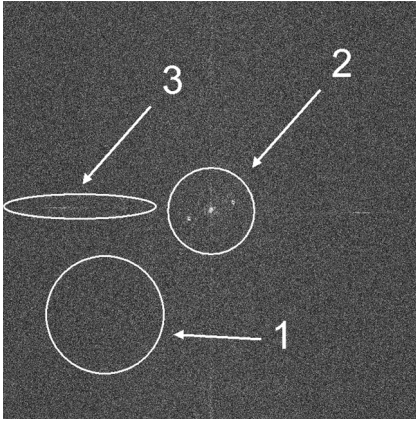


Fig. 6. Intensity image of  $\tilde{H}(k_x, k_y, 0)$  for  $4n = 4$  frames without signal  $\mathcal{E}$ . Three kind of noises can be identified. left: FFT aliasing, down left: Shot noise, middle: Technical noise of the CCD. By truncating the image and keeping only the left down part, the shot noise limit is reached. The image is displayed in arbitrary logarithm grey scale.

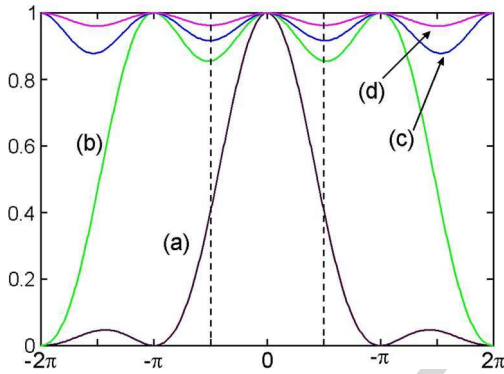


Fig. 7. 1D angular response of the detection efficiency (a) for the intensity  $\sum_m |\text{sinc}(X + m\pi)|^2$  as a function of  $X$  for the main lobe;  $m = 0$ ; (b) for the main lobe and 2 aliases:  $m = 0, \pm 1$ ; (c) for the main lobe and 4 aliases:  $m = 0, \pm 1, \pm 2$ ; (d) for the main lobe and 10 aliases:  $m = 0, \pm 1, \pm 2, \dots, \pm 5$ .

### B. Effect the Finite Size of the Pixel

Because of the finite size of the pixels  $d_{pix}$ , the heterodyne detection efficiency within direction  $k_x, k_y$  is weighted by a factor  $\zeta$  for the field  $\tilde{H}$ , and  $|\zeta|^2$  for the intensity  $|\tilde{H}|^2$  with

$$\begin{aligned} \zeta(k_x, k_y) &= \frac{1}{d_{pix}^2} \int_{x=-\frac{1}{2}d_{pix}}^{\frac{1}{2}d_{pix}} \int_{y=-\frac{1}{2}d_{pix}}^{\frac{1}{2}d_{pix}} e^{j(k_x x + k_y y)} dx dy \\ &= \text{sinc}(X) \text{sinc}(Y) \end{aligned} \quad (33)$$

with  $X = k_x d_{pix}/2$  and  $Y = k_y d_{pix}/2$ . This factor  $\zeta$  corresponds to the angular sinc diffraction pattern of the rectangular pixels, which affects the component of  $\tilde{H}$  corresponding to the signal of the object. The efficiency in energy  $|\zeta|^2$  is plotted in Fig. 7, curve (a) in black.

Because of the sampling made by the CCD pixels, the hologram  $\tilde{H}(k_x, k_y)$  is periodic in the reciprocal space, with a periodicity equal to  $2\pi/d_{pix}$  for  $k_x$  and  $k_y$ , or  $\pi$  for  $X$  and  $Y$ . This means that the edges of the FFT calculation grid, which are displayed on Fig. 7 as vertical dashed lines, corresponds to  $k_x, k_y = \pm\pi/d_{pix}$  or to  $X, Y = \pm\pi/2$ . Note that the detection

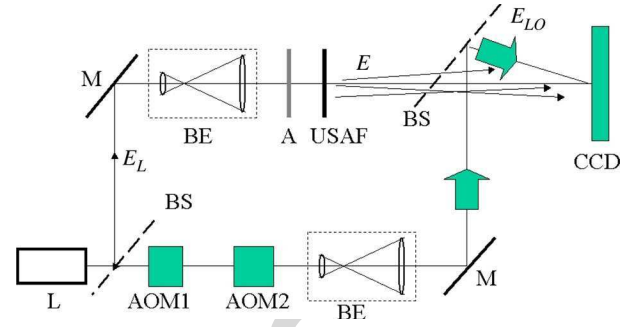


Fig. 8. Setup of the test experiment with USAF target. L: Main laser; BS: Beam splitter; AOM1 and AOM2: Acousto optic modulators; BE: Beam expander; M: Mirror; A1 and A2: Light attenuators. USAF: Transmission USAF target that is imaged. CCD: CCD camera.

efficiency is non zero at the edges of the calculation grid since we have  $|\zeta|^2 = 4/\pi^2 \simeq 0.40$  for  $X = \pi/2$  and  $Y = 0$ .

If the factor  $|\zeta|^2$  affects the component of  $|\tilde{H}|^2$  corresponding to the signal of the object, it do not affects the shot noise component, whose weight is 1 whatever  $k_x$  and  $k_y$  are. One can demonstrate this result by calculating the noise by Monte Carlo simulation from (14) and (16). The Monte Carlo simulation yields a fully random speckle noise, both in the  $x, y$  space, and in the  $k_x, k_y$  reciprocal space.

This point can be understood another way, which is illustrated by Fig. 7. Each pixel is a coherent detector, whose detection antenna diagram is the Fig. 7(a) sinc function. Because of the periodicity within the reciprocal space, the signal that is detected for  $(k_x, k_y)$  or for  $(X, Y)$  corresponds to the sum of the signal within the main lobe  $(X, Y)$ , and within all the aliases corresponding to the periodicity  $(X + m\pi, Y + m'\pi)$ . Since the object is located within a well defined direction, the main lobe contribute nearly alone for the signal. But this is not true for the shot noise, since the shot noise (or the vacuum field noise) spreads over all  $(k_x, k_y)$  points of the reciprocal space with a flat average density. One has thus to sum the response of the main lobe (i.e.  $|\text{sinc}(X)|^2$  in 1D) with all the periodicity aliases (i.e.  $|\text{sinc}(X + m\pi)|^2$  with  $m \neq 0$ ). Fig. 7 shows the 1D angular response  $\sum_m |\text{sinc}(X + m\pi)|^2$  that correspond to sum of the main lobe with more and more aliases. As seen, adding more and more aliases make the angular response flat and equal to one.

### C. Experimental Validation With an USAF Target

We have verified that it is possible to perform shot noise limited holography in actual experiments, by recording the hologram of an USAF target in transmission. The holographic setup is sketched on Fig. 8. We have recorded sequences of  $4n = 12$  frames, and we have reconstructed the image of the USAF target.

Fig. 9 shows the holographic reconstructed images of the USAF target. The intensity of the signal illumination is adjusted with neutral density filters. In order to filter off the technical noise, the reconstruction is done by selecting the order 1 image of the object, within the reciprocal space [8]. Since the  $400 \times 400$  pixels region that is selected is off axis, the low spatial frequency noisy region, which corresponds to the zero order image (region 1 on Fig. 6), is filtered-off.



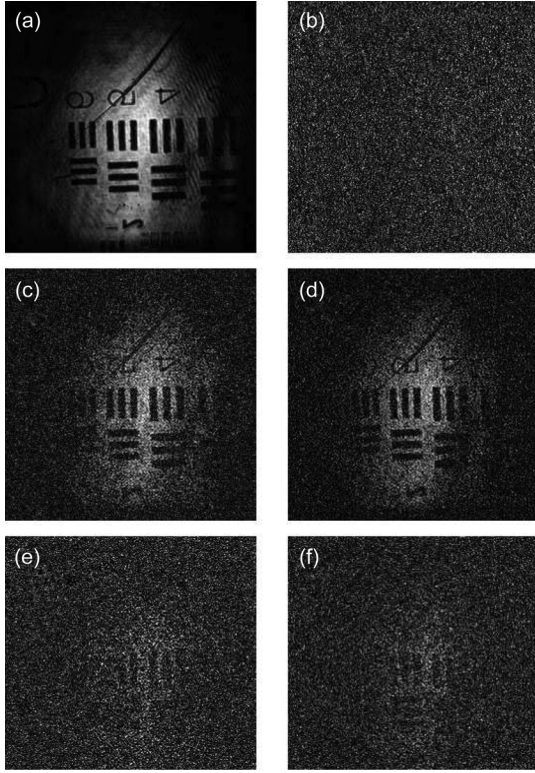


Fig. 9. (a), (c), (d): Reconstructions of an USAF target with different level of illumination 700 (a), 1 (c) and 0.15 e/pixel (d). (b): Simulated Shot Noise noise image. (e), (f): Simulated reconstructed image obtained by mixing image (a) with weight  $X$ , and image (b) with weight  $1 - X$ . The weight  $X$  is  $1/700$  (e), and  $0.15/700$  (f). Images are displayed in arbitrary logarithmic grey scale.

Fig. 9(a), (c), (d) shows the reconstructed images obtained for different USAF target illumination levels. For each image, we have measured the average number of photo electrons per pixel corresponding to the object beam, within the reciprocal space region that has been selected for the reconstruction (i.e.  $400 \times 400$  pixels). The images of Fig. 9 correspond to 700 (a), 1 (c), and 0.15 e/pix (d) respectively. The object beam intensity has been measured by the following way. We have first calibrated the response of our camera with an attenuated laser whose power is known. We have then measured with the camera, at high level of signal, the intensity of the signal beam alone (without LO beam). We have decreased, to the end, the signal beam intensity by using calibrated attenuator in order to reach the low signal level of the images of Fig. 6(a), (c), (d). In the case of image (a) with 700 e/pix, we also have measured the averaged signal intensity from the data by calculating  $|H|^2/D$  (see (24)). The two measurements gave the same result: 700 e per pixel.

On Fig. 9(a), with 700 e per pixel, the USAF signal is much larger than the shot noise, and the signal-to-noise ratio (SNR) is large. On Fig. 9(c), with 1 e per pixel, the USAF signal is roughly equal to the shot noise, and the SNR is about 1. With 0.15 e per pixel, the SNR is low on Fig. 9(d) (about 0.15), and the USAF is hardly seen. It is nevertheless quite difficult to evaluate the SNR of an image. To perform a more quantitative analysis of the noise within the images, we have synthesized noisy images of 9(e), (f) by adding noise to the Fig. 9(a) noiseless image. We have first synthesized a pure Shot Noise image, which corresponds to the image that is expected without signal.

Image	Signal (e/pix)	Noise (e/pix)
a	700	1
b	0	1
c	1	1
d	0.15	1
e	1	1
f	0.15	1

Fig. 10. Signal and shot noise on images of Fig. 9.

The Shot Noise, which is displayed on Fig. 9(b), is obtained by the following way. From one of the measured frames (for example  $I_0$ ) we have calculated the noise components  $i_{k,p,q}$  by Monte Carlo drawing with the condition

$$\langle i_{k,p,q}^2 \rangle = I_{0,p,q} \quad (34)$$

This condition corresponds to (15) since  $\langle I_{k,p,q} \rangle \simeq I_{0,p,q}$ . We have then synthesized the sequence of image  $I_k$  by

$$I_{k,p,q} = I_{0,p,q} + i_{k,p,q} \quad (35)$$

The Shot Noise image of Fig. 9(b) is reconstructed then from the  $I_{k,p,q}$  sequence.

We have synthesized noisy images by summing the noiseless image of Fig. 9(a) with weight  $X$ , with the Shot Noise image of Fig. 9(b) with weight  $(1 - X)$ . The image of Fig. 9(e) is obtained with  $X = 1/700$ . As shown on the table of Fig. 10, Fig. 9(e) corresponds to the same signal, and the same noise than Fig. 9(c) (1 e of signal, and 1 e of noise respectively). Fig. 9(c) and Fig. 9(e), which have been displayed here with the same linear grey scale, are visually very similar and exhibit the same SNR. The image of Fig. 9 is similarly obtained with  $X = 0.15/700$ . It corresponds to the same Signal and Noise than Fig. 9(d) (0.15 e of signal, and 1 e of noise), and, as expected, Fig. 9(d) and Fig. 9(f), which have been displayed here with the same linear grey scale, are similar and exhibit the same SNR too.

Here we demonstrated our ability to synthesize a noisy image with a noise that is calculated by Monte Carlo from (34) and (35). Moreover, we have verified that the noisy image is visually equivalent to the image we have obtained in experiments. These results prove that we are able to quantitatively account theoretically the noise, and that the noise that is obtained in experiments reaches the theoretical limit.

## V. CONCLUSION

In this paper, we have studied the noise limits in digital holography. We have shown that in high heterodyne gain of the holographic detection (achieved when the object field power is much weaker than the LO field power), the noise of the CCD camera can be neglected. Moreover by a proper arrangement of the holographic setup, that combines off-axis geometry with phase shifting acquisition of holograms, it is possible to reach the theoretical shot noise limit. We have studied theoretically this limit, and we have shown that it corresponds to 1 photo electron per pixel for the whole sequence of frame that is used to reconstruct the holographic image. This paradoxical result is related to the heterodyne detection, where the detection bandwidth is inversely proportional to the measurement time. We have verified

all our results experimentally, and we have shown that is possible to image an object at very low illumination levels. We have also shown that is possible to mimic the very weak illumination levels holograms obtained in experiments by Monte Carlo noise modeling. This opens the way to simulation of “gedanken” holographic experiments in weak signal conditions.

#### REFERENCES

- [1] D. Gabor, “Microscopy by reconstructed wavefronts,” *Proc. Roy. Soc. A*, vol. 197, p. 454, 1949.
- [2] A. Macovsky, “Consideration of television holography,” *Opt. Acta*, vol. 22, no. 16, p. 1268, Aug. 1971.
- [3] U. Schnars, “Direct phase determination in hologram interferometry with use of digitally recorded holograms,” *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 11, p. 977, July 1994.
- [4] J. W. Goodman and R. W. Lawrence, “Digital image formation from electronically detected holograms,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 11, p. 77, 1967.
- [5] E. Leith, J. Upatnieks, and K. Haines, “Microscopy by wavefront reconstruction,” *J. Opt. Soc. Amer.*, vol. 55, no. 8, pp. 981–986, 1965.
- [6] U. Schnars and W. Jüptner, “Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction,” *Appl. Opt.*, vol. 33, no. 2, pp. 179–181, 1994.
- [7] T. M. Kreis, W. P. O. Juptner, and J. Geldmacher, “Principles of digital holographic interferometry,” *SPIE*, vol. 3478, p. 45, July 1988.
- [8] E. Cucho, P. Marquet, and C. Depeursinge, “Spatial filtering for zero-order and twin-image elimination in digital off-axis holography,” *Appl. Opt.*, vol. 39, no. 23, pp. 4070–4075, 2000.
- [9] I. Yamaguchi and T. Zhang, “Phase-shifting digital holography,” *Opt. Lett.*, vol. 18, no. 1, p. 31, 1997.
- [10] U. Schnars and W. Jüptner, “Digital recording and numerical reconstruction of holograms,” *Meas. Sci. Technol.*, vol. 13, no. 9, pp. 85–101, 2002.
- [11] A.-F. Doval, “A systematic approach to tv holography,” *Meas. Sci. Technol.*, vol. 11, p. 36, Jan. 2000.
- [12] Y. Pu and H. Meng, “Intrinsic speckle noise in off-axis particle holography,” *J. Opt. Soc. Amer. A*, vol. 21, no. 7, pp. 1221–1230, 2004.
- [13] T. Colomb, P. Dahlgren, D. Beghin, E. Cucho, P. Marquet, and C. Depeursinge, “Polarization imaging by use of digital holography,” *Appl. Opt.*, vol. 41, no. 1, pp. 27–37, 2002.
- [14] E. Cucho, F. Belivacqua, and C. Depeursinge, “Digital holography for quantitative phase-contrast imaging,” *Opt. Lett.*, vol. 24, no. 5, pp. 291–293, 1999.
- [15] J. Massig, “Digital off-axis holography with a synthetic aperture,” *Opt. Lett.*, vol. 27, no. 24, pp. 2179–2181, 2002.
- [16] Z. Ansari, Y. Gu, M. Tziraki, R. Jones, P. French, D. Nolte, and M. Melloch, “Elimination of beam walk-off in low-coherence off-axis photorefractive holography,” *Opt. Lett.*, vol. 26, no. 6, pp. 334–336, 2001.
- [17] P. Massatsch, F. Charrière, E. Cucho, P. Marquet, and C. Depeursinge, “Time-domain optical coherence tomography with digital holographic microscopy,” *Appl. Opt.*, vol. 44, no. 10, pp. 1806–1812, 2005.
- [18] E. Absil, G. Tessier, M. Gross, M. Atlan, N. Warnasooriya, S. Suck, M. Coppey-Moisan, and D. Fournier, “Photothermal heterodyne holography of gold nanoparticles,” *Opt. Express*, vol. 18, pp. 780–786, 2010.
- [19] P. Marquet, B. Rappaz, P. Magistretti, E. Cucho, Y. Emery, T. Colomb, and C. Depeursinge, “Digital holographic microscopy: A noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy,” *Opt. Lett.*, vol. 30, no. 5, pp. 468–470, 2005.
- [20] M. Atlan, M. Gross, P. Desbiolles, É. Absil, G. Tessier, and M. Coppey-Moisan, “Heterodyne holographic microscopy of gold particles,” *Opt. Lett.*, vol. 33, no. 5, pp. 500–502, 2008.
- [21] N. Warnasooriya, F. Joud, P. Bun, G. Tessier, M. Coppey-Moisan, P. Desbiolles, M. A. M. Atlan, and M. Gross, “Imaging gold nanoparticles in living cell environments using heterodyne digital holographic microscopy,” *Opt. Express*, vol. 18, no. 4, pp. 3264–3273, 2010.
- [22] T. Zhang and I. Yamaguchi, “Three-dimensional microscopy with phase-shifting digital holography,” *Opt. Lett.*, vol. 23, no. 15, pp. 1221–1223, 1998.
- [23] T. Nomura, B. Javidi, S. Murata, E. Nitani, and T. Numata, “Polarization imaging of a 3D object by use of on-axis phase-shifting digital holography,” *Opt. Lett.*, vol. 32, no. 5, pp. 481–483, 2007.
- [24] I. Yamaguchi, T. Matsumura, and J. Kato, “Phase-shifting color digital holography,” *Optics Letters*, vol. 27, no. 13, pp. 1108–1110, 2002.
- [25] F. Le Clerc, M. Gross, and L. Collot, “Synthetic-aperture experiment in the visible with on-axis digital heterodyne holography,” *Opt. Lett.*, vol. 26, no. 20, pp. 1550–1552, 2001.
- [26] S. Tamano, Y. Hayasaki, and N. Nishida, “Phase-shifting digital holography with a low-coherence light source for reconstruction of a digital relief object hidden behind a light-scattering medium,” *Appl. Opt.*, vol. 45, no. 5, pp. 953–959, 2006.
- [27] I. Yamaguchi, T. Ida, M. Yokota, and K. Yamashita, “Surface shape measurement by phase-shifting digital holography with a wavelength shift,” *Appl. Opt.*, vol. 45, no. 29, pp. 7610–7616, 2006.
- [28] I. Yamaguchi, J. Kato, S. Ohta, and J. Mizuno, “Image formation in phase-shifting digital holography and applications to microscopy,” *Appl. Opt.*, vol. 40, no. 34, pp. 6177–6186, 2001.
- [29] F. LeClerc, L. Collot, and M. Gross, “Numerical heterodyne holography using 2d photo-detector arrays,” *Opt. Lett.*, vol. 25, p. 716, Mai 2000.
- [30] M. Atlan, M. Gross, and E. Absil, “Accurate phase-shifting digital interferometry,” *Opt. Lett.*, vol. 32, no. 11, pp. 1456–1458, 2007.
- [31] M. Gross and M. Atlan, “Digital holography with ultimate sensitivity,” *Optics Letters*, vol. 32, no. 8, pp. 909–911, 2007.
- [32] E. Cucho, P. Marquet, and C. Depeursinge *et al.*, “Spatial filtering for zero-order and twin-image elimination in digital off-axis holography,” *Appl. Opt.*, vol. 39, no. 23, pp. 4070–4075, 2000.
- [33] M. Gross, M. Atlan, and E. Absil, “Noise and aliases in off-axis and phase-shifting holography,” *Applied Optics*, vol. 47, no. 11, pp. 1757–1766, 2008.
- [34] F. Joud, F. Laloe, M. Atlan, J. Hare, and M. Gross, “Imaging a vibrating object by sideband digital holography,” *Optics Express*, vol. 17, p. 2774, 2009.
- [35] F. Joud, F. Verpillat, F. Laloe, M. Atlan, J. Hare, and M. Gross, “Fringe-free holographic measurements of large-amplitude vibrations,” *Opt. Lett.*, vol. 34, no. 23, pp. 3698–3700, 2009.
- [36] M. Atlan, M. Gross, and J. Leng, “Laser Doppler imaging of microflow,” *J. Eur. Opt. Soc. Rapid Publ.*, vol. 1, p. 06 025-1, 2006.
- [37] M. Atlan, M. Gross, B. Forget, T. Vitalis, A. Rancillac, and A. Dunn, “Frequency-domain wide-field laser Doppler in vivo imaging,” *Opt. Lett.*, vol. 31, no. 18, pp. 2762–2764, 2006.
- [38] M. Atlan, B. Forget, A. Boccara, T. Vitalis, A. Rancillac, A. Dunn, and M. Gross, “Cortical blood flow assessment with frequency-domain laser Doppler microscopy,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 12, p. 024019, 2007.
- [39] M. Atlan, M. Gross, T. Vitalis, A. Rancillac, J. Rossier, and A. Boccara, “High-speed wave-mixing laser Doppler imaging in vivo,” *Opt. Lett.*, vol. 33, no. 8, pp. 842–844, 2008.
- [40] M. Gross, P. Goy, B. Forget, M. Atlan, F. Ramaz, A. Boccara, and A. Dunn, “Heterodyne detection of multiply scattered monochromatic light with a multi-pixel detector,” *Opt. Lett.*, vol. 30, no. 11, pp. 1357–1359, 2005.
- [41] M. Lesaffre, M. Atlan, and M. Gross, “Effect of the photon’s brownian Doppler shift on the weak-localization coherent-backscattering cone,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 97, no. 3, p. 33901, 2006.
- [42] M. Gross, P. Goy, and M. Al-Koussa, “Shot-noise detection of ultrasound-tagged photons in ultrasound-modulated optical imaging,” *Opt. Lett.*, vol. 28, no. 24, pp. 2482–2484, 2003.
- [43] M. Atlan, B. Forget, F. Ramaz, A. Boccara, and M. Gross, “Pulsed acousto-optic imaging in dynamic scattering media with heterodyne parallel speckle detection,” *Opt. Lett.*, vol. 30, no. 11, pp. 1360–1362, 2005.
- [44] L. Wang and X. Zhao, “Ultrasound-modulated optical tomography of absorbing objects buried in dense tissue-simulating turbid media,” *Appl. Opt.*, vol. 36, no. 28, pp. 7277–7282, 1997.
- [45] F. Ramaz, B. Forget, M. Atlan, A. Boccara, M. Gross, P. Delaye, and G. Roosen, “Photorefractive detection of tagged photons in ultrasound modulated optical tomography of thick biological tissues,” *Opt. Express*, vol. 12, pp. 5469–5474, 2004.
- [46] L. Wang and G. Ku, “Frequency-swept ultrasound-modulated optical tomography of scattering media,” *Opt. Lett.*, vol. 23, no. 12, pp. 975–977, 1998.
- [47] M. Gross, F. Ramaz, B. Forget, M. Atlan, A. Boccara, P. Delaye, and G. Roosen, “Theoretical description of the photorefractive detection of the ultrasound modulated photons in scattering media,” *Opt. Express*, vol. 13, pp. 7097–7112, 2005.
- [48] L. Sui, R. Roy, C. DiMarzio, and T. Murray, “Imaging in diffuse media with pulsed-ultrasound-modulated light and the photorefractive effect,” *Appl. Opt.*, vol. 44, no. 19, pp. 4041–4048, 2005.

- [49] M. Lesaffre, F. Jean, F. Ramaz, A. Boccara, M. Gross, P. Delaye, and G. Roosen, "In situ monitoring of the photorefractive response time in a self-adaptive wavefront holography setup developed for acousto-optic imaging," *Optics Express*, vol. 15, no. 3, pp. 1030–1042, 2007.
- [50] L. Yu and M. Kim, "Wavelength-scanning digital interference holography for tomographic three-dimensional imaging by use of the angular spectrum method," *Opt. Lett.*, vol. 30, no. 16, pp. 2092–2094, 2005.
- [51] H. Bachor, T. Ralph, S. Lucia, and T. Ralph, *A Guide to Experiments in Quantum Optics*. New York: Wiley-vch, 1998.



**Frédéric Verpillat** received the **which degree???** from the Ecole Normale Supérieure of Lyon (France) in 2005, and the M.S degree of the Ecole Polytechnique Fédérale of Lausanne (Switzerland) in microengineering in 2009. His specialization is applied optics for biology or medicine (microscopy, optical tomography). he is currently working toward the Ph.D. degree from the Laboratoire Kastler Brossel, École Normale Supérieure, Paris, France, under the direction of Dr. M. Gross on the tracking of nanoparticles with digital holography.



**Fadwa Joud** received the M.S degree in condensed matter and radiation physics from Université Joseph Fourier Grenoble 1, France, in **which year??**. Since October 2008,

In October 2008, she joined the team Optics and Nano Objects at the Laboratoire Kastler Brossel, École Normale Supérieure, Paris, France, working toward the Ph.D. degree in applied physics under the supervision of Dr. M. Gross. Her major research project is holographic microscopy and its applications in the field of biology and the detection of

nanoparticles.



**Michael Atlan** received the Ph.D. degree and post-doctorates in optical physics under the tutelage of Drs. C. Boccara, A. Dunn, Maite Coppey and M. Gross.

He is currently a research investigator at CNRS, Paris, France. He works on non-invasive and non-ionizing imaging modalities to assess biological structures and dynamic processes from subcellular to tissular scales, designing coherent optical detection schemes to enable highly sensitive imaging at high throughput.



**Michel Gross** entered the French Ecole Normale Supérieure in 1971. He received the Ph.D. degree from University Pierre et Marie Curie, Paris, France, in 1980.

He has been with the Laboratoire Kastler Brossel (Paris, France, since 1975, where he is currently a research scientist. His scientific interests are atomic physics (superradiance, Rydberg and circular atoms), excimer laser refractive surgery, millimeter wave and terahertz technology, and digital. He developed a Millimeter Wave Network Analyzer and participated

toward the creation of the AB Millimeter company. His main current interest is digital holography. He has published about 80 scientific papers, and is co-inventor of 6 patents.

LEFEEE P  
Web Versio



