Etudes théorique et expérimentale du suivi de particules uniques en conditions extrêmes : imagerie aux photons uniques

Thomas Cajgfinger

▶ **To cite this version:**

Thomas Cajgfinger. Etudes théorique et expérimentale du suivi de particules uniques en conditions extrêmes : imagerie aux photons uniques. Autre [cond-mat.other]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10205 . tel-00999629

HAL Id: tel-00999629

https://theses.hal.science/tel-00999629

Submitted on 3 Jun 2014

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.

Numéro d'ordre : 205-2012 Année 2012

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

École Doctorale de Physique et d'Astrophysique

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenance prévue le 19 octobre 2012

par

Thomas CAJGFINGER

Étude théorique et expérimentale du suivi des particules uniques en conditions extrêmes : imagerie aux photons uniques.

Thèse dirigée par Rémi BARBIER

préparée à l'Institut de Physique Nucléaire de Lyon, Groupe EBCMOS

Jury :

Rapporteurs :	Jérôme	BAUDOT	-	Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien
	Xavier	MICHALET	-	University of California at Los Angeles
Directeur :	Rémi	BARBIER	-	Institut de Physique Nucléaire de Lyon
Président du jury :	Christophe	DUJARDIN	-	Laboratoire de Physico-chimie des matériaux luminescents (LPCML)
Examinateurs :	Maxime	DAHAN	-	Laboratoire Kastler Brossel
	Christophe	PLACE	-	Laboratoire Joliot Curie

Résumé

Ce manuscrit présente mon travail de thèse portant sur le détecteur de photons uniques *electron-bombarded* CMOS (ebCMOS) à haute cadence de lecture (500 images/seconde).

La première partie compare trois détecteurs ultra-sensibles et et leurs méthodes d'amélioration de la sensibilité au photon : le CMOS bas bruit (sCMOS), l' *electron-multiplying* CCD (emCCD) à multiplication du signal par pixel et l'ebCMOS à amplification par application d'un champ électrique. La méthode de mesure de l'impact intra-pixel des photons sur le détecteur ebCMOS est présentée.

La seconde partie compare la précision de localisation de ces trois détecteurs dans des conditions extrêmes de très bas flux de photons ($<$10 photons/image). La limite théorique est tout d'abord calculée à l'aide de la limite inférieure de Cramér-Rao pour des jeux de paramètres significatifs. Une comparaison expérimentale des trois détecteurs est ensuite décrite. Le montage permet la création d'un ou plusieurs points sources contrôlés en position, nombre de photons et bruit de fond. Les résultats obtenus permettent une comparaison de l'efficacité, de la pureté et de la précision de localisation des sources.

La dernière partie décrit deux expériences réalisées avec la caméra ebCMOS. La première consiste au suivi de nano-cristaux libres (D$>$10 $\mu m^2 s^{-1}$) au centre Nanoptec avec l'équipe de Christophe Dujardin. La seconde s'intéresse à la nage de bactéries en surface à l'institut Joliot Curie avec l'équipe de Laurence Lemelle. L'algorithme de suivi de sources ponctuelles au photon unique avec l'implémentation d'un filtre de Kalman est aussi décrit.

Abstract

This manuscript presents my thesis on the high frame rate (500 frames / second) single-photon detector electron-bombarded CMOS (ebCMOS).

The first section compares three ultra-sensitive detectors and their methods for improving photon sensitivity : the CMOS low noise (sCMOS), the electron-multiplying CCD (emCCD) with signal multiplication by pixel and the ebCMOS with amplification by applied electric field. The method developed to detect single photon impacts with intra-pixel resolution on the ebCMOS sensor is presented.

The second section compares the localization accuracy of these detectors in extreme conditions of very low photon flux (<10 photons/frame). First the theoretical limit is calculated using the Cramér-Rao lower bound for significant parameter sets. An experimental comparison of the detectors is then described. The setup provides of one or more point sources controlled in position, signal and background noise. The results allow a comparison of the experimental effectiveness, purity and localization accuracy.

The last section describes two experiments with the ebCMOS camera. The first aims to track hundreds of quantum dots simultaneously at the Nanoptec center with the team of Christophe Dujardin. The second focuses on the swimming of bacteria at the surface at the Joliot Curie Institute with the team of Laurence Lemelle. The point sources tracking algorithm using single photons and the Kalman filter implementation developed for these experiments is also described.

Table des matières

Résumé **1**

Abstract **2**

Table des matières **3**

Introduction **7**

I Détection de photons à bas niveaux de lumière 10

1 Imageurs rapides et sensibles étudiés **13**
1.1 Détecteurs de photons CCD et CMOS 14
1.1.1 Conversion d'un photon en un porteur de charge 15
1.1.2 Collection et accumulation des charges 16
1.1.3 Efficacité et bruits associés à la collection des charges secondaires . 16
1.1.4 Lecture des charges accumulées 17
1.2 Principe de fonctionnement des CCD à multiplication électronique 22
1.2.1 Ionisation par impact 22
1.2.2 Efficacité quantique effective 24
1.2.3 Facteur de bruit en excès (ENF) 24
1.2.4 Bruit d'horloge CIC 25
1.3 Description du principe du détecteur ebCMOS 25
1.3.1 Création et focalisation de proximité d'un photo-électron 26
1.3.2 Trajectoire et accélération du photo-électron 27
1.3.3 Diffusion des électrons secondaires et collection par les diodes . . . 30
1.4 Spécification des caméras sCMOS et emCCD testées 33
1.4.1 Caractéristiques mesurées de la caméra Andor sCMOS Neo 33
1.4.2 Caractéristiques de la caméra Andor emCCD iXon Ultra 897 38
1.5 Caméra ebCMOS : le prototype LUSIPHER 41
1.5.1 Caractéristiques du CMOS 46
1.5.2 Caractérisation des photo-cathodes S20 et S25 48
1.6 Valeurs des paramètres utilisés dans la simulation Monte-Carlo 53

Conclusion **54**

2 Méthode de reconstruction d'un impact de photo-électron avec l'ebCMOS **55**
2.1 Présentation de l'algorithme de détection des photo-électrons 55
2.1.1 Paramètres et données disponibles à chaque image 56
2.1.2 Méthode du clustering 57

2.2 Localisation et comptage des impacts de photo-électrons et filtrage des retours ioniques . . . 61
2.2.1 Localisation de l'impact d'un photo-électron et fonction de correction η . . . 61
2.2.2 Mesure d'efficacité et de pureté avec la simulation Monte-Carlo . . 63
2.2.3 Linéarité du gain et comptage de photons . . . 65
2.2.4 Détection et suppression des retours ioniques . . . 67
2.3 Applications de la méthode des clusters . . . 69

Conclusion **71**

Bibliographie **74**

II Calculs et mesures de limites de localisation sur la position de sources ponctuelles 75

3 Calculs de précision de localisation de sources ponctuelles immobiles : la borne inférieure de Cramér-Rao **79**
3.1 Réponse impulsionnelle du système optique . . . 79
3.2 Limite de Cramér-Rao et modélisation de l'information recueillie par les détecteurs . . . 82
3.2.1 Énoncé du théorème . . . 82
3.2.2 Méthode, paramètres, variables et distributions . . . 84
3.3 Détecteur de position de photons . . . 85
3.3.1 Émission de la source . . . 85
3.3.2 Modélisation de la réponse impulsionnelle du système de détection . 85
3.3.3 Modélisation de l'ebCMOS en mode comptage . . . 86
3.4 Modélisation d'un détecteur pixelisé . . . 86
3.4.1 Pixelisation . . . 87
3.4.2 Collection de charges . . . 87
3.4.3 Bruit de lecture . . . 88
3.4.4 Amplification des électrons secondaires . . . 88
3.5 Calcul des limites de précision de localisation . . . 90
3.5.1 Matrice d'information dans le cas du détecteur parfait . . . 90
3.5.2 Dérivées des fonctions de vraisemblance utilisées dans le calcul de la limite de Cramér-Rao . . . 91
3.5.3 Implémentation numérique . . . 92
3.6 Étude de paramètres significatifs sur la précision de localisation dans des conditions extrêmes de luminosité . . . 93
3.6.1 Paramètres généraux . . . 93
3.6.2 Limites d'échantillonnage . . . 93
3.6.3 Influence des bruits et de l'amplification des charges primaires . . . 96

Conclusion **105**

4 Mesures expérimentales de précision de localisation **106**
4.1 Principe et calibration de l'expérience de focalisation d'un point source contrôlé . . . 106
4.1.1 Calibration du signal délivré par la source . . . 107
4.1.2 Calibration spatiale . . . 108

4.1.3 Signal reçu et quantification de l'efficacité quantique relative entre l'emCCD et l'ebCMOS . . . 112
4.1.4 Méthode de calcul de la précision de localisation sur la position estimée . . . 114
4.1.5 Méthode de calcul de l'efficacité et du taux de faux . . . 115
4.2 Comparaison des caméras ebCMOS, sCMOS et emCCD . . . 115
4.2.1 Efficacité et taux de faux . . . 115
4.2.2 Précision de localisation du point source . . . 117
4.3 Mesure de l'effet du bruit de fond sur la précision de localisation . . . 122
4.3.1 Calibration du point source . . . 122
4.3.2 Génération et contrôle du bruit de fond . . . 123
4.3.3 Mesures de précision de localisation, d'efficacité et de taux de faux . 124
4.4 Étude du cas de points sources multiples formés par une matrice de micro-lentilles . . . 125
4.4.1 Description du système . . . 125
4.4.2 Mesure des bruits et calibration des points sources . . . 126
4.4.3 Précision de localisation, efficacité et pureté en fonction du signal . 129

Conclusion **131**

Bibliographie **132**

III Expériences et suivi dynamique de particules 133

5 Suivi de sources émettrices de photons et filtre de Kalman **137**
5.1 Détection et suivi d'une source en détection de photo-électrons . . . 137
5.1.1 Identification d'une source . . . 139
5.1.2 Description du suivi de sources . . . 140
5.1.3 Gestion de la combinatoire des positions nouvelles d'une source en construction . . . 141
5.2 Filtre de Kalman avec détection de photons . . . 142
5.2.1 Prédictions et filtre de Kalman . . . 142
5.2.2 Équation d'état et innovation avec détection de photons . . . 145
5.3 Mesure du coefficient de diffusion de particules libres . . . 150
5.3.1 Description de la mesure . . . 150
5.3.2 Influence des précisions temporelle et de localisation et optimisation 151
5.3.3 Comparaison théorique des détecteurs emCCD et ebCMOS pour la mesure du MSD . . . 152
5.3.4 Amélioration de la précision avec le filtre de Kalman . . . 154

Conclusion **155**

6 Suivi de nanocristaux à très bas niveau de lumière et mesures de coefficients de diffusion **156**
6.1 Description du système optique . . . 156
6.1.1 Microscopie de fluorescence . . . 156
6.1.2 Nanocristaux semiconducteurs . . . 157
6.2 Description de l'expérience . . . 159
6.2.1 Montage expérimental . . . 159
6.2.2 Mesure du bruit de fond . . . 159
6.3 Mesures de précision de localisation et détection du clignotement . . . 162

6.3.1 Mesures de précision de localisation pour deux échantillons d'intensités différentes . . . 162
6.3.2 Mesures de clignotement de Quantum Dots . . . 165
6.3.3 Calibration des moteurs et précision sur la vitesse . . . 167
6.4 Quantum Dots libres entre deux lames de verre : mesure du coefficient de diffusion . . . 169
6.4.1 Signal et bruit de fond entre deux lames de verre . . . 169
6.4.2 Mesure du coefficient de diffusion et calcul de la taille des QD . . . 171

Conclusion **174**

7 Étude de la nage de bactéries à la surface et calibration d'un évènement de tumbling **175**
7.1 Description du montage expérimental de la nage de bactéries observée par microscopie en champ sombre . . . 176
7.1.1 Description de la microscopie en champ sombre . . . 176
7.1.2 Montage expérimental et réglages de la caméra ebCMOS . . . 176
7.2 Mesure du bruit caméra et du bruit de fond microscope . . . 177
7.3 Suivi de bactéries . . . 178
7.3.1 Description du procédé expérimental de la culture de bactéries . . . 178
7.3.2 Détection d'une bactérie . . . 179
7.3.3 Mesures de précision sur des bactéries immobiles . . . 184
7.4 Étude de la nage de bactéries à la surface au grandissement 100× . . . 189
7.4.1 Étude de la différence entre les centres de gravité de la forme et de l'intensité . . . 189
7.4.2 Suivi de l'orientation du corps pendant la nage . . . 191
7.4.3 Détection d'événements "anormaux" au cours de la nage . . . 194
7.5 Perspectives sur l'utilisation du grandissement 20× pour le suivi de bactéries . . . 197

Conclusion **200**

Bibliographie **202**

Conclusion **203**

Liste des tableaux **206**

Liste des figures **207**

Introduction

La vidéo-microscopie vise l'étude d'un grand nombre de phénomènes physiques ou biologiques : de la position et de l'interaction de particules, à la structure de molécules par pointillisme (PALM : *Photoactivated Localization Microscopy*, STORM : *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) en passant par les changements locaux d'environnements par mesure de la variation du coefficient de diffusion. Dans ces études, ce n'est plus l'image mais l'information sur la position des sources au cours du temps qui est utilisée.

Chacune de ces applications nécessite une résolution spatiale sur la position des sources de l'ordre de quelques micromètres dans le plan image en un temps suffisamment court correspondant au processus physique observé ou à la méthode utilisée.

L'amélioration des résolutions obtenues par vidéo-microscopie passe par le développement des balises lumineuses (quantum dots, protéines fluorescentes,...), qui ont été rendues plus stables et plus efficaces. Malgré cela, l'observation peut être entravée par la phototoxicité de la biologie observée ou l'auto-fluorescence du milieu, qui peut augmenter plus rapidement que le signal des sources.

Un signal limité et une cadence de lecture qui augmente conduisent à l'élément de base de la détection : **le photon**.

De nombreux capteurs ont été développés pour détecter le photon, l'emCCD (*electron-multiplying* CCD) étant le plus utilisé d'entre eux. Sa stratégie repose sur la multiplication du signal reçu par ionisation d'impact, donnant un signal pour un photon unique très supérieur en moyenne au bruit de lecture. Le caractère stochastique de l'amplification peut cependant limiter l'efficacité de la détection du photon.

L'emCCD est une technologie mature qui permet une très bonne sensibilité à quelques photons par pixels pour un grand champ de vue à une vitesse de 30 images par seconde.

Une autre stratégie repose sur la réduction forte du bruit de lecture, comme c'est le cas pour le sCMOS (*Scientific* CMOS). Le bruit de lecture est réduit jusqu'à 1 e- RMS. Le sCMOS possède de plus un pixel petit et une grande vitesse d'acquisition.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet R&D LUSIPHER (*Large-scale Ultra-fast SIngle-PHoton recordER*), un système composé d'une caméra ebCMOS (*electron-bombarded* CMOS) et d'un système d'acquisition 10 Gbit/s.

L'ebCMOS consiste en une photo-cathode, un tube à vide, un champ électrique et un capteur rapide CMOS aminci et éclairé en face arrière. L'impact d'un photon sur la photo-cathode génère un photo-électron dans le tube à vide qui est accéléré par le champ

électrique et dépose son énergie dans la couche epitaxiale du CMOS, créant un grand nombre d'électrons secondaires.

Le projet LUSIPHER permet ainsi de répondre aux critères nécessaires à la vidéo-microscopie :

- Sensibilité au photon unique.
- Linéarité du gain permettant un comptage des photons.
- Haute cadence de lecture sur un grand champ de vue.
- Acquisition en continu.

La stratégie du capteur ebCMOS mise sur l'indépendance de la multiplication du signal et de la lecture des pixels pour permettre une sensibilité au photon sur un grand champ de vue pour une cadence de lecture très importante (500 images par seconde) disponible sur des temps longs.

Cependant, l'amplification par photo-cathode souffre d'une faible efficacité quantique (15 à 25 % au maximum) par rapport à celle de l'emCCD (80 - 90 %) et même du sCMOS (50 - 60 %).

Les trois capteurs présentés ont chacun leur avantages et leurs faiblesses liés à la stratégie choisie d'amplification du rapport signal sur bruit, donnés dans la table 1.

	Bruit de lecture	Amplification du signal	Taille de pixel	Efficacité quantique	Vitesse de lecture
sCMOS	1 e-	non	6.5 μm	50 %	500 fps
emCCD	50 e-	300	16 μm	90 %	30 fps
ebCMOS	8 e-	200	10 μm	25 %	500 fps

TABLE 1 – Résumé des caractéristiques des trois détecteurs sCMOS, emCCD et ebCMOS.

Comment ces stratégies impactent la résolution des détecteurs au photon unique ? Est-il pertinent de mesurer l'information à ce niveau de lumière, étant donné que la résolution évolue en $1/\sqrt{\text{signal}}$?

Le travail présenté dans ce manuscrit est composé de trois parties. La première partie présente les trois détecteurs étudiés dans la suite de ce travail emCCD, sCMOS et ebCMOS. Pour chaque capteur, le principe de fonctionnement, les performances et les bruits ainsi que la méthode utilisée pour détecter les photons seront décris.

La deuxième partie traite de la résolution sur la localisation d'une source pour ces capteurs. En premier lieu la méthode statistique de Cramér-Rao sera développée. L'influence de plusieurs paramètres clés sur la résolution sera étudiée, ainsi qu'une comparaison des détecteurs à bas niveau de lumière.

Des mesures expérimentales réalisées sur bancs de tests seront présentées par la suite. Elles permettront la calibration de la résolution de la position d'un point-source micrométrique pour les trois capteurs étudiés. De plus, une matrice de microlentilles sera utilisée pour focaliser plusieurs centaines de sources lumineuses sur le capteur.

La dernière partie s'intéresse aux cibles dynamiques. Tout d'abord la méthode de suivi de sources en mouvement sera présentée, avec l'introduction d'un filtre de Kalman et une discussion sur la mesure de coefficients de diffusion. Ensuite deux expériences réalisées avec la caméra ebCMOS seront présentées :

1. la première est typique de la vidéo-microscopie et s'intéresse au suivi de quantum dots en mouvement brownien par microscopie de fluorescence ;
2. la seconde traite de la nage de bactéries à la surface, avec une mesure image par image de l'orientation de son corps.

Première partie

Détection de photons à bas niveaux de lumière

Table des matières

1 Imageurs rapides et sensibles étudiés 13

1.1 Détecteurs de photons CCD et CMOS 14
1.1.1 Conversion d'un photon en un porteur de charge 15
1.1.2 Collection et accumulation des charges 16
1.1.3 Efficacité et bruits associés à la collection des charges secondaires . 16
1.1.4 Lecture des charges accumulées 17
1.2 Principe de fonctionnement des CCD à multiplication électronique 22
1.2.1 Ionisation par impact 22
1.2.2 Efficacité quantique effective 24
1.2.3 Facteur de bruit en excès (ENF) 24
1.2.4 Bruit d'horloge CIC 25
1.3 Description du principe du détecteur ebCMOS 25
1.3.1 Création et focalisation de proximité d'un photo-électron 26
1.3.2 Trajectoire et accélération du photo-électron 27
1.3.3 Diffusion des électrons secondaires et collection par les diodes . . . 30
1.4 Spécification des caméras sCMOS et emCCD testées 33
1.4.1 Caractéristiques mesurées de la caméra Andor sCMOS Neo 33
1.4.2 Caractéristiques de la caméra Andor emCCD iXon Ultra 897 38
1.5 Caméra ebCMOS : le prototype LUSIPHER 41
1.5.1 Caractéristiques du CMOS 46
1.5.2 Caractérisation des photo-cathodes S20 et S25 48
1.6 Valeurs des paramètres utilisés dans la simulation Monte-Carlo 53

Conclusion 54

2 Méthode de reconstruction d'un impact de photo-électron avec l'ebCMOS 55

2.1 Présentation de l'algorithme de détection des photo-électrons 55
2.1.1 Paramètres et données disponibles à chaque image 56
2.1.2 Méthode du clustering 57
2.2 Localisation et comptage des impacts de photo-électrons et filtrage des retours ioniques 61
2.2.1 Localisation de l'impact d'un photo-électron et fonction de correction η 61
2.2.2 Mesure d'efficacité et de pureté avec la simulation Monte-Carlo . . 63

2.2.3 Linéarité du gain et comptage de photons 65
2.2.4 Détection et suppression des retours ioniques 67
2.3 Applications de la méthode des clusters 69

Conclusion **71**

Bibliographie **74**

Chapitre 1

Imageurs rapides et sensibles étudiés

La vidéo-microscopie nécessite un imageur sensible, rapide avec une bonne précision de localisation pour permettre le suivi simultané d'un grand nombre de particules afin de mesurer des paramètres physiques (vitesse, coefficient de diffusion,...). Les photons visibles émis par les sources observées ont une énergie de l'ordre de l'électron-volt (eV), que les capteurs des imageurs doivent convertir en un signal lisible par une acquisition électronique.

La lecture du signal s'effectue avec une précision de l'ordre de la dizaine d'électrons pour les capteurs actuels, alors que le signal d'un photon incident vaut un. Le signal émis par les sources est quant à lui limité par :

1. l'efficacité des sondes pour la microscopie par fluorescence.
2. la phototoxicité des molécules pour les processus biologiques.
3. l'auto-fluorescence et le bruit de fond, qui peuvent augmenter plus rapidement que le signal.
4. la saturation des fluorophores et leur blanchiment.

De plus, pour suivre des particules en mouvement en conservant une bonne précision de localisation il est nécessaire d'obtenir :

1. une bonne résolution temporelle donnée par une grande cadence de lecture. Comme le nombre d'images augmente, le signal par image diminue. De plus, le bruit de lecture augmente avec la vitesse de lecture.
2. une bonne précision de localisation donnée par une petite taille de pixel (élément sensible), ce qui résulte en une diminution du signal par pixel tout en conservant le même bruit de lecture par pixel.
3. un grand champ de vue donné par un grand nombre de pixels, ce qui nécessite une augmentation de la vitesse de lecture, donc augmente le bruit de lecture.

Les conditions requises par la vidéo-microscopie vont donc dans le sens d'une diminution du rapport signal sur bruit, ce qui dégrade fortement la précision de localisation ($\propto 1/\sqrt{\text{signal}}$). Les imageurs doivent donc permettre toutes ces conditions en augmentant le rapport signal sur bruit. Pour cela, plusieurs méthodes sont utilisées :

1. baisser le bruit de lecture. Pour permettre une détection du photon unique, il faut donc un bruit de lecture bien inférieur au signal déposé par un photon unique.
2. amplifier le signal incident avant la lecture.

Il existe beaucoup de projets d'imageurs développés dans ce but :
- les détecteurs à galette de microcanaux [1] (*MicroChannel Plate* ou MCP).
- le détecteur à comptage de photons h33D [2], composé d'une photo-cathode S20 focalisée sur un empilement de MCP, permettant le suivi de molécules uniques [3].
- les détecteurs à base de photomultiplicateurs en Silicium [4] [5] (*Silicon Photo-Multipliers* ou SiPM) composés de matrices de photodiodes à avalanche (*Avalance PhotoDiode* ou APD).
- les détecteurs CCD à bombardement électronique [6] (*electron bombardment CCD* ou ebCCD) utilisant une photo-cathode focalisée sur un capteur CCD.

Le but de ce chapitre n'est pas une description exhaustive de tous les imageurs sensibles. Nous ne nous intéresserons ici qu'à trois capteurs solides basés sur la technologie très répandue des CCD (Charge-Coupled-Device) et CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) [7] :
- le capteur CMOS scientifique [8] [9] (sCMOS) dont l'objectif est de réduire au maximum le bruit de lecture.
- le capteur CCD amplifié électroniquement [10] (electron-multiplying CCD ou emCCD) qui utilise une amplification électronique du signal reçu par pixel.
- le capteur CMOS électro-bombardé [11] (electro bombarded CMOS ou ebCMOS) dont l'amplification provient de l'accélération des électrons photo-convertis qui augmente le signal déposé par 1 photon.

Ces détecteurs s'appuient sur la même technologie de détection du photon, avec une détection de l'énergie du photon par des pixels solides. Il est donc possible de comparer l'efficacité relative de trois méthodes d'amplification du rapport signal sur bruit dans l'objectif de la vidéo-microscopie.

En premier lieu, nous verrons dans la partie 1.1 le principe de détection de ces imageurs. Ensuite, nous nous intéresserons dans les parties 1.2 et 1.3 aux stratégies de multiplication du signal utilisées par les capteurs emCCD et ebCMOS permettant la sensibilité au photon, leurs avantages et leurs limites. Enfin, nous verrons dans les parties 1.4 et 1.5 les mesures expérimentales de performances de ces trois capteurs.

1.1 Détecteurs de photons CCD et CMOS

Un imageur échantillonne à l'aide d'un capteur pixellisé une image formée par un système optique. La brique élémentaire de cet échantillonnage est le pixel (pour *picture element*) qui mesure le flux de photons incident sur sa surface sensible.

La capture de l'image, c'est à dire sa mise en forme numérique, se décompose en quatre étapes :
1. Mise au "zéro" du pixel, replacé à sa tension de référence V_{ref}.
2. Photo-conversion des photons en porteurs de charges.
3. Collection des porteurs de charges.
4. Conversion des charges en un signal électrique mesurable par l'électronique d'acquisition après amplification.

La formation et la collection des charges primaires dans les pixels des capteurs CCD et CMOS (étapes 2 et 3) s'appuient sur les même principes physiques. L'architecture de lecture des pixels (étapes 1 et 4) différencie les deux types de capteurs :

- le capteur CCD effectue une lecture en série des pixels, par colonnes.
- le capteur CMOS est composé de pixels actifs ou APS (*Active Pixel Sensor*) contenant un circuit intégré permettant la mesure des charges par le pixel, qui induit une lecture de la matrice libre, en série ou en parallèle.

Les effets de chaque architecture sur le comportement des capteurs sera étudié par la suite.

1.1.1 Conversion d'un photon en un porteur de charge

Définition d'un matériau semi-conducteur

La partie sensible du pixel est constituée de matériaux semi-conducteurs, typiquement du Silicium (Si). Les semi-conducteurs se différencient des métaux par l'écart d'énergie (gap) entre les bandes de valence et de conduction. Les électrons de la couche de valence ne sont donc pas libres dans un semi-conducteur. Le passage de la bande de valence à la bande de conduction nécessite l'apport d'une énergie extérieure supérieure au gap. Le schéma de la Fig. 1.1 résume ce modèle.

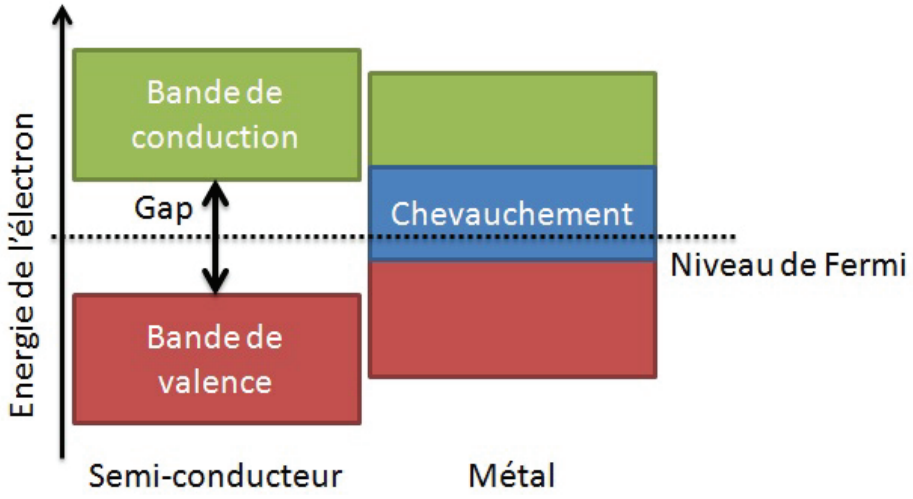


FIGURE 1.1 – Les bandes d'énergie de valence et de conduction d'un métal se chevauchent, permettant la circulation des électrons. Dans un semi-conducteur, les bandes sont séparées par une différence d'énergie, le "gap". Pour libérer un électron, il faut apporter une énergie extérieure supérieure au gap.

Effet photoélectrique

L'effet photoélectrique est le processus d'excitation d'un électron de la bande de valence sur la bande de conduction par l'absorption de l'énergie d'un photon ($E = h\nu$) supérieure à l'énergie du gap (E_{gap}).

Réduction du gap par dopage du matériau

L'énergie du gap peut être réduite par dopage du semi-conducteur. Le principe du dopage est d'introduire dans le matériau cristallin une certaine quantité d'atomes (10^{13} à

10^{19} atomes par cm^3) ayant un nombre d'électrons de valence différent, modifiant ainsi la structure des bandes.

Un dopage de type N (Négatif) est constitué d'atomes ayant plus d'électrons de valence, à l'inverse du dopage P (Positif). Pour un dopage P du Silicium (N=14, 4 e- de valence), du Bore peut être utilisé (N=5, 3 e- de valence).

1.1.2 Collection et accumulation des charges

Un pixel fonctionne en formant un puits de potentiel dans lequel les porteurs de charge photo-convertis sont piégés [12]. Chaque pixel d'un capteur CCD ou CMOS est constitué d'une capacité MOS (*Metal Oxide Semiconductor*) ou une photodiode suivant ce principe. Le schéma de principe du piège à électrons secondaires est donné pour la capacité MOS par la Fig. 1.2.

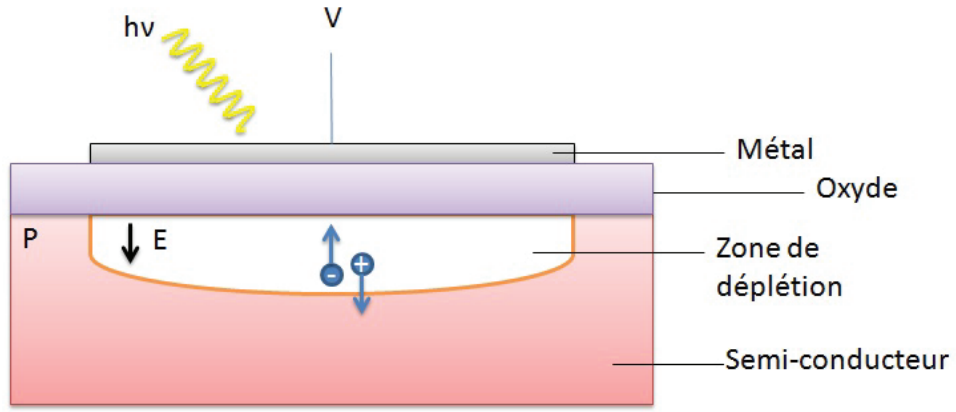


FIGURE 1.2 – Schéma de principe d'un détecteur de photons de type CCD ou CMOS. Une paire électron-trou est créée par effet photoélectrique dans la zone sensible et les électrons sont guidés par le champ électrique de la zone de déplétion. Le nombre d'électrons capturés est en principe proportionnel au nombre de photons incidents.

Une capacité MOS est constituée d'un métal connecté à une électrode permettant d'appliquer un potentiel, d'un isolant (oxyde) et d'un substrat de Si dopé P.

En appliquant une tension positive à l'électrode, les trous sont repoussés et une zone de déplétion est créée. Cette zone forme un puits de potentiel entre l'isolant et le substrat. Les électrons des paires électrons-trous photo-converties dans le substrat sont guidés par le champ électrique et confinés dans cette zone. La quantité d'électrons piégés est directement proportionnelle au nombre de photons incidents.

1.1.3 Efficacité et bruits associés à la collection des charges secondaires

La collection de charges issues de la conversion des photons n'est pas parfaite. Elle est impactée par la technologie utilisée, les caractéristiques physiques du détecteur et les

impuretés présentes. Les effets qui impactent l'efficacité et la pureté de ce processus sont classés en deux catégories :

1. L'efficacité de l'ensemble conversion-collection des charges, qui dépend des matériaux utilisés.
2. Les bruits issus de la fabrication des pixels, qui provoquent une non-uniformité des pixels et introduisent des impuretés.

Efficacité quantique, efficacité de collection de charges et recombinaison

L'efficacité quantique du pixel η_p est définie comme le rapport entre le nombre de photoélectrons piégés dans la zone de déplétion et le nombre de photons incidents. Elle s'écrit :

$$\eta_p = \mathrm{QE} = \frac{\text{Nombre de photoélectrons piégés}}{\text{Nombre de photoélectrons incidents}} \tag{1.1}$$

La contribution à l'efficacité quantique est divisée en deux parties, extérieure et intérieure à la zone sensible du pixel :

1. la partie externe correspond au facteur de transmission des couches externes ainsi qu'à l'absorption du photon dans la couche sensible. Les processus physiques responsables de la perte en efficacité sont :
   (a) la réflexion du photon sur les couches superficielles du pixel (passivation, oxyde,...).
   (b) la non absorption du photon par la zone sensible. Cette valeur dépend du coefficient d'absorption $\alpha\ (\lambda)$ du matériau qui dépend de la longueur d'onde λ du photon.
2. la partie interne correspond à l'efficacité de collection des électrons générés dans la couche sensible. Les électrons peuvent ne pas être collectés dans la zone de déplétion si :
   (a) l'électron généré se recombine avec un trou.
   (b) l'électron diffuse en dehors de la zone de déplétion.

Les capteurs actuels ont une bonne efficacité quantique, supérieure à 80 % pour les CCD et 50 % pour les CMOS éclairés en face avant.

Courant d'obscurité dans les pixels

Le courant d'obscurité du pixel est défini comme le nombre de charges détectées dans le noir par le pixel par unité de temps. Ces électrons mesurés sont générés thermiquement dans le pixel et sont piégés dans la zone de déplétion.

La valeur du courant d'obscurité dépend de la durée d'exposition du pixel et peut être réduite par refroidissement du capteur. L'ordre de grandeur du courant d'obscurité des pixels actuels est inférieur à 0.1 électrons par pixel et par seconde.

1.1.4 Lecture des charges accumulées

Principe général de lecture de la charge

La lecture des électrons piégés est faite par conversion de la charge accumulée en signal électrique mesurable par l'électronique d'acquisition après amplification.

La diode polarisée en inverse se comporte en condensateur et est préchargée à une tension de référence V_{ref}. L'accumulation des charges décharge en partie le condensateur. Ainsi, la différence de potentiel entre la tension de référence et la tension V_{out} en fin de lecture est proportionnelle au nombre de charges piégées. La différence de potentiel ΔV correspondant au signal est donnée par :

$$\Delta V = V_{signal} = V_{ref} - V_{out} = n_e \frac{Aq}{C} \tag{1.2}$$

avec n_e le nombre d'électrons captés, q la charge électrique élémentaire, A le gain du transistor de suivi et C la capacité de la diode.

Le signal de sortie est amplifié par le gain A puis par le buffer de sortie pour devenir une tension mesurable par le système d'acquisition. Ce processus ne doit pas briser la linéarité du processus de lecture de charges accumulées. Le signal échantillonné par un convertisseur analogique numérique (CAN) est alors exprimé en unités ADCU (*Analog-to-Digital Conversion Unit* ou conversion analogique/digital). Le nombre d'électrons secondaires est proportionnel au nombre d'ADCU, par le facteur de conversion f_{ADC}.

Bruit de lecture

Le bruit de lecture d'un pixel est la somme de tous les phénomènes modifiant le nombre d'électrons photo-convertis. Sa valeur est exprimée en électrons RMS et mesure l'écart-type de la réponse du pixel autour du signal moyen dans le noir. Plusieurs facteurs entrent en compte dans la détermination du bruit de lecture du pixel :

1. le courant d'obscurité.
2. le bruit de reset.
3. les bruits d'amplification électroniques.

La connaissance du bruit de lecture du pixel permet de quantifier la validité du signal reçu. Un rapport signal sur bruit supérieur à trois (3 σ) pour un bruit gaussien a une probabilité inférieure à 0.3 %. Le choix de la valeur du rapport signal sur bruit est arbitraire et dépend de la pureté désirée.

L'ordre de grandeur du bruit de lecture des détecteurs CCD et CMOS actuels va de 1 (sCMOS) à 50 (emCCD) e- RMS. Il augmente avec la vitesse de lecture, ce qui pose un problème pour le suivi rapide de sources.

Bruit kTC et double échantillonnage corrélé

Après chaque lecture, la diode du pixel est remise à sa valeur de reset par application d'une tension en inverse. Le bruit de reset [13] ou bruit kTC définit la fluctuation due au bruit thermique autour de la valeur de la tension de référence. La valeur du bruit kTC est donnée par :

$$N_{reset} = \frac{\sqrt{kTC}}{q} \tag{1.3}$$

où N_{reset} est le bruit de reset exprimé en électrons, k est la constante de Boltzmann, T la température, q la charge de l'électron et C la capacité du condensateur.

Le double échantillonnage corrélé [13] ou CDS (*Correlated Double Sampling*) consiste à stocker la mesure de la tension du transistor de lecture après le reset pour la soustraire au signal mesuré après l'intégration des charges. Cela permet de supprimer les bruits liés à la lecture du pixel comme le bruit kTC.

Le principe de lecture de la charge d'un pixel est donné par la Fig. 1.3.

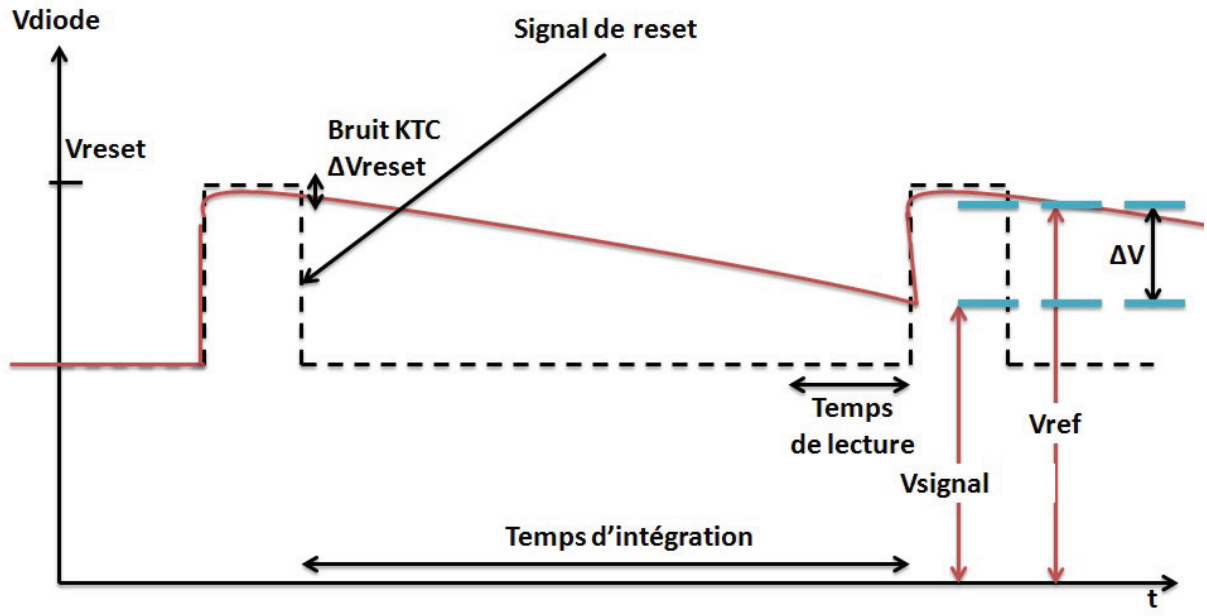
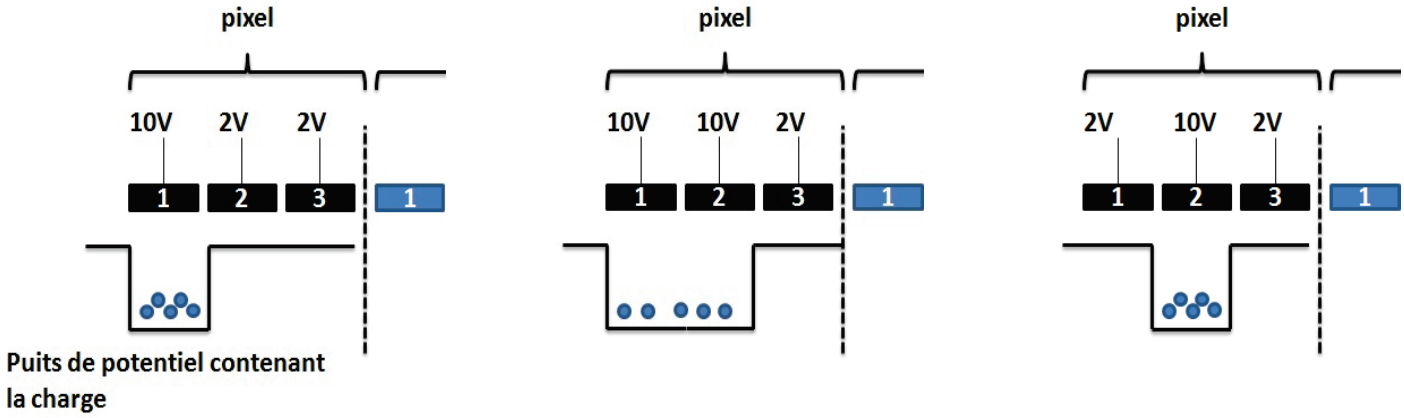


FIGURE 1.3 – Évolution de la tension mesurée par le transistor à la lecture des charges accumulées. Le pixel est mis à sa tension de référence en début de cycle. V_{ref} est mesurée et stockée. Les charges secondaires font baisser la tension jusqu'à une valeur V_{signal}. La charge accumulée est donc proportionnelle à $\Delta V = V_{ref} - V_{signal}$.

Lecture d'un pixel CCD

Un capteur CCD possède un transistor de lecture commun par colonne de pixels. Les pixels sont lus ligne après ligne par les registres de lecture. Pour arriver à ces registres, la charge de chaque pixel doit être transférée verticalement de voisin en voisin. La Fig. 1.4 montre comment la charge est transférée à l'intérieur du pixel vers le pixel voisin.



(a) (b) (c)

FIGURE 1.4 – Transfert de la charge d'un pixel au pixel voisin dans un capteur CCD. (a) La charge accumulée par un pixel est piégée dans un puits de potentiel créé par application d'une tension (10V). (b) Un puits de potentiel est créé dans la zone adjacente, où les charges peuvent se déplacer. (c) Le premier puits est éliminé. Les charges sont transférées ainsi vers le pixel voisin.

Le pixel est en général constitué de trois phases dans lesquelles des potentiels différents peuvent être appliqués, représentés par la Fig. 1.4 :

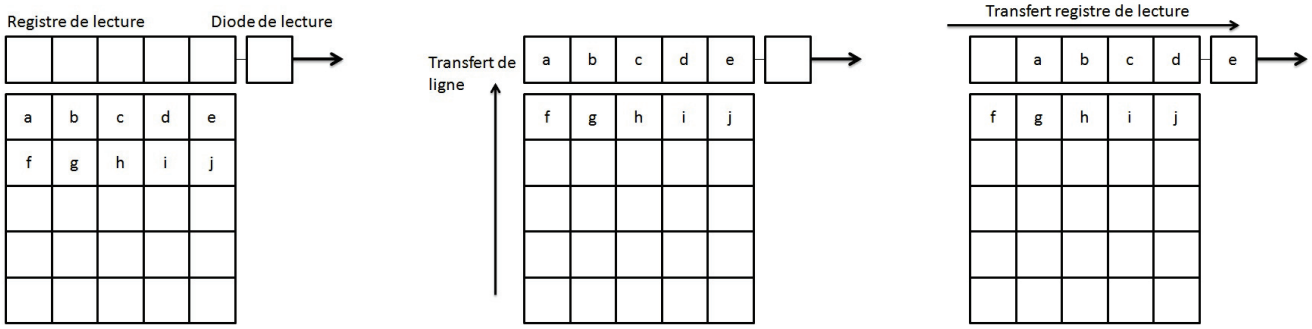
(a) Quand une tension suffisante est appliquée, un puits de potentiel est créé. Il permet de piéger les électrons pendant le temps d'intégration.

(b) Pour déplacer les charges piégées dans le puits de potentiel, une tension identique est appliquée dans la zone adjacente pour créer un autre puits de potentiel.

(c) Le premier puits de potentiel est éliminé, toutes les charges se déplacent de la zone 1 vers la zone 2.

(d) Le processus est répété pour amener la charge dans la zone 3, puis dans la zone 1 du pixel voisin.

La charge de chaque pixel est ainsi transférée de proche en proche vers le registre de lecture, comme le montre la Fig. 1.5.



(a) (b) (c)

FIGURE 1.5 – Lecture de la matrice de pixels d'un capteur CCD. Les charges sont transférées de proche en proche jusqu'au registre de lecture, où la valeur de chaque pixel est mesurée.

Le mécanisme de couplage de charges permet de transférer les charges des pixels dans le registre de lecture accolé à la matrice de pixels où elles seront lues par le transistor de lecture commun, schématisé par la Fig. 1.5 où :

(a) Les charges sont accumulées pendant le temps d'intégration.
(b) Les charges sont transférées ligne par ligne pour arriver dans le registre de lecture.
(c) La charge de chaque pixel est mesurée.
(d) Le processus est répété pour lire la matrice entière.

Ce mode de lecture a l'avantage d'homogénéiser les pixels qui possèdent alors les mêmes bruits de lecture par colonne (amplificateur commun), mais a l'inconvénient de limiter la vitesse de lecture qui est effectuée en série.

Efficacité de transfert de charges

Le transfert de charges d'un pixel à son voisin ne se fait pas sans perte. Pour chaque itération, quelques électrons ne sont pas transférés dans la zone suivante. L'efficacité du transfert de charge ou CTE (*Charge Transfer Efficiency*) est définie comme le rapport du nombre de charges transférées sur le nombre de charges initiales. Le nombre de transferts de charges grandit avec le nombre de pixels de la matrice. Pour conserver une bonne efficacité pour des grandes matrices de pixels, une très bonne CTE est nécessaire. Avec une efficacité de 99 %, il suffit de 69 transferts pour perdre la moitié des charges accumulées.

La charge non transférée n'est pas perdue mais distribuée dans les pixels traversés. Ainsi, la CTE n'affecte pas uniquement la valeur du signal du pixel considéré, mais aussi ceux de sa colonne car pour chaque transfert, (100-CTE)% d'électrons du pixel restent dans le puits précédent. Pour une bonne efficacité, la CTE des CCD actuels est généralement supérieure à 0.999999 ($1 - 10^{-6}$).

Lecture d'un pixel CMOS

La lecture d'un pixel CMOS ne se fait plus par transfert de charges pixel à pixel mais par conversion du signal reçu en signal électrique directement à l'intérieur du pixel. Cette architecture permet une lecture en parallèle des pixels, diminuant le temps de lecture de la matrice.

Le capteur CMOS est composé de pixels actifs ou APS (*Active Pixel Sensor*) qui sont composés d'une zone sensible comparable à celle d'un CCD, à laquelle est ajouté un circuit intégré qui permet la conversion de la charge accumulée en tension par le pixel. Le schéma de principe d'un pixel simple 3T (Transistors) est représenté par la Fig. 1.6.

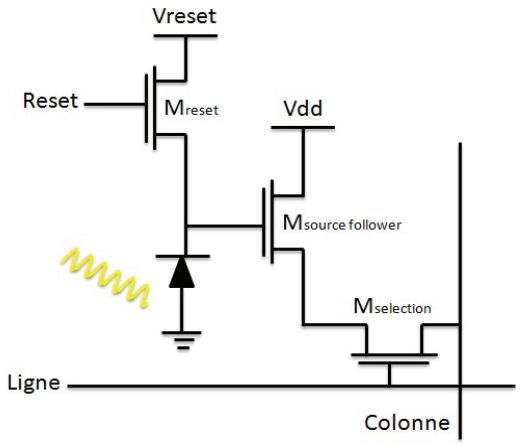


FIGURE 1.6 – Pixel CMOS 3T contenant un transistor de remise à la valeur de reset, un transistor de lecture (suiveur ou *source follower*) et un transistor d'adressage du pixel (sélection), permettant la lecture de la charge accumulée directement dans le pixel.

Le transistor de sélection sert à choisir la ligne de pixels à la lecture de la matrice de pixels. Le transistor *source follower* (suiveur de source) permet de mesurer la charge accumulée dans le pixel et de la convertir en tension. Le transistor de *reset* permet de remettre le pixel à une valeur de tension de référence.

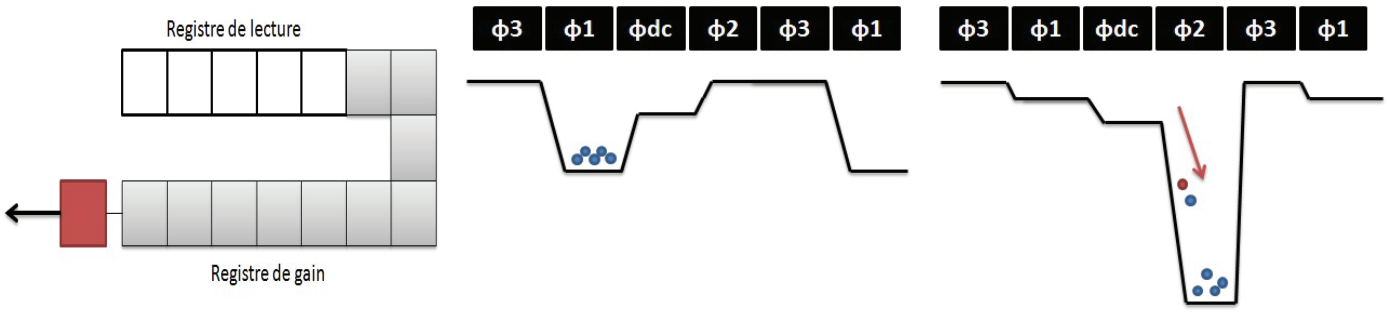
Bruit fixe spatial (FPN)

Comme chaque pixel dans un capteur CMOS possède son propre transistor de lecture, il possède aussi son propre bruit et son propre gain de conversion. Ces valeurs sont différentes pour chaque pixel. Ce bruit est appelé le bruit FPN (*Fixed Pattern Noise*) et se corrige avec le CDS qui peut se faire à l'intérieur du pixel ou en dehors selon la complexité du pixel (3T,4T,...).

1.2 Principe de fonctionnement des CCD à multiplication électronique

1.2.1 Ionisation par impact

Pour permettre d'augmenter le rapport signal sur bruit de lecture, l'emCCD amplifie les charges primaires dans un registre de gain qui est intercalé entre le registre de lecture et le transistor de lecture comme schématisé dans la Fig. 1.7.



(a) (b) (c)

FIGURE 1.7 – (a) Ajout d'un registre de gain entre le registre de lecture et le transistor de lecture. (b) Tension normale d'un CCD pour le transfert de charges. (c) Tension augmentée (40 - 60V) pour générer une ionisation par impact et augmenter le nombre de charges à la sortie du registre.

Dans le registre de gain, les charges sont transférées en appliquant un potentiel plus grand (40-60V) que dans le registre de lecture classique (10V). Le potentiel appliqué génère un champ électrique local qui accélère les charges électriques. Des électrons secondaires peuvent alors être générés par ionisation d'impact et être ajoutés aux charges primaires déjà présentes. La probabilité d'ionisation par impact est faible (1 à 1,5 %) mais est compensée par le nombre important d'étages (500) pour aboutir à une amplification du signal forte, jusqu'à 1000.

Le nombre moyen d'électrons en sortie du registre pour l'entrée d'un électron est donné par :

$$G = (1+g)^N \tag{1.4}$$

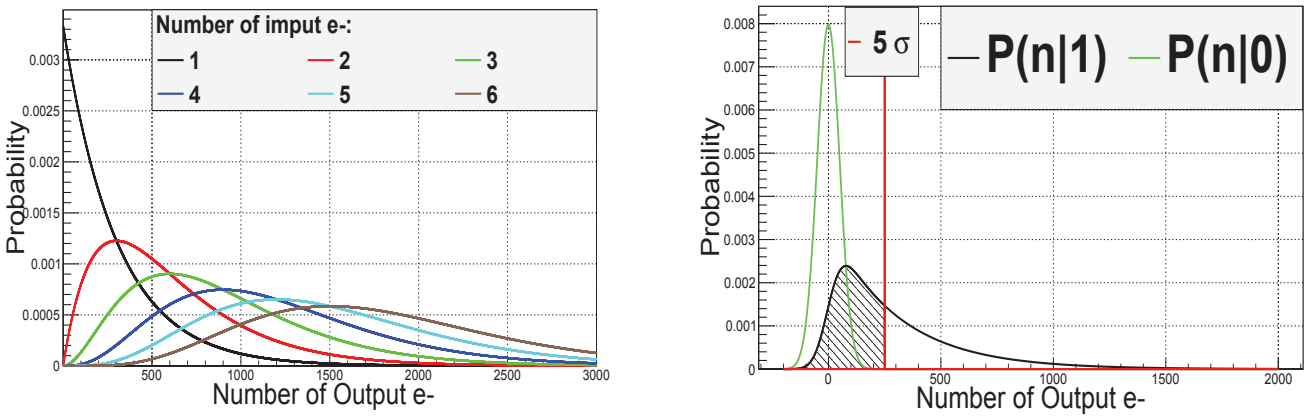
avec G le gain moyen de l'emCCD, g la probabilité d'un arrachement d'électrons lors d'un transfert et N le nombre d'étages de transfert.

Le nombre d'électrons en sortie du registre de gain est très variable à cause du caractère stochastique du processus d'amplification. La distribution de probabilité du nombre n d'électrons en sortie du registre de gain en fonction du nombre m d'électrons incidents est donnée par [14] :

$$P(n|m) = \frac{n^{m-1}}{(m-1)!G^m} \exp\left(-\frac{n}{G}\right), n \geq m \tag{1.5}$$

avec $P(n|m)$ la fonction de probabilité qu'il y ait n électrons en sortie du registre d'amplification, pour m électrons en entrée. Dans cette équation, le nombre d'électrons de sortie est supposé toujours plus grand que le nombre d'électrons en entrée, ce qui est une hypothèse de travail réaliste.

La forme de la distribution dépend fortement du nombre d'électrons en entrée. La Fig. 1.8a donne la distribution de probabilité du nombre d'électrons en sortie en fonction du nombre d'électrons en entrée.



(a) (b)

FIGURE 1.8 – Distribution de l'amplification par ionisation par impact de l'emCCD (a) Probabilité d'obtenir n électrons secondaires en sortie du registre de gain en fonction du nombre m d'électrons primaires, selon l'Eq. 1.5 pour un gain de 300. (b) Probabilité d'obtenir n électrons mesurés en sortie du pixel avec un bruit de lecture (σ = 50 e-), pour un signal d'un électron en entrée (noir) ou sans signal (vert). La limite de 5 fois le bruit est donnée en rouge. La valeur est centrée en 0 car la valeur d'offset du signal est retranchée.

La distribution de sortie du gain de l'emCCD pose donc deux problèmes :

1. Pour peu d'électrons en entrée, une probabilité non négligeable du nombre d'électrons en sortie est inférieure à 5 σ du bruit de lecture typique de l'emCCD, limitant l'efficacité quantique effective de la détection des photons.
2. Les courbes de gains se chevauchent. En connaissant le nombre d'électrons en sortie du registre de gain, il est impossible de compter le nombre d'électrons en entrée. Il faut alors fonctionner en mode binaire : 0 ou 1 photon, ou utiliser une approximation forte sur la valeur présumée du nombre d'électrons en entrée.

1.2.2 Efficacité quantique effective

La Fig. 1.8b montre la probabilité d'obtenir n électrons en sortie avec un gain de 270 avec et sans signal (1e-). Les deux courbes se chevauchent sur une zone importante. Pour obtenir une bonne pureté sur un signal de photon, il faut sélectionner uniquement les pixels renvoyant une valeur forte, dépassant le bruit de lecture d'un facteur 3 voire 5 pour une très bonne pureté.

Une coupure à 5 σ du bruit du pixel, condition nécessaire à la pureté requise à bas niveau de lumière, réduit de 56 % la probabilité de détecter un photon unique. En définissant l'efficacité quantique effective (EQE) comme le nombre de photons validés en sortie par rapport au nombre de photons en entrée, l'efficacité quantique typique de 90 % est réduite à seulement 40 %.

1.2.3 Facteur de bruit en excès (ENF)

La nature stochastique de l'ionisation par impact servant à l'amplification dans le registre de gain apporte un nouveau bruit à l'emCCD. Le facteur de bruit en excès ou ENF

[15] (*Excess Noise Factor*) F est défini par le rapport de la variance du signal d'entrée sur la variance du signal de sortie. Il est égal à un pour un détecteur sans amplification ou une amplification parfaite, et il est défini par :

$$F = \frac{\sigma_{out}}{G\sigma_{in}} \tag{1.6}$$

avec G le gain moyen, σ_{in}^2 et σ_{out}^2 les variances des signaux d'entrée et de sortie.

Un emCCD a un facteur d'excès de bruit théorique et mesuré $F = \sqrt{2}$ pour un gain supérieur à 300 [13].

1.2.4 Bruit d'horloge CIC

Pour chaque lecture des pixels par l'emCCD, des électrons ont une probabilité non nulle d'être arrachés et d'entrer dans le processus de multiplication. Ce phénomène peut se produire alors qu'aucun électron n'avait été collecté par le pixel. Ce bruit est appelé la charge induite par l'horloge [13] ou CIC (*Clock Induced Charge*). Il est exprimé en électrons par pixel et par image (e-/pix/image).

Pour un emCCD en mode gain, ce bruit devient le bruit limitant, car le signal est équivalent à celui de la détection d'un photon unique. L'ordre de grandeur du bruit CIC des détecteurs emCCD actuels est de 10^{-3} à 10^{-1} e-/pix/image. Il dépend du nombre de transferts dans le CCD ainsi que de la fréquence de lecture.

1.3 Description du principe du détecteur ebCMOS

Le détecteur ebCMOS possède une amplification par photo-cathode qui a lieu avant la collection des charges par les pixels. Le principe de détection de l'ebCMOS, représenté en Fig. 1.9, est de convertir le photon incident en électron par une photo-cathode puis d'accélérer l'électron par un champ électrique afin qu'il acquiert de l'énergie et la dépose dans la couche sensible du détecteur. L'énergie accumulée permet la création d'un grand nombre d'électrons secondaires pour un seul photon incident.

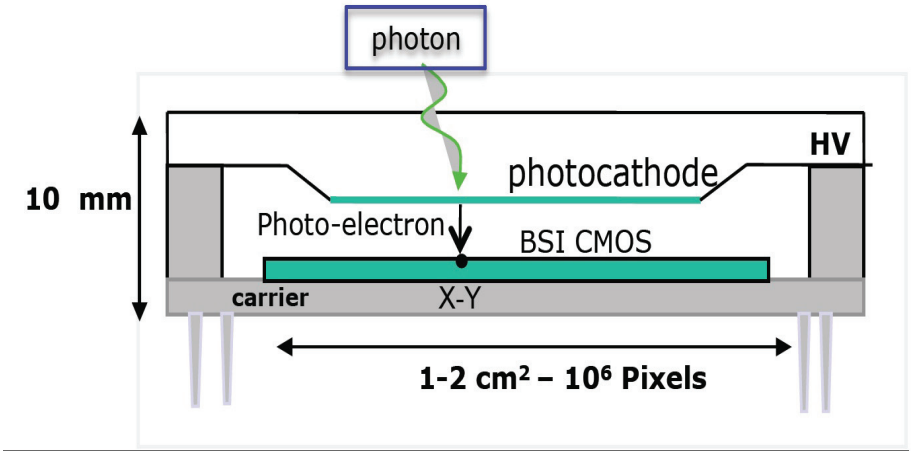


FIGURE 1.9 – Schéma de principe du détecteur ebCMOS. Un photon génère un électron dans la photo-cathode. L'électron est ensuite accéléré par le champ électrique généré par la haute tension dans le tube à vide. L'électron dépose l'énergie cinétique accumulée et génère un grand nombre d'électrons secondaires dans la couche sensible.

1.3.1 Création et focalisation de proximité d'un photo-électron

Photo-cathode

Une photo-cathode fonctionne comme un semi-conducteur, en convertissant un rayonnement en électrons par effet photoélectrique. Le modèle de bandes est identique à celui utilisé pour la création de paires électrons-trous dans le Silicium. Les photo-cathodes sont généralement composées de métaux alcalins. Dans le cas de l'ebCMOS, la photo-cathode est accolée à un tube à vide dans lequel les électrons excités sont accélérés. Le processus de libération d'un électron dans le tube à vide à partir de l'impact d'un photon se résume en trois étapes :

1. Absorption du photon et création d'une paire électron-trou par effet photoélectrique.
2. Transport du photo-électron vers le tube à vide, par diffusion ou guidé par un champ électrique.
3. Émission du photo-électron dans le tube à vide.

Lors de chacune de ces étapes, des processus physiques peuvent empêcher la libération de l'électron dans le tube à vide, réduisant son efficacité quantique.

Efficacité quantique de la photo-cathode

L'absorption d'un photon par la photo-cathode dépend de son gap et de l'énergie du photon incident. Elle se fait avec une efficacité notée η_a. La différence d'énergie entre le photon incident et le gap donne l'énergie excédentaire du photo-électron.

Pendant sa diffusion vers l'interface avec le vide, le photo-électron perd une partie de cette énergie excédentaire, majoritairement par interaction phonons. De plus, les photo-électrons peuvent se recombiner pendant ce trajet avec des trous de la photo-cathode. L'efficacité quantique du transport est notée η_t.

L'émission du photo-électron dans le tube à vide à l'interface dépend de l'affinité électronique E_A, définie comme la différence entre le niveau d'énergie du vide et celui de la bande de conduction. Le processus de préparation de ce type d'affinité électronique génère une barrière de potentiel qui peut être traversée par effet tunnel. Dans les deux cas, l'efficacité d'émission du photo-électron dans le vide est notée η_e. L'efficacité quantique totale de la cathode η_c est le produit des efficacités de ces trois processus successifs, définie par :

$$\eta_c = \eta_a \times \eta_t \times \eta_e \tag{1.7}$$

L'équation générale de l'efficacité quantique d'une photo-cathode est donnée par [16] :

$$\eta_c(\lambda) \approx (1 - R)\frac{P_\lambda}{\mu}\frac{P_e}{1 + 1/(\alpha L)} \tag{1.8}$$

avec R le coefficient de réflexion, λ la longueur d'onde, P_λ la probabilité que le photo-électron atteigne un état excité, α le coefficient d'absorption des photons $[\mathrm{L}^{-1}]$, L le libre parcours moyen du photo-électron excité et P_e la probabilité que le photo-électron arrivant à l'interface s'échappe dans le vide.

Les paramètres R, P_λ, L et α sont optimisés par les types de matériaux utilisés et le type de cristaux. P_e dépend de l'affinité électronique, qui peut être rendue négative par dépôt d'une couche électropositive. Cela permet l'augmentation de P_e pour les photons de grande longueur d'onde, moins énergétiques. L'efficacité quantique est alors augmentée au détriment d'un bruit plus important.

L'efficacité typique des photo-cathodes varie de 10 à 25 % pour les types GenII à 40 - 50 % pour les photo-cathodes de dernière génération, type AsGa.

1.3.2 Trajectoire et accélération du photo-électron

Tube à vide, champ électrique et PSF

Une haute tension U génère un champ électrique $\overrightarrow{E}$ dans le tube à vide. Ce champ dirige et accélère les photo-électrons issus de la photo-cathode vers la matrice de pixels. La distance parcourue d_t dans le tube à vide est très courte pour obtenir une focalisation de proximité : la position du photo-électron sur la matrice de pixels s'écarte très peu de celle du photon sur la photo-cathode.

Les photo-électrons émis dans le tube à vide possèdent une vitesse radiale non nulle. Ils dévient de leur position initiale dans le plan de la photo-cathode avant leur impact sur la matrice de pixels. La trajectoire du photo-électron est balistique : sa position dans le plan de la photo-cathode est déterminée par sa vitesse initiale.

La distribution des positions d'impacts des photo-électrons sur la matrice de pixels est modélisée par une fonction gaussienne. Cette distribution représente la fonction d'étalement du point du tube (PSF pour *Point Spread Function*). Sa moyenne est donnée par la position du photon incident sur la photo-cathode, et sa variance, notée σ_{B}^2, dépend du champ électrique E appliqué ainsi que de la distance d_t entre la photo-cathode et les pixels.

La Fig. 1.10 schématise le trajet d'un photo-électron émis par la photo-cathode à l'impact d'un photon jusqu'à la matrice de pixels, à travers le tube à vide.

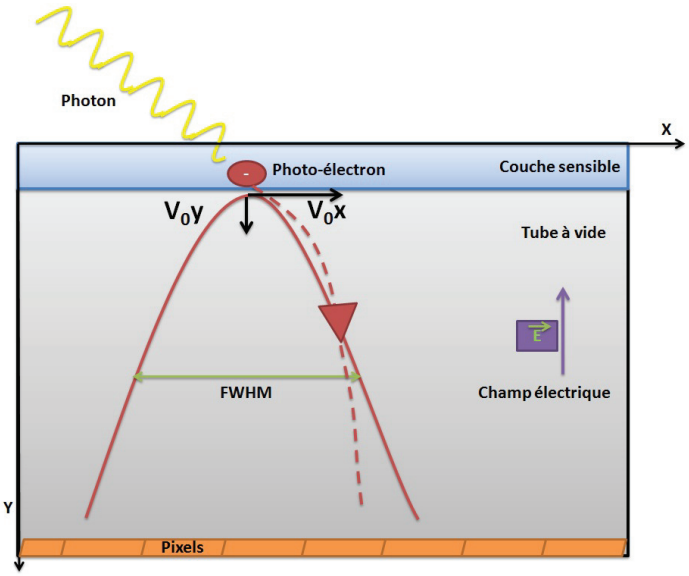


FIGURE 1.10 – Schéma du trajet d'un photo-électron émis dans le tube à vide sous l'effet du champ électrique. Un photon impactant la photo-cathode génère un photo-électron, qui est libéré dans le tube à vide. Il est ensuite accéléré en direction des pixels par le champ électrique E. La vitesse radiale initiale des photo-électrons est à l'origine de l'étalement de la position initiale du photo-électron, créant une PSF modélisée par une fonction gaussienne.

Afin de modéliser la distribution spatiale issue de la PSF du tube à vide, il faut calculer le temps de vol t_{L} du photo-électron accéléré dans le tube entre la photo-cathode et les pixels. La force de Lorentz $\mathbf{F}$ (Eq. 1.9) appliquée au photo-électron est intégrée deux fois pour obtenir l'équation du mouvement. Les conditions initiales et finales sont données par la distance L entre la photo-cathode et le CMOS. L'équation finale et les calculs suivants ont été obtenus par E. Eberhardt [17] :

$$\mathbf{F} = eV\mathbf{z} \tag{1.9}$$

$$L = \frac{eVt_{\mathrm{L}}^2}{2mL} + v_{\mathrm{z}}(0)t_{\mathrm{L}} \tag{1.10}$$

avec v_{z} la vitesse initiale axiale de l'électron, V la tension appliquée, e et m respectivement la charge et la masse de l'électron.

L'équation précédente est réécrite en transformant la vitesse initiale en potentiel initial $V_{0\mathrm{z}}$:

$$L = \frac{e(V + V_{0\mathrm{z}})t^2}{2mL} \tag{1.11}$$

Le temps de vol est obtenu par développement limité sur l'énergie axiale initiale du photo-électron supposée très faible devant la tension appliquée :

$$t_{\mathrm{L}} = L \times \left(\frac{2m}{eV}\right)^{\frac{1}{2}} \left[1 - \left(\frac{V_{0\mathrm{z}}}{V}\right)^{\frac{1}{2}} + ...\right] \tag{1.12}$$

Il est ensuite approximé par :

$$t_{\mathrm{L}} \approx L \times \left(\frac{2m}{eV}\right)^{\frac{1}{2}} + o\left[\left(\frac{V_{0\mathrm{z}}}{V}\right)^{\frac{1}{2}}\right] \tag{1.13}$$

La distance parcourue radialement par le photo-électron à l'impact sur la matrice de pixels est alors obtenue en fonction de l'énergie radiale initiale de l'électron $V_{0\mathrm{r}}$ exprimée à partir de la vitesse radiale initiale $v_{0\mathrm{r}}$.

$$eV_{0\mathrm{r}} = \frac{1}{2}mv_{0\mathrm{r}}^2 \tag{1.14}$$

$$r = v_{0\mathrm{r}}t \approx v_{0\mathrm{r}}L \times \left(\frac{2m}{eV}\right)^{\frac{1}{2}} = 2L \times \left(\frac{V_{0\mathrm{r}}}{V}\right)^{\frac{1}{2}} \tag{1.15}$$

La distribution de probabilité spatiale $p_{\mathrm{r}}(r)$ du déplacement radial de l'électron s'exprime en fonction de la distribution de probabilité de l'énergie initiale radiale de l'électron. $p(V_{0\mathrm{r}})$ nous donne la PSF $P(r)$ en s'intéressant à l'anneau de surface $2\pi r dr$ compris entre r et $r + dr$.

$$p_{\mathrm{r}}(r) = p(V_{0\mathrm{r}}) \times \frac{dV_{0\mathrm{r}}}{dr} = p(V_{0\mathrm{r}}) \times \left(\frac{rV}{2L^2}\right) \tag{1.16}$$

$$\frac{P(r)}{P(0)} = p_{\mathrm{r}}(r) \times \frac{dr}{2\pi r dr} = p(V_{0\mathrm{r}}) \times \frac{V}{4\pi L^2} \tag{1.17}$$

avec $P(0)$ une constante de normalisation.

En supposant une distribution Maxwellienne des vitesses initiales des photo-électrons, la PSF $P^{\mathrm{M}}(r)$ obtenue est alors gaussienne.

$$\begin{aligned} \frac{P^{\mathrm{M}}(r)}{P^{\mathrm{M}}(0)} &= \exp\left(-\frac{V_{0\mathrm{r}}}{\overline{V}_{0\mathrm{r}}}\right) \\ &= \exp\left(-\frac{r^2V}{4L^2\overline{V}_{0\mathrm{r}}}\right) \\ &= \exp\left(-\frac{r^2}{2\sigma^2}\right) \end{aligned} \tag{1.18}$$

$$\text{avec } \sigma^2 = \frac{2L^2\overline{V}_{0\mathrm{r}}}{V} \tag{1.19}$$

La PSF s'exprime alors en fonction de la tension appliquée, de la distance photo-cathode/pixels et de l'énergie radiale des photo-électrons à la sortie de la photo-cathode.

$$P(r) = P(0)\exp(-\frac{r^2V}{4L^2V_{\mathrm{r}}}) \tag{1.20}$$

avec $P(0)$ la valeur maximale de la PSF, r la distance au maximum, V la tension appliquée, L la longueur du gap et V_{r} l'énergie radiale moyenne d'émission des photo-électrons.

Pour minimiser la taille de la PSF, il faut donc une distance L faible et une tension V élevée. La distance L est limitée par la technologie et le rapport $\frac{V}{L}$ responsable du claquage dans le tube. Le bruit d'électrons accélérés émis par la photo-cathode est majoritairement issu de l'effet de champ quand le champ augmente. Il faut donc faire un compromis entre gain et bruit de fond.

Ce bruit est appelé le courant d'obscurité de la photo-cathode. Il est défini comme le nombre d'électrons impactant le détecteur par image dans le noir lorsque la haute tension est appliquée. Il s'exprime en fréquence par unité de surface et par unité de temps ($Hz/mm^2/s$) car il n'est pas lié à la fréquence de lecture du pixel.

1.3.3 Diffusion des électrons secondaires et collection par les diodes

Le photo-électron accéléré dans le tube à vide gagne de l'énergie cinétique. Cette énergie déposée dans la couche épitaxiale du capteur CMOS génère un grand nombre de paires électrons-trous par effet photoélectrique.

Le capteur CMOS est bombardé en face arrière afin de détecter les électrons. Le substrat est enlevé puis la couche épitaxiale est passivée. Cette passivation génère une couche morte où les photo-électrons perdent de l'énergie. En effet, toute charge générée dans cette couche n'atteindra aucune diode de collection.

Le nombre total d'électrons secondaires générés dans la couche sensible dépend de l'énergie du photo-électron, de l'énergie perdue dans la couche morte ainsi que de l'énergie nécessaire à la création de paires. Sa valeur moyenne est donnée par :

$$\bar{n}_e = \frac{(E - E_{dead})}{\epsilon} \tag{1.21}$$

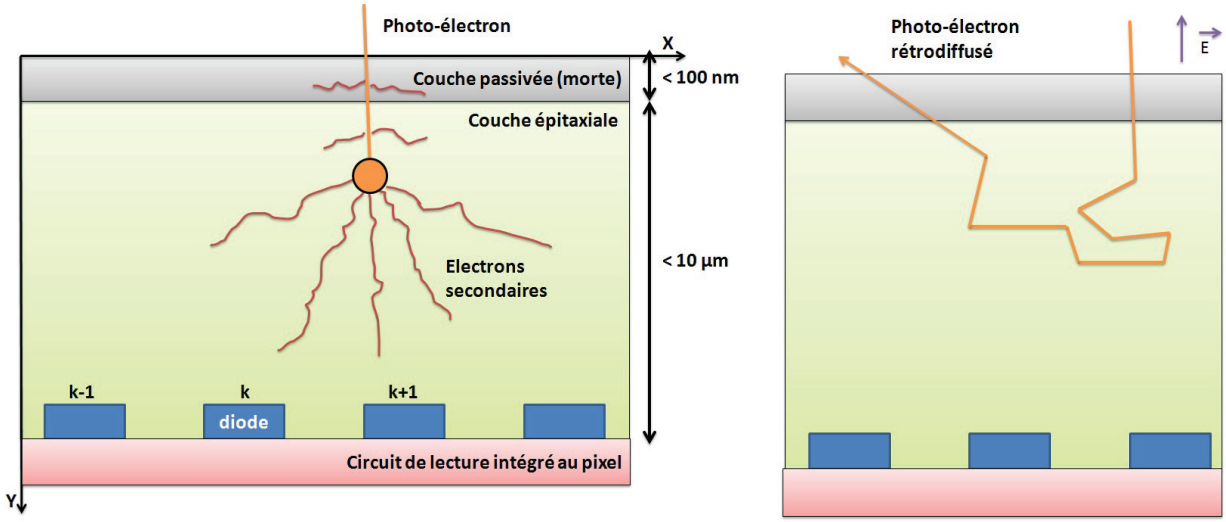
avec n_e le nombre d'électrons secondaires générés, E l'énergie du photo-électron, E_{dead} l'énergie perdue dans la couche passivée, ϵ l'énergie nécessaire à la création d'une paire ($\epsilon = 3,6\text{eV}$ dans le silicium).

La variance du nombre moyen d'électrons générés dépend du facteur de Fano[18], et est donnée par :

$$\sigma_e^2 = F\bar{n}_{phe} \tag{1.22}$$

avec σ_e^2 la variance de n_e, $\bar{n}_{phe}$ le nombre moyen de photo-électrons et F le facteur de Fano ($F \sim 0,12$ dans le silicium).

La Fig. 1.11a schématise la diffusion des charges secondaires dans la couche épitaxiale à l'impact d'un photo-électron accéléré.



(a) (b)

FIGURE 1.11 – (a) Schéma de la création et de la diffusion de charges secondaires dans la couche épitaxiale de l'ebCMOS. Un photo-électron accéléré impacte la couche épitaxiale avec une énergie typique de 3 keV. Il perd une partie de cette énergie dans la couche passivée puis dépose le reste dans la couche épitaxiale. Cette énergie sert à la création d'un grand nombre de paires électrons-trous qui diffusent thermiquement vers les pixels. (b) Visualisation du trajet d'un photo-électron rétrodiffusé. Après la sortie de la couche sensible, il est de nouveau accéléré par le champ électrique et impacte de nouveau la matrice.

Les charges secondaires générées sont ensuite collectées par les diodes des pixels. Les charges secondaires issues d'un unique impact sont collectées par plusieurs pixels voisins. La diffusion thermique des charges étale le point d'impact du photo-électron sur la couche épitaxiale, créant une nouvelle PSF. Cette nouvelle PSF est accompagnée d'une amplification des charges primaires.

Cette PSF de diffusion sera modélisée par une fonction gaussienne dont la moyenne sera la position d'impact du photo-électron et sa variance sera notée σ_c^2.

Rétrodiffusion des photo-électrons

Lors de l'impact du photo-électron accéléré sur la matrice de pixels, il peut être rétrodiffusé et ressortir de la couche sensible. Un exemple de photo-électron rétrodiffusé est donné par la Fig. 1.11b.

Un photo-électron rétrodiffusé ne dépose qu'une fraction q de son énergie. Le reste de l'énergie est diffusé dans une autre partie du détecteur, selon l'angle avec lequel l'électron a quitté la couche sensible. La probabilité $r(q)$ qu'un photo-électron soit rétrodiffusé et donne la charge q est approximativement donnée par la relation empirique [19] :

$$r(q) = \begin{cases} \frac{3\mu}{(1-1.5q_m)}(0.5 - q_m + q_m q - 0.5q^2) & \text{pour} \quad 0 \leq q < 1 \\ (1-\mu)\delta(q-1) & \text{pour} \quad q = 1 \end{cases} \tag{1.23}$$

avec μ le coefficient de rétrodiffusion (ici 0.18) et q_m est la valeur la plus probable de la distribution d'énergie de la rétrodiffusion (ici 0.3).

La rétrodiffusion impacte 18% des photo-électrons incidents pour l'ebCMOS en diminuant l'énergie déposée dans la couche épitaxiale. La Fig. 1.12 montre la distribution de probabilité du nombre d'électrons secondaires générés dans la couche épitaxiale et lus par le pixel, pour un signal suivant une distribution de Poisson autour de 5, avec et sans rétrodiffusion.

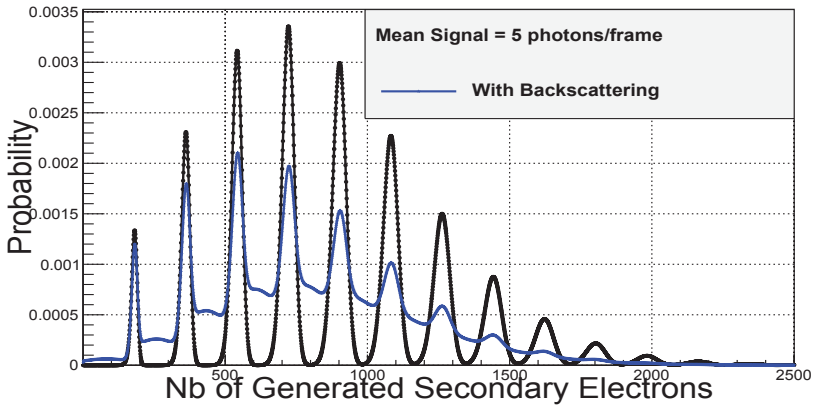


FIGURE 1.12 – Distribution de la probabilité du nombre d'électrons secondaires générés dans la couche épitaxiale et lus par le pixel avec (vert) et sans (noir) rétrodiffusion. Le signal suit une distribution de Poisson de moyenne 5, le bruit de lecture est de 8 e- RMS, V=2 800 V et E_{dead}=1 600 eV.

La rétrodiffusion est la première cause de détérioration de la résolution énergétique des pics photo-électrons de l'ebCMOS, bien plus que le bruit de lecture.

Retours ioniques

Le vide généré dans le tube est de l'ordre de 10^{-12} Pa. Lorsqu'un atome résiduel est ionisé par impact d'un électron, il est accéléré vers la photo-cathode. L'impact de l'ion arrache un grand nombre d'électrons qui sont accélérés à leur tour et se déposent sur la matrice de pixels. Cette pluie d'électrons accélérés se manifeste par un signal ponctuel très intense.

Le nombre de retours ioniques du courant d'obscurité de la photo-cathode est mesuré dans le noir avec une haute tension appliquée. Il est de l'ordre de 8 Hz/mm^2 dans le noir, mais il augmente avec la densité d'électrons incidents, qui augmente la probabilité d'ionisation. L'algorithme permettant de s'affranchir en partie des retours ioniques sera décrit dans la partie 2.2.4.

1.4 Spécification des caméras sCMOS et emCCD testées

Afin de mesurer expérimentalement les bruits et la précision de localisation des caméra sCMOS et emCCD, les caméras Andor sCMOS Neo, et emCCD iXon Ultra 897 sont utilisées.

1.4.1 Caractéristiques mesurées de la caméra Andor sCMOS Neo

Caractéristiques et efficacité quantique

Pour les expériences décrites dans les chapitres suivants, la caméra sCMOS utilisée sera une caméra Andor sCMOS Neo dont les caractéristiques principales données par le constructeur sont résumées dans la table 1.1. La courbe d'efficacité quantique en fonction de la longueur d'onde est donnée en Fig. 1.13.

Matrice de pixels	2560 × 2160
Côté d'un pixel	6.5 μm
Courant d'obscurité	0.03 e-

TABLE 1.1 – Caractéristiques principales de la caméra Andor sCMOS Neo.

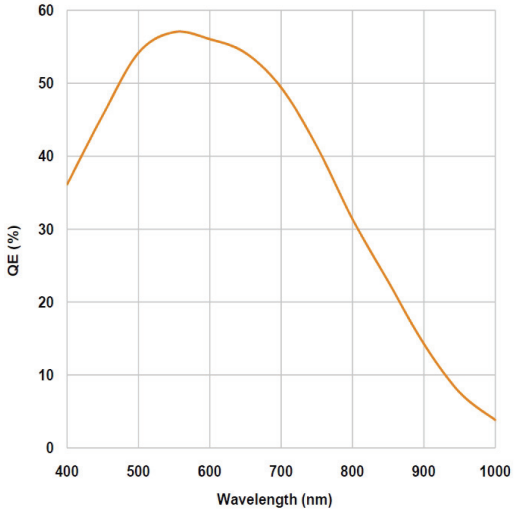
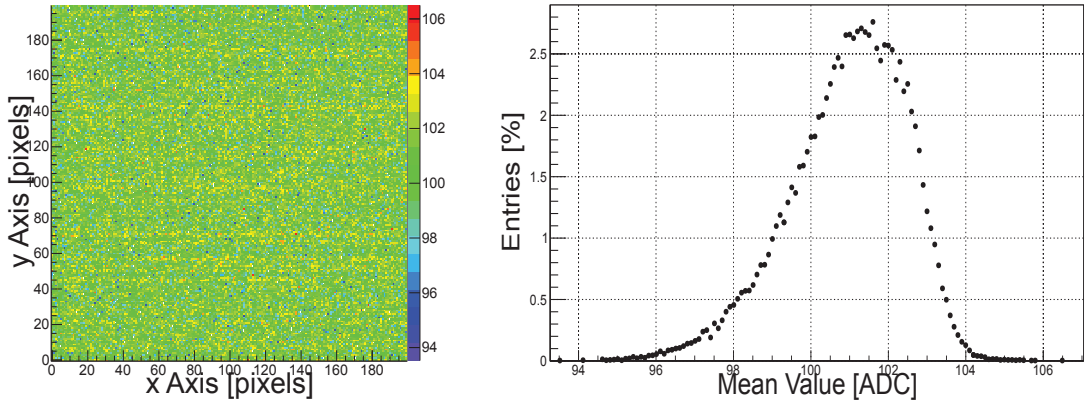


FIGURE 1.13 – Efficacité quantique de la caméra Andor sCMOS Neo en fonction de la longueur d'onde.

Distribution de la valeur moyenne par pixel

Une acquisition de 20 000 images dans le noir à une cadence de 100 images/seconde sur 200×200 pixels permet une caractérisation des pixels de la caméra sCMOS. La distribution spatiale de la valeur moyenne des pixels est donnée par la Fig. 1.14a, et sa dispersion en valeur par la Fig. 1.14b.



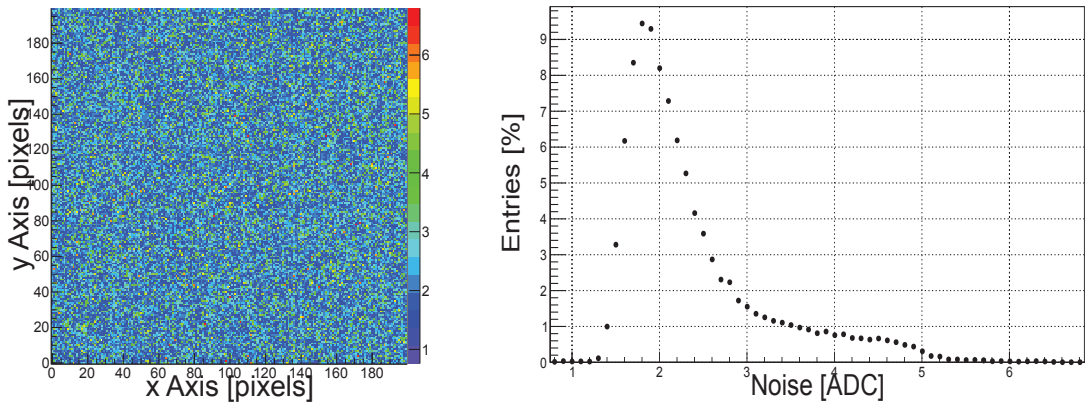
(a) (b)

FIGURE 1.14 – Valeur moyenne par pixel pour une acquisition de 20 000 images sur 200×200 pixels à 100 images/seconde par la caméra sCMOS. (a) Distribution spatiale de la valeur moyenne par pixel. L'échelle de couleur donne le nombre moyen d'ADCU. (b) Distribution de la valeur moyenne par pixel.

La distribution spatiale est typique d'un capteur CMOS, avec des pixels plus brillants qui parsèment la matrice. La dispersion en valeur est limitée, la majorité des pixels ayant une valeur moyenne entre 95 et 104 correspondant à l'offset de la caméra.

Mesure du bruit de lecture des pixels

Le bruit de lecture des pixels est défini comme l'écart-type de la réponse du pixel autour de sa valeur moyenne. La distribution spatiale du bruit de lecture est donnée par la Fig. 1.15a, et sa dispersion en valeur par la Fig. 1.15b.



(a) (b)

FIGURE 1.15 – Distribution de l'écart-type de la valeur de chaque pixel pour une acquisition de 20 000 images sur 200×200 pixels à 100 images/seconde par la caméra sCMOS. (a) Distribution spatiale de l'écart-type des valeurs des pixels. L'échelle de couleur donne l'écart-type du pixel. (b) Distribution de l'écart-type des valeurs des pixels.

La valeur moyenne du bruit se trouve aux alentours de 2 ADCU (facteur de conversion 1 ADCU = 1 e-) mais il existe une queue de distribution non négligeable de pixels bruyants, jusqu'à 5 ADCU. La fonction cumulative donnée par la Fig. 1.16 montre que bien que 50 % des pixels ont un bruit inférieur à 2 ADCU RMS, près de 10 % ont un bruit supérieur à 4 ADCU RMS.

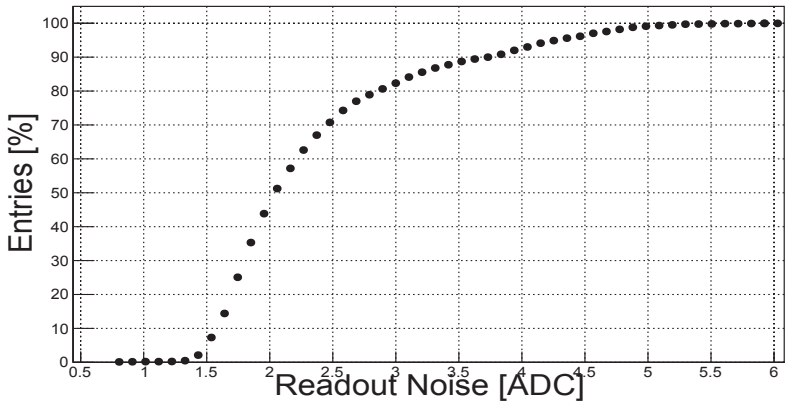


FIGURE 1.16 – Fonction cumulative du bruit de lecture du capteur sCMOS.

Détermination du nombre de faux positifs par image

Le nombre de faux positifs est défini comme le nombre de pixels ayant un rapport signal sur bruit supérieur à 5 lors d'une acquisition dans le noir de 500 images.

La Fig. 1.17 montre un exemple de deux acquisitions sur 2000 images dans le noir pour l'emCCD, dans les cas de gain EM à 1 et 1000 pour un pixel. Le bruit de lecture de ce pixel est de l'ordre de $\sigma = 8.72$ ADCU. Les droites de valeur 3 et 5 σ sont données en référence.

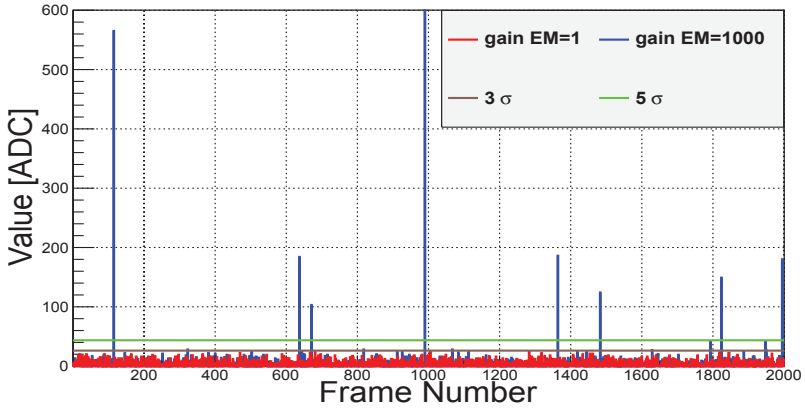
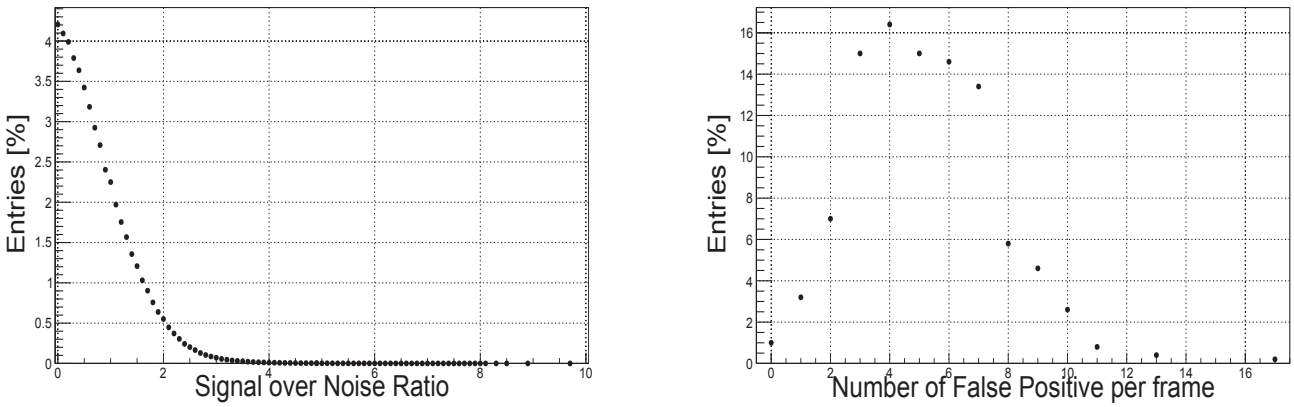


FIGURE 1.17 – Réponse d'un pixel emCCD pour une acquisition dans le noir et des gain EM égaux à 1 et 1000. Les courbes correspondant à 3 et 5 fois le bruit de lecture sont données en référence.

Les faux positifs correspondent aux pixels qui dépassent la courbe de 5 σ. Pour le pixel choisi, le nombre de faux positifs est nul pour le gain 1 et vaut 8 pour le gain égal à 1000.

La Fig. 1.18a donne la distribution moyenne du rapport signal sur bruit des pixels. La Fig. 1.18b montre la distribution moyenne du nombre de faux par image.



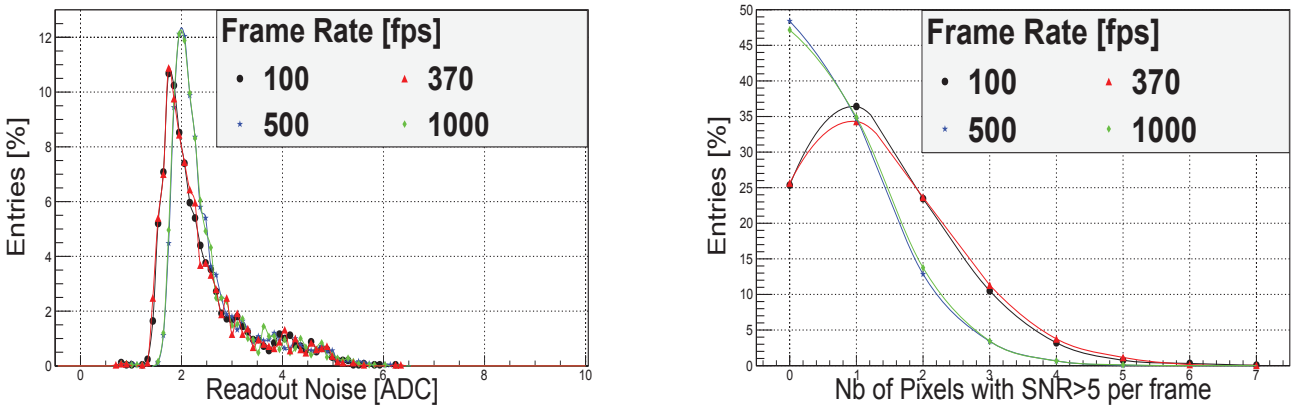
(a) (b)

FIGURE 1.18 – Distribution du rapport signal sur bruit des pixels pour une acquisition de 500 images sur 200×200 pixels à 100 images/seconde par la caméra sCMOS. (a) Distribution moyenne du rapport signal sur bruit des pixels par image. (b) Distribution du nombre de pixels ayant une valeur supérieure à 5 fois leur bruit par image.

Le taux de faux moyen est de l'ordre de 5 par image, soit environ 300 Hz/mm^2. Pour un bruit de lecture de 1 e- RMS, 5 σ du bruit correspond donc à 5 photons détectés. Le sCMOS ayant une efficacité quantique de 50 %, le signal minimal pouvant être détecté par cette méthode est de 10 photons par image par pixel.

Influence de la vitesse de lecture

L'influence de la cadence de lecture sur le bruit de lecture est mesurée en observant la distribution du taux de faux pour quatre cadences : 100, 370, 500 et 1000 images par seconde. Les Fig. 1.19a et 1.19b montrent la distribution du bruit de lecture et le nombre de faux par image pour chaque cadence, exprimée en images par seconde (*frame per second* ou fps).



(a) (b)

FIGURE 1.19 – Influence de la cadence de lecture sur le bruit de lecture d'une acquisition de 2 000 images sur 100 × 100 pixels pour la caméra sCMOS. (a) Distribution du bruit de lecture des pixels. (b) Distribution du nombre de pixels ayant un rapport signal sur bruit supérieur à 5 par image.

Les valeurs moyennes du taux de faux sont données dans la table 1.2.

Cadence [fps]	Nombre total de faux	Nombre moyen par image	Probabilité par pixel
100	2670	1.335	1.335×10^{-4}
370	2750	1.375	1.375×10^{-4}
500	1468	0.734	7.34×10^{-5}
1000	1517	0.758	7.58×10^{-5}

TABLE 1.2 – Évolution du nombre moyen de faux en fonction de la cadence de lecture pour la caméra sCMOS.

Les distributions des cadences 100 et 370 fps d'une part (mode de lecture I), 500 et 1000 fps d'autre part (mode de lecture II) sont quasiment identiques. Le bruit de lecture augmente de l'ordre de 5 % entre les deux temps de lecture, alors que le nombre de pixels ayant un SNR supérieur à 5 diminue.

La charge intégrée due au courant de fuite est plus faible pour des durées plus courtes.

1.4.2 Caractéristiques de la caméra Andor emCCD iXon Ultra 897

Caractéristiques et efficacité quantique

Pour les expériences décrites dans les chapitres suivants, la caméra emCCD utilisée sera une caméra Andor emCCD iXon Ultra 897 dont les caractéristiques principales données par le constructeur sont résumées dans la table 1.3. La courbe d'efficacité quantique en fonction de la longueur d'onde est donnée en Fig. 1.20.

Matrice de pixels	512 × 512
Côté d'un pixel	16 μm
Courant d'obscurité	0.001 e-/pixel/sec
Bruit CIC	0.005 e-/pixel/image

TABLE 1.3 – Caractéristiques principales de la caméra Andor emCCD iXon Ultra 897.

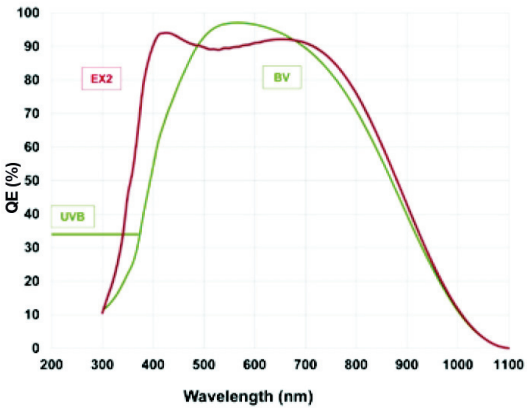
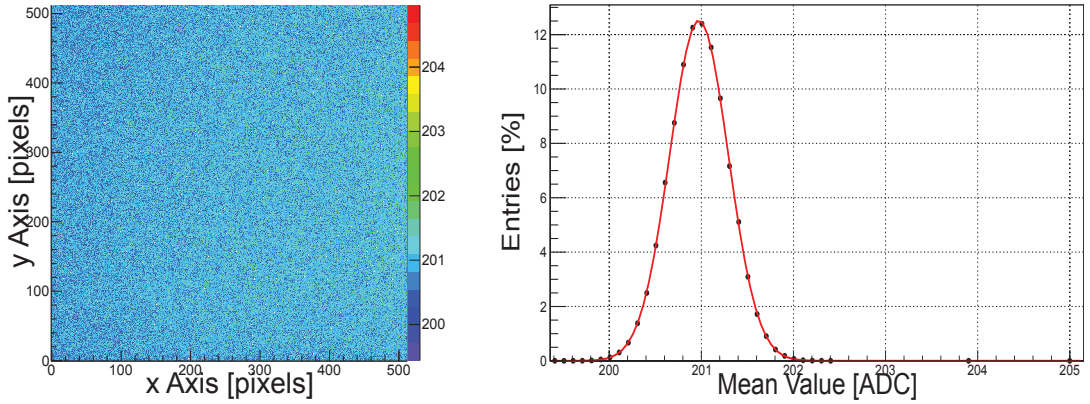


FIGURE 1.20 – Efficacité quantique de la caméra Andor emCCD iXon Ultra 897 en fonction de la longueur d'onde.

Bruit de lecture

Comme pour la caméra sCMOS, une acquisition 20 000 images dans le noir est effectuée à une cadence de 10 images/seconde sur 512 × 512 pixels. La distribution spatiale de la valeur moyenne des pixels est donnée par la Fig. 1.21a et sa distribution en valeur par la Fig. 1.21b.

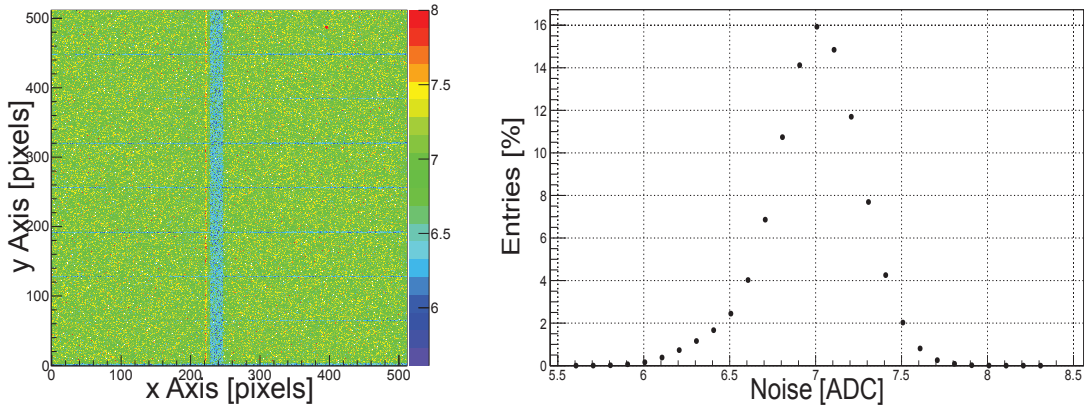


(a) (b)

FIGURE 1.21 – Valeurs moyennes des pixels pour une acquisition de 500 images sur 512 × 512 pixels à 10 images/seconde par la caméra emCCD sans gain. (a) Distribution spatiale des valeurs moyennes. (b) Distribution de la valeur moyenne de pixels avec un fit gaussien.

La distribution spatiale des valeurs moyennes des pixels de l'emCCD est beaucoup plus homogène que pour le CMOS, car les pixels sont lus par le même amplificateur en bout de registre à décalage. La valeur moyenne des pixels est contenue entre 200 et 205 ADCU.

Le bruit de lecture du pixel est donné par l'écart-type de sa réponse dans le noir. La distribution spatiale du bruit de lecture est donnée par la Fig. 1.22a, et sa dispersion en valeur par la Fig. 1.22b.



(a) (b)

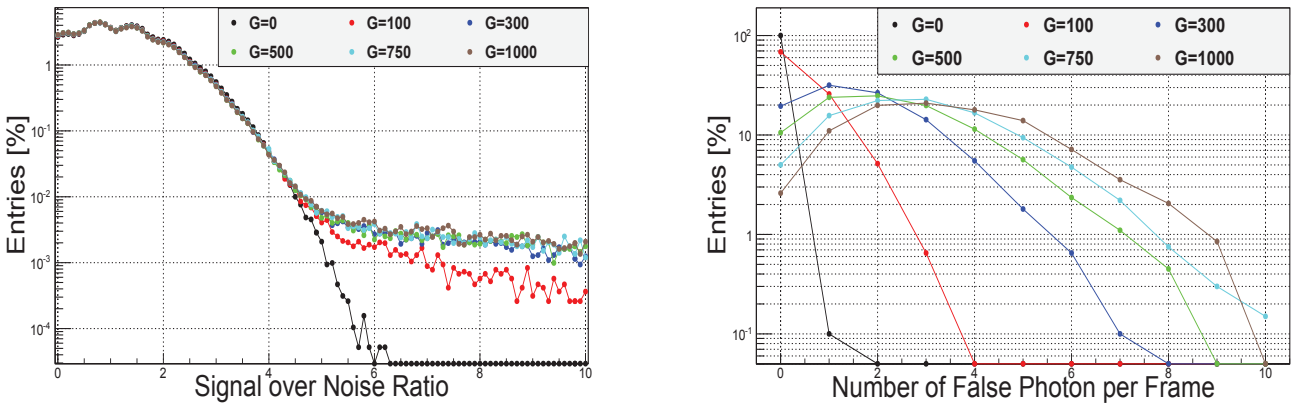
FIGURE 1.22 – Distribution de l'écart-type de la valeur de chaque pixel pour une acquisition de 500 images sur 512 × 512 pixels à 10 images/seconde par la caméra emCCD sans gain.(a) Distribution spatiale. (b) Distribution en valeur.

Pour cette faible cadence de lecture, le bruit est limité autour de 7 ADCU, sans la queue de distribution du CMOS. La distribution spatiale des bruits est homogène selon des lignes et une colonne. Une zone de pixels bruyants est visible sur le capteur.

Influence du gain électronique sur le bruit de lecture

L'influence du gain électronique (EM) sur le bruit de lecture est mesurée pour une acquisition de 2 000 images dans le noir sur une partie du capteur de 31 × 31 pixels à une cadence de 227 fps, pour différentes valeurs du gain EM (1 à 1000).

La Fig. 1.23a montre la distribution moyenne du rapport signal sur bruit des pixels sur une image. La détection d'un photon sera définie par un pixel ayant un rapport signal sur bruit supérieur à 5 σ. Dans le noir, ces détections sont générées par le bruit de lecture et le bruit CIC. La Fig. 1.23b montre la distribution du nombre de faux par image dans le noir en fonction du gain.

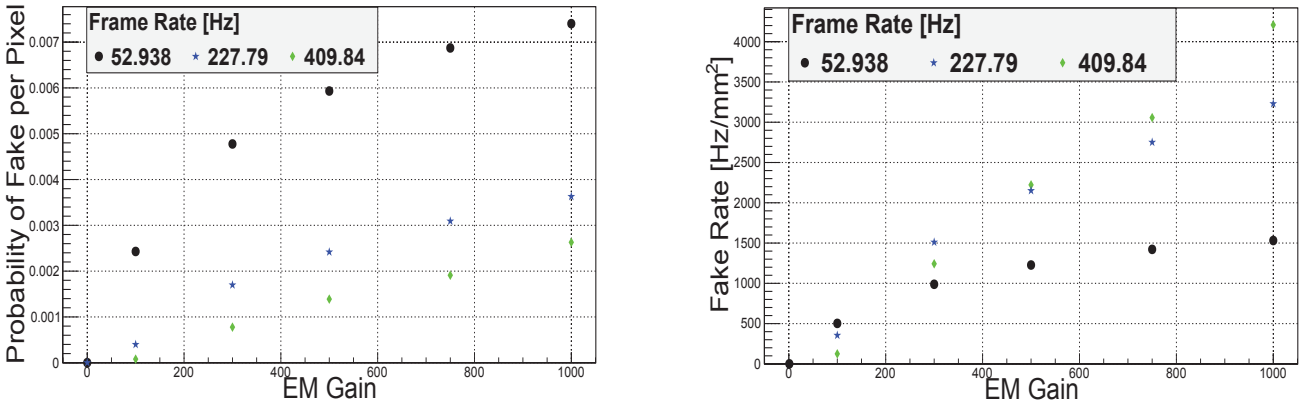


(a) (b)

FIGURE 1.23 – Rapport signal sur bruit (SNR) des pixels pour une acquisition de 2 000 images sur 31 × 31 pixels à 227 images/seconde par la caméra emCCD pour des consigne de gain EM allant de 1 à 1000. (a) Distribution moyenne des valeurs de SNR des pixels par image. (b) Distribution moyenne du nombre de faux (SNR supérieur à 5) par image en fonction du gain EM.

L'activation du gain EM à 100 provoque une nette augmentation du nombre de pixels ayant un SNR supérieur à 5. Sans gain, le nombre de faux est très proche de zéro. Le pourcentage d'images sans aucun faux diminue avec le gain, pour descendre à 10% et moins à partir d'un gain de 500.

Afin de mesurer la dépendance du bruit CIC à la cadence de lecture, trois acquisitions sont effectuées pour des cadences différentes : 52.938, 227.79 et 409.84 fps. La Fig. 1.24a montre l'évolution de taux de faux par pixels en fonction du gain. Cette probabilité normalisée en unité d'espace et de temps, donnant le taux de faux en Hz/mm^2 est donnée par la Fig. 1.24b.



(a) (b)

FIGURE 1.24 – Taux de faux pour une acquisition de 2 000 images sur 31 × 31 pixels par la caméra emCCD pour des gains allant de 0 à 1000. (a) Probabilité d'avoir un faux par pixel en fonction du gain EM et de la fréquence de lecture. (b) Évolution du taux de faux par unité de surface et par unité de temps en fonction du gain EM et de la fréquence de lecture.

Les données de taux de faux de l'emCCD pour différentes valeurs du gain EM pour plusieurs vitesses d'acquisition sont dans la table 1.4.

Gain EM		0	100	300	500	750	1000
Cadence	Taux de faux						
50.025 fps	Probabilité	5.20×10^{-7}	2.42×10^{-3}	4.77×10^{-3}	5.93×10^{-3}	6.87×10^{-3}	7.40×10^{-3}
227.79 fps	par pixel	1.04×10^{-6}	3.98×10^{-4}	1.69×10^{-3}	2.41×10^{-3}	3.09×10^{-3}	3.62×10^{-3}
409.84 fps	par image	0	7.75×10^{-5}	7.75×10^{-4}	1.38×10^{-3}	1.90×10^{-3}	2.62×10^{-3}
50.025 fps	Fréquence	0.10	502	987	1226	1420	1530
227.79 fps	[Hz/mm^2]	0.92	354	1510	2150	2750	3229
409.84 fps		0	124	1241	2221	3056	4207

TABLE 1.4 – Taux de faux photons par pixel et nombre moyen de faux par unité de temps et d'espace en fonction du gain EM appliqué.

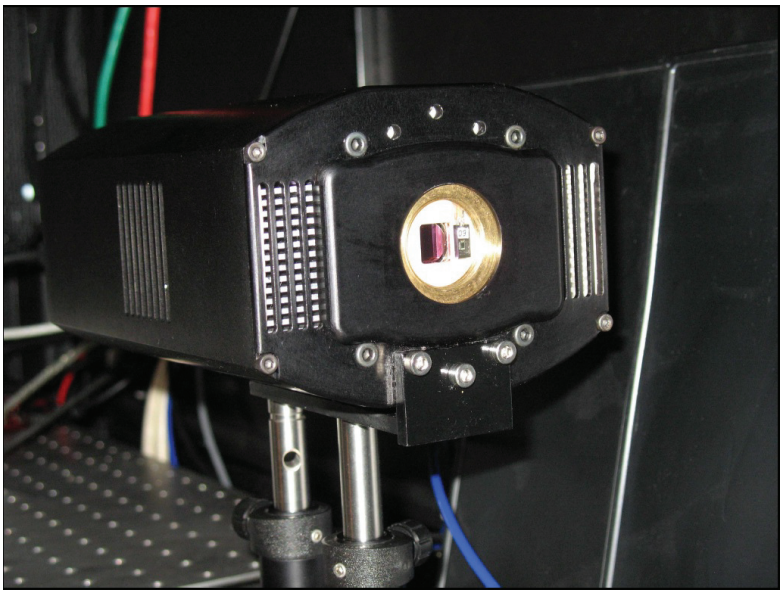
Comme attendu, la fréquence du taux de faux augmente avec le gain et la cadence de lecture. Cependant, pour une vitesse d'acquisition de 409 fps et un gain EM inférieur à 300, le taux de faux est inférieur à celui de l'acquisition à 227 fps. Pour cette vitesse d'acquisition, il doit certainement y avoir des effets fins sur le potentiel accélérateur (phase Φ2) peu connus [20].

1.5 Caméra ebCMOS : le prototype LUSIPHER

Le prototype LUSIPHER (Large-scale Ultra-fast SIngle-PHoton recordER) est un projet R&D combinant :

1. Un capteur ebCMOS rapide, avec un CMOS aminci et éclairé en face arrière, sensible au photon unique grâce à une photo-cathode S20 ou S25.
2. Un système d'acquisition Ethernet 10 Gbits/s permettant la lecture de 800 ×800 pixels à 500 fps en continu.
3. Une interface homme-machine (IHM) permettant le suivi de sources en temps réel.

La caméra a été réalisée par le service d'instrumentation de l'Institut de Physique Nucléaire de Lyon (IPNL). Elle pèse 2.5 kg pour des dimensions 20 × 6 × 5 cm. Le capteur CMOS aminci et éclairé en face arrière à été réalisé à l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC) de Strasbourg. La photo-cathode et l'intégration dans le tube à vide par la société PHOTONIS. Des photographies de la caméra et du capteur ebCMOS LUCY sont données dans la Fig. 1.25.

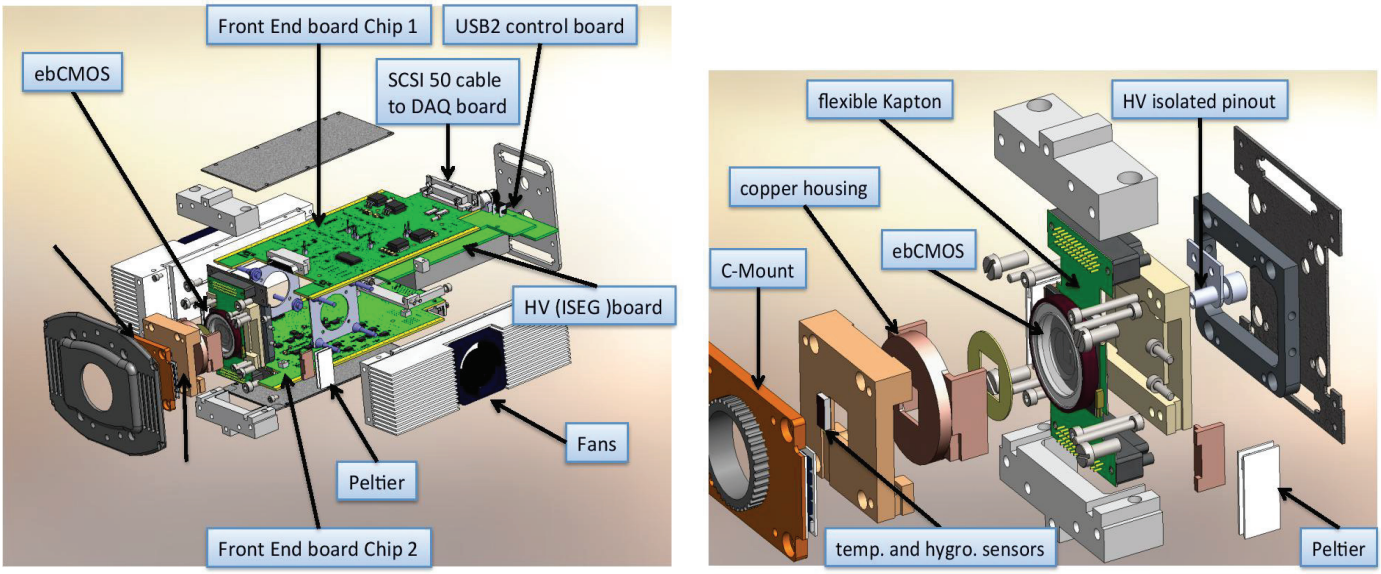


(a)

(b)

FIGURE 1.25 – (a) Photographie de la caméra LUSIPHER. (b) Photographie du capteur ebCMOS. La photo-cathode a un diamètre de 12 mm. L'ebCMOS contient deux matrices de 400 × 800 pixels de 10 μm, soit une zone sensible de 64 mm^2.

Les Fig. 1.26a et 1.26b montrent les schémas techniques de la caméra ebCMOS, avec ses deux cartes Front End permettant la lecture de deux matrices CMOS 800 ×400. Le capteur ebCMOS est refroidi par effet Peltier et maintenu à une température inférieure à 15°C pour limiter le courant d'obscurité. Le reste de la caméra est maintenu à une température inférieure à 35°C par des ventilateurs.



(a) (b)

FIGURE 1.26 – Schéma de la caméra LUSIPHER. (a) Lecture, pilotage et refroidissement. (b) Intégration du capteur.

La carte de pilotage permet de :

1. communiquer avec le serveur d'acquisition ;
2. donner les valeurs de référence à la carte Font End ;
3. donner et lire la tension appliquée (0-6V) au module de haute tension ;
4. donner la consigne au refroidissement Peltier ;
5. mettre en marche et arrêter les ventilateurs ;
6. mesurer la température et l'hygrométrie des capteurs.

Acquisition 10 Gbits/s Ethernet

Un des points forts du projet LUSIPHER est l'acquisition 10 Gbits/s qui permet la lecture en continu des 800 × 800 pixels à 500 images par seconde. Un réseau de portes programmables (FPGA) digitalise les sorties analogiques et mémorise la valeur de reset des pixels.

Le traitement des données est fait en moins de 2 ms pour permettre la lecture en continu. La sortie des données est codée sur 8 bits par pixel, ce qui correspond à 2 560 Mbits par seconde pour les 800 × 800 pixels à 500 images par seconde. Les données peuvent être sauvegardées sur 4 disques RAID en parallèle.

Le schéma de principe de l'acquisition des données du projet LUSIPHER est donné par la Fig. 1.27.

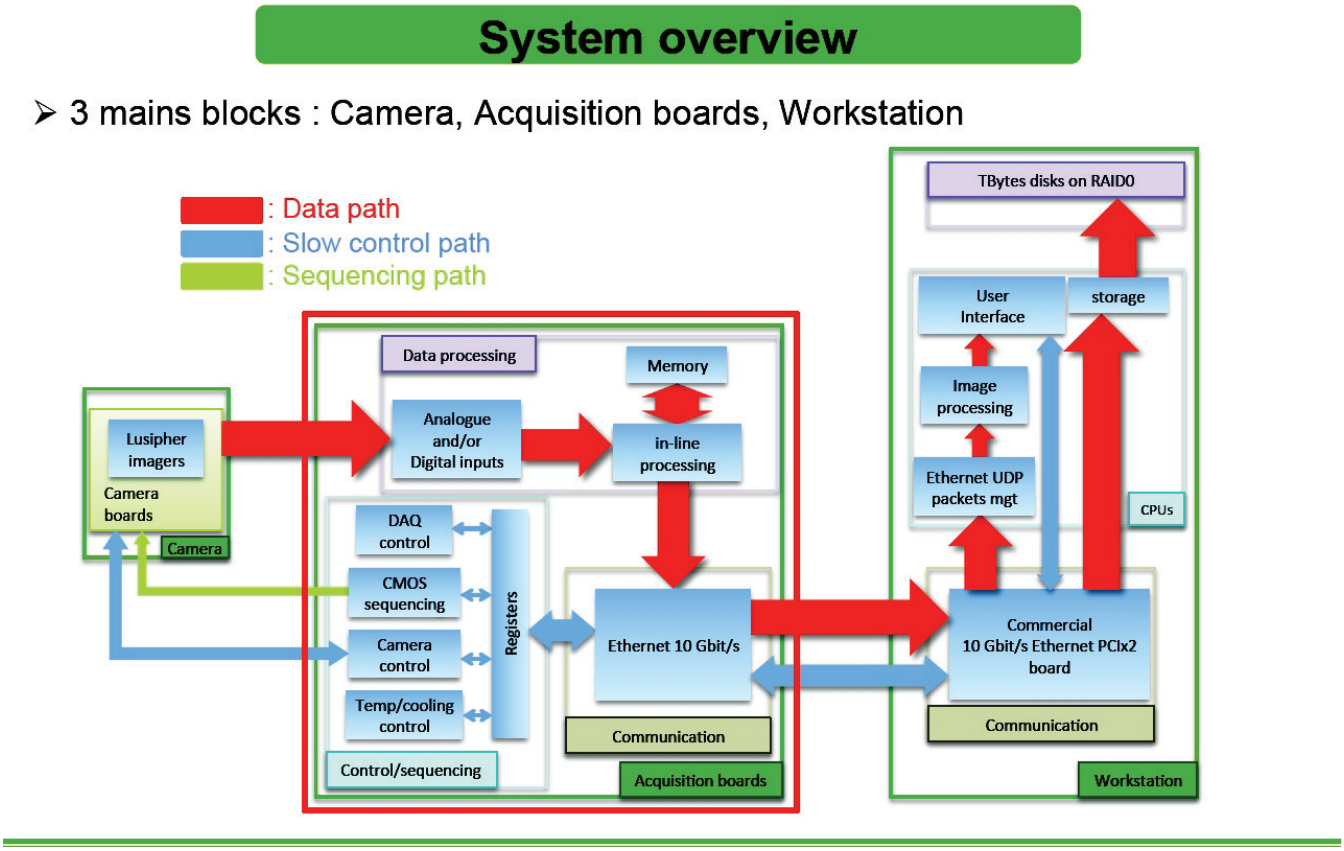


FIGURE 1.27 – Description de la chaîne de traitement des données du projet LUSIPHER, de la caméra et son contrôle à la sauvegarde en continu des images à 500 images/seconde

L'interface homme-machine (IHM) se fait grâce au logiciel SWIFTER [21]. SWIFTER permet de traiter les images en ligne pour en extraire les impacts photo-électrons, puis d'utiliser ces positions pour détecter les sources de photons, avec la possibilité d'utiliser un filtre de Kalman.

La carte mère et la carte fille 10 Gbits/s sont données en Fig. 1.28.

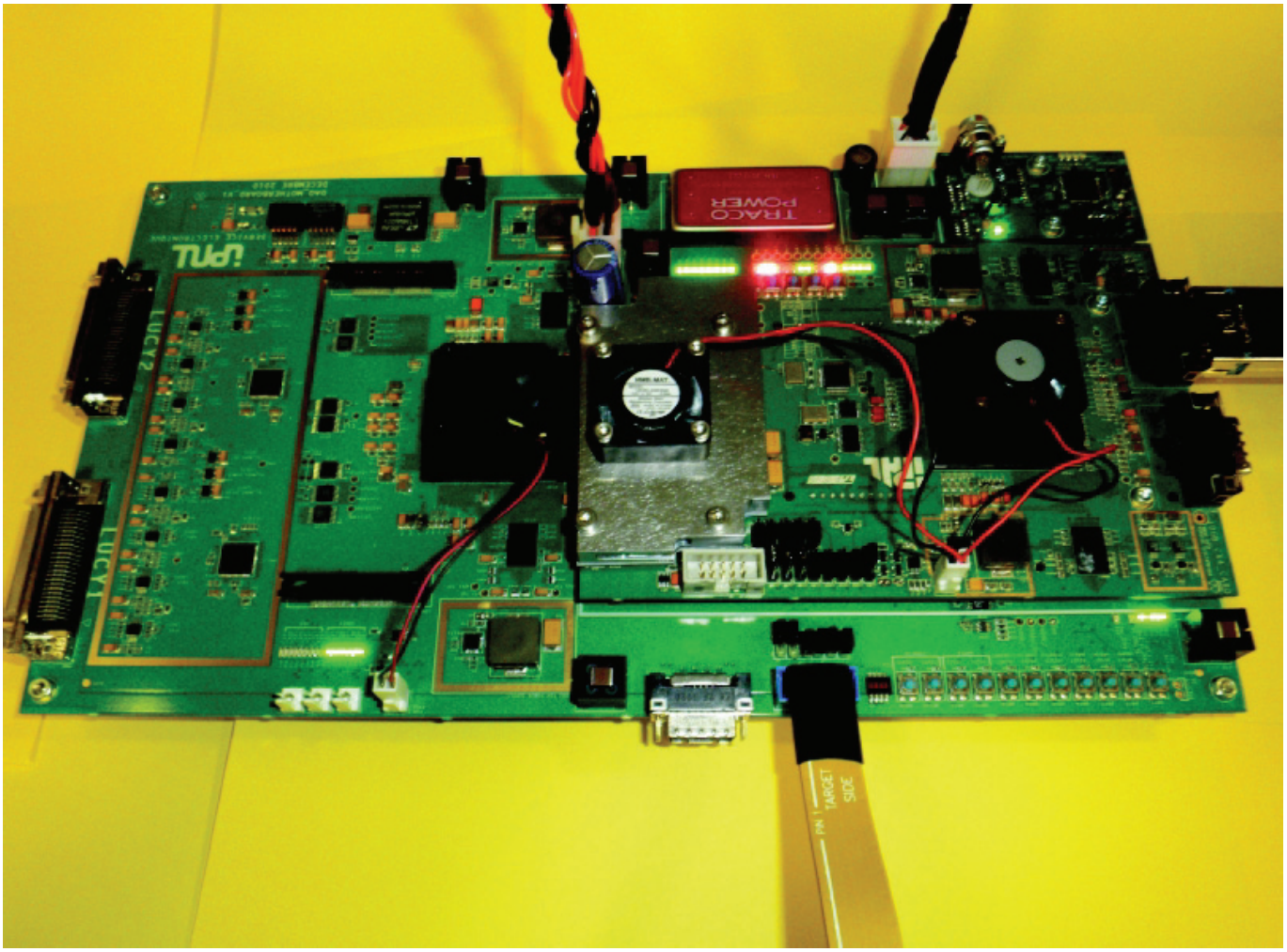


FIGURE 1.28 – Photographie de la carte mère surmontée de la carte fille 10 Gbits/s Ethernet.

Une image du logiciel SWIFTER est donnée en Fig. 1.29.

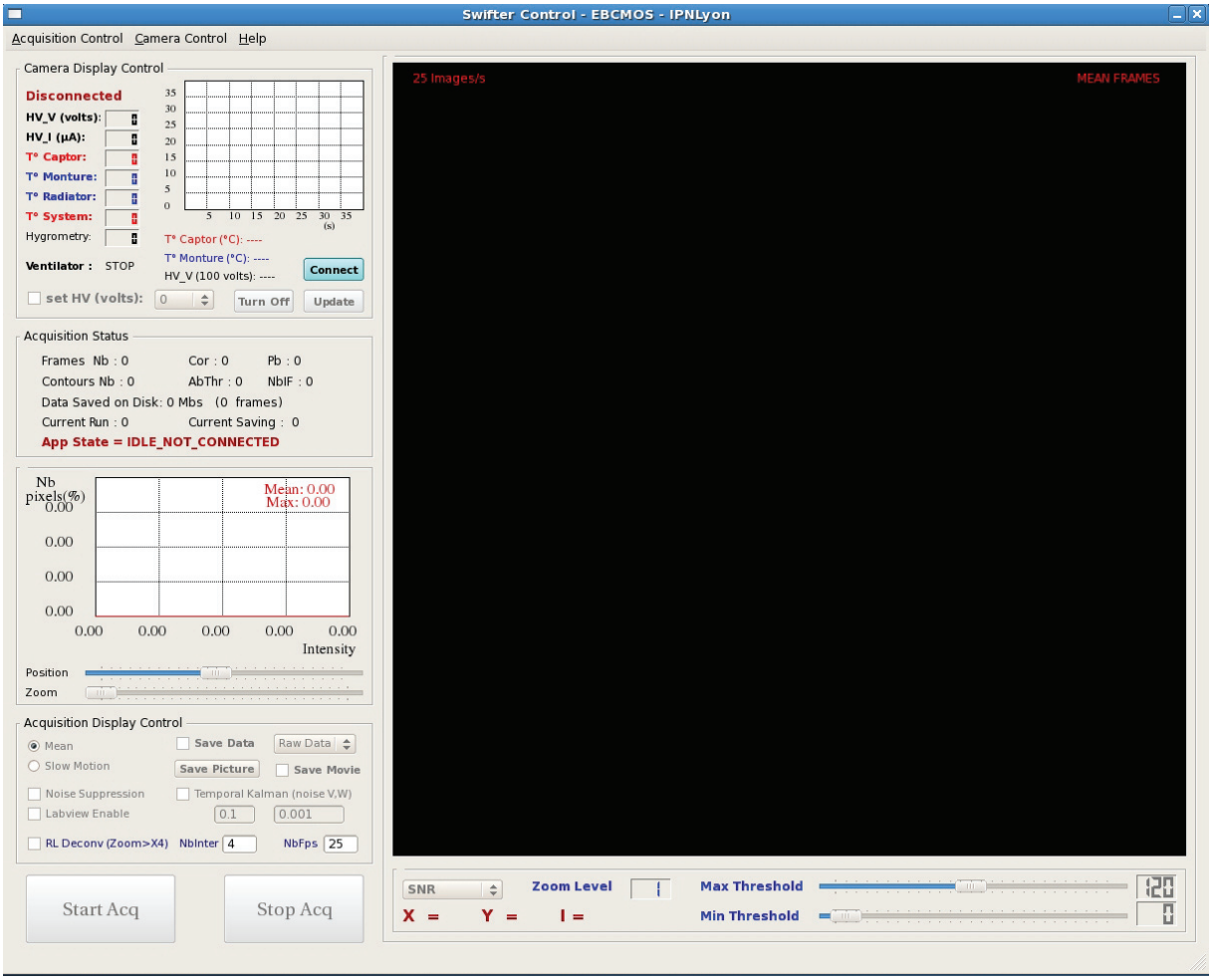


FIGURE 1.29 – Image du logiciel IHM SWIFTER.

Les caractéristiques principales de la caméra ebCMOS du projet LUSIPHER sont résumées dans la table 1.5.

Capteur CMOS	
Matrice de pixels	800 × 800
Côté d'un pixel	10 μm
Vitesse d'acquisition	125/250/500 fps
Bruit de lecture	8 e-
Conversion ADCU	1e-=4.8ADCU

Amplification	
Courant d'obscurité photo-cathode [Hz/mm^2]	S20 : 30 (à 2.8 kV) S25 : 800 (à 2.8 kV)
Efficacité quantique	S20 : 23% (480nm) S25 : 15% (605nm)
PSF tube	10.5 μm
PSF de diffusion	4 μm
Gain	1 - 300

TABLE 1.5 – Caractéristiques principales de la caméra ebCMOS LUSIPHER, pour la lecture du CMOS et l'amplification par photo-cathode.

1.5.1 Caractéristiques du CMOS

Calibration de l'ADCU et mesure de l'efficacité de collection de charges

La calibration du facteur de conversion ADCU / électron a été effectuée [11] en bombardant le capteur CMOS nu par une source de Fer^{55}. La distribution de l'énergie collectée

dans un pixel est donnée dans la Fig. 1.30. Les deux pics d'énergie du Fer émergent de la distribution, permettant une conversion de l'ADC en électrons par comparaison d'énergie. Le résultat est alors :

$$f_{\text{ADCU}} = 4.8 \text{ e-/ADCU} \tag{1.24}$$

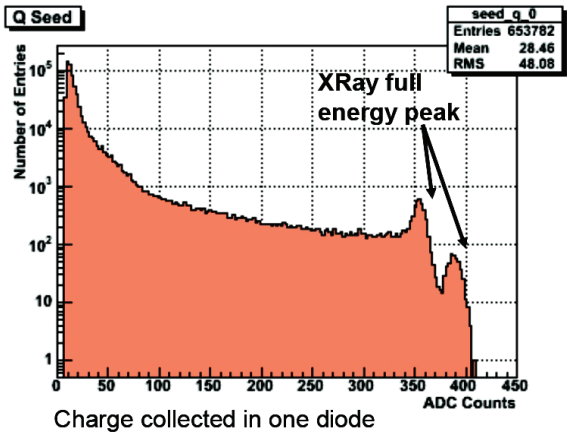


FIGURE 1.30 – Calibration du facteur de conversion e-/ADCU en utilisant la distribution de la charge mesurée par les pixels pendant l'exposition à une source de Fer^{55}. Les deux pics correspondent aux deux raies d'émission K_α, donc dans ce cas l'intégralité de la charge a été déposée dans un seul pixel, permettant la conversion.

L'efficacité de collection des charges est mesurée en étudiant la distribution de la charge collectée dans un amas de 5×5 pixels. La distribution mesurée est donnée par la Fig. 1.31. La charge collectée est comparée à la charge du pic et le rapport entre les deux nous donne l'efficacité de collection de la charge.

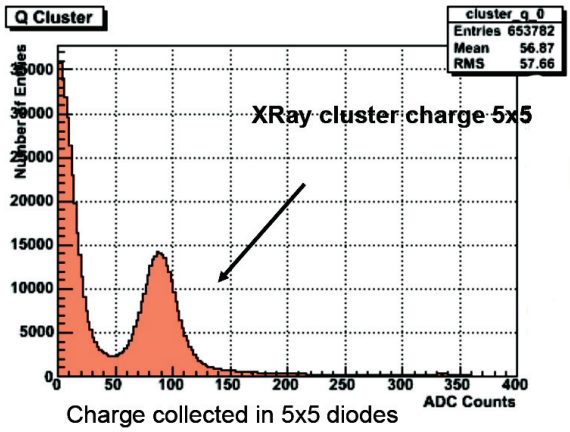
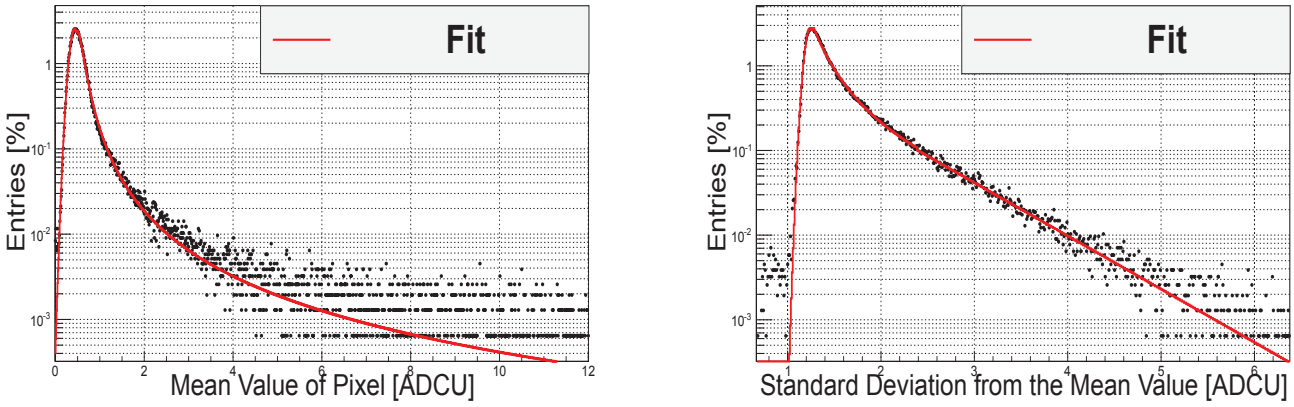


FIGURE 1.31 – Calibration de l'efficacité de collection de la charge par comparaison de l'énergie collectée par un amas de 5×5 pixels pour le pic de la raie du Fer^{55}. Le rapport entre les deux nous donne l'efficacité de collection de la charge.

La caméra ebCMOS est dotée d'une puce dont le dopage de la couche épitaxiale à été gradué pour diriger les électrons secondaires vers les diodes des pixels. Son efficacité de collection de charges est mesurée à 60 %.

Valeur moyenne et bruit de lecture

Le signal des pixels sur 400 × 400 pixels est mesuré pendant une acquisition de 20 000 images dans le noir sans haute-tension appliquée, à 125 fps, pour obtenir les distributions des valeurs moyennes (Fig. 1.32a) et des bruits des pixels (Fig. 1.32b).



(a) (b)

FIGURE 1.32 – Moyennes et écart-types des valeurs des pixels pour une acquisition de 20 000 images sur 400 × 400 pixels à 125 images/seconde par la caméra ebCMOS dans le noir et 0 kV de haute tension. (a) Distribution de la valeur moyenne des pixels. (b) Distribution de l'écart-type à la valeur moyenne des pixels. Les courbes en rouge sont les fonctions utilisées pour la simulation Monte-Carlo.

Le bruit de lecture est en moyenne de 1.5 ADCU, soit 8 e-. Une queue de distribution du bruit de lecture est présente comme dans le cas du capteur sCMOS. Les tests de SNR et de taux de faux sur le bruit de lecture seront effectués dans le chapitre suivant sur la détection de photons avec l'ebCMOS.

1.5.2 Caractérisation des photo-cathodes S20 et S25

Deux types de photo-cathodes multi-alkali ont été implémentés sur les caméras ebCMOS : une S20 optimisée pour le bleu/vert (480 nm), et une S25 étendue vers le rouge (605 nm) ayant par conséquent un courant d'obscurité photo-cathode plus important. L'efficacité quantique pour deux photo-cathodes S20 et deux S25 est donnée par le constructeur sur la Fig. 1.33.

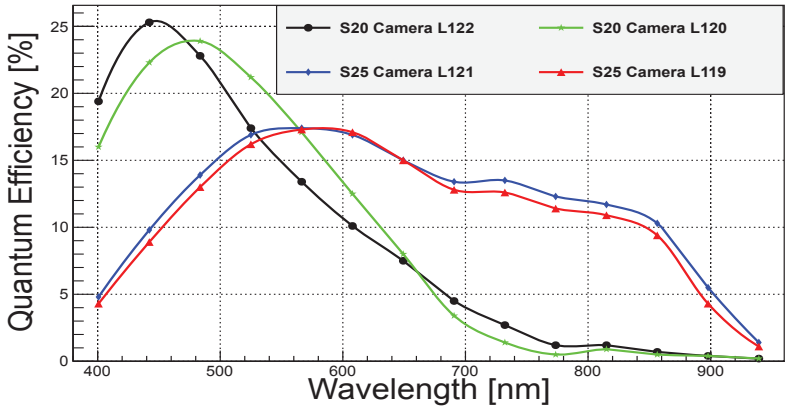
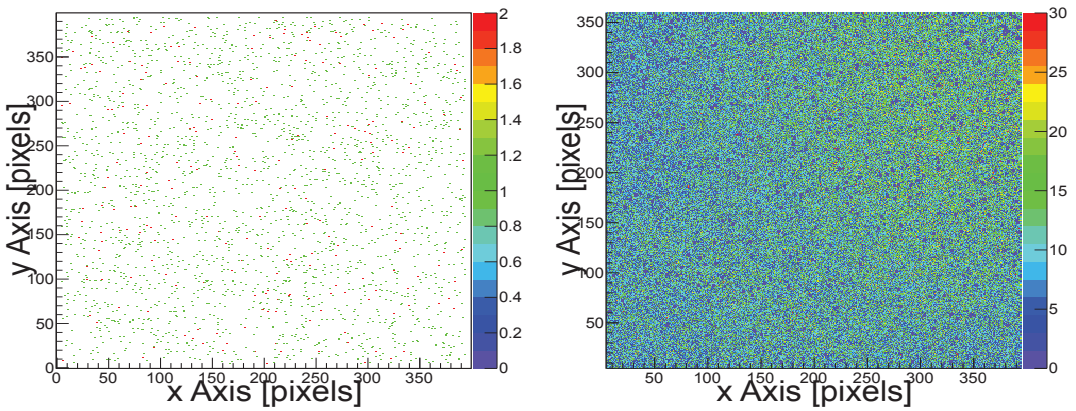


FIGURE 1.33 – Évolution de l'efficacité quantique des photo-cathodes en fonction de la longueur d'onde des photons incidents.

Mesure du courant d'obscurité

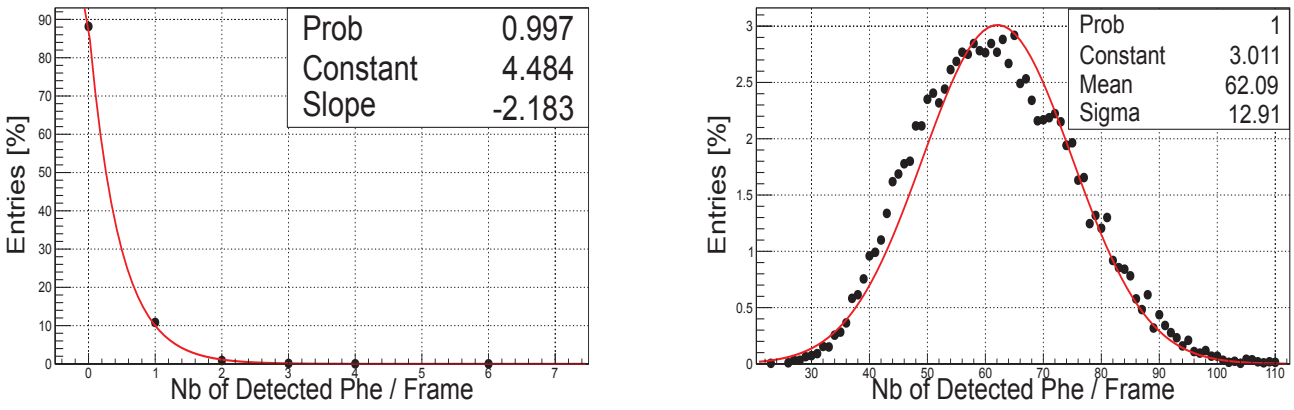
Le courant d'obscurité est mesuré sur 22 000 images à 125 fps, dans le noir pour une tension à 2.8 kV. L'image intégrée en photons de l'acquisition avec et sans haute tension est donnée dans la Fig. 1.34.



(a) (b)

FIGURE 1.34 – Image sommée (22 000 images) dans le noir avec reconstruction de photons pour l'ebCMOS à 125 fps, 400×400 pixels, S25. (a) Sans haute tension. (b) Avec haute tension nominale à 2.8 kV.

Le nombre de faux provenant du bruit de lecture est très proche de zéro. La distribution du nombre de faux par image donnée par la Fig. 1.35b, suit une distribution exponentielle. Le nombre d'électrons issus du courant d'obscurité de la photo-cathode mesurés par le capteur par image suit une distribution gaussienne, ici autour de 62 électrons par image.

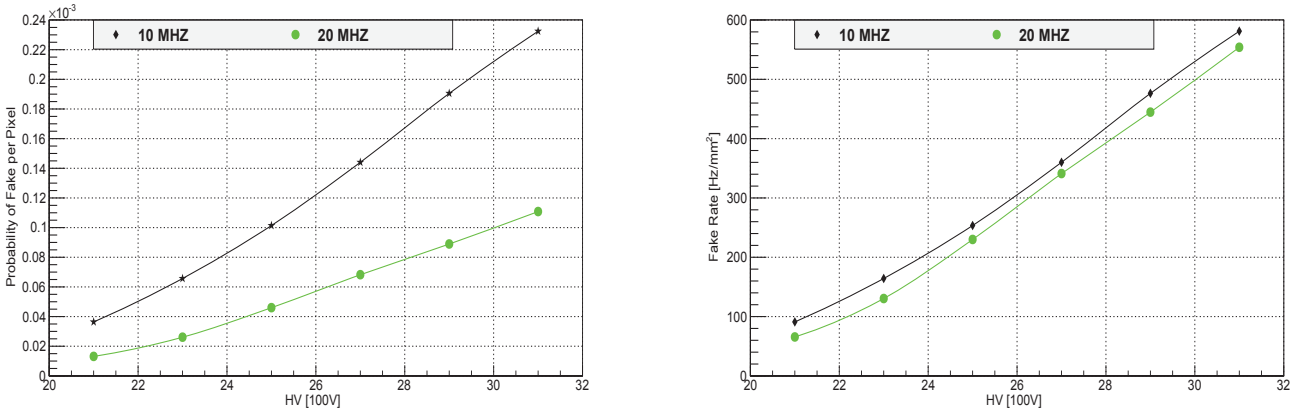


(a) (b)

FIGURE 1.35 – Mesure du taux de faux et du courant d'obscurité de la photo-cathode pour une acquisition de 22 000 images dans le noir à 125 fps sur 400 × 400 pixels avec une photo-cathode S25. (a) Acquisition sans haute tension : distribution du nombre de faux par image suivant une distribution exponentielle. (b) Acquisition avec une haute tension de 3 kV : distribution du nombre d'électrons accélérés du courant d'obscurité par image suivant une distribution gaussienne.

Le nombre de photons issus du courant d'obscurité de la photo-cathode dépend de la valeur de la haute tension car l'effet de champ augmente avec le champ électrique appliqué. Il ne dépend pas de la vitesse de lecture du capteur, car les électrons sont émis par la photo-cathode.

La Fig. 1.36a donne la probabilité de mesurer un photon dans le noir par pixel en fonction de la haute tension appliquée, pour deux vitesses d'acquisition 125 et 250 fps. La Fig. 1.36b montre l'évolution du taux de faux normalisé par unité de temps et d'espace en fonction de la haute tension.

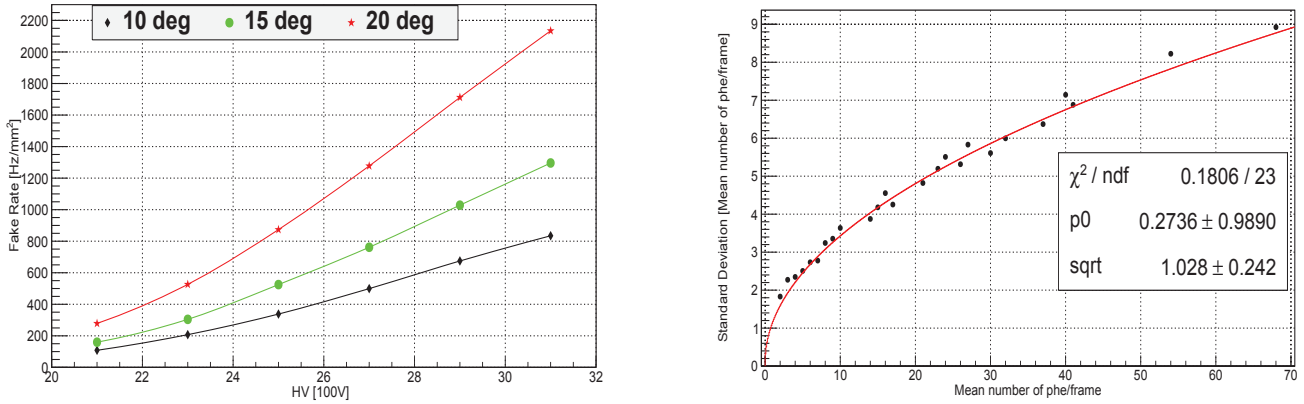


(a) (b)

FIGURE 1.36 – Mesure du courant d'obscurité de la photo-cathode S25, pour deux vitesses de lecture : 125 fps (10 MHz) et 250 fps (20 MHz). (a) Probabilité de mesurer un photon dans un pixel par image en fonction de la haute tension appliquée. (b) Taux de faux par unité de surface par unité de temps en fonction de la haute tension appliquée.

Le courant d'obscurité photo-cathode est dominé à basse tension par les électrons thermiques. Plus la tension augmente, plus les électrons produits par effet de champ prennent d'importance. La Fig. 1.37a montre l'évolution du courant d'obscurité en fonction de la haute tension appliquée et de la température de la photo-cathode (10, 15 et 20 °C).

La Fig. 1.37b montre l'évolution de l'écart-type de la distribution en fonction de la moyenne du courant d'obscurité, suivant une loi en $\sqrt{x}$.



(a) (b)

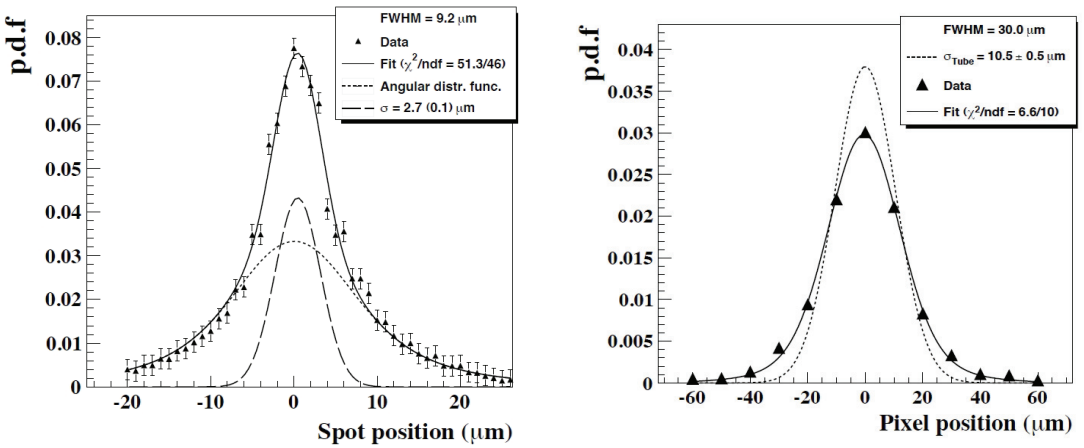
FIGURE 1.37 – (a) Mesure de l'influence de la température du capteur sur le courant d'obscurité à 125 fps sur 400 × 400 pixels et une photo-cathode S25. Évolution du courant d'obscurité en fonction de la haute tension et de la température du capteur (10, 15 et 20 °C). (b) Évolution de l'écart-type du nombre de photons du courant d'obscurité par image en fonction du nombre moyen de photons de courant d'obscurité. La distribution suit une loi en $\sqrt{x}$.

Les mesures du courant d'obscurité de la photo-cathode S20 donnent une valeur très inférieure, de l'ordre de 30 Hz/mm^2 contre plus de 400 pour la S25. Le choix de la photo-cathode adaptée à une expérience sera un compromis entre efficacité quantique à la longueur d'onde observée et courant d'obscurité de la photo-cathode.

Mesure des PSF tube et diffusion

Les PSF du tube à vide et de la diffusion des charges secondaires ont été mesurées sur banc de test. Un spot focalisé inférieur au micron balaie le capteur CMOS nu ou l'ebCMOS (pixel de 10 μm de côté).

Pour chaque pas de 2 μm, une intégration est faite et la distribution des charges est sauvegardée. La distribution de la charge des pixels selon la distance au spot nous donne la PSF de diffusion dans le cas du capteur nu. Les distributions expérimentales de la PSF de diffusion est donnée dans la Fig. 1.38a.



(a) (b)

FIGURE 1.38 – Distribution de probabilité des PSF. (a) PSF de diffusion des charges secondaires dans le CMOS. (b) PSF des photo-électrons dans le tube à vide.

La PSF de diffusion est la somme d'une distribution gaussienne et d'une fonction géométrique (Lambert) [11]. L'écart-type équivalent pour une approximation à l'aide de deux gaussiennes est de 4 μm.

La PSF tube est obtenue par déconvolution de la PSF de diffusion dans l'expérience similaire avec l'ebCMOS et suit une distribution gaussienne d'écart-type 10.5 μm. La Fig. 1.38b montre sa distribution et son fit.

1.6 Valeurs des paramètres utilisés dans la simulation Monte-Carlo

Une simulation Monte-Carlo des trois capteurs a été réalisée en modélisant les étapes de la détection du photon propres à chaque détecteur décrit précédemment. Le but de cette simulation est de calibrer les algorithmes de détection et de suivi de sources. Les chiffres clés des détecteurs sont résumés dans la table 1.6.

	Pixel [μm]	Bruit de lecture	Multiplication des charges	Efficacité quantique	Taux de faux [Hz/mm^2]	Vitesse d'acquisition
sCMOS	6.5	2 e-	-	50%	300	100-500 fps
emCCD	16	10-50 e-	1-1000	90%	0-4000	10-410 fps
ebCMOS	10	8 e-	200 - 300	15-25%	30-800	125-500 fps

TABLE 1.6 – Résumé des chiffres clés des trois caméras utilisées.

Conclusion

Dans cette partie, nous avons étudié les principales différences des trois détecteurs sensibles sCMOS, emCCD et ebCMOS.

Le capteur sCMOS possède un très bas bruit de lecture. Malgré cela, il ne semble pas pouvoir détecter le photon unique car le bruit est équivalent au signal mesuré. L'absence de facteur d'excès de bruit le rend par contre plus stable aux fortes conditions de bruit de fond.

Le gain du capteur emCCD amplifie l'influence du bruit CIC, augmentant ainsi le taux de faux. Il est de l'ordre de 1 000 Hz/mm^2 pour un gain de 300, ce qui pose la question de la pureté de la mesure à bas niveau de lumière. De plus, le caractère stochastique du gain électronique diminue l'efficacité quantique effective de détection du photon de 50 % au photon unique.

Le capteur ebCMOS possède lui un bruit très faible, de l'ordre de 30 Hz/mm^2 pour la photo-cathode S20. C'est l'efficacité quantique de la photo-cathode qui est le facteur limitant à bas niveau de lumière, avec des valeurs comprises entre 15 et 25 %, alors que celle de l'emCCD est supérieure à 80%.

Nous verrons dans la partie suivante comment la diffusion et la multiplication des charges secondaires dans la couche sensible permet à l'ebCMOS de détecter la position des photo-électrons avec une position intra-pixel.

Chapitre 2

Méthode de reconstruction d'un impact de photo-électron avec l'ebCMOS

La valeur mesurée par les pixels permet de détecter la position des sources. Selon le capteur utilisé, le traitement est différent :

- **Imageur sans gain CCD ou CMOS :** une détection du signal se fait en mesurant les pixels ou groupes de pixels ayant un rapport signal sur bruit supérieur à 5.
- **Imageur à multiplication électronique emCCD :** un photon est détecté dans un pixel si son rapport signal sur bruit est supérieur à 5. Ce mode de détection forme une matrice de pixels avec des valeurs binaires. La valeur du nombre de photons incidents peut de plus être estimée en utilisant la distribution théorique du gain de multiplication électronique.
- **Imageur avec une amplification par champ électrique en amont de la multiplication par ionisation ebCMOS :** la diffusion des charges secondaires sur plusieurs pixels permet une reconstruction des impacts photo-électrons.

Les méthodes utilisées pour les deux premiers types de détecteurs sont connues et publiées. Elles seront développées par la suite lors de la calibration expérimentale de ces détecteurs. Le but de ce chapitre est d'introduire une nouvelle méthode de détection au photon unique basée sur la technologie ebCMOS.

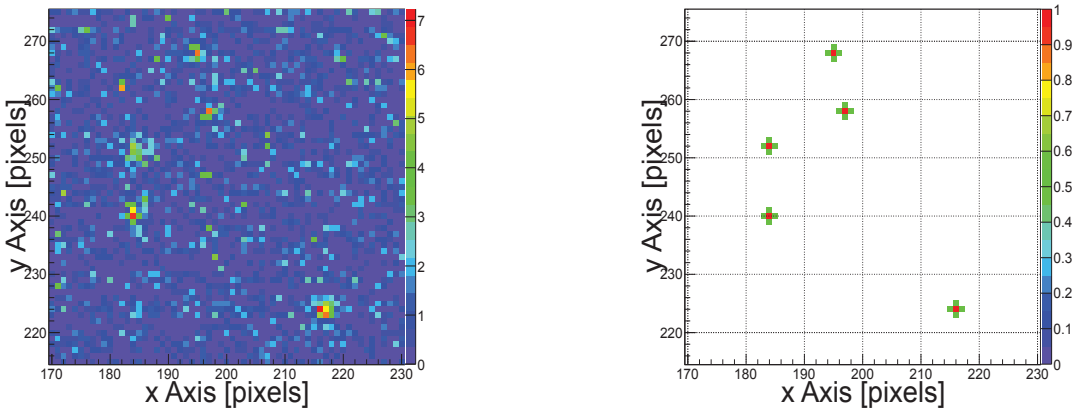
Ce chapitre décrit la méthode mise en place pour détecter l'impact des photons de la caméra ebCMOS, son principe, ses performances et ses applications. Le principe de la méthode est décrit dans la partie 2.1. Ensuite, les résultats des résolutions spatiales et énergétiques sont discutées dans la partie 2.2. Enfin, les applications expérimentales pour lesquelles cette méthode a été implémentée sont décrites dans la partie 2.3, comme le système embarqué LuSEApher qui étudie la bioluminescence des grands fonds marins.

2.1 Présentation de l'algorithme de détection des photo-électrons

Chaque photo-électron accéléré impactant le capteur génère des centaines de charges secondaires qui diffusent dans la couche épitaxiale avant d'être recueillies par les pixels. La diffusion est telle que pour un unique photo-électron incident, plusieurs pixels récoltent des charges secondaires formant un groupement appelé dans la suite *cluster*. Le principe de l'algorithme de recherche d'impacts photo-électrons est de trouver ces clusters de pixels [22].

La Fig. 2.1a montre un exemple d'amas de pixels touchés par les électrons secondaires de photo-électrons. L'image représente le rapport signal sur bruit de 50 × 50 pixels d'une acquisition dans le noir faite à 125 fps avec une haute tension d'accélération appliquée de 2.8 kV. Les impacts mesurés sont issus du courant d'obscurité de la photo-cathode.

Un impact photo-électron se caractérise par un groupement de pixels brillants ayant un SNR [1] supérieur à 2. Cinq impacts sont présents sur cette image, avec plusieurs pixels brillants isolés. Après traitement par la méthode des clusters, les impacts de photo-électrons sont détectés et représentés sur la Fig. 2.1b.



(a) (b)

FIGURE 2.1 – Exemple de détection des impacts de photo-électrons par la méthode des clusters pour une acquisition dans le noir à 125 fps avec une haute tension appliquée de 2.8 kV. (a) Image du rapport signal sur bruit de 50 × 50 pixels (b) Position des impacts photo-électrons détectés.

Le but de la méthode est de détecter les amas de pixels en filtrant les pixels bruyants typiques du capteur CMOS.

2.1.1 Paramètres et données disponibles à chaque image

Pour détecter des photo-électrons, plusieurs paramètres d'entrée sont disponibles. Les informations sur les pixels sont collectées sous forme de matrices de taille $N \times N$.

1. La matrice du signal mesuré par les pixels .
2. La matrice du bruit des pixels. Le bruit du pixel est défini comme l'écart-type σ_{bruit} des valeurs retournées par le pixel dans le noir et sans haute tension.
3. La PSF de la diffusion des électrons secondaires dans le CMOS.
4. La valeur attendue du gain qui dépend de la haute tension appliquée, ainsi que de l'épaisseur de la couche morte et de la couche épitaxiale.

1. *Signal to Noise Ratio* : rapport signal sur bruit

Le bruit du pixel permet de calculer le rapport signal sur bruit ou SNR (*Signal to Noise Ratio*) du pixel, qui est le rapport du signal reçu sur le bruit mesuré. Le SNR donne une indication sur la qualité de l'information recueillie par le pixel.

2.1.2 Méthode du clustering

Le principe de détection du photo-électron est fondé sur la recherche d'une structure de pixels adjacents dans des amas de pixels appelés clusters. Un cluster est centré sur un pixel siège, dans lequel se produit l'impact du photo-électron. La première étape de la détection est donc la recherche de pixels sièges, qui sont sélectionnés selon leur SNR. Le seuil de détection est fixé selon un compromis entre efficacité et taux de déclenchement.

Un pixel sélectionné n'est conservé que s'il est le maximum du cluster. La taille du cluster est déterminée par la PSF de diffusion des charges secondaires. En approximant la PSF de diffusion à une distribution gaussienne, l'ordre de grandeur de l'écart-type de la distribution est de 4 μm. La taille du pixel étant de 10 μm, nous mesurons le signal adjacent dans un cluster de $R \times R = 5 \times 5$ pixels.

La table 2.1 donne la valeur moyenne de la charge collectée dans des clusters de tailles différentes. La matrice Q_R est composée de $R \times R$ pixels. La Fig. 2.2 montre l'évolution dans Q_{11} de la charge moyenne des pixels dans le cluster. Les pixels sont classés pour chaque cluster par ordre décroissant selon leur signal mesuré.

	Q_1	Q_3	Q_5	Q_7	Q_9
Pourcentage de Q_9 (%)	13,0	50,7	75,7	90,6	100
Augmentation en charge ($Q_{R-1} \rightarrow Q_R$) (%)	-	289,2	49,2	19,6	10,2
Charge moyenne par pixel (ADC)	8,24	3,56	1,91	1,16	0,78

TABLE 2.1 – Distribution et évolution de la charge moyenne collectée dans le cluster selon sa taille.

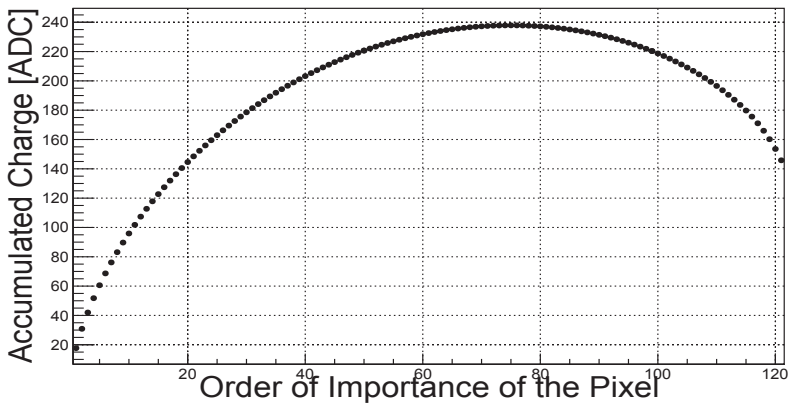


FIGURE 2.2 – Évolution de la charge moyenne cumulée des pixels voisins du cluster, classés par ordre décroissant selon leur signal ADCU après soustraction de la valeur moyenne du pixel dans le noir.

Pour R supérieur ou égal à 7, le signal moyen par pixel devient très inférieur au bruit de lecture (1.5 ADCU). La Fig. 2.2 montre une courbe en cloche : après le 75^e pixel, les pixels ont en moyenne une valeur négative (la valeur moyenne du pixel est retranchée).

Ces pixels n'ont mesuré aucun signal. La distribution du signal d'un pixel dans le noir est une gaussienne centrée sur la valeur moyenne. La valeur de ces pixels correspond donc à la partie négative de la distribution du signal. Il existe alors d'autres pixels n'ayant reçu aucun signal correspondant à la partie positive .

En utilisant la symétrie de la courbe, nous supposons que le bruit commence vers le 20^e pixel. Le nombre de pixels touchés correspond à un taille de cluster R comprise entre 3 et 5.

La moyenne du pixel central est de l'ordre de 8 ADCU, soit un rapport signal sur bruit moyen supérieur à 3. Pour un bruit gaussien, la probabilité d'avoir un SNR supérieur à 3 est de l'ordre de 0.3 %, ce qui fait en moyenne 480 pixels par image sur une matrice 400×400. L'information des pixels contenus dans Q_5 permet le filtrage des pixels bruyants :

1. **Signal minimum** $p_c \geq s_c$ **:** Le pixel central p_c doit avoir un signal supérieur à s_c.
2. **Maximum local :** p_c doit être le maximum du cluster de taille R.
3. **Structure de diffusion :** un impact photo-électron n'est validé que s'il possède au moins n_s pixels secondaires ayant un signal supérieur à s_s.

Tous ces paramètres dépendent du nombre de charges secondaires générées et de la PSF de diffusion. Pour la suite, nous utiliserons $s_c = 3$ et $R = 5$. Le choix des valeurs de n_s et s_s sera expliqué dans la partie suivante.

Un schéma de l'algorithme est donné par la Fig. 2.3

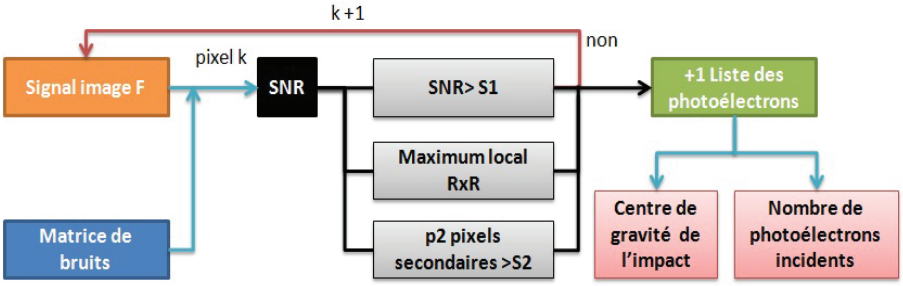


FIGURE 2.3 – Étapes de la méthode de détection d'un événement photo-électron. En utilisant la matrice de SNR des pixels, un cluster de photo-électron vérifie trois critères : un SNR suffisant, un maximum local et un nombre suffisant de pixels voisins ayant reçu un signal significatif. Cette méthode permet aussi de mesurer la position de l'impact avec un centre de gravité et un comptage du nombre d'impacts locaux avec la linéarité du gain.

Afin de définir la valeur des paramètres restants de l'algorithme (s_s et n_s), deux acquisitions dans le noir sont effectuées, la première sans haute tension et la seconde avec une haute tension de 2.8 kV.

La première acquisition ne comporte aucun événement photo-électron accéléré. Cette acquisition sert de mesure de la pureté de l'algorithme de détection.

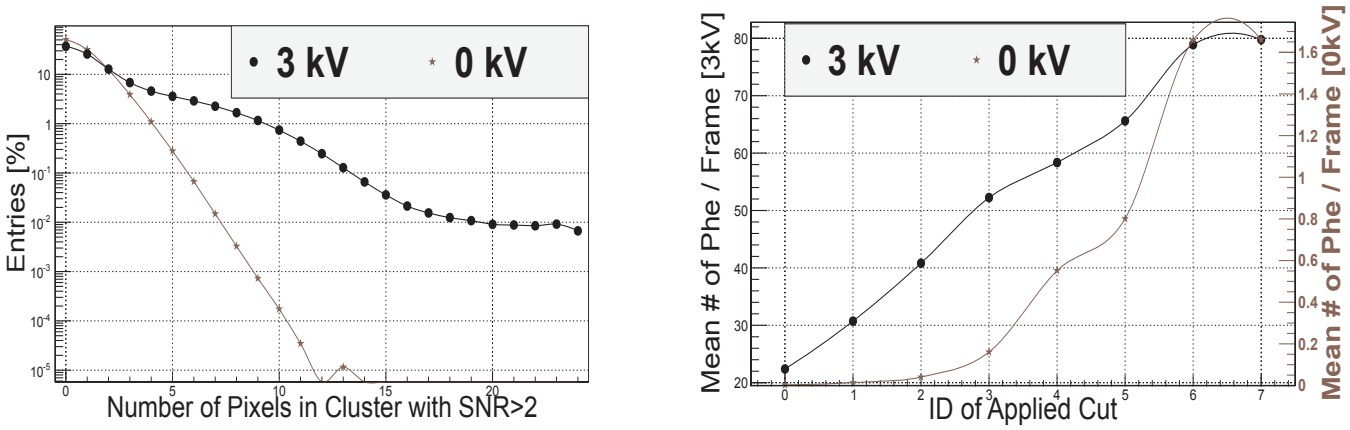
Dans la seconde acquisition, les électrons du courant d'obscurité de la photo-cathode sont accélérés et sont ainsi identiques à un impact photo-électron. De plus, comme le courant d'obscurité est distribué aléatoirement sur toute la matrice, les impacts sont en grande majorité isolés. Pour un courant d'obscurité de 100 électrons accélérés par image de 400 × 400 pixels, un impact se produit en moyenne tous les 1600 pixels.

Le nombre d'électrons accélérés détectés dans la seconde acquisition donne une indication de l'efficacité de la sélection. Comme le nombre exacte d'électrons accélérés par courant d'obscurité est inconnu, il n'existe pas de méthode parfaite pour déterminer l'efficacité réelle de l'algorithme.

Afin de fixer un ordre de grandeur des valeurs s_s et n_s, les clusters sont tout d'abord uniquement sélectionnés sur le pixel central. Le nombre de pixels ayant un SNR supérieur à 2 est compté pour chaque cluster.

La Fig. 2.4a montre la distribution du nombre moyen de pixels ayant un SNR supérieur à 2 par cluster, pour les deux acquisitions. Une nette différence entre les deux courbes est visible pour un nombre de pixels supérieur à 3.

Le nombre moyen d'événements détectés dans les deux acquisitions pour plusieurs valeurs de coupures n_s et s_s est donné par la Fig. 2.4b. Le valeurs n_s et s_s utilisées sont résumées dans la table 2.2.



(a) (b)

FIGURE 2.4 – (a) Mesure dans le noir du nombre de pixels ayant un SNR supérieur à 2 dans un cluster 5×5 autour d'un maximum local ayant un SNR supérieur à 3. En vert sans haute tension, en noir à 3 kV. (b) Nombre moyen de photons mesurés par image dans le noir à 0 (vert) et 3 (noir) kV sur 20 000 images en fonction des coupures appliquées. Pour toutes les coupures, $s_c = 3$. Les valeurs des coupures sont données dans la table 2.2.

ID	0	1	2	3	4	5	6	7
Type	Charge	SNR	Charge	SNR	Charge	Charge	Charge	SNR
n_s	4	4	3	3	3	2	4	2
s_s	6 ADC	2	6 ADC	2	6 ADC	6 ADC	2	2
R	3	3	3	3	5	3	5	3

TABLE 2.2 – Coupures utilisées en test de détection de photons sur les images de noir à 0 et 3 kV.

Ces mesures nous donnent une indication sur la pureté et l'efficacité de la détection en photons. En relâchant encore la contrainte, il est possible d'augmenter l'efficacité, mais un taux de déclenchement à 0 kV inférieur à 2 photons par image semble nécessaire pour garder une pureté suffisante.

Nous voulons ici la meilleure efficacité possible, car la méthode de suivi pourra ensuite utiliser l'information spatio-temporelle pour améliorer la pureté. Pour la suite, la méthode n° 7 est conservée : un pixel central ayant un SNR supérieur à 3 et au moins deux autres pixels ayant un SNR supérieur à 2 dans un cluster 3×3 pixels.

Finalement, le bruit mesuré est en moyenne inférieur à 1.6 faux par image, soit un bruit de lecture par pixel équivalent à 10^{-5} événements par pixel par image.

Afin de tester la valeur de la sélection par clusters, nous étudions la distribution moyenne de la charge cumulée dans Q_5 pour trois méthodes de sélection :

1. une méthode de sélection uniquement sur le pixel central sélectionné pour être le maximum local et ayant un SNR supérieur à 3.
2. une méthode aléatoire de sélection du pixel central.
3. la méthode des clusters.

Aucune de ces méthodes ne fait de sélection sur la charge totale du cluster. La distribution moyenne de la charge mesurée dans Q_5 pour ces méthodes est donnée dans la Fig. 2.5.

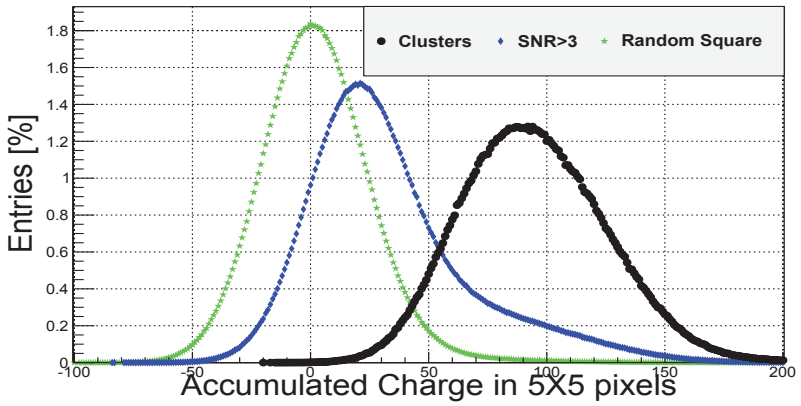


FIGURE 2.5 – Distribution de la charge cumulée dans une sous-matrice de 5×5 pixels autour du pixel central, mesurée sur 20 000 images dans le noir avec une haute tension de 3 kV. Trois méthodes utilisées pour la sélection du pixel central : la méthode des clusters (noir), la sélection par le pixel central ayant un SNR supérieur à 3 et le maximum local (bleu) et une sélection aléatoire (vert).

La méthode aléatoire donne une distribution centrée autour de 0, prenant autant de bruit positif que négatif. La méthode du SNR supérieur à 3 permet d'obtenir un signal plus significatif. La méthode des clusters permet de vraiment séparer le bruit du signal et justifie l'emploi de cette méthode pour sélectionner les impacts de photo-électrons. Cela permet de réduire l'influence du bruit de lecture pour la sélection du signal lors du suivi de sources.

2.2 Localisation et comptage des impacts de photo-électrons et filtrage des retours ioniques

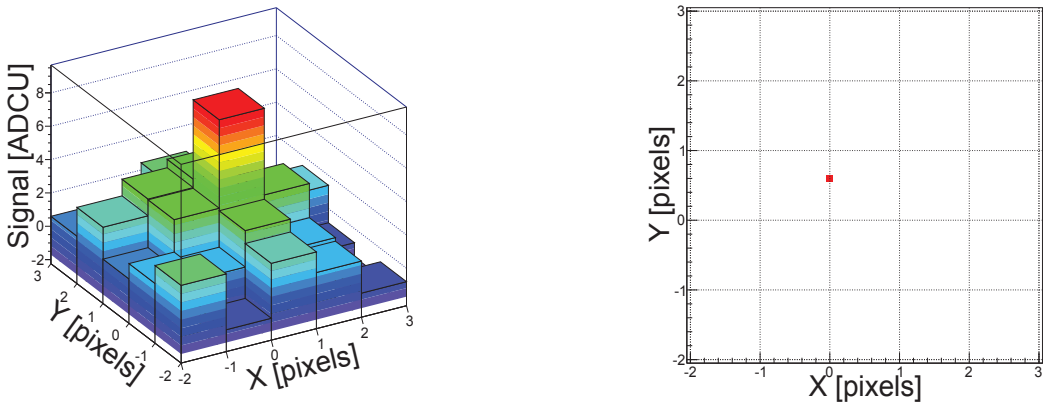
Cette méthode de sélection permet d'obtenir la position de l'impact à l'intérieur du pixel, de compter le nombre de photo-électrons incidents et de filtrer les retours ioniques.

2.2.1 Localisation de l'impact d'un photo-électron et fonction de correction η

Le centre de gravité de la charge mesurée dans Q_5 nous donne la position de l'impact du photo-électron à l'intérieur du pixel, contrairement à la méthode de sélection des photons

de l'emCCD, qui permet uniquement de donner le pixel dans lequel a eu lieu l'impact.

La Fig. 2.6a montre le profil 2D typique de la charge accumulée dans Q_5 d'un événement photo-électron. La Fig. 2.6b montre la position estimée de l'impact à l'intérieur du pixel.



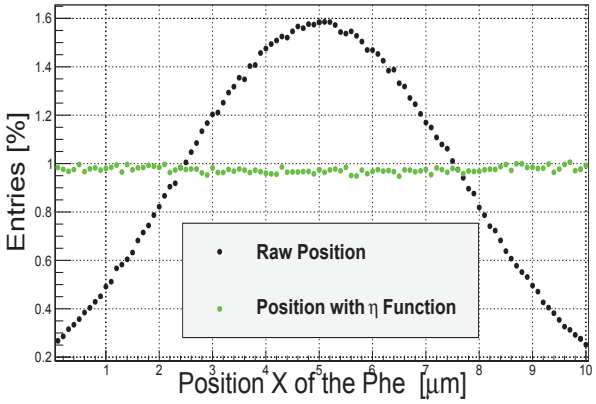
(a) (b)

FIGURE 2.6 – (a) Charge en unités ADC des pixels d'un événement photo-électron à 3 kV (b)Position reconstruite du centre de l'impact à partir du centre de gravité des charges.

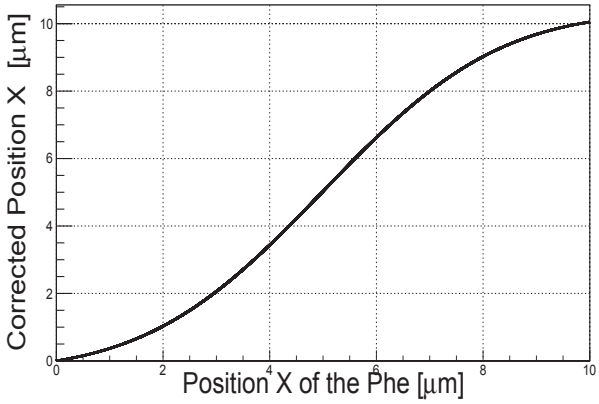
La reconstruction de la position par centre de gravité des pixel est biaisée [23] [24] [25]. Pour calculer le centre de gravité (COG pour *Center Of Gravity*) de la charge, le centre des pixels est utilisé comme référence, alors que la charge peut être déposée sur tout le pixel. Un poids plus important est donc donné au centre du pixel.

Les électrons accélérés du courant d'obscurité de la photo-cathode sont émis aléatoirement sur tout le détecteur, selon une distribution plate. Ainsi, la distribution des positions reconstruites par rapport au pixel central des clusters pour les photo-électrons du courant d'obscurité devrait elle aussi être plate. La distribution mesurée n'est pas plate mais gaussienne, comme le montre la Fig. 2.7a.

La fonction de correction η est obtenue avec la fonction cumulative de cette distribution. Elle fait correspondre à la position reconstruite du photo-électron sa position corrigée. Sa distribution est donnée par la Fig. 2.7b.



(a)



(b)

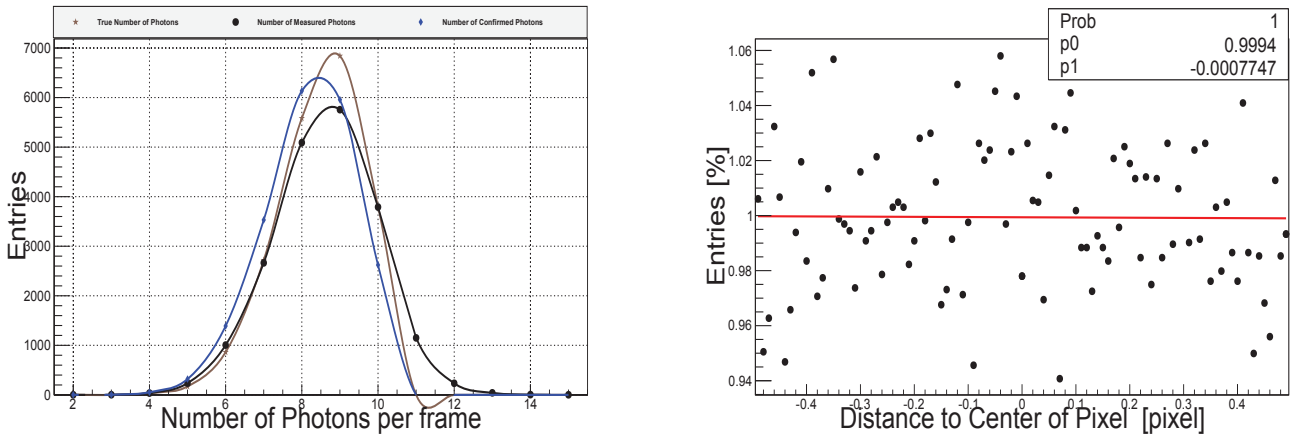
FIGURE 2.7 – (a) Distribution des centres de gravité de photon par rapport au pixel central sans correction (noir) et après application de la fonction η (vert). 20 000 images de courant d'obscurité à 3 kV. (b) Fonction de correction η.

La fonction η permet de retrouver une distribution plate des photons reconstruits, comme le montre la Fig. 2.7a. La simulation Monte-Carlo développée pour l'ebCMOS sera utilisée pour vérifier que le biais ne vient pas aussi du fait que l'algorithme sélectionne avec une meilleure efficacité les photo-électrons qui tombent au centre du pixel.

2.2.2 Mesure d'efficacité et de pureté avec la simulation Monte-Carlo

La simulation Monte-Carlo développée à partir des distributions mesurées sur la caméra ebCMOS permet de tester la fiabilité de cette sélection, sa résolution et ses biais possibles. Les résultats suivants ont été obtenus sur une simulation d'un capteur de 50×50 pixels pour 20 000 images avec une moyenne de 10 photo-électrons de courant d'obscurité.

La Fig. 2.8a montre la distribution du nombre de photons par image : la vraie distribution (marron), le nombre de photons mesurés par la méthode de clusters (noir), et le nombre de ces photons correspondant à un vrai photon (bleu). La fig 2.8b montre la distribution des positions vraies des photons correctement détectés par la méthode par rapport au pixel dans lequel ils sont tombés.



(a) (b)

FIGURE 2.8 – (a) Distribution du nombre de photons par image. Nombre de photons simulés (marron), nombre de photons détectés (noir), nombre de photons validés (bleu). (b) Distribution de la position vraie des photons correctement détectés par rapport au pixel d'impact. Fit en p_1x+p_0.

La distribution des positions par rapport au pixel ne montre aucun biais de reconstruction. C'est une validation du modèle précédent qui attribue le biais de la distribution de positions reconstruites à la position privilégiée du centre des pixels. Ce résultat est très important pour permettre une résolution intra-pixel.

En utilisant la liberté offerte par la simulation Monte-Carlo, nous étudions l'effet du bruit de lecture et celle de la haute tension sur la reconstruction des photons :

1. Quel effet a la queue de distribution du bruit de lecture ?
2. Quelle influence a le nombre de charges secondaires générées ?

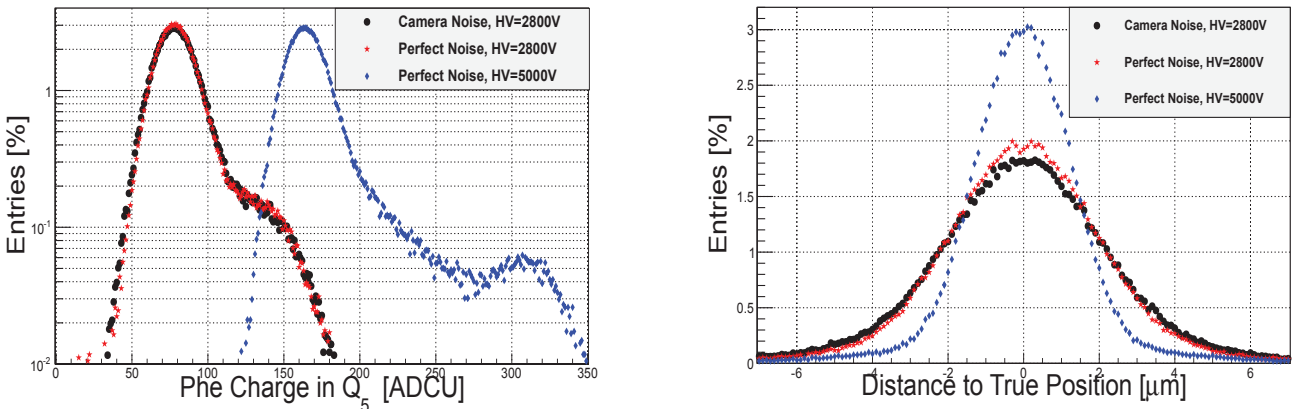
Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé trois simulations :

1. **Camera Noise, HV=2800V (noir) :** la modélisation des bruits possède une queue de distribution et suit la distribution donnée par la Fig. 1.32 dans la partie 1.5.1. La haute tension est simulée à 2.8 kV.
2. **Perfect Noise, HV=2800V (rouge) :** le bruit des pixels fixé à 1.5 ADC, la haute tension à 2.8 kV.
3. **Perfect Noise, HV=5000V (bleu) :** le bruit des pixels fixé à 1.5 ADC, la haute tension à 5 kV.

Selon ces critères, quatre valeurs sont comparés :

1. la charge moyenne accumulée par cluster ;
2. la précision de localisation de la position de l'impact ;
3. l'efficacité ;
4. la pureté.

La Fig. 2.9a montre la distribution de la charge mesurée des photons dans Q_5 pour les trois simulations. La Fig. 2.9b montre la distribution de l'écart à la position réelle du photon pour les trois simulations. La table 2.3 résume les résultats sur la précision de localisation, l'efficacité et la pureté des trois simulations.



(a) (b)

FIGURE 2.9 – Trois conditions de simulation. (a) Distribution de la charge mesurée dans Q_5 des photons détectés. (b) Distribution de l'écart à la position vraie des photons détectés.

Simulation Monte Carlo	Efficacité [%]	Pureté [%]	Précision de localisation [μm]
1 : Camera Noise, HV=2800V	96.66	94.95	2.26
2 : Perfect Noise, HV=2800V	97.09	96.19	2.06
3 : Perfect Noise, HV=5000V	95.00	99.45	1.30

TABLE 2.3 – Mesure de précision de localisation, d'efficacité et de pureté de la reconstruction de photons pour les trois conditions de simulation.

La méthode des clusters permet une très bonne efficacité ainsi qu'une bonne pureté, avec l'avantage d'obtenir une précision de localisation sur la position inférieure au quart du pixel.

L'impact de la forme du bruit de lecture sur la détection du photon est mince : moins de 1.5 % de gain sur l'efficacité et la pureté et une amélioration de moins de 9 % sur la précision de localisation. Par contre, augmenter le gain permet une meilleure définition des pics 1 et 2 photons, et améliore la précision de localisation de 36 %.

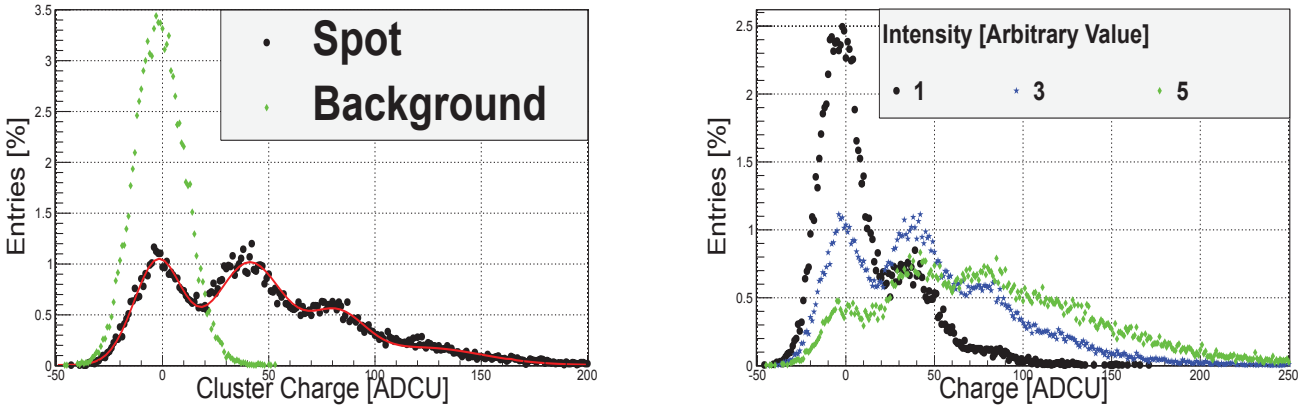
2.2.3 Linéarité du gain et comptage de photons

La linéarité du processus d'amplification des charges primaires permet un comptage du nombre de photons incidents par pixel ou groupe de pixels. Pour des impacts plus éloignés, la création de deux maxima locaux distincts permet de les séparer sans avoir à les compter.

Dans le cas de deux impacts rapprochés, le comptage est effectué avec la charge collectée dans Q_5, en utilisant la linéarité du processus d'amplification des charges.

Afin de visualiser la résolution en comptage de photons de cette méthode, plusieurs acquisitions sont effectuées en utilisant un spot contrôlé d'une taille inférieur au micromètre. Le montage expérimental de cette expérience est décrit dans la partie 4. Pour chaque image, quelques photons impactent le détecteur au même endroit.

La distribution des charges collectées pour un spot d'intensité 3 (unités arbitraires), comparée à celle de pixels non touchés par le spot est donnée par la Fig. 2.10a. Plusieurs intensités sont utilisées (1, 3 et 5) afin de faire varier la moyenne du signal. Les distributions en charge des ces intensités sont données dans la Fig. 2.10b.



(a) (b)

FIGURE 2.10 – Distribution de la charge mesurée dans Q_5. (a) Comparaison entre le signal du spot et une zone sans signal. (b) Comparaison des distributions pour trois intensités : 1, 3 et 5 (unité arbitraire).

Les pics d'intensité correspondant à 0, 1 et 2 photo-électrons sont clairement définis. Le pic correspondant à 3 photo-électrons est plus étalé. Le principe du comptage est validé, même si la résolution énergétique se dégrade avec le nombre de photo-électrons.

Cette méthode a été conçue pour un bas niveau de lumière où le comptage de photo-électrons présente un intérêt pour réduire le bruit de lecture. Pour un signal plus important, il devient plus efficace d'utiliser la charge qui est alors bien au dessus du bruit de lecture.

Pour une source ponctuelle ayant un signal inférieur à 10 photons détectés par image, les PSF du tube et du système optique étalent les impacts photo-électrons suffisamment pour permettre un comptage avec une bonne résolution.

Des pistes sont avancées pour améliorer la résolution énergétique et donc le comptage de photo-électrons. Une approche matérielle pourrait toucher les aspects suivants :

1. augmenter la haute tension ;

2. diminuer la couche morte ;
3. diminuer le bruit de lecture, qui élargit les pics ;
4. diminuer la rétrodiffusion ;
5. améliorer l'efficacité de collection de charges, en guidant la diffusion des charges secondaires.

Une approche numérique utilise un algorithme de recuit déterministe (inspiré de la physique statistique) ayant pour effet de partager la charge d'un pixel entre plusieurs prototypes de photo-électrons proches. La Fig. 2.11 [26] montre que cette méthode fonctionne pour une haute tension de 8 kV. Un travail futur sera d'évaluer l'apport de cette technique pour une haute tension plus faible, autour de 3 kV.

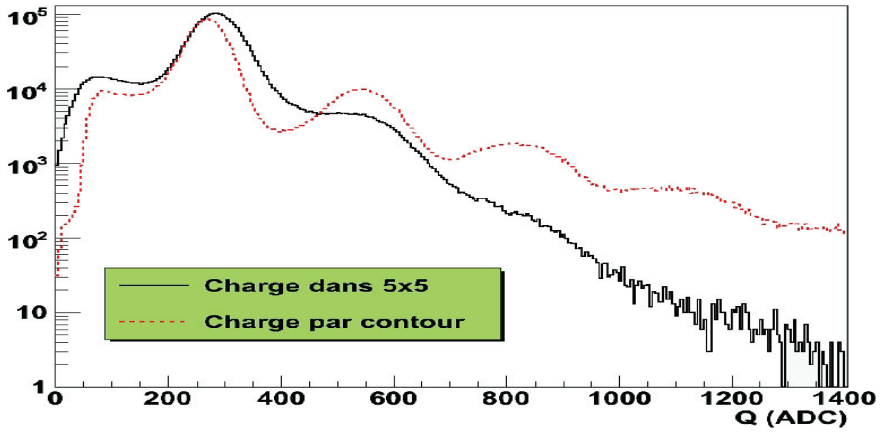
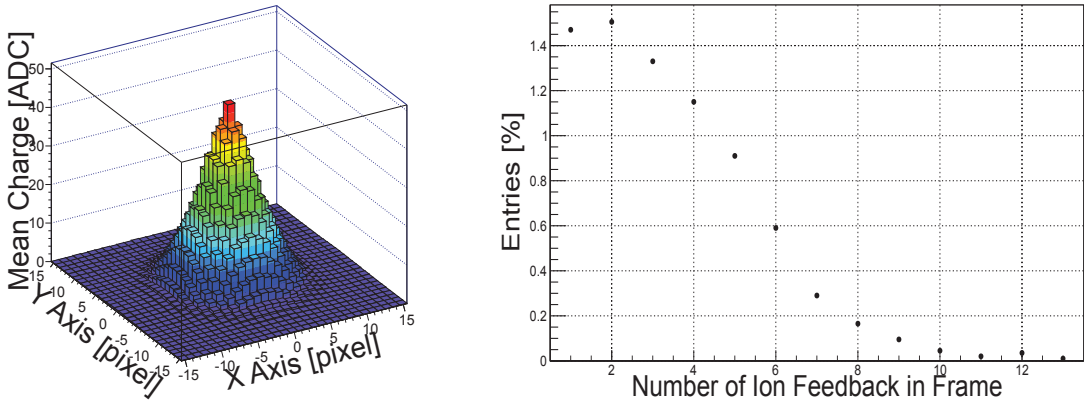


FIGURE 2.11 – Distribution de la charge des pixels dans des clusters de 5 × 5 pixels (noir) ou dans des contours au nombre libre de pixels (rouge) à 8 kV

2.2.4 Détection et suppression des retours ioniques

Les retours ioniques constituent un bruit additionnel par l'ensemble tube à vide et photo-cathode. Ces événements rares sont facilement discernables de l'impact de photo-électrons. Un impact photo-électron touche en moyenne 5×5 pixels autour du pixel central alors qu'un retour ionique dépose une énergie non négligeable dans une zone de 15×15 pixels, comme le montre la Fig. 2.12a qui représente la charge moyenne collectée autour du pixel central d'un retour ionique.

La Fig. 2.12b montre la distribution moyenne du nombre de retours ioniques détectés par image, sur une acquisition de 20 000 images à 3 kV, sur 400×400 pixels.

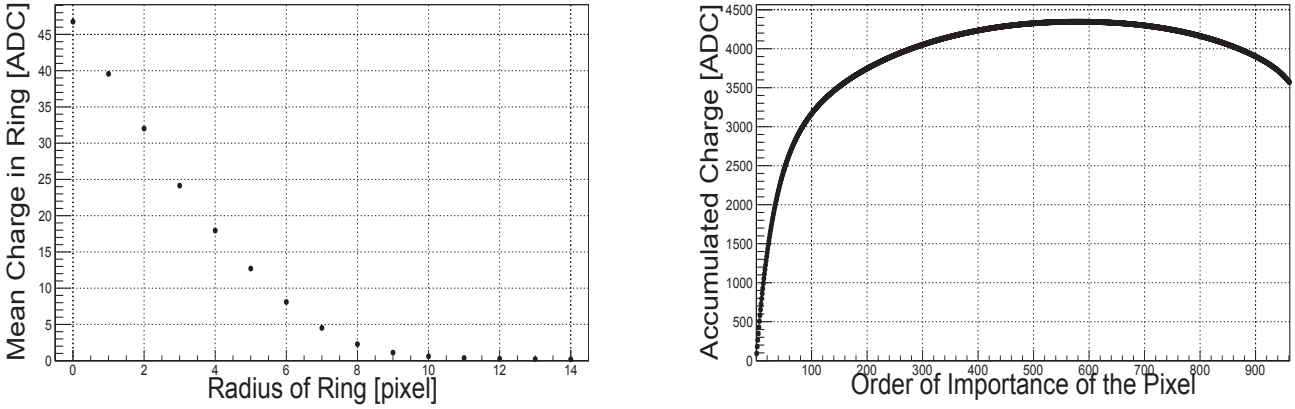


(a) (b)

FIGURE 2.12 – 20 000 images dans le noir, 3 kV, 125 fps, 400×400 pixels. (a) Distribution moyenne de la charge d'un retour ionique dont le pixel le plus brillant est centré. (b) Distribution moyenne du nombre de retours ioniques détectés par image pendant l'acquisition.

Le nombre moyen de retours ioniques par image est de l'ordre de 0.3 événements par image, ce qui est équivalent à moins de 5 Hz/mm^2.

La Fig. 2.13a montre la charge moyenne contenue dans les couronnes successives autour du pixel central. La Fig. 2.13b montre l'évolution de la charge moyenne des pixels de Q_{31} classés par importance du pixel.



(a) (b)

FIGURE 2.13 – Charge déposée dans les pixels par un événement de retour ionique. (a) Charge moyenne collectée dans les couronnes successives centrées sur le pixel le plus brillant. (b) Évolution de la charge sommée moyenne des pixels classés dans leur ordre d'importance.

Nous utilisons la méthode développée pour le photo-électron pour mettre en évidence le nombre de pixels contenant l'information de la charge déposée par impact. Pour un retour ionique, l'information est contenue dans moins de 100 pixels, 5 fois plus que pour le photo-électron. Le résultat est identique en utilisant la méthode de la charge moyenne contenue dans les couronnes successives autour du pixel central. Le signal reste significatif jusqu'à la 7^e couronne, contre la 2^e pour le photo-électron.

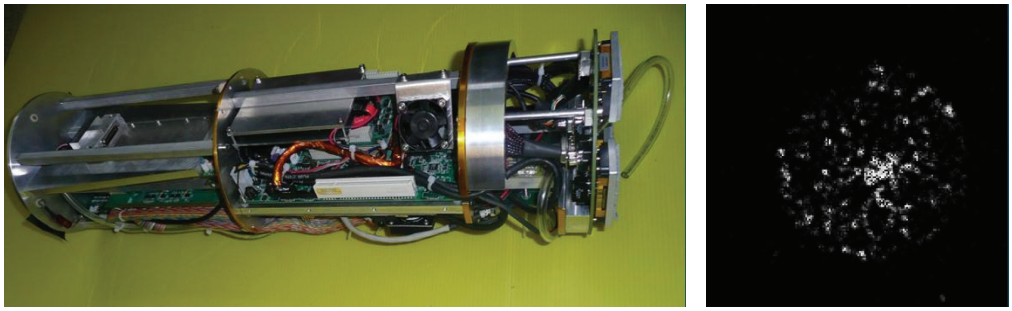
Les retours ioniques ont une forme similaire à celle des impacts photo-électrons, avec un pixel siège maximum local. Ainsi, les retours ioniques sont aussi détectés par la méthode des clusters. Afin de les supprimer, une coupure est effectuée sur la charge du cluster. Lorsque les sources observées ont un signal important, du même ordre de grandeur que certains des retours ioniques, la dimension temporelle est utilisée pour éliminer ces derniers.

Comme les retours ioniques ont une distribution spatiale plate sur le capteur et que leur probabilité d'apparition est faible, il est très peu probable que deux retours ioniques impactent la même zone sur deux ou trois images consécutives. Ainsi, à chaque image, une liste annexe à la liste des photons est formée, celle des retours ioniques potentiels. Cette liste est comparée aux listes précédentes afin de confirmer ou d'infirmer la présence d'un signal fort. Dans le cas d'une visualisation de l'image, les valeurs des pixels touchés par le retour ionique sont remplacées par celles de l'image précédente.

2.3 Applications de la méthode des clusters

La méthode des clusters est utilisée dans de nombreuses applications de la caméra ebCMOS. Elle a été utilisée dans les mesures off-line de spots sur banc de test et dans des expériences de suivi de nanocristaux pour la mesure de coefficients de diffusion.

Elle a été implémentée dans le projet luSEApher, une caméra ebCMOS avec une photocathode S20 placée au fond de la mer à 2 500 mètres de profondeur sur le site du projet Antarès pour mesurer la bioluminescence [27]. La Fig. 2.14a montre une image de l'ensemble du système embarqué LuSEApher. La Fig. 2.14b montre une image intégrée sur 200 images d'un événement de bioluminescence.



(a) (b)

FIGURE 2.14 – (a) Photographie du montage embarqué LuSEApher. (b) Image intégrée sur 200 images d'un événement de bioluminescence à 62.5 fps et 2.8 kV.

L'utilisation de la méthode de détection des photons a deux avantages :

- **Bande passante :** le débit de connexion est trop faible pour permettre la lecture en continu des images par un serveur sur terre ou le stockage sur disque dans le système embarqué (62.5 fps et 400×400 pixels équivalents à 600 MB/min). Une image de photons détectés (position et charge) est beaucoup plus légère.
- **Déclenchement :** la détection de bioluminescence se fait si une image compte plus de 14 photons détectés. Cela permet un filtrage du bruit de fond, tout en gardant une très bonne sensibilité.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons vu la méthode de détection des photons mise en place pour la caméra ebCMOS. Cette méthode permet une réduction de l'influence du bruit de fond, comme pour l'emCCD mais présente l'avantage d'avoir une efficacité de sélection supérieure à 95 % alors qu'elle est de l'ordre de 50 % pour l'emCCD.

Le bruit émis par la photo-cathode est très faible et ne dépend pas de la cadence de lecture. Il n'y a donc aucun compromis à faire entre la pureté du signal et la vitesse de lecture. La méthode des clusters permet aussi de filtrer facilement les retours ioniques.

La détection du photon présente aussi l'avantage de résoudre la position de l'impact à l'intérieur du pixel, diminuant théoriquement la taille des pixels et donc permettant un meilleur échantillonnage de la PSF. La méthode permet aussi d'éliminer le biais provenant de la reconstruction à partir des centres des pixels.

La connaissance de la position intra-pixel est un avantage à très bas niveau de lumière, lorsque le nombre de photons permettant d'échantillonner la PSF est très faible.

La linéarité du processus d'amplification de l'ebCMOS permet un comptage du nombre de photons incidents alors que le gain stochastique de l'emCCD présente une très faible résolution de comptage.

Nous nous intéresserons dans la partie suivante à la limite de Cramér-Rao des détecteurs sCMOS, emCCD et ebCMOS.

Bibliographie

[1] J.S. Lapington and T. Conneely. Multi-channel picosecond photon timing with microchannel plate detectors. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 648, Supplement 1(0) :S186 – S189, 2011. 14

[2] X Michalet, O H W Siegmund, J V Vallerga, P Jelinsky, J E Millaud, and S Weiss. Photon Counting H33D Detector for Biological Fluorescence Imaging. *Nucl Instrum Methods Phys Res A*, 567(1) :133, 2006. 14

[3] X Michalet, R a Colyer, J Antelman, O H W Siegmund, a Tremsin, J V Vallerga, and S Weiss. Single-quantum dot imaging with a photon counting camera. *Current pharmaceutical biotechnology*, 10(5) :543–58, August 2009. 14

[4] Jelena Ninkovic, Ladislav Andricek, Christian Jendrisyk, Gerhard Liemann, Gerhard Lutz, Hans-Gunther Moser, Rainer Richter, and Florian Schopper. The first measurements on sipms with bulk integrated quench resistors. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 628(1) :407 – 410, 2011. 14

[5] T. Frach, G. Prescher, C. Degenhardt, R. de Gruyter, A. Schmitz, and R. Ballizany. The digital silicon photomultiplier : Principle of operation and intrinsic detector performance. In *Nuclear Science Symposium Conference Record (NSS/MIC), 2009 IEEE*, pages 1959 –1965, 2009. 14

[6] Atsumu Suzuki, Shigeki Aoki, Junji Haba, Makoto Sakuda, and Motohiro Suyama. Novel large aperture ebccd. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 628(1) :260 – 263, 2011. 14

[7] Pierre Magnan. Detection of visible photons in ccd and cmos : A comparative view. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 504(13) :199 – 212, 2003. Proceedings of the 3rd International Conference on New Developments in Photodetection. 14

[8] Fowler B Coates C and Holst G. sCMOS Scientific CMOS Technology A High-Performance Imaging Breakthrough. *White Paper*, 2009. 14

[9] B. Fowler, C. Liu, S. Mims, J. Balicki, W. Li, H. Do, and P. Vu. Low-light-level CMOS image sensor for digitally fused night vision systems. In *Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Conference Series*, volume 7298 of *Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Conference Series*, May 2009. 14

[10] M.S. Robbins and B.J. Hadwen. The noise performance of electron multiplying charge-coupled devices. *Electron Devices, IEEE Transactions on*, 50(5) :1227 – 1232, may 2003. 14

[11] R. Barbier, T. Cajgfinger, P. Calabria, E. Chabanat, D. Chaize, P. Depasse, Q.T. Doan, A. Dominjon, C. Guérin, J. Houles, L. Vagneron, J. Baudot, A. Dorokhov, W. Dulinski, M. Winter, and C.T. Kaiser. A single-photon sensitive ebcmos camera : The lusipher prototype. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 648(1) :266 – 274, 2011. 14, 46, 52

[12] Ibrahima Djité. *Analyse et modélisation de la collection de charges dans les capteurs d'images CCD et CMOS : Application à l'évaluation de la Fonction de Transfert de Modulation et de l'efficacité de collection*. 2011. 16

[13] G.C. Holst and T.S. Lomheim. *CMOS/CCD Sensors and Camera Systems*. SPIE PM. JCD Publishing, 2007. 18, 19, 25

[14] C.A. Haniff A.G. Basden and C.D. Mackay. Photon counting strategies with low light level ccds. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 2003. 23

[15] J.N. Hollenhorst. A theory of multiplication noise. *Electron Devices, IEEE Transactions on*, 37(3) :781 –788, mar 1990. 25

[16] HAMAMATSU. *Photomultiplier Tubes : Basics and Applications. Third Edition*. 2006. 26

[17] Edward H. Eberhardt. Image transfer properties of proximity focused image tubes. *Appl. Opt.*, 16(8) :2127–2133, Aug 1977. 28

[18] U. Fano. Ionization Yield of Radiations. II. The Fluctuations of the Number of Ions. *Physical Review*, 72 :26–29, July 1947. 30

[19] C. d'Ambrosio and H. Leutz. Photoelectron backscattering from silicon anodes of hybrid photodetector tubes. *Nuclear Science, IEEE Transactions on*, 47(4) :1685 –1690, aug 2000. 31

[20] Olivier Daigle, Jean-Luc Gach, Christian Guillaume, Simon Lessard, Claude Carignan and Sébastien Blais-Ouellette. CCCP : A CCD Controller for Counting Photons. *arXiv*, 2008. 41

[21] Q. T. Doan, R. Barbier, A. Dominjon, T. Cajgfinger, and C. Guerin. Multiple-target tracking implementation in the ebCMOS camera system : the LUSIPHER prototype. In *Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Conference Series*, volume 8436 of *Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Conference Series*, May 2012. 44

[22] E. Belau, R. Klanner, G. Lutz, E. Neugebauer, H. Seebrunner, A. Wylie, T. Bohringer, L. Hubbeling, P. Weilhammer, and J. Kemmer. Charge collection in silicon strip detectors. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 214 :253–260, September 1983. 55

[23] Gregorio Landi. Properties of the center of gravity as an algorithm for position measurements. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 485(3) :698 – 719, 2002. 62

[24] G. Landi. Properties of the center of gravity as an algorithm for position measurements : two-dimensional geometry. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, 497 :511–534, February 2003. 62

[25] Gregorio Landi. Problems of position reconstruction in silicon microstrip detectors. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 554(13) :226 – 246, 2005. 62

[26] R. Barbier, J. Baudot, E. Chabanat, P. Depasse, W. Dulinski, N. Estre, C. T. Kaiser, N. Laurent, and M. Winter. Performance study of a MegaPixel single photon position sensitive photodetector EBCMOS. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, 610 :54–56, October 2009. 67

[27] A. Dominjon, M. Ageron, R. Barbier, M. Billault, J. Brunner, T. Cajgfinger, P. Calabria, E. Chabanat, D. Chaize, Q.T. Doan, C. Guérin, J. Houlès, and L. Vagneron. An ebcmos camera system for marine bioluminescence observation : The luseapher prototype. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 2011. 69

Deuxième partie

Calculs et mesures de limites de localisation sur la position de sources ponctuelles

Table des matières

3 Calculs de précision de localisation de sources ponctuelles immobiles : la borne inférieure de Cramér-Rao 79

3.1 Réponse impulsionnelle du système optique 79

3.2 Limite de Cramér-Rao et modélisation de l'information recueillie par les détecteurs 82

3.2.1 Énoncé du théorème 82

3.2.2 Méthode, paramètres, variables et distributions 84

3.3 Détecteur de position de photons 85

3.3.1 Émission de la source 85

3.3.2 Modélisation de la réponse impulsionnelle du système de détection . 85

3.3.3 Modélisation de l'ebCMOS en mode comptage 86

3.4 Modélisation d'un détecteur pixelisé 86

3.4.1 Pixelisation 87

3.4.2 Collection de charges 87

3.4.3 Bruit de lecture 88

3.4.4 Amplification des électrons secondaires 88

3.5 Calcul des limites de précision de localisation 90

3.5.1 Matrice d'information dans le cas du détecteur parfait 90

3.5.2 Dérivées des fonctions de vraisemblance utilisées dans le calcul de la limite de Cramér-Rao 91

3.5.3 Implémentation numérique 92

3.6 Étude de paramètres significatifs sur la précision de localisation dans des conditions extrêmes de luminosité 93

3.6.1 Paramètres généraux 93

3.6.2 Limites d'échantillonnage 93

3.6.3 Influence des bruits et de l'amplification des charges primaires . . . 96

Conclusion 105

4 Mesures expérimentales de précision de localisation 106

4.1 Principe et calibration de l'expérience de focalisation d'un point source contrôlé 106

4.1.1 Calibration du signal délivré par la source 107

4.1.2 Calibration spatiale 108

4.1.3 Signal reçu et quantification de l'efficacité quantique relative entre l'emCCD et l'ebCMOS 112

4.1.4 Méthode de calcul de la précision de localisation sur la position estimée . . . 114
4.1.5 Méthode de calcul de l'efficacité et du taux de faux . . . 115
4.2 Comparaison des caméras ebCMOS, sCMOS et emCCD . . . 115
4.2.1 Efficacité et taux de faux . . . 115
4.2.2 Précision de localisation du point source . . . 117
4.3 Mesure de l'effet du bruit de fond sur la précision de localisation . . . 122
4.3.1 Calibration du point source . . . 122
4.3.2 Génération et contrôle du bruit de fond . . . 123
4.3.3 Mesures de précision de localisation, d'efficacité et de taux de faux . 124
4.4 Étude du cas de points sources multiples formés par une matrice de micro-lentilles . . . 125
4.4.1 Description du système . . . 125
4.4.2 Mesure des bruits et calibration des points sources . . . 126
4.4.3 Précision de localisation, efficacité et pureté en fonction du signal . 129

Conclusion **131**

Bibliographie **132**

Dans cette partie, nous nous intéressons à la précision de localisation de la position d'une source fixe, selon le signal et les bruits, pour les différentes caméras étudiées.

Dans le premier chapitre, nous étudions la limite inférieure de Cramer Rao, un outil statistique qui donne la précision de localisation théorique minimale d'un estimateur. Ce travail a été tout d'abord réalisé pour les caméras CCD par Ober *et al.* [1] en utilisant le modèle développé par Snyder *et al.*[2].

Dans l'article d'Ober *et al.*, les limites de précision de localisation sur la position d'une source sont calculées pour plusieurs paramètres (grandissement, taille des pixels, position de la source, bruit de lecture, ...). La modélisation de la PSF optique utilisée est principalement une fonction de Bessel alors que nous utiliserons une fonction gaussienne, afin de pouvoir ajouter simplement les différentes PSF des capteurs sCMOS et ebCMOS.

La valeur du signal moyen par pixel est définie comme une distribution de Poisson dont la moyenne correspond au signal moyen de la source multiplié par la portion de PSF échantillonnée par le pixel. Nous utiliserons une modélisation globale de la source avec pour chaque pixel une loi binomiale. Les résultats sont identiques mais permettent une adaptation au cas de l'ebCMOS où la position du photon à l'intérieur du pixel présente une importance, contrairement au cas des détecteurs sCMOS et emCCD.

Cet outil a été développé ensuite pour les capteurs emCCD encore par Ober *et al.* [3] en 2012. Le travail décrit dans ce chapitre est concomitant à celui de cette publication. De plus, le gain électronique de l'emCCD utilisée par Ober *et al.* est modélisé par une modélisation géométrique de la probabilité de générer un électron supplémentaire. Nous utiliserons une multiplication de type Bernouilli décrite par Basden *et al.* [4].

L'intérêt de cette approche théorique est son indépendance vis à vis de la méthode de suivi de sources, ainsi que la possibilité d'étudier les effets de certains paramètres physiques (grandissement, taille de pixel, ...). Elle permet aussi de comparer les détecteurs pour des conditions rigoureusement identiques. Cette méthode a été appliquée par exemple dans la conception d'interféromètres [5] ou pour la mesure de l'influence des propriétés du signal sur la précision de localisation [6].

Cette approche théorique est ensuite comparée à une analyse sur bancs de tests, ainsi qu'à des données simulées, dans le deuxième chapitre. L'expérience consiste à focaliser un ou plusieurs points sources lumineux dont la position, la taille et le signal sont contrôlés, puis de mesurer la précision de localisation des caméras pour différents paramètres (gain, position du point source, signal, bruit de fond,...).

Chapitre 3

Calculs de précision de localisation de sources ponctuelles immobiles : la borne inférieure de Cramér-Rao

Dans ce chapitre, nous nous intéressons à la modélisation de la chaîne de détection du photon, de l'émission par la source, puis la focalisation à travers le système optique et le système de caméra jusqu'à l'image pixellisée. Pour chaque étape, il faut déterminer la distribution de probabilité des phénomènes stochastiques modélisant le processus de détection.

Tout d'abord, les parties 3.1 et 3.2 décrivent la limite de Cramér-Rao ainsi que les hypothèses générales utilisées. Ensuite, les parties 3.3, 3.4 et 3.5 présentent la modélisation des distributions de probabilités utilisées pour le calcul dans le cas de détecteurs à comptage de photons et de détecteurs pixellisés, ainsi que de l'implémentation numérique du calcul de Cramér-Rao. Enfin, la partie 3.6 présente les études effectuées pour les différents détecteurs, ainsi que leur comparaison à bas niveau de lumière.

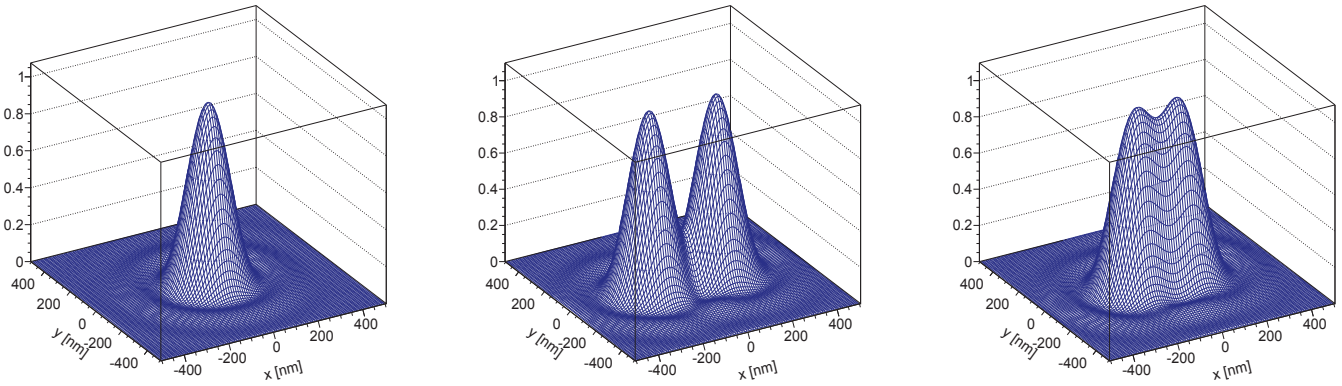
3.1 Réponse impulsionnelle du système optique

L'observation par microscope d'un point source entraîne la diffraction de la lumière résultant en une tache d'Airy ou PSF (*Point Spread Function* ou fonction d'étalement du point). L'intensité I de la tache d'Airy est déterminée dans le cas parfait par :

$$I(\theta) = I_0 \left(\frac{2J_1(ka \sin\theta)}{ka \sin\theta} \right)^2 \tag{3.1}$$

avec θ l'angle d'observation, J_1 la fonction de Bessel de première espèce du premier ordre, k le nombre d'onde et a l'ouverture numérique.

Pour mesurer la position du point source, la PSF est échantillonée. Pour deux sources proches, les PSF se superposent. Le premier zéro de la tache d'Airy nous donne une bonne échelle pour déterminer la distance minimale nécessaire à la séparation de deux sources proches. Le schéma de la Fig. 3.1 permet de comprendre ce point. Si les sources sont suffisamment éloignées, elle peuvent être échantillonnées individuellement (a). Plus elles se rapprochent, plus il devient difficile de mesurer les maxima locaux (b), surtout lorsque le signal est faible, jusqu'au point où il faut un très grand nombre de photons pour pouvoir séparer les deux pics (c).



(a) (b) (c)

FIGURE 3.1 – Distribution de probabilité spatiale de la PSF optique 2D, longueur d'onde $\lambda = 520$ nm, Ouverture Numérique O.N.= 1.4. (a) Pour des sources isolées, une déconvolution permet une bonne mesure du centre d'émission de la source. (b) Pour deux sources distantes de $d = 300$ nm, la reconstruction des centres d'émission devient bruitée par le chevauchement des PSF. (c) Pour deux sources distantes de $d = 200$ nm, les deux sources sont plus difficilement distinguables.

Le premier zéro de la fonction de Bessel $J_1(x)$ se trouve à $x = 3.8317$. Cela nous donne pour la tache d'Airy, l'approximation :

$$\sin\theta \approx 1.22\frac{\lambda}{2a} \tag{3.2}$$

Ce zéro nous permet de quantifier la valeur de la distance minimale R_A entre deux sources discernables, qui détermine le pouvoir de séparation de deux objets proches par le système optique :

$$R_A \approx \frac{1.22\lambda}{2 \text{ O.N.}} = 227 \text{ nm} \tag{3.3}$$

avec λ =520 nm et O.N.=1.4.

Nous ne nous intéresserons pas à cet effet dans ce chapitre, qui se focalise sur la précision de localisation de la position de particules uniques selon les détecteurs. En effet, la précision de localisation de la position de la source ne dépend pas de ce critère lorsque la source est unique localement, hypothèse utilisée dans tous les calculs suivants. Ober *et al.* [3] a récemment quantifié l'effet de deux sources proches sur la précision de localisation.

Dans l'hypothèse de sources uniques, la précision de localisation de la position de la source ne dépend plus que de la déconvolution de la PSF optique, donc de la qualité de l'information sur les positions des photons ainsi que des bruits de mesure. Ceci est vrai dans l'approximation où la source est ponctuelle et immobile par rapport à la PSF optique. Dans le cas contraire, il faut reconstruire la convolution des centres émetteurs de la source avec la PSF optique.

Dans la suite, les sources seront supposées ponctuelles pour plus de généralité. De plus, la PSF optique sera approximée par une fonction gaussienne. La forme de ces deux distributions est semblable, et l'écart entre ces deux courbes est relativement faible, comme le montre la Fig. 3.2.

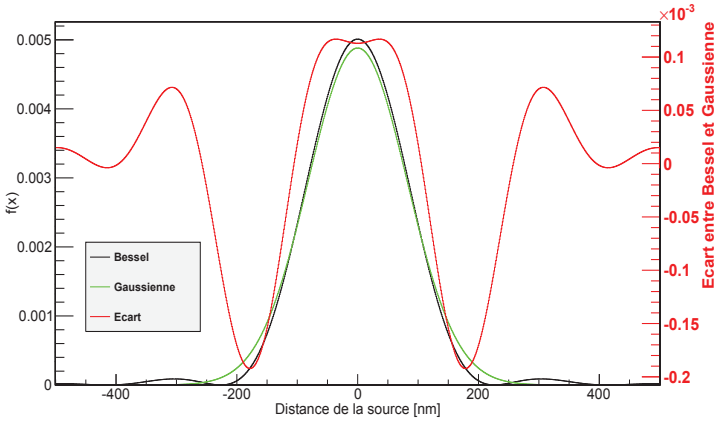


FIGURE 3.2 – Distribution de probabilité d'une fonction de Bessel J_1 (noir) pour $\lambda = 520$ nm et une ouverture numérique O.N.$= 1.4$ et d'une fonction gaussienne d'écart-type $\sigma = 81.73$ nm (vert). La différence entre les deux distributions est donnée en rouge.

L'écart entre les deux distributions est inférieur à 2 % dans la zone contenant 95 % de la charge, permettant une très bonne approximation de la PSF optique. Cette approximation très répandue permet la simplification des calculs théoriques.

Aberrations optiques

Les aberrations optiques sont des déformations entre l'image reçue et l'image parfaite d'un objet. Elles peuvent être classées en deux catégories :

- Les aberrations monochromatiques ou géométriques dépendent de la réflexion et de la réfraction de la lumière sur la géométrique des lentilles du microscope.
- Les aberrations chromatiques sont liées à la dispersion de la lumière qui lie l'indice de réfraction d'une lentille à la longueur d'onde. Ces aberrations n'apparaissent pas en lumière monochromatique.

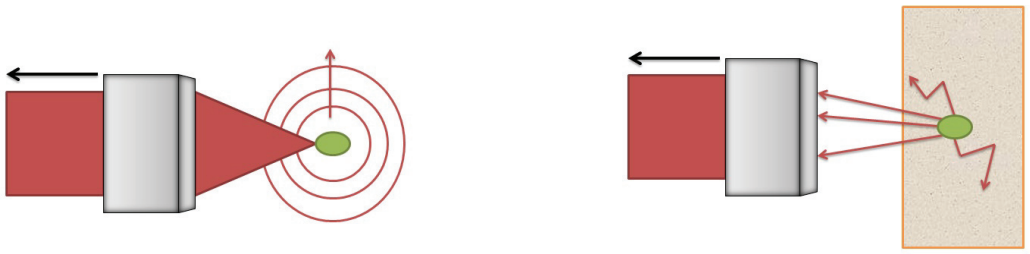
Ces aberrations sont des corrections d'ordres supérieurs à la PSF, elles ne seront pas prises en compte dans la modélisation de la chaîne de détection des photons.

Efficacité de collection de photons issus de la source

Un photon issu de la source est un photon émis ou diffusé par l'objet observé. Ces photons ne parviennent pas tous jusqu'au détecteur. Il faut prendre en compte l'efficacité de collection des photons issus de la source, qui est définie comme le rapport entre le nombre de photons issus de la source et le nombre qui atteignent le détecteur.

La perte d'efficacité de collection résulte de deux processus distincts :

1. La géométrie de l'émission et la surface finie du détecteur sont responsables d'une perte d'efficacité. Pour une trajectoire balistique des photons, seuls ceux émis dans le cône issu de la source en direction du microscope sont captés, comme le montre la Fig. 3.3a. L'efficacité de collection du microscope est ici le rapport entre la surface de détection du microscope et l'angle solide de détection. Pour calculer l'efficacité globale, il faut prendre en compte l'efficacité du détecteur par rapport au microscope.
2. La diffusion des photons dans le milieu observé est responsable d'une baisse de l'efficacité de collection. Comme le montre le schéma de la Fig. 3.3b, les photons peuvent diffuser ou être stoppés par les molécules présentes dans le milieu.



(a) (b)

FIGURE 3.3 – (a) Schéma de l'efficacité de collection géométrique du microscope. La source émet généralement des photons dans toutes les directions. Seuls les photons dans un certain angle solide parviennent jusqu'au capteur. (b) Schéma de la perte de photons issus de la source par diffusion dans le milieu. Les photons peuvent interagir avec le milieu dans lequel la source est contenue avant d'arriver jusqu'au capteur.

Le système optique est identique pour les trois détecteurs. Nous utiliserons donc directement le nombre de photons bombardant chaque capteur.

La distribution d'émission de photons par unité de temps des sources sera supposée indépendante des processus de perte d'efficacité de collection de photons décrits précédemment.

3.2 Limite de Cramér-Rao et modélisation de l'information recueillie par les détecteurs

3.2.1 Énoncé du théorème

Soit X une variable aléatoire réelle, obtenue par échantillonnage d'une fonction de densité de probabilité (f.d.p.) $f(x;\boldsymbol{\theta})$ dépendante de l'ensemble de paramètres $\boldsymbol{\theta}$. Soit $\mathbf{x}$ un ensemble de n observations indépendantes de X.

La borne inférieure de Cramér-Rao [7] exprime la limite inférieure de la variance d'un estimateur en fonction de l'information de Fisher $I(\theta)$.

Soit $\hat{\theta}$ un estimateur de θ ayant un biais $b_n(\hat{\theta}) = \mathbb{E}\left[\hat{\theta}\right] - \theta$ vérifiant les conditions suivantes :

1. Sa variance $V(\hat{\theta})$ est finie.
2. Le domaine de définition de X ne dépend pas de θ.

Une borne inférieure à sa variance est définie telle que :

$$V(\hat{\theta}) = \sigma^2(\hat{\theta}) \geq \frac{\left[1 + \frac{1}{\partial\theta} b_n(\hat{\theta})\right]}{I(\theta)} \tag{3.4}$$

Aucun estimateur ne peut avoir une variance plus faible. Cette borne inférieure diminue quand I augmente, ce qui est cohérent avec la troisième règle de l'information de Fisher [8]. Ce résultat se généralise pour n paramètres et le résultat dans le cas d'un estimateur sans biais est :

$$\sigma^2(\hat{\theta}_i) \geq \left[\mathbf{I}^{-1}(\boldsymbol{\theta})\right]_{ii} \tag{3.5}$$

Pour la suite nous allons utiliser un estimateur sur la position $(x_\mathrm{s}, y_\mathrm{s})$ de la source et ainsi obtenir la précision de localisation minimale $(\sigma_{x_\mathrm{s}}, \sigma_{y_\mathrm{s}})$ sur la localisation du point source.

Fonction de vraisemblance

La fonction de vraisemblance (*likelihood function*) d'un modèle statistique mesure l'adéquation entre un échantillon aléatoire et une loi de probabilité en fonction d'un ensemble de paramètres $\boldsymbol{\theta}$.

La fonction de densité de probabilité jointe des x_i s'écrit :

$$\mathcal{L}(\mathbf{x}; \boldsymbol{\theta}) = \mathcal{L}(x_1, x_2, ..., x_n; \boldsymbol{\theta}) = \prod_{i=1}^{n} f(x_i, \boldsymbol{\theta}) \tag{3.6}$$

La fonction $\mathcal{L}$ dépend des mesures x_i et des paramètres $\boldsymbol{\theta}$. Pour des x_i fixés, la fonction ne dépend que des paramètres $\boldsymbol{\theta}$ et s'appelle fonction de vraisemblance.

Information de Fisher

La notion d'information proposée par R.A. Fisher propose de quantifier l'information disponible sur des paramètres $\boldsymbol{\theta}$ pouvant être extraite d'un échantillon $\mathbf{x}$ qui dépend de $\boldsymbol{\theta}$. L'information de Fisher obéit à trois règles :

1. L'information augmente avec le nombre d'observations.
2. Les données qui sont indépendantes des paramètres observés ne contiennent pas d'information relative à ces paramètres.
3. La précision de l'estimation des paramètres observés augmente avec l'information.

L'information de Fisher se définit en utilisant la fonction de vraisemblance $\mathcal{L}$ du système ($\mathbf{x}$,$\boldsymbol{\theta}$) suivant les équations suivantes, dans le cas d'un paramètre unique :

$$I_\mathbf{x}(\theta) = \mathbb{E}\left[\left(\frac{\partial \ln\, \mathcal{L}(\mathbf{x}, \theta)}{\partial\theta}\right)^2\right] = \int_{\Omega_\theta} \left(\frac{\partial \ln\, \mathcal{L}(\mathbf{x}, \theta)}{\partial\theta}\right)^2 \mathcal{L}(\mathbf{x}, \theta) d\mathbf{x} \tag{3.7}$$

avec $\mathbb{E}[...]$ qui définit la valeur attendue et Ω_θ l'ensemble des valeurs possibles de X.

Cette équation se généralise dans le cas de n paramètres où l'information est alors une matrice $n \times n$:

$$[\mathbf{I}_{\mathbf{x}}(\boldsymbol{\theta})]_{ij} = \mathbb{E}\left[\left(\frac{\partial \ln\, \mathcal{L}(\mathbf{x}, \boldsymbol{\theta})}{\partial \theta_i} \frac{\partial \ln\, \mathcal{L}(\mathbf{x}, \boldsymbol{\theta})}{\partial \theta_j}\right)\right] \tag{3.8}$$

Nous nous intéressons aux deux paramètres $x_{\mathrm{S}}, y_{\mathrm{S}}$. L'équation 3.8 contient alors une matrice 2×2.

3.2.2 Méthode, paramètres, variables et distributions

Afin de calculer la limite de Cramér-Rao, il est nécessaire de modéliser la distribution de probabilité de sortie de la matrice de pixels du détecteur. Pour cela il faut retracer le parcours des photons issus de la source, auxquels se joignent les photons de bruit, à travers l'optique puis à travers le détecteur. Nous nous intéressons ensuite à la création d'électrons secondaires et à leur cheminement jusqu'aux pixels où ils pourront être amplifiés puis seront mesurés avec une erreur.

La Fig. 3.4 schématise ce parcours de la source jusqu'à la sortie du pixel pour chaque type de détection : sCMOS (bleu), emCCD (rouge) et ebCMOS (vert). Les distributions de probabilité de chaque étape sont données en correspondance.

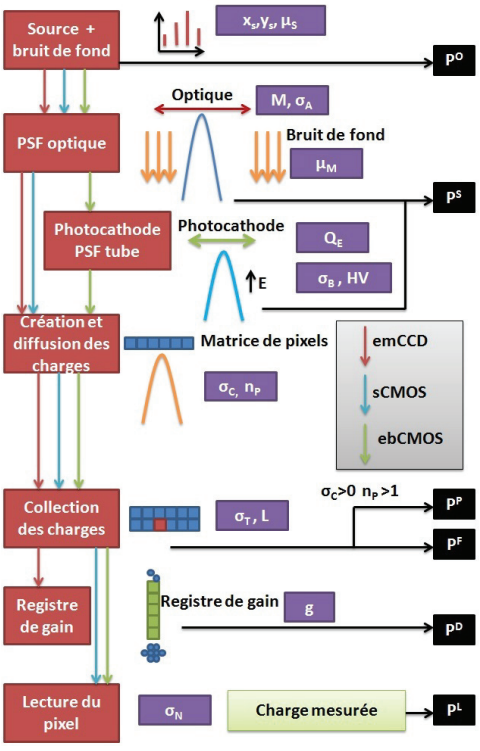


FIGURE 3.4 – Paramètres et distributions principales utilisées dans l'analyse de Cramér-Rao.

- $[x_{\mathrm{S}}, y_{\mathrm{S}}]$: position de la source émettrice.
- μ_{S} : signal moyen de la source en photons par image.
- P^{O} : distribution du nombre de photons reçus.
- σ^2_{A} : variance de la PSF optique.
- μ_{M} : signal moyen du courant d'obscurité et du bruit de fond par image.
- σ^2_{B} : variance de la PSF des électrons dans le tube à vide.
- P^{S} : distribution spatiale de l'impact des photons ou des photo-électrons.
- S : surface sensible totale du détecteur.
- σ^2_{C} : variance de la fonction de diffusion des charges secondaires dans le silicium.
- n_{P} : nombre moyen de paires électrons-trous créées à l'impact d'un photo-électron dans le silicium.
- P^{F} : distribution du nombre d'électrons secondaires accumulés dans le pixel k.
- P^{P} : distribution du nombre d'électrons secondaires accumulés dans le pixel k diffusant depuis la position $(x_{\mathrm{P}}, y_{\mathrm{P}})$ d'un impact photo-électron.
- g : amplification moyenne du registre de gain emCCD.
- P^{D} : distribution du gain emCCD.
- σ^2_{N} : variance du bruit de lecture du pixel k.
- P^{L} : distribution du nombre d'électrons lus par le pixel k.

Avant de s'intéresser aux détecteurs pixélisés, nous verrons en premier lieu le cas du détecteur parfait avec et sans bruit et le cas de la détection en photons de l'ebCMOS. La détection en photons de l'emCCD n'est pas prise en compte ici car elle ne permet pas

d'obtenir une position du photon mais uniquement le pixel dans lequel il est tombé. Pour modéliser cette détection, il suffit d'utiliser la méthode du détecteur pixélisé sans bruit de lecture en ajoutant une efficacité de détection du photon et la possibilité d'un comptage.

3.3 Détecteur de position de photons

Le détecteur parfait permet de mesurer la position exacte des photons incidents sans bruit de lecture. Dans un premier temps, le cas sans bruit de fond sera étudié.

3.3.1 Émission de la source

L'émission de photons par la source est modélisée par une distribution de Poisson. Les paramètres de cette distribution sont :

- μ_{S} : le nombre moyen de photons émis par la source reçus sur le détecteur pour une image. Ce nombre s'obtient en utilisant le signal moyen de la source et l'efficacité géométrique du détecteur. Cette étape n'est pas nécessaire explicitement pour la comparaison des détecteurs le système optique est supposé identique.
- η_{QE} : l'efficacité quantique du détecteur. Elle dépend de la longueur d'onde des photons incidents. La longueur d'onde sera supposée optimale pour chacun des détecteurs.
- Le signal reçu moyen est le produit de ces deux facteurs :

$$\mu_{\text{R}} = \mu_{\text{S}} \times \eta_{\text{E}} \tag{3.9}$$

Nous nous intéressons alors à la probabilité P^{O} que n_{R} photo-électrons impactent le plan de l'imageur :

$$P^{\text{O}}(n_{\text{R}}; \boldsymbol{\theta}) = \frac{\mu_{\text{R}}^{n_{\text{R}}} e^{-\mu_{\text{R}}}}{n_{\text{R}}!} \tag{3.10}$$

3.3.2 Modélisation de la réponse impulsionnelle du système de détection

Les photons issus de la source sont focalisés sur le détecteur par un système optique qui étale les photons. Cet étalement est modélisé par une distribution gaussienne dont les paramètres sont :

- $x_{\text{S}}, y_{\text{S}}$: la position de la source par rapport au centre du détecteur.
- σ_{T} : l'écart-type de la PSF du détecteur. Pour un détecteur sans diffusion des charges entre les pixels, la PSF totale du détecteur est la PSF optique :

$$\sigma_{\text{T}} = \sigma_{\text{A}} \tag{3.11}$$

  Dans le cas d'une diffusion des charges par le détecteur, comme c'est le cas pour les photo-électrons dans le tube à vide de l'ebCMOS, il faut ajouter quadratiquement la PSF du tube à vide. La somme de deux distributions gaussiennes donne une distribution gaussienne. La moyenne est la somme des moyennes des PSF et la variance devient :

$$\sigma_{\text{T}}^2 = \sigma_{\text{A}}^2 + \sigma_{\text{B}}^2 \tag{3.12}$$

La probabilité qu'un photon issu de la source traversant le système optique impacte le détecteur à la position (x, y) est donnée par la probabilité $P^{\text{S}}(x, y; \boldsymbol{\theta})$:

$$P^{\text{S}}(x, y; \boldsymbol{\theta}) = \mathcal{N}(x, y; x_{\text{S}}, y_{\text{S}}, \sigma_{\text{T}}) = \frac{1}{2\pi\sigma_{\text{T}}^2} e^{-\frac{(x-x_{\text{S}})^2+(y-y_{\text{S}})^2}{2\sigma_{\text{T}}^2}} \tag{3.13}$$

3.3.3 Modélisation de l'ebCMOS en mode comptage

L'ebCMOS permet une détection des photo-électrons incidents et de mesurer leurs positions intra-pixel par centre de gravité de la charge collectée. Comme cette détection n'est pas parfaite et que l'ebCMOS possède un courant d'obscurité de photo-cathode, il faut modifier la distribution trouvée pour le détecteur parfait. Pour cela il faut prendre en compte :

- **Le courant d'obscurité de la photo-cathode.** Le détecteur de surface S est soumis en plus à un courant d'obscurité moyen de μ_{M} électrons par image, qui sont indissociables des vrais photo-électrons provenant de la source. Pour calculer la distribution de probabilité P^{T} qu'un photo-électron impacte le capteur à la position (x, y) il faut prendre en compte ses deux origines possibles, la source ou le courant d'obscurité.
- **La précision de la mesure.** L'erreur sur la position mesurée du photo-électron est modélisée par une fonction gaussienne d'écart-type σ_{D}. Elle s'ajoute à l'ensemble des PSF du détecteur qui modifient la trajectoire du photon. Comme il s'agit de distributions gaussiennes, les variances s'ajoutent. La variance totale est donnée par :

$$\sigma_{\text{T}}^2 = \sigma_{\text{A}}^2 + \sigma_{\text{B}}^2 + \sigma_{\text{D}}^2 \tag{3.14}$$

- **L'efficacité de la mesure.** L'efficacité et la pureté de la détection du photon ne sont pas de 100 %. Pour prendre en compte ces effets, il faut multiplier le signal moyen par l'efficacité et ajouter le nombre de faux à la moyenne du courant d'obscurité, comme suit :

$$\mu_{\text{R}} = \mu_{\text{S}} \times \eta_{\text{E}} \times \eta_{\text{P}} \tag{3.15}$$

$$\mu_{\text{B}} = \mu_{\text{M}} + \mu_{\text{P}} \tag{3.16}$$

Chaque photon incident à la position (x, y) a deux origines possibles. Il peut être émis par la source ou il peut s'agir d'un photon de bruit. Le bruit de fond est modélisé selon une distribution plate sur l'ensemble de la surface S du détecteur. La distribution de probabilité résultante est donnée par :

$$P^{\text{T}}(x, y; \boldsymbol{\theta}) = \frac{\mu_{\text{R}}}{\mu_{\text{R}} + \mu_{\text{B}}} P^{\text{S}}(x, y; \boldsymbol{\theta}) + \frac{\mu_{\text{B}}}{\mu_{\text{R}} + \mu_{\text{B}}} \times \frac{1}{S} \tag{3.17}$$

3.4 Modélisation d'un détecteur pixelisé

Nous nous intéressons maintenant à la détection en nombre de charges par pixels. Il faut alors prendre en compte les effets de la pixélisation, de la collection de charges secondaires et du bruit de lecture.

3.4.1 Pixelisation

Pour un détecteur pixelisé, l'information n'est plus la position des photo-électrons incidents mais la charge accumulée dans chaque pixel. Chaque pixel est supposé identique et carré de côté L. La taille de la matrice carrée contenant K pixels étudiée dépend de L. K est sélectionné afin que la PSF du détecteur soit complètement échantillonnée spatialement par la matrice.

La diaphonie entre les pixels est négligée afin de supposer les pixels indépendants. L'information de Fisher totale est la somme de l'information de tous les pixels :

$$\mathbf{I} = \sum_{k=1}^{K} \mathbf{I}_k \tag{3.18}$$

3.4.2 Collection de charges

Les pixels accumulent les charges secondaires générées par les photons. La position du photon sur le détecteur suit la même distribution que l'Eq. 3.13. L'efficacité de collection de charge η_{C} a la même influence que l'efficacité quantique sur le signal :

$$\mu_{\mathrm{R}} = \mu_{\mathrm{S}} \times \eta_{\mathrm{E}} \times \eta_{\mathrm{C}} \tag{3.19}$$

Si l'électron peut diffuser dans la couche épitaxiale avant d'être collecté par un pixel, deux situations se présentent :

1. Il y a une équivalence 1 photon = 1 électron secondaire. Dans ce cas la modélisation précédente est utilisée en modifiant la PSF du détecteur pour inclure la PSF de diffusion :

$$\sigma_{\mathrm{T}}^2 = \sigma_{\mathrm{A}}^2 + \sigma_{\mathrm{C}}^2 \tag{3.20}$$

2. Un photon crée plusieurs électrons secondaires. Dans ce cas les électrons secondaires ne peuvent pas être traités de manière indépendante. Il faut utiliser une autre approche qui sera explicitée dans la partie 3.4.4.

Dans le premier cas, pour trouver la probabilité que e_{S} électrons secondaires soient accumulés par le pixel k, il faut calculer deux distributions intermédiaires.

- La première est la probabilité qu'un électron secondaire soit dans la zone sensible du pixel. Cette probabilité q_k dépend de la position de la source, des PSF successives et des limites du pixel k. Elle est donnée par :

$$q_k(x_{\mathrm{S}}, y_{\mathrm{S}}, \sigma_{\mathrm{T}}) = \iint_k P^{\mathrm{S}}(x, y; \boldsymbol{\theta}) dxdy \tag{3.21}$$

- La seconde est la probabilité que e_{S} électrons secondaires issus des e_{P} photons émis par la source soient collectés dans le pixel. La probabilité précédente $q_k$est implémentée dans une loi binomiale pour obtenir la distribution de probabilité :

$$P_k^{\mathrm{F}}(e_{\mathrm{S}}; e_{\mathrm{P}}, \boldsymbol{\theta}) = \binom{e_{\mathrm{P}}}{e_{\mathrm{S}}} q_k^{e_{\mathrm{S}}}(x_{\mathrm{S}}, y_{\mathrm{S}}, \sigma_{\mathrm{T}})(1 - q_k(x_{\mathrm{S}}, y_{\mathrm{S}}, \sigma_{\mathrm{T}}))^{e_{\mathrm{P}} - e_{\mathrm{S}}} \tag{3.22}$$

La probabilité P_k^{Q} d'obtenir e_{S} électrons secondaires dans le pixel k provenant de la source est issue du produit de convolution de la distribution P_k^{F} donnée par l'Eq. 3.22 avec celle du signal de la source P^{O} donnée par l'Eq. 3.10. Le nombre de photons incidents étant discret, la convolution est limitée à une somme sur le nombre de photons e_{P} :

$$P_k^{\mathrm{Q}}(e_{\mathrm{S}};\boldsymbol{\theta}) = \sum_{e_{\mathrm{P}}=0}^{\infty} P_k^{\mathrm{F}}(e_{\mathrm{S}};e_{\mathrm{P}},\boldsymbol{\theta})P^{\mathrm{O}}(e_{\mathrm{P}}) \tag{3.23}$$

$$= \sum_{e_{\mathrm{P}}=0}^{\infty} \binom{e_{\mathrm{P}}}{e_{\mathrm{S}}} \left(\iint_k \frac{1}{2\pi\sigma_{\mathrm{T}}^2} e^{-\frac{(x-x_{\mathrm{S}})^2+(y-y_{\mathrm{S}})^2}{2\sigma_{\mathrm{T}}^2}} dxdy \right)^{e_{\mathrm{S}}}$$

$$\times \left(1 - \iint_k \frac{1}{2\pi\sigma_{\mathrm{T}}^2} e^{-\frac{(x-x_{\mathrm{S}})^2+(y-y_{\mathrm{S}})^2}{2\sigma_{\mathrm{T}}^2}} dxdy \right)^{e_{\mathrm{P}}-e_{\mathrm{S}}} \frac{\mu_{\mathrm{R}}^{n_{\mathrm{R}}} e^{-\mu_{\mathrm{R}}}}{n_{\mathrm{R}}!} \tag{3.24}$$

Pour prendre en compte le courant d'obscurité ainsi que le bruit de fond, il faut considérer que le nombre d'électrons secondaires e_{S} peut venir soit de la source soit du bruit. Il faut donc faire la convolution de ces deux probabilités pour chaque e_{S}, soit :

$$P_k^{\mathrm{Q}}(e_{\mathrm{S}};\boldsymbol{\theta}) = \sum_{e_{\mathrm{N}}=0}^{e_{\mathrm{S}}} \left(\sum_{e_{\mathrm{P}}=0}^{\infty} P_k^{\mathrm{F}}(e_{\mathrm{S}}-e_{\mathrm{N}};e_{\mathrm{P}},\boldsymbol{\theta})P^{\mathrm{O}}(e_{\mathrm{P}};\mu_{\mathrm{R}}) \right) \times P^{\mathrm{O}}(e_{\mathrm{N}};\mu_{\mathrm{B}}) \tag{3.25}$$

3.4.3 Bruit de lecture

Le bruit de lecture modélise l'erreur sur le nombre d'électrons secondaires mesurés e_{R} par rapport au nombre de charges collectées e_{S} dans le pixel k. Le bruit est modélisé par une distribution gaussienne P^{N} et dépend de l'écart-type σ_{N} donné en électrons :

$$P^{\mathrm{N}}(e_{\mathrm{R}};e_{\mathrm{S}},\boldsymbol{\theta}) = \mathcal{N}(e_{\mathrm{R}};e_{\mathrm{S}},\sigma_{\mathrm{N}}) \tag{3.26}$$

Finalement, la probabilité P_k^{L} que e_{R} électrons soient lus pour le pixel k est la convolution du bruit de lecture avec la distribution P_k^{Q} donnée par l'Eq. 3.23. Elle s'écrit :

$$P_k^{\mathrm{L}}(e_{\mathrm{R}}) = \sum_{e_{\mathrm{S}}=0}^{\infty} P^{\mathrm{N}}(e_{\mathrm{R}};e_{\mathrm{S}},\boldsymbol{\theta})P_k^{\mathrm{Q}}(e_{\mathrm{S}};\boldsymbol{\theta}) \tag{3.27}$$

3.4.4 Amplification des électrons secondaires

Pour limiter l'influence du bruit de lecture, une amplification des électrons secondaires est nécessaire. Elle peut avoir lieu avant l'arrivée sur les pixels dans le cas de l'ebCMOS (partie 1.3) ou juste avant la lecture des pixels dans le cas de l'emCCD (partie 1.2).

Amplification par pixel

L'amplification des électrons secondaires par un registre de lecture est modélisée en utilisant la distribution du gain. Elle donne la probabilité d'obtenir e_{A} électrons après amplification en fonction du nombre d'électrons secondaires e_{S} présents à l'entrée du registre. Le gain emCCD comporte deux composantes intéressantes :

1. Le nombre d'électrons secondaires avant la lecture est amplifié, apportant une amélioration du rapport signal sur bruit.
2. Le processus de multiplication est stochastique.

Une amplification parfaite de valeur g est modélisée afin de distinguer l'influence du gain indépendamment du caractère stochastique. Le caractère stochastique sera introduit ensuite en utilisant la distribution du gain de l'emCCD.

Gain parfait par pixel

Pour un gain non stochastique g fixe, la distribution de sortie P_k^{G} est semblable à l'Eq. 3.27. Il faut seulement multiplier le nombre d'électrons secondaires en sortie par g.

$$P_k^{\mathrm{G}}(e_{\mathrm{R}}) = \sum_{e_{\mathrm{S}}=0}^{\infty} P^{\mathrm{N}}(e_{\mathrm{R}}; g \times e_{\mathrm{S}}, \boldsymbol{\theta}) P_k^{\mathrm{Q}}(e_{\mathrm{S}}; \boldsymbol{\theta}) \tag{3.28}$$

Amplification stochastique emCCD

Dans le cas de l'amplification stochastique, le gain est modélisé selon [4] :

$$P^{\mathrm{D}}(e_{\mathrm{A}}; e_{\mathrm{S}}, \boldsymbol{\theta}) = \frac{e_{\mathrm{A}}^{e_{\mathrm{S}}-1}}{(e_{\mathrm{S}}-1)! g^{e_{\mathrm{S}}}} \exp\left(-\frac{e_{\mathrm{A}}}{g}\right), e_{\mathrm{A}} \geq e_{\mathrm{S}} \tag{3.29}$$

La distribution P_k^{R} finale du nombre d'électrons lus est semblable à l'Eq. 3.27 dans laquelle l'Eq. 3.26 est convoluée à l'Eq. 3.29 du gain :

$$P_k^{\mathrm{R}}(e_{\mathrm{R}}) = \sum_{e_{\mathrm{A}}=0}^{\infty} P^{\mathrm{N}}(e_{\mathrm{R}}; e_{\mathrm{A}}, \boldsymbol{\theta}) \sum_{e_{\mathrm{S}}=0}^{\infty} P^{\mathrm{D}}(e_{\mathrm{A}}; e_{\mathrm{S}}, \boldsymbol{\theta}) P_k^{\mathrm{Q}}(e_{\mathrm{S}}; \boldsymbol{\theta}) \tag{3.30}$$

Amplification par photo-cathode

L'amplification du signal par l'ebCMOS se fait par accélération du photo-électron par un champ électrique. Elle permet la génération d'un grand nombre d'électrons secondaires dans la couche épitaxiale (sensible). Les électrons secondaires ne sont plus indépendants, il faut donc les traiter de manière différente.

Les photons issus de la source sont supposés indépendants. Nous nous intéressons tout d'abord au cas d'un photon unique. Le cas de plusieurs photons incidents sera obtenu par convolution de la distribution d'un photon.

La position d'impact du photo-électron sur la matrice de pixels suit la distribution P^{S} donnée par l'Eq. 3.13 avec :

$$\sigma_{\mathrm{T}}^2 = \sigma_{\mathrm{A}}^2 + \sigma_{\mathrm{B}}^2 \tag{3.31}$$

L'impact du photo-électron accéléré dans la couche épitaxiale du CMOS crée n_{P} paires électrons-trous dans le silicium. Ces électrons diffusent selon une gaussienne d'écart-type σ_{C} avant d'être collectés par les pixels.

Pour un photo-électron impactant la couche épitaxiale à la position $(x_{\mathrm{P}}, y_{\mathrm{P}})$, il faut calculer la probabilité que le pixel k reçoive e_{S} des n_{P} électrons secondaires disponibles. Cette distribution P^{S} donnée par l'Eq. 3.32 est calculée selon la même distribution q_k donnée par l'Eq. 3.21 avec les paramètres liés à la diffusion et à la position du photo-électron, $q_k(x_{\mathrm{P}}, y_{\mathrm{P}}, \sigma_{\mathrm{C}})$.

$$P_k^{\mathrm{P}}(e_{\mathrm{S}}, x_{\mathrm{P}}, y_{\mathrm{P}}, \boldsymbol{\theta}) = \binom{n_{\mathrm{P}}}{e_{\mathrm{S}}} q_k^{e_{\mathrm{S}}}(x_{\mathrm{P}}, y_{\mathrm{P}}, \sigma_{\mathrm{C}}) (1 - q_k(x_{\mathrm{P}}, y_{\mathrm{P}}, \sigma_{\mathrm{C}}))^{n_{\mathrm{P}}-e_{\mathrm{S}}} \tag{3.32}$$

Pour calculer la distribution finale P_k^{C}, il faut alors prendre toutes les positions possibles du photo-électron pondérées par leur probabilité :

$$P_k^{\text{C}}(e_{\text{S}}; e_{\text{P}} = 1, \boldsymbol{\theta}) = \iint_{\text{DET}} dx_{\text{P}} dy_{\text{P}} P^{\text{S}}(x, y; \boldsymbol{\theta}) P_k^{\text{P}}(e_{\text{S}}, x_{\text{P}}, y_{\text{P}}, \boldsymbol{\theta}) \tag{3.33}$$

Pour prendre en compte la rétrodiffusion, il faut convoluer le gain n_{P} par l'équation modélisant la distribution de probabilité de rétrodiffusion du photo-électron $r(q)$ donnée par l'Eq. 1.23 de la partie 1.3.3.

Cas de plusieurs photo-électrons incidents

Dans le cas de e_{P} photo-électrons, la distribution P_k^{C} de l'Eq. 3.33 est convoluée e_{P} fois avec elle-même. Pour chaque valeur e_{S} d'électrons collectés par le pixel k toutes les origines possibles de ces électrons sont alors prises en compte. Cette distribution est donnée par :

$$P_k^{\text{C}}(e_{\text{S}}; e_{\text{P}}, \boldsymbol{\theta}) = P_k^{\text{C}}(e_{\text{S}}; e_{\text{P}} = 1, \boldsymbol{\theta}) \underbrace{\otimes \cdots \otimes}_{e_{\text{P}}-1} P_k^{\text{C}}(e_{\text{S}}; e_{\text{P}} = 1, \boldsymbol{\theta}) \tag{3.34}$$

Lecture des pixels de l'ebCMOS

Comme pour les autres détecteurs, il faut convoluer la distribution P_k^{C} donnée par l'Eq. 3.34 à celles du bruit de lecture et du signal de la source. La résultante est la distribution P_k^{E} du nombre de charges e_{R} lues à la sortie du pixel k, soit :

$$P_k^{\text{E}}(e_{\text{R}}; \boldsymbol{\theta}) = \sum_{e_{\text{S}}=0}^{\infty} P^{\text{N}}(e_{\text{R}}; e_{\text{S}}, \boldsymbol{\theta}) \sum_{e_{\text{P}}=0}^{\infty} P_k^{\text{C}}(e_{\text{S}}; e_{\text{P}}, \boldsymbol{\theta}) P^{\text{O}}(e_{\text{P}}) \tag{3.35}$$

3.5 Calcul des limites de précision de localisation

3.5.1 Matrice d'information dans le cas du détecteur parfait

La valeur attendue $\mathbb{E}$ de la distribution de Poisson de l'Eq. 3.10 est la moyenne μ_{R}. De plus, elle est indépendante de la position des photons et de la position de la source $(x_{\text{S}}, y_{\text{S}})$:

$$\begin{aligned}
[\mathbf{I}(\boldsymbol{\theta})]_{ii} = [\mathbf{I}(\boldsymbol{\theta})]_{jj} &= \mathbb{E}\left[\left(\frac{\partial \ln\ [P^{\text{O}}(n_{\text{R}}; \boldsymbol{\theta}) \times P^{\text{S}}(x, y; \boldsymbol{\theta})]}{\partial \theta_i}\right)^2\right] \\
&= \mathbb{E}\left[P^{\text{O}}(n_{\text{R}}; \boldsymbol{\theta})\right] \iint_{\Re^2} \frac{1}{P^{\text{S}}(x, y; \boldsymbol{\theta})} \left[\frac{\partial P^{\text{S}}(x, y; \boldsymbol{\theta})}{\partial x_{\text{S}}}\right]^2 dxdy \\
&= \frac{\mu_{\text{R}}}{\sigma_{\text{T}}^4} \left(\int_{\Re} \frac{(x - x_{\text{S}})^2}{\sqrt{2\pi}\sigma_{\text{T}}} e^{-\frac{(x-x_{\text{S}})^2}{2\sigma_{\text{T}}^2}} dx\right) \times \left(\int_{\Re} \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_{\text{T}}} e^{-\frac{(y-y_{\text{S}})^2}{2\sigma_{\text{T}}^2}} dy\right) \\
&= \frac{\mu_{\text{R}}}{\sigma_{\text{T}}^2}
\end{aligned} \tag{3.36}$$

Cette intégrale s'annule pour les termes diagonaux car $\frac{\partial P^{\text{S}}(x,y;\boldsymbol{\theta})}{\partial x}$ est impaire sur $\Re$. La précision sur la position de la source est alors :

$$\sigma_{x_{\text{S}}} = \sigma_{y_{\text{S}}} \geq \left[\mathbf{I}^{-\frac{1}{2}}(\boldsymbol{\theta})\right]_{ii} = \frac{\sigma_{\text{T}}}{\sqrt{\mu_{\text{R}}}} \tag{3.37}$$

3.5.2 Dérivées des fonctions de vraisemblance utilisées dans le calcul de la limite de Cramér-Rao

Pour finaliser le calcul de la limite de Cramér-Rao, il faut calculer les dérivées par rapport au paramètre estimé, ici, la position de la source $(x_{\mathrm{S}}, y_{\mathrm{S}})$. Les calculs sont symétriques en xy, nous ne nous intéresserons donc uniquement à x_{S}.

Comptage de photons avec bruit de fond

L'équation à dériver est :

$$P^{\mathrm{T}}(x, y; \boldsymbol{\theta}) = \frac{\mu_{\mathrm{R}}}{\mu_{\mathrm{R}} + \mu_{\mathrm{B}}} P^{\mathrm{S}}(x, y; \boldsymbol{\theta}) + \frac{\mu_{\mathrm{B}}}{\mu_{\mathrm{R}} + \mu_{\mathrm{B}}} \times \frac{1}{S}$$

Le bruit de fond ne dépend pas de la position de la source. Nous nous intéressons alors uniquement à la distribution $P^{\mathrm{T}}(x, y; \boldsymbol{\theta})$:

$$\begin{aligned} \frac{\partial P^{\mathrm{T}}(x, y; \boldsymbol{\theta})}{\partial x_{\mathrm{S}}} &= \frac{\mu_{\mathrm{S}}}{\mu_{\mathrm{S}} + \mu_{\mathrm{M}}} \frac{\partial P^{\mathrm{S}}(x, y; \boldsymbol{\theta})}{\partial x_{\mathrm{S}}} \\ &= \frac{\mu_{\mathrm{S}}}{\mu_{\mathrm{S}} + \mu_{\mathrm{M}}} \frac{1}{2\pi\sigma_{\mathrm{T}}^2} \frac{\partial}{\partial x_{\mathrm{S}}} e^{-\frac{(x-x_{\mathrm{S}})^2 + (y-y_{\mathrm{S}})^2}{2\sigma_{\mathrm{T}}^2}} \end{aligned} \tag{3.38}$$

$$\frac{\partial P^{\mathrm{T}}(x, y; \boldsymbol{\theta})}{\partial x_{\mathrm{S}}} = \frac{x - x_{\mathrm{S}}}{\sigma_{\mathrm{T}}^2} \left[\frac{\mu_{\mathrm{R}}}{\mu_{\mathrm{R}} + \mu_{\mathrm{B}}} P^{\mathrm{S}}(x, y; \boldsymbol{\theta}) \right] \tag{3.39}$$

Détecteurs sCMOS/emCCD

L'équation finale pour l'emCCD est :

$$P_k^{\mathrm{R}}(e_{\mathrm{R}}) = \sum_{e_{\mathrm{A}}=0}^{\infty} P^{\mathrm{N}}(e_{\mathrm{R}}; e_{\mathrm{A}}, \boldsymbol{\theta}) \sum_{e_{\mathrm{S}}=0}^{\infty} P^{\mathrm{D}}(e_{\mathrm{A}}; e_{\mathrm{S}}, \boldsymbol{\theta}) P_k^{\mathrm{Q}}(e_{\mathrm{S}}; \boldsymbol{\theta})$$

Le bruit de lecture P^{N} et le gain P^{D} ne dépendent pas de la position de la source. Seulement P_k^{Q} a une dérivée non nulle selon x_{S} :

$$\frac{\partial P_k^{\mathrm{Q}}(e_{\mathrm{S}}; \boldsymbol{\theta})}{\partial x_{\mathrm{S}}} = \frac{\partial}{\partial x_{\mathrm{S}}} \sum_{e_{\mathrm{P}}=0}^{\infty} P_k^{\mathrm{F}}(e_{\mathrm{S}}; e_{\mathrm{P}}, \boldsymbol{\theta}) P^{\mathrm{O}}(e_{\mathrm{P}}) \tag{3.40}$$

Comme précédemment, uniquement la partie dépendante de x_{S}, P_k^{F}, est conservée :

$$\frac{\partial P_k^{\mathrm{F}}}{\partial x_{\mathrm{S}}} = \frac{\partial}{\partial x_{\mathrm{S}}} \binom{e_{\mathrm{P}}}{e_{\mathrm{S}}} q_k^{e_{\mathrm{S}}}(x_{\mathrm{S}}, y_{\mathrm{S}}, \sigma_{\mathrm{T}}) (1 - q_k(x_{\mathrm{S}}, y_{\mathrm{S}}, \sigma_{\mathrm{T}}))^{e_{\mathrm{P}} - e_{\mathrm{S}}} \tag{3.41}$$

Pour dériver q_k, il faut utiliser :

$$\frac{\partial f^n(x)}{\partial x} = n f^{n-1}(x) \frac{\partial f(x)}{\partial x} \tag{3.42}$$

Pour obtenir :

$$\frac{\partial P_k^{\mathrm{F}}}{\partial x_{\mathrm{S}}} = \binom{e_{\mathrm{P}}}{e_{\mathrm{S}}} \frac{\partial q_k}{\partial x_{\mathrm{S}}} \left[e_{\mathrm{S}} \times q_k^{e_{\mathrm{S}}-1} (1 - q_k)^{e_{\mathrm{P}} - e_{\mathrm{S}}} - (e_{\mathrm{P}} - e_{\mathrm{S}}) \times q_k^{e_{\mathrm{S}}} (1 - q_k)^{e_{\mathrm{P}} - e_{\mathrm{S}} - 1} \right] \tag{3.43}$$

$$\begin{aligned} &= \binom{e_{\mathrm{P}}}{e_{\mathrm{S}}} \frac{\partial q_k}{\partial x_{\mathrm{S}}} q_k^{e_{\mathrm{S}}-1} (1 - q_k)^{e_{\mathrm{P}} - e_{\mathrm{S}} - 1} \left[e_{\mathrm{S}}(1 - q_k) - (e_{\mathrm{P}} - e_{\mathrm{S}}) q_k \right] \\ &= \binom{e_{\mathrm{P}}}{e_{\mathrm{S}}} \frac{\partial q_k}{\partial x_{\mathrm{S}}} q_k^{e_{\mathrm{S}}-1} (1 - q_k)^{e_{\mathrm{P}} - e_{\mathrm{S}} - 1} \left[e_{\mathrm{S}} - e_{\mathrm{P}} q_k \right] \end{aligned} \tag{3.44}$$

avec

$$\frac{\partial q_k}{\partial x_{\mathrm{S}}} = \frac{\partial}{\partial x_{\mathrm{S}}} \iint_k \frac{1}{2\pi\sigma_{\mathrm{T}}^2} e^{-\frac{(x-x_{\mathrm{S}})^2+(y-y_{\mathrm{S}})^2}{2\sigma_{\mathrm{T}}^2}} dxdy \tag{3.45}$$

Soit en dérivant sous l'intégrale :

$$\frac{\partial q_k}{\partial x_{\mathrm{S}}} = \frac{1}{2\pi\sigma_{\mathrm{T}}^4} \iint_k (x - x_{\mathrm{S}}) e^{-\frac{(x-x_{\mathrm{S}})^2+(y-y_{\mathrm{S}})^2}{2\sigma_{\mathrm{T}}^2}} dxdy \tag{3.46}$$

Finalement :

$$\frac{\partial P_k^{\mathrm{F}}}{\partial x_{\mathrm{S}}} = \left(\frac{1}{2\pi\sigma_{\mathrm{T}}^4} \iint_k (x - x_{\mathrm{S}}) e^{-\frac{(x-x_{\mathrm{S}})^2+(y-y_{\mathrm{S}})^2}{2\sigma_{\mathrm{T}}^2}} dxdy \right) \binom{e_{\mathrm{P}}}{e_{\mathrm{S}}} q_k^{e_{\mathrm{S}}-1} (1-q_k)^{e_{\mathrm{P}}-e_{\mathrm{S}}-1} \left[e_{\mathrm{S}} - e_{\mathrm{P}} q_k \right] \tag{3.47}$$

Détecteur ebCMOS

L'équation finale de l'ebCMOS est :

$$P_k^{\mathrm{E}}(e_{\mathrm{R}}; \boldsymbol{\theta}) = \sum_{e_{\mathrm{S}}=0}^{\infty} P^{\mathrm{N}}(e_{\mathrm{R}}; e_{\mathrm{S}}, \boldsymbol{\theta}) \sum_{e_{\mathrm{P}}=0}^{\infty} P_k^{\mathrm{C}}(e_{\mathrm{S}}; e_{\mathrm{P}}, \boldsymbol{\theta}) P^{\mathrm{O}}(e_{\mathrm{P}})$$

Comme précédemment, la dépendance en x_{S} porte uniquement sur P_k^{C}. Comme le produit de convolution utilisé dans P_k^{C} est un produit de fonctions identiques, la dérivation se factorise :

$$\frac{\partial P_k^{\mathrm{C}}(e_{\mathrm{S}}; e_{\mathrm{P}}, \boldsymbol{\theta})}{\partial x_{\mathrm{S}}} = e_{\mathrm{P}} \times \frac{\partial P_k^{\mathrm{C}}(e_{\mathrm{P}} = 1)}{\partial x_{\mathrm{S}}} \otimes P_k^{\mathrm{C}}(e_{\mathrm{P}} = 1) \underbrace{\otimes \cdots \otimes}_{e_{\mathrm{P}}-2} P_k^{\mathrm{C}}(e_{\mathrm{P}} = 1) \tag{3.48}$$

avec

$$\frac{\partial P_k^{\mathrm{C}}(e_{\mathrm{P}} = 1)}{\partial x_{\mathrm{S}}} = \frac{\partial}{\partial x_{\mathrm{S}}} \iint_{\mathrm{DET}} dx_{\mathrm{P}} dy_{\mathrm{P}} P^{\mathrm{S}}(x, y; \boldsymbol{\theta}) P_k^{\mathrm{P}}(e_{\mathrm{S}}, x_{\mathrm{P}}, y_{\mathrm{P}}, \boldsymbol{\theta}) \tag{3.49}$$

La dépendance en x_{S} porte uniquement sur $P^{\mathrm{S}}(x, y; \boldsymbol{\theta})$, la probabilité qu'un photon soit à la position $x_{\mathrm{P}}, y_{\mathrm{P}}$ connaissant la position de la source. En dérivant sous l'intégrale :

$$\frac{\partial P^{\mathrm{S}}(x, y; \boldsymbol{\theta})}{\partial x_{\mathrm{S}}} = \frac{1}{2\pi\sigma_{\mathrm{T}}^4} (x - x_{\mathrm{S}}) e^{-\frac{(x-x_{\mathrm{S}})^2+(y-y_{\mathrm{S}})^2}{2\sigma_{\mathrm{T}}^2}} \tag{3.50}$$

3.5.3 Implémentation numérique

L'implémentation numérique du calcul de limite de Cramér-Rao pose plusieurs problèmes :

1. **Intégration de Gauss-Legendre :** Les résultats comportent des intégrales qui ne sont pas exprimables analytiquement. Une intégration de Gauss-Legendre suivant la librairie de Pavel Holoborodko [1] est utilisée pour obtenir un résultat numérique.
2. **Transformée de Fourier :** dans le calcul de la limite de Cramér-Rao pour l'ebCMOS, il est nécessaire de calculer un produit de convolution pour le cas à plusieurs photons. Ce calcul est extrêmement lent. Dans l'espace de Fourier, le produit de convolution devient un simple produit. Ainsi, le calcul est effectué en utilisant une librairie de calcul de transformée de Fourier rapide [2].

1. www.holoborodko.com
2. www.fftw.org

Les distributions ont été comparées aux simulations Monte-Carlo. L'intégration numérique nécessite un choix pertinent de la zone d'intégration en fonction des fonctions et des paramètres choisis. Les résultats obtenus ont tout d'abord été comparés avec succès aux résultats obtenus par Ober *et al.* [1] dans le cas sans amplification du signal, validant ainsi les distributions choisies.

3.6 Étude de paramètres significatifs sur la précision de localisation dans des conditions extrêmes de luminosité

3.6.1 Paramètres généraux

Nous utiliserons généralement des conditions classiques d'imagerie optique, avec un grandissement 100×, équivalent à une PSF optique de 8 μm sur capteur. Sauf mention contraire, aucun bruit de fond n'est ajouté. La source est généralement placée en (0,0) au centre du pixel, pour un nombre impair de pixels par ligne.

Les caméras sCMOS et CCD sont modélisées par les mêmes distributions, seuls les paramètres changent. Les conclusions sur ces deux détecteurs seront identiques, en prenant en compte les limites des capteurs CCD actuels par rapport au bruit de lecture.

Les paramètres principaux des détecteurs sont résumés dans la table 3.1. De plus, la PSF tube de l'ebCMOS est modélisée à 10.5 μm et la PSF de diffusion à 4 μm.

Détecteur	Côté du pixel	Bruit de lecture	Courant d'obscurité	Amplification
CCD	16 μm	10e-	0	-
sCMOS	6.5 μm	3e-	0	-
emCCD	16 μm	49e-	5 $\times 10^{-3}$ e-	300
ebCMOS	10 μm	8e-	1.25 $\times 10^{-5}$ phe	300

TABLE 3.1 – Récapitulatif des paramètres par défaut des détecteurs.

3.6.2 Limites d'échantillonnage

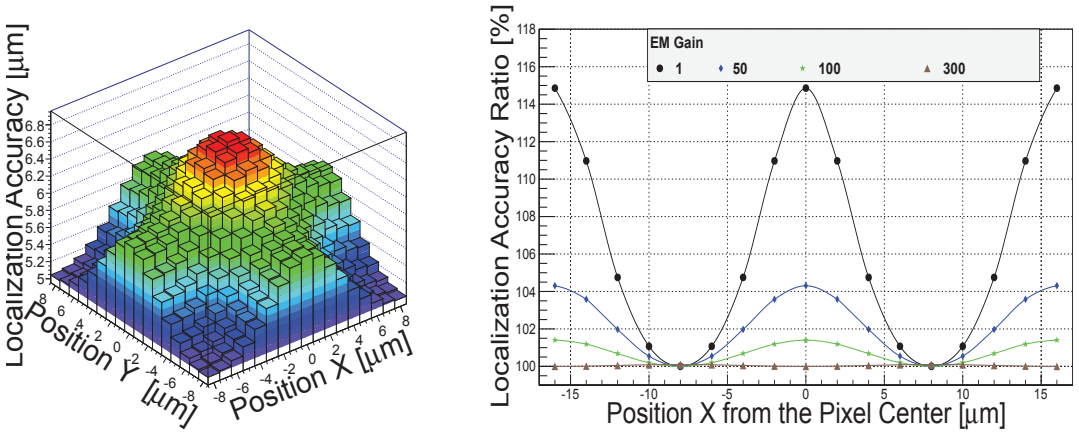
Dans cette partie, nous nous intéressons aux pertes en précision de localisation liées à une perte d'efficacité de l'échantillonnage de la PSF.

Position de la source par rapport aux pixels

La variation de la position de la source par rapport au pixel central modifie la charge mesurée par chaque pixel, modifiant l'échantillonnage de la PSF. Dans le cas d'un grandissement 100 ×, avec une PSF optique d'écart-type 8 μm.

Lorsque la source se trouve à l'intersection de deux ou de quatre pixels, la charge est diffusée et partagée par plusieurs pixels. Lorsqu'elle est au centre du pixel, les pixels voisins obtiennent moins de charge. En fonction du rapport signal sur bruit des voisins, l'échantillonnage est moins efficace lorsque le nombre de pixels apportant de l'information diminue.

La perte en précision de localisation résultant de ce phénomène est donnée pour le capteur CCD (pixel 16μm, bruit de lecture 10 e- RMS) par la Fig. 3.5a. La position (0,0) correspond au cas où la source est centrée par rapport au pixel. La Fig. 3.5b montre l'influence du gain emCCD sur cette perte d'échantillonnage.



(a) (b)

FIGURE 3.5 – Précision de localisation de la position de la source obtenue avec la limite de Cramér-Rao. (a) Visualisation 2D en fonction de la position de la source par rapport au centre du pixel [pixel 16μm, bruit de lecture 10e-]. (b) Évolution de la précision de localisation suivant la position de la source selon l'axe X, en fonction du gain emCCD appliqué [pixel 16μm, bruit de lecture 49e-]

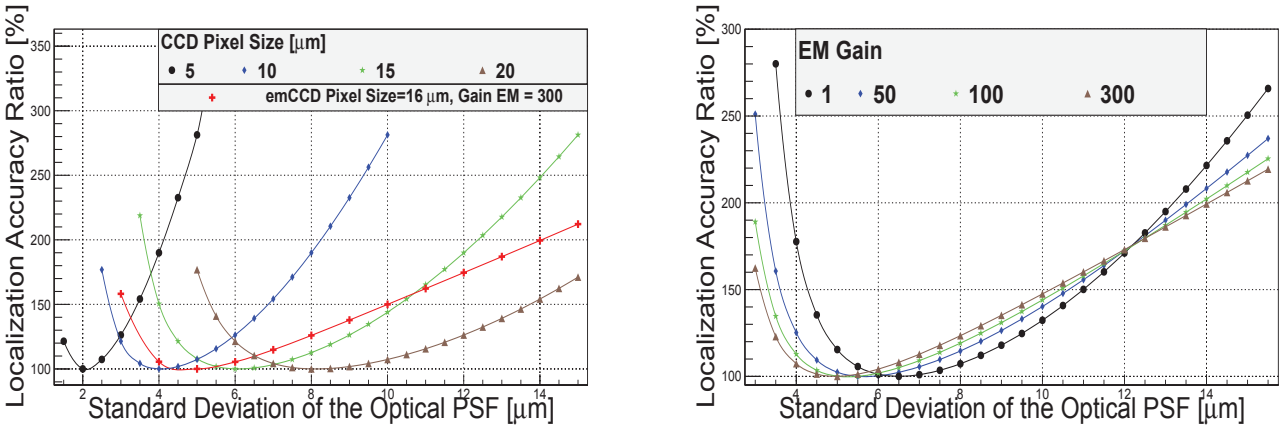
Dans le cas où la source est placée au centre du pixel central, la précision de localisation du capteur CCD perd 15 % par rapport au cas où la source est placée entre deux pixels voisins. Cette perte est encore plus importante quand la source est placée entre quatre pixels, permettant un échantillonnage maximal.

Le gain EM permet une augmentation du rapport signal sur bruit des pixels. Les pixels ayant reçu un signal faible contribuent ainsi à l'échantillonnage de la PSF, limitant ainsi la perte en précision de localisation.

Ce problème d'échantillonnage est supprimé dans le cas de l'ebCMOS grâce à la PSF de diffusion qui permet un échantillonnage plus important quelle que soit la PSF optique, comme vu dans la partie précédente sur la détection du photon par l'ebCMOS.

Grandissement et PSF optique

Ce problème d'échantillonnage peut être généralisé pour les différents grandissements avec différentes PSF optiques. Pour une taille de pixel donnée, il est possible de trouver une PSF optique optimale permettant le meilleur échantillonnage par rapport au bruit des pixels. Les Fig. 3.6a et 3.6b montrent l'évolution de la précision de localisation au centre du pixel selon la PSF optique et selon la taille du pixel, respectivement sans et avec gain emCCD.



(a) (b)

FIGURE 3.6 – Perte de précision de localisation sur la position de la source par rapport à la précision de localisation minimale en fonction de l'écart-type de la PSF optique. (a) CCD. En fonction de la taille du pixel : 5, 10, 15 et 20 μm. La courbe en cyan est celle de l'emCCD à gain 300. (b) En fonction du gain emCCD : G=1, 50, 100 et 300.

Les résultats trouvés sont semblables au travail d'Ober *et al.* [1] pour le CCD. Avec l'ajout du gain emCCD, la forme de la courbe se modifie. Elle possède toujours un minimum, décalé vers les petites PSF par rapport au CCD. La perte en précision de localisation est aussi moins marquée vers les grandes PSF.

Plus le gain emCCD est important, plus le rapport signal sur bruit des pixels augmente, ce qui compense la diminution du signal des pixels voisins dans le cas d'une PSF plus étroite. Une large PSF étale la charge sur plus de pixels, diminuant le signal par pixel. Le gain EM permet de conserver une précision de localisation correcte malgré la baisse du rapport signal sur bruit.

PSF de diffusion des charges dans l'ebCMOS

Nous nous intéressons à l'influence de la PSF de diffusion de l'ebCMOS. La PSF tube augmente la taille de la PSF, limitant l'échantillonnage et dégradant la précision de localisation. La PSF de diffusion associée à l'amplification des charges permet la détection du photon à l'intérieur du pixel.

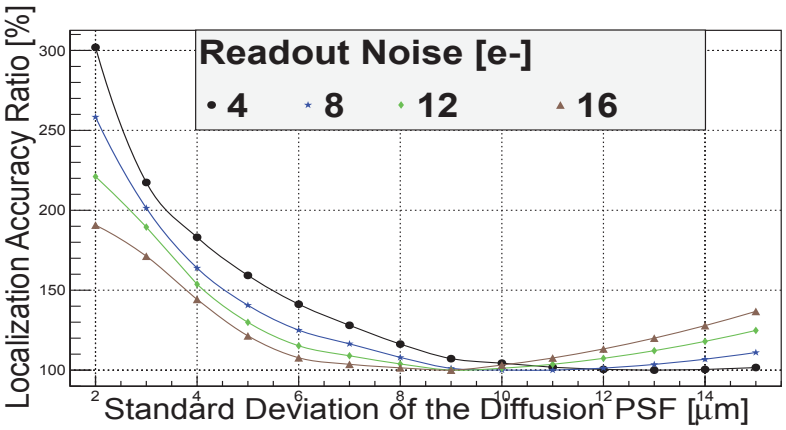


FIGURE 3.7 – Perte de précision de localisation de la position de la source par rapport à la précision de localisation minimale en fonction de l'écart-type de la PSF de diffusion dans le CMOS.

La PSF de diffusion des charges couplée à leur amplification joue un rôle primordial dans la précision de localisation de l'ebCMOS. C'est cette diffusion qui permet d'échantillonner au mieux la PSF optique.

Le minimum de précision de localisation correspond à l'équilibre entre le gain d'information apporté par un étalement de la charge et la dégradation du signal par la baisse du rapport signal sur bruit des pixels. Dans le cas d'un grand bruit de lecture, la pente pour les larges PSF s'accentue, car l'information diffusée est perdue.

Pour les petites PSF, l'effet est inverse, avec une pente plus importante pour les faibles bruits, pour lesquels la perte due à la diminution du nombre de pixels participant à l'échantillonnage est plus importante.

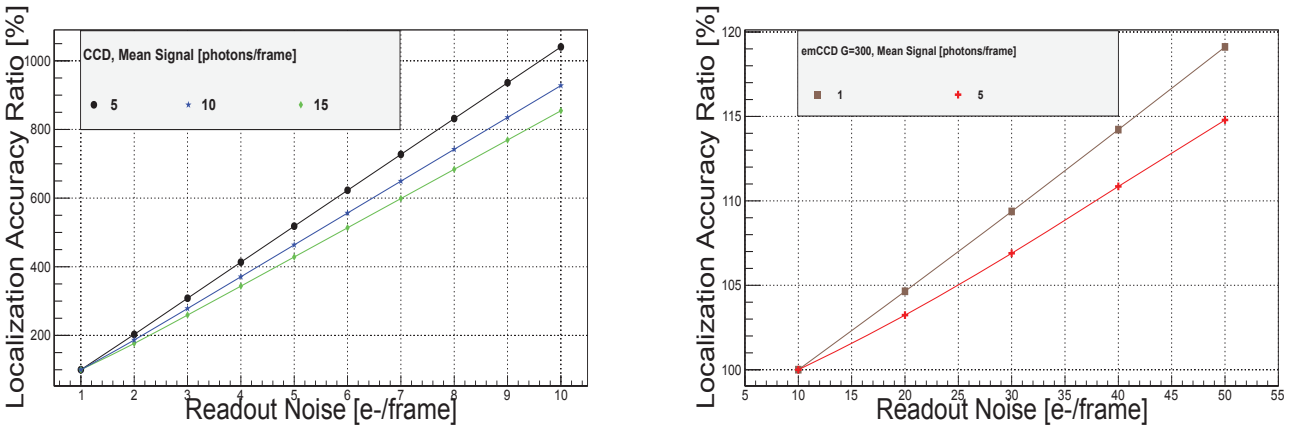
Dans le cas des capteurs éclairés en face arrière et sans gain, les résultats sont identiques au cas de la partie 3.6.2 précédente. Dans ce cas il suffit de sommer quadratiquement les PSF de diffusion et optique car la PSF de diffusion n'affecte qu'un électron secondaire à la fois, conservant l'indépendance des photons.

3.6.3 Influence des bruits et de l'amplification des charges primaires

Dans cette partie, nous nous intéressons à l'influence du bruit de lecture et du bruit de fond sur la précision de localisation de l'emCCD. La valeur du bruit CIC sera mise à zéro dans cette partie, sauf mention contraire.

Influence du bruit de lecture

Les Fig. 3.8a (CCD) et 3.8b (emCCD) montrent l'influence du bruit de lecture sur la précision de localisation, pour différentes valeurs de signal de la source. Nous nous intéressons à la perte en précision de localisation par rapport au minimum possible à 1 e- RMS de bruit de lecture pour pouvoir mesurer la pente de perte en précision de localisation selon le signal incident.



(a) (b)

FIGURE 3.8 – Perte de précision de localisation de la position de la source par rapport à la précision de localisation minimale en fonction de la valeur du bruit de lecture. (a) Sans gain emCCD pour trois valeurs de signal : 5, 10 et 15 photons par image. (b) Gain emCCD G=300 pour deux valeurs de signal : 1 et 5 photons par image.

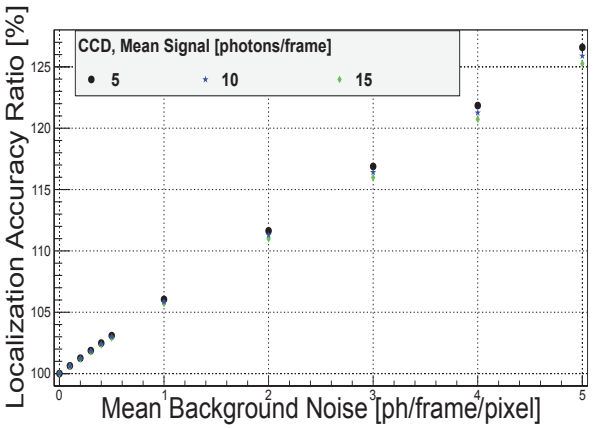
Le bruit de lecture dégrade la précision de localisation d'un facteur supérieur à huit pour le passage de 1 à 10 e- RMS de bruit de lecture. La perte en précision de localisation est linéaire, et la pente dépend du signal moyen de la source. Plus le signal moyen par image est important, moins le bruit de lecture a d'influence sur la précision de localisation.

Pour un signal moyen de cinq photons par image, la pente est de 10.46 μm par électron de bruit pour le CCD et de 0.0475 μm pour l'emCCD à 300 de gain. Le gain EM permet de réduire d'un facteur 200 l'influence du bruit de lecture.

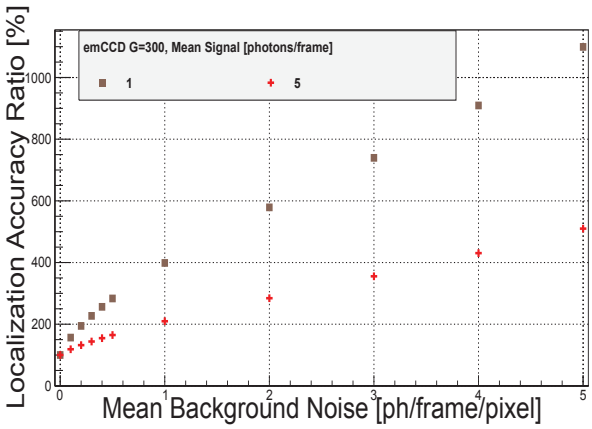
Influence du bruit de fond de photons

Dans le cas d'un bas niveau de lumière, le bruit de fond, même faible, dégrade la précision de localisation sur la position de la source. Les Fig. 3.9a (CCD) et 3.9b (emCCD) montrent l'influence du bruit de fond sur la précision de localisation. Le nombre de photons de bruit de fond est exprimé en nombre moyen par pixel par image. Comme le signal, le bruit de fond est modélisé selon une distribution de Poisson.

La perte en précision de localisation se fait par rapport au minimum possible quand il n'y a aucun bruit de fond. Le courant d'obscurité et le bruit CIC peuvent être modélisés de la même manière, en nombre moyen de photons par pixel par image.



(a)



(b)

FIGURE 3.9 – Perte de précision de localisation de la position de la source par rapport à la précision de localisation minimale en fonction de la valeur moyenne du bruit de fond par image et par pixel en photons. (a) Sans gain emCCD pour trois valeurs de signal : 5, 10 et 15 photons par image. (b) Gain emCCD G=300 pour deux valeurs de signal : 1 et 5 photons par image.

Le bruit de fond dégrade aussi la précision de localisation de façon linéaire. Par contre, la pente ne dépend quasiment pas du signal moyen pour le CCD. Elle passe de 5.37 à 5.10 μm par photon de bruit par pixel quand le signal moyen passe de 5 à 15 photons par image, soit une amélioration de 5 %. Dans les mêmes conditions, la pente de perte en précision de localisation pour le bruit de lecture passe de 10.46 à 3.40 μm par électron, soit une amélioration d'un facteur 3.

Les valeurs de minimum de précision de localisation et de pentes d'évolution de la précision de localisation selon les bruits sont résumées dans les table 3.2 et 3.3 respectivement pour le CCD et l'emCCD pour G=300.

Signal moyen	Variation du bruit de lecture		Variation du bruit de fond	
[ph/image]	Minimum [μm]	Pente [μm/e-]	Minimum [μm]	Pente [μm/ph]
5	10.0	10.46	30.83	5.37
10	5.61	5.16	15.62	5.23
15	4.06	3.40	10.55	5.10

TABLE 3.2 – Coefficient directeur de la perte en précision de localisation due au bruit de lecture et au bruit de fond pour le capteur CCD. La taille du pixel est de 16 μm. Le bruit de lecture est fixé à 10 e- RMS dans le cas de l'évolution du bruit de fond.

Signal moyen [ph/image]	Variation du bruit de lecture		Variation du bruit de fond	
	Minimum [μm]	Pente [μm/e-]	Minimum [μm]	Pente [μm/ph]
1	9.49	0.0475	11.78	20.35
5	4.50	0.0169	5.32	4.29

TABLE 3.3 – Coefficient directeur de la perte en précision de localisation due au bruit de lecture et au bruit de fond pour le capteur emCCD avec un gain de 300. La taille du pixel est de 16 μm. Le bruit de lecture est fixé à 49 e- RMS dans le cas de l'évolution du bruit de fond.

Dans le cas du CCD, le bruit de lecture est le facteur limitant pour la précision de localisation à faible signal. Quand le signal augmente, la dégradation de la précision de localisation par le bruit de lecture est fortement diminuée, contrairement à celle provenant du bruit de fond.

Le gain emCCD permet de réduire drastiquement l'influence du bruit de lecture sur la précision de localisation. Le bruit de fond n'est alors plus du tout négligeable car il devient le facteur limitant, avec une influence plus de 200 fois supérieure.

Le gain EM inverse l'importance relative des deux types de bruit. Pour un bruit de fond important, les courbes d'évolution des capteurs sCMOS et emCCD se croisent. Pour un faible bruit de fond à faible signal, l'emCCD a une meilleure précision de localisation que le sCMOS. Mais au fur et à mesure que le bruit de fond augmente, les courbes de précision de localisation des deux détecteurs se croisent, comme le montre la Fig. 3.10.

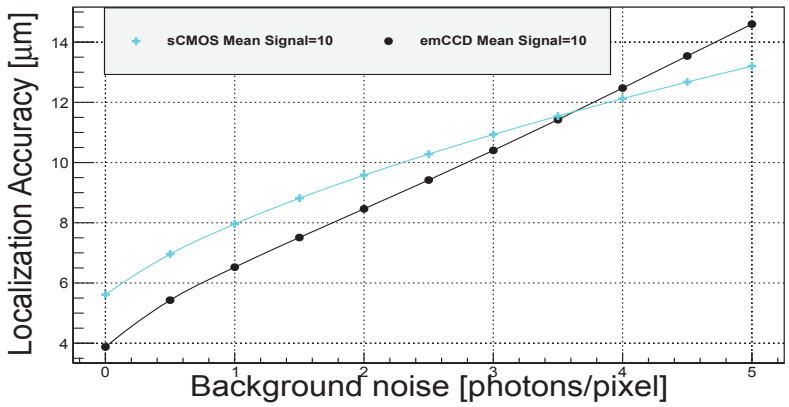


FIGURE 3.10 – Évolution de la précision de localisation en fonction du bruit de fond moyen par pixel, pour les capteurs sCMOS et emCCD avec un signal moyen de 10 photons par image.

Dans ces conditions particulières, la précision de localisation du sCMOS est meilleure que celle de l'emCCD pour un bruit de fond moyen de 4 photons par pixel par image. Ce résultat s'explique par l'amplification du bruit de fond par l'emCCD. Selon le bruit de fond, il devient donc plus avantageux d'utiliser une caméra sensible sans gain, et donc sans facteur d'excès de bruit, qui dégrade fortement la précision de localisation à ces régimes.

Influence du gain électronique

Nous nous intéressons tout d'abord à l'effet stochastique sur la précision de localisation. Pour cela nous étudions l'évolution de la précision de localisation en fonction du nombre de photons, pour l'emCCD en mode gain stochastique et pour l'emCCD avec un gain constant idéal. La Fig. 3.11 montre cette distribution.

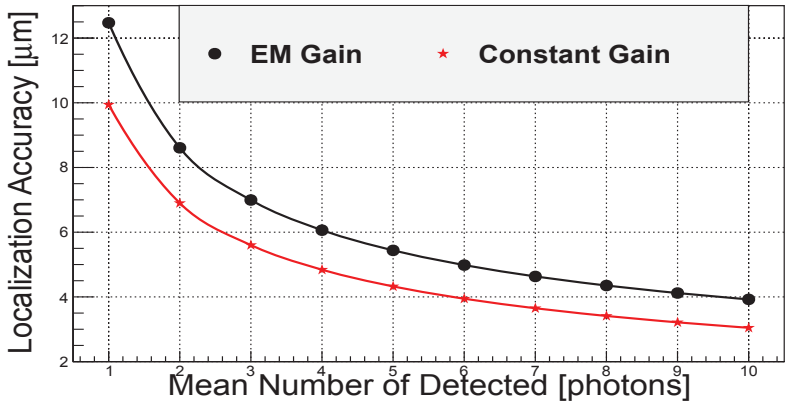


FIGURE 3.11 – Évolution de la précision de localisation en fonction du signal, pour un gain idéal constant (bleu) et pour la distribution stochastique (noir) pour l'emCCD avec G=300.

L'effet stochastique dégrade de façon non négligeable la précision de localisation de l'emCCD, de l'ordre de 25 % dans ces conditions, et cet écart ne diminue pas avec le signal. Bien entendu, ce type de gain parfait est irréaliste, mais il peut être plus avantageux d'avoir un gain plus faible bien que moins aléatoire pour obtenir une meilleure précision de localisation.

Nous nous intéressons ensuite à l'influence de la valeur du gain sur la précision de localisation. Dans ce cas, l'augmentation du bruit CIC qu'induit l'augmentation du gain n'est pas prise en compte. La Fig. 3.12 montre l'évolution de la précision de localisation en fonction du gain EM appliqué.

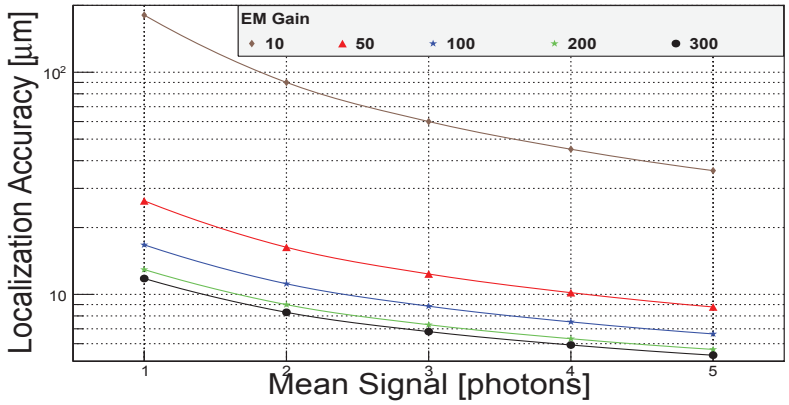


FIGURE 3.12 – Évolution de la précision de localisation en fonction du gain appliqué, pour différentes valeurs de signal pour la caméra emCCD.

L'augmentation du gain EM permet une amélioration importante de la précision de localisation, d'un facteur 10 dans des conditions extrêmes de luminosité. L'augmentation du gain de 100 à 200 pour un signal moyen de 1 photon améliore la précision de localisation de 22 % alors qu'elle n'est améliorée que de moins de 9 % pour le passage de 200 à 300. Ces chiffres passent respectivement à 11 et 4 % pour un signal de 10 photons par image.

L'augmentation du bruit CIC mesuré dans la partie 1.4.2 n'est au maximum que de 2,35 $\times 10^{-3}$ électrons lorsque le gain passe de 100 à 300. Cela correspond à une perte de 0.05 μm de précision de localisation, soit moins de 0.5 % dans les conditions de signal moyen de 1 photon par image. Pour une augmentation plus importante du bruit CIC, il sera alors nécessaire de trouver un compromis entre gain et bruit CIC.

Influence de la rétrodiffusion des photo-électrons sur la précision de localisation de l'ebCMOS

Comme pour l'emCCD, une amplification parfaite de l'ebCMOS sans rétrodiffusion est modélisée. La Fig. 3.13 montre l'évolution de la précision de localisation de l'ebCMOS en fonction du signal, avec et sans rétrodiffusion des photo-électrons.

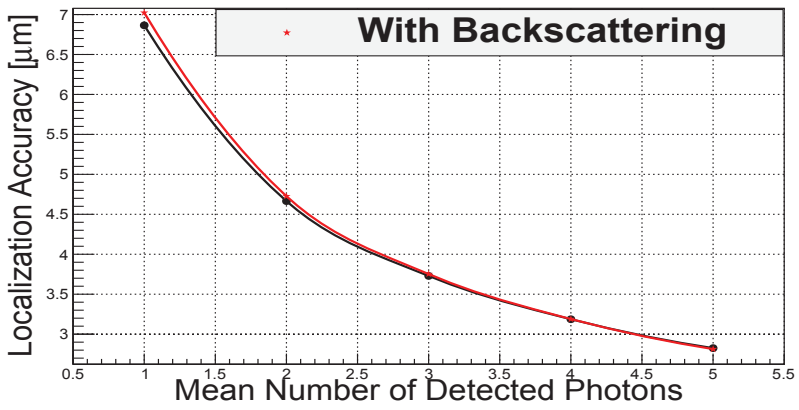


FIGURE 3.13 – Évolution de la précision de localisation sur la position de la source en fonction du nombre moyen de photons par image. Sans rétrodiffusion (noir) et avec (rouge) pour la caméra ebCMOS.

La perte en précision de localisation qu'induit la rétrodiffusion est faible, de l'ordre de 2.5 % pour un signal d'un photon. La rétrodiffusion induit une perte d'énergie mais elle est toujours déposée, permettant une amplification même moins importante du signal.

La dégradation de la résolution énergétique des charges déposées par les photo-électrons est plus importante pour le comptage de photons. Pour une charge moyenne déposée par photon de l'ordre de 200 électrons, une perte de 100 électrons dans le cas de trois photo-électrons incidents ne diminue l'amplification que de 16.6 %. Le comptage de 2 photo-électrons au lieu de 3 est une perte de 33 %.

Comparaison de la méthode en charges et du comptage de photons pour l'ebCMOS

Nous nous intéressons aux deux modélisations de l'ebCMOS, avec reconstruction des photons, et avec uniquement l'information de la charge. La Fig. 3.14 montre l'évolution de la précision de localisation en fonction du signal pour ces deux méthodes.

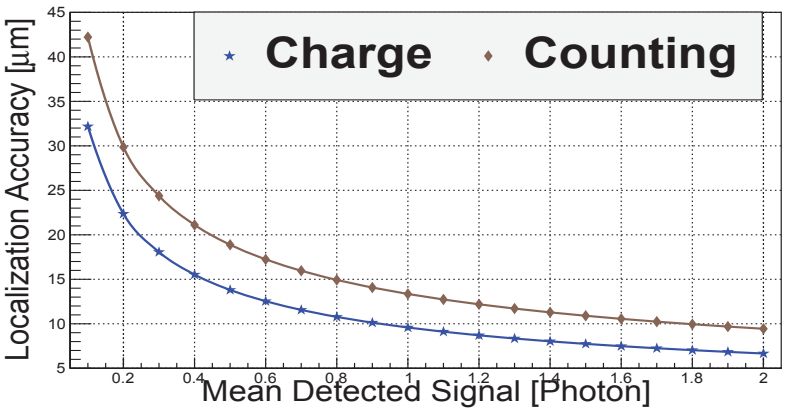


FIGURE 3.14 – ebCMOS : Évolution de la précision de localisation sur la position de la source en fonction du nombre moyen de photons par image pour la méthode en comptage de charges (bleu) et celle de détection des photo-électrons (marron).

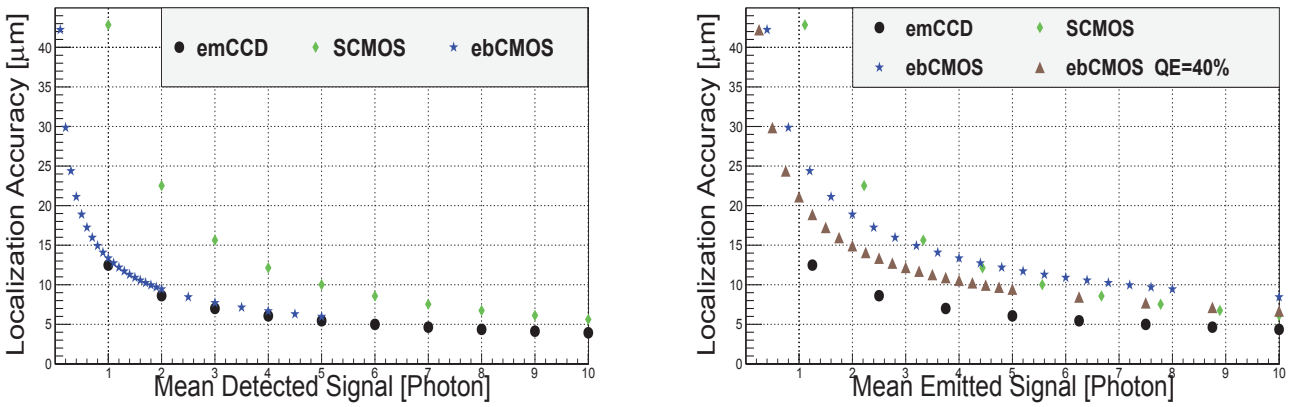
La méthode en charge donne de meilleurs résultats que la limite théorique du détecteur parfait, en $\sigma_A/\sqrt{\text{Signal}}$. Ce résultat est dû à la non indépendance des pixels de l'ebCMOS pour l'impact d'un photo-électron car les charges secondaires diffusent dans plusieurs pixels.

Sans amplification, les résultats obtenus par cette méthode sont identiques à ceux obtenus pour les capteurs sCMOS et emCCD pour les mêmes paramètres. Les deux distributions de la Fig. 3.14 montrent la même évolution, ce qui tend à montrer que le comportement est conservé bien que la valeur soit biaisée.

Afin de mesurer la limite de Cramér-Rao dans le cas de l'ebCMOS en charge, il est alors nécessaire de prendre en compte cette corrélation entre les pixels dans le calcul de l'information de Fisher. Dans la suite, seule la méthode en comptage de photons de l'ebCMOS sera utilisée.

Comparaison des détecteurs à très bas niveau de lumière

Enfin, les limites de précision de localisation dans ces conditions de très faible luminosité sont calculés pour les trois détecteurs. Nous nous intéressons tout d'abord au principe des détecteurs, avec l'évolution de la précision de localisation en fonction du nombre moyen de photons détectés. Cette distribution est donnée par la Fig. 3.15a. Les limitations de l'efficacité quantique sont ensuite prises en compte avec une évolution de la précision de localisation en fonction du nombre moyen de photons impactant les détecteurs par image, donnée par la Fig. 3.15b.



(a) (b)

FIGURE 3.15 – Évolution de la précision de localisation en fonction du nombre moyen de photons détectés (a) ou émis (b), pour les caméras emCCD, ebCMOS en mode comptage et sCMOS.

Les résultats montrent une meilleure précision de localisation globale pour l'emCCD. Le capteur sCMOS ne devient compétitif qu'à un nombre relativement important de photons (10) ou pour un bruit de fond important, comme vu précédemment.

L'évolution des photo-cathodes (type AsGa à 40 % d'efficacité quantique par exemple) permettra à l'ebCMOS d'être compétitif en conservant une très bonne vitesse de lecture. Une autre piste d'amélioration est la baisse de la PSF tube, avec la réduction de la distance entre la photo-cathode et les pixels. L'ebCMOS actuel permet tout de même une très bonne précision de localisation pour une vitesse de lecture allant jusqu'à 500 fps et est donc un très bon candidat aux applications de vidéo-microscopie.

Dans le chapitre suivant, ces résultats seront comparés aux données expérimentales obtenues pour ces trois caméras.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons vu l'influence de plusieurs paramètres sur la précision de localisation des détecteurs par le calcul de la limite de Cramér-Rao.

La précision de localisation sur la position dépend fortement de la bonne adéquation de la taille des pixels à celle de de la PSF du détecteur. Il faut donc adapter les caméras utilisées aux montages expérimentaux

Nous avons montré que l'influence du bruit de lecture, très forte pour le CCD à bas niveau de lumière est quasiment effacée grâce à l'amplification de l'emCCD. Cette amélioration se fait par contre au détriment de l'influence du bruit de fond.

Le facteur d'excès de bruit de l'emCCD rend en effet le bruit de fond très problématique. La dégradation du signal induite par le bruit de fond est si importante qu'à fort bruit de fond (4 photons par pixel par image), le capteur sCMOS devient plus précis que le capteur emCCD.

Nous avons étudié l'effet de la PSF de diffusion de l'ebCMOS sur la précision de localisation. Cette diffusion dégrade la précision de localisation pour un détecteur sans gain éclairé en face arrière, car elle augmente la PSF optique. Pour le capteur ebCMOS, l'amplification des charges secondaires transforme cet inconvénient en avantage car il permet un meilleur échantillonnage de la PSF optique.

Finalement, nous avons comparé les détecteurs sCMOS, emCCD et ebCMOS dans des conditions de très bas niveau de lumière. Nous avons vu que la stratégie du sCMOS est payante pour un signal faible (10 photons par image) ou un fort bruit de fond (4 photons par pixel par image) mais qu'elle ne permet pas encore une bonne précision de localisation au photon unique car le bruit de lecture est du même ordre de grandeur que le signal d'un photon.

Les capteurs emCCD et ebCMOS possèdent des précisions de localisation comparables malgré la différence d'efficacité quantique. Le principe d'amplification du capteur ebCMOS est donc validé pour le suivi de sources ponctuelles à bas niveau de lumière, où la détermination de la position du photon à l'intérieur du pixel apporte un avantage significatif.

Dans la partie suivante, nous nous intéresserons à la comparaison expérimentale de ces détecteurs sur bancs de tests.

Chapitre 4

Mesures expérimentales de précision de localisation

Dans ce chapitre, un point source contrôlé (taille, signal, bruit de fond) est focalisé sur le plan de détection des caméras sur banc de test. Ce point source nous permettra une mesure expérimentale de la précision de localisation des différents détecteurs utilisés dans notre étude.

Le chapitre s'organise en 4 parties. La partie 4.1 concerne la calibration du point source : son signal, sa taille et le bruit de fond associé. Nous décrirons aussi les méthodes utilisées pour mesurer expérimentalement la précision de localisation de la position du point source.

Dans la partie 4.2, nous comparerons les trois caméras sCMOS, emCCD et ebCMOS. Nous ferons varier les paramètres disponibles : signal, fréquence d'acquisition et gain. Les résultats obtenus seront comparés aux analyses Cramér-Rao du chapitre 3.6.

Dans la partie 4.3, nous mènerons une étude de la sensibilité au bruit de fond du capteur ebCMOS. Finalement, la capacité à suivre plusieurs centaines de points sources avec la caméra ebCMOS sera testée dans la partie 4.4, avec l'utilisation d'une matrice de microlentilles.

4.1 Principe et calibration de l'expérience de focalisation d'un point source contrôlé

La source de photons utilisée pour les mesures de précision de localisation est un point source focalisé par un objectif de microscope inversé. Une LED [1] pulsée à travers une fibre optique est utilisée pour calibrer le signal. Le schéma du montage expérimental est donné par la Fig. 4.1.

Les choix de l'objectif (50× et 10×) et de la fibre optique (8, 50 et 400 μm de diamètre) permettent une variation de la taille du point source. Une sphère intégrante dont le signal est contrôlé peut éclairer le capteur pour créer du bruit de fond.

1. Ocean Optics LS-640 Red LED Pulsed Light Source 50 μW

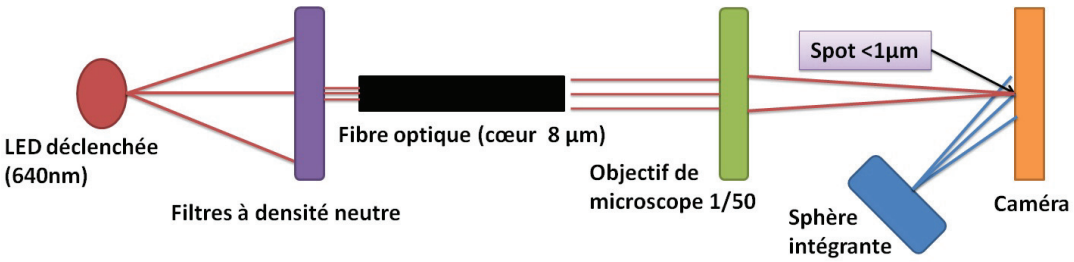


FIGURE 4.1 – Schéma du montage de la génération d'un point source. Une fibre optique de diamètre D (=8, 50 ou 400 μm) focalise la lumière pulsée par une LED à travers un objectif inversé ($\times$10 ou $\times$50) sur la matrice de pixels du détecteur. Une sphère intégrante peut être ajoutée pour augmenter le bruit de fond.

4.1.1 Calibration du signal délivré par la source

La calibration du signal est effectuée avec la caméra l'ebCMOS en mode comptage de photons. La LED est déclenchée pour qu'il y ait un pulse par image. Les images sont accumulées pour différentes valeurs d'intensité, puis le nombre moyen de photons est calculé. La mesure sera ensuite renormalisée en prenant en compte l'efficacité quantique de la photo-cathode S20 à cette longueur d'onde (640 nm), qui est de l'ordre de 8 %, et de la rétrodiffusion qui correspond à une perte de 18 % du signal.

L'intensité est donnée en unité arbitraire, allant de 0.5 à 7.5. Nous nous intéressons à la distribution du nombre moyen de photons détectés en fonction de l'intensité, donnée par la Fig. 4.2.

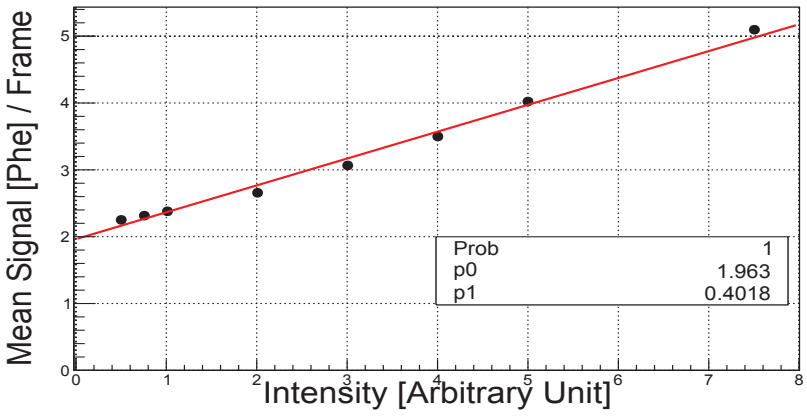


FIGURE 4.2 – Nombre moyen de photons détectés par l'ebCMOS à 125 fps pour différentes intensités de la lampe. Le fit nous donne 0.40 phe/image/I ou 100 phe/s/I.

Le signal donné par la source est bien linéaire. Les données mesurées dans cette calibration sont résumées dans la table 4.1 :

Intensité de la lampe (unité arbitraire)	0.5	0.75	1	2	3	4	5	7.5
Nombre moyen de photons par image	2.25	2.31	2.37	2.65	3.06	3.49	4.02	5.09
Nombre moyen de photons par seconde	562	577	592	662	765	872	1005	1272

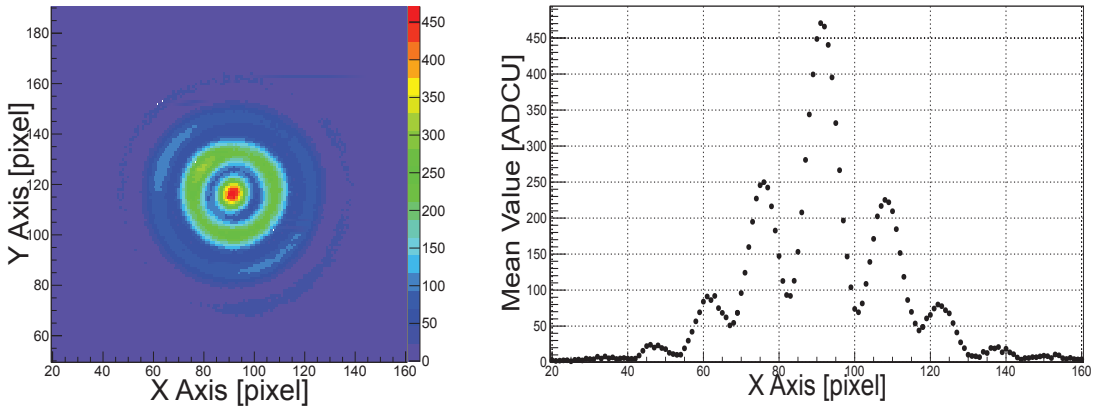
TABLE 4.1 – Nombre moyen de photons détectés par l'ebCMOS à 125 fps pour différentes intensités de la lampe.

Le signal mesuré est de l'ordre de 600 photons par seconde pour I=1. Le signal absolu est alors de l'ordre de 9 150 photons par seconde par unité d'intensité.

4.1.2 Calibration spatiale

Les comparaisons de détecteurs sont effectuées avec un objectif 10 × [2] et une fibre optique de 8 μm de diamètre. La taille du point source sur capteur est alors inférieure à 1 μm.

La caméra sCMOS ayant un petit pixel (6.5 μm) est utilisée pour imager le point source. Le point source est observé à travers un objectif 50 × [3]. Nous nous intéressons au profil d'intensité pour en déduire la taille. Les profils 1D et 2D sont donnés par la Fig. 4.3 .



(a) (b)

FIGURE 4.3 – Profil en intensité du point source utilisant une fibre optique de diamètre 8 μm focalisé par un objectif 10× et observé à travers un objectif 50× par la caméra sCMOS : (a) en 2D. L'échelle de couleur correspond au nombre de coups. (b) en 1D selon l'axe X.

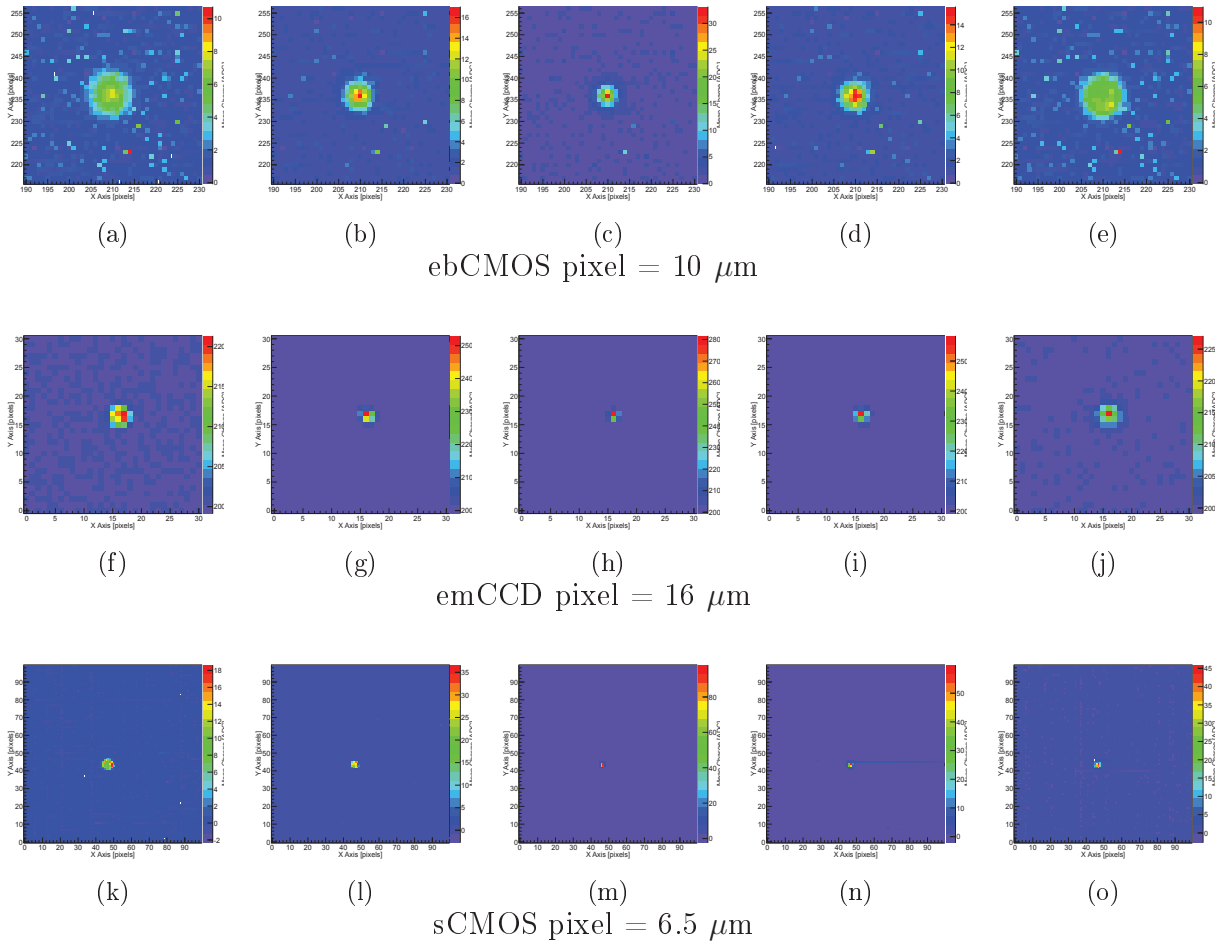
2. Objectif Mitutoyo Plano Apochromatique 10×, ouverture numérique 0.28, WD=33.5 mm
3. Objectif Mitutoyo Plano Apochromatique 50×, ouverture numérique 0.55, WD=13.0 mm

L'image de diffraction est dans la région de diffraction de Fraunhofer, car la distance entre le plan objet et le plan image est de l'ordre de la dizaine de centimètres. Elle ne correspond pas à une tache d'Airy d'un point source car la fonction remonte à plus de 50 % du premier pic.

Nous nous intéressons aussi à la taille du point source focalisé sur les différents capteurs. Les courbes de focalisation sont obtenues en faisant varier la distance entre la caméra et le point source à l'aide d'un moteur [4] par pas de 10 μm. Cette direction sera notée z. La valeur de l'intensité maximale et l'écart-type du fit gaussien du profil d'intensité sont mesurées sur l'image intégrée. La focalisation sera alors au z du maximum d'intensité maximale et au minimum d'écart-type.

Le passage à la focalisation pour les trois caméras est illustré par la Fig. 4.4, qui montre les images obtenues pour différentes valeurs de Δz (écart au point focal).

4. Moteur Polytech PI M-405-2S



(a) (b) (c) (d) (e)

ebCMOS pixel = 10 μm

(f) (g) (h) (i) (j)

emCCD pixel = 16 μm

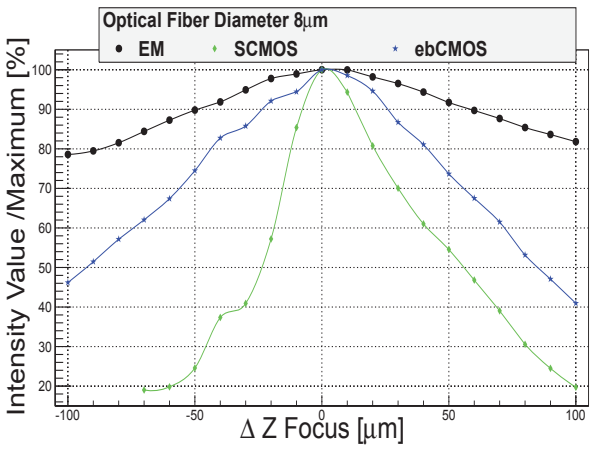
(k) (l) (m) (n) (o)

sCMOS pixel = 6.5 μm

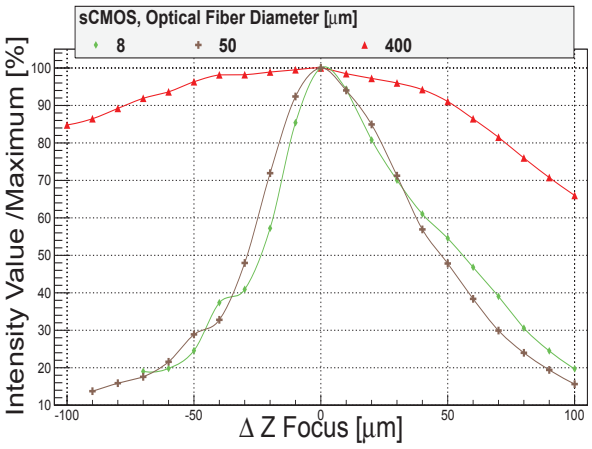
FIGURE 4.4 – Images intégrées à différents z. Les écarts sont données en μm par rapport au point focal. L'échelle de couleur donne le nombre d'ADCU.
ebCMOS à 125 fps et 3 kV, pixel = 10 μm : (a) Δz= -180. (b) Δz= -90. (c) Δz=0. (d) Δz= 90. (e) Δz= 180.
emCCD sans gain à 10 fps, pixel = 16 μm : (f) Δz= -100. (g) Δz= -50. (h) Δz=0. (i) Δz= 50. (j) Δz= 100.
sCMOS à 100 fps, pixel = 6.5 μm : (k) Δz= -70. (l) Δz= -40. (m) Δz=0. (n) Δz= 40. (o) Δz= 70.

Une symétrie est visible pour les caméras emCCD et ebCMOS, mais le point source se défocalise plus lentement pour le sCMOS aux Δz croissants. Pour la caméra ebCMOS, le point source mesuré est plus large à cause des PSF du tube et de diffusion.

Nous nous intéressons tout d'abord à la courbe de focalisation en intensité donnée en Fig. 4.5, montrant l'évolution de l'intensité maximale en fonction de Δz, par rapport à l'intensité maximale trouvée pour Δz=0.



(a)

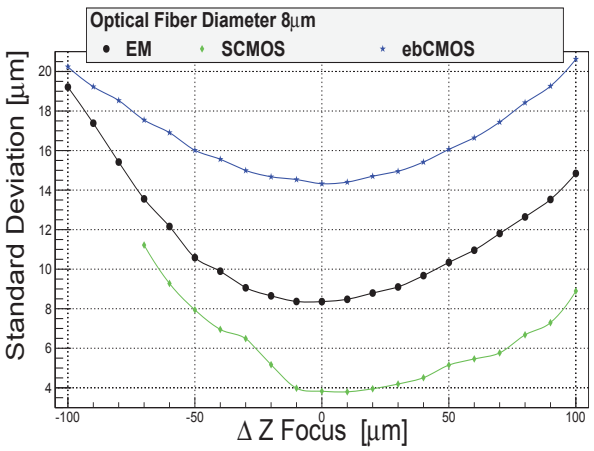


(b)

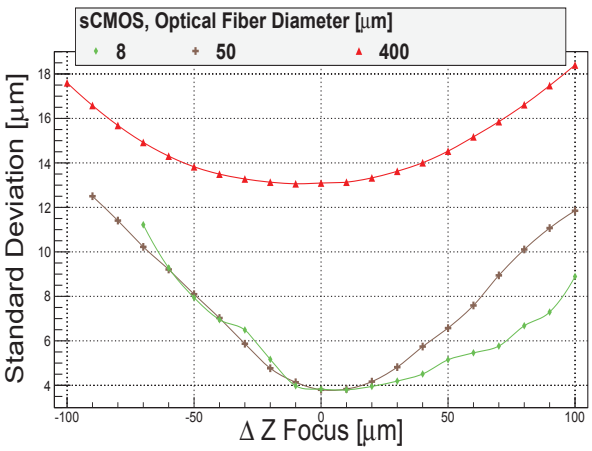
FIGURE 4.5 – Évolution du rapport de l'intensité du pixel maximum en fonction de Δz par rapport à l'intensité maximale à Δz=0. (a) Distributions pour les trois détecteurs emCCD (EM), sCMOS et ebCMOS pour une fibre optique de 8 μm. (b) Distributions pour le détecteur sCMOS pour trois tailles de fibre optique, 8, 50 et 400 μm.

Les courbes ont globalement la même forme. La courbe de focalisation du sCMOS pour la fibre à 8 μm est asymétrique, se défocalisant moins rapidement en s'éloignant du détecteur. L'absence d'asymétrie marquée dans les autres courbes s'explique par la taille du point source par rapport à la taille du pixel, qui ne permet plus de voir les effets fins de défocalisation.

Nous nous intéressons maintenant à la courbe de focalisation en fonction de la largeur l'image du point source, donnée en Fig. 4.6. Elle montre l'évolution de l'écart-type du profil d'intensité du point source en fonction de Δz. Les valeurs minimales de chaque mesure sont données dans la table 4.2.



(a)



(b)

FIGURE 4.6 – Évolution de l'écart-type du profil d'intensité des points sources en fonction deΔz. (a) Distributions pour les trois détecteurs emCCD (EM), sCMOS et ebCMOS pour une fibre optique de 8 μm. (b) Distributions pour le détecteur sCMOS pour trois tailles de fibre optique, 8, 50 et 400 μm.

Diamètre de la fibre optique [μm]	8	50	400	Détecteur
Écart-type du point source au point focal [μm]	8.35	8.75	16.43	emCCD
	3.82	4.22	13.09	sCMOS
	14.32	15.55	19.86	ebCMOS

TABLE 4.2 – Mesure de l'écart-type du profil d'intensité du point source au point focal, pour les trois détecteurs pour différentes tailles de fibre optique.

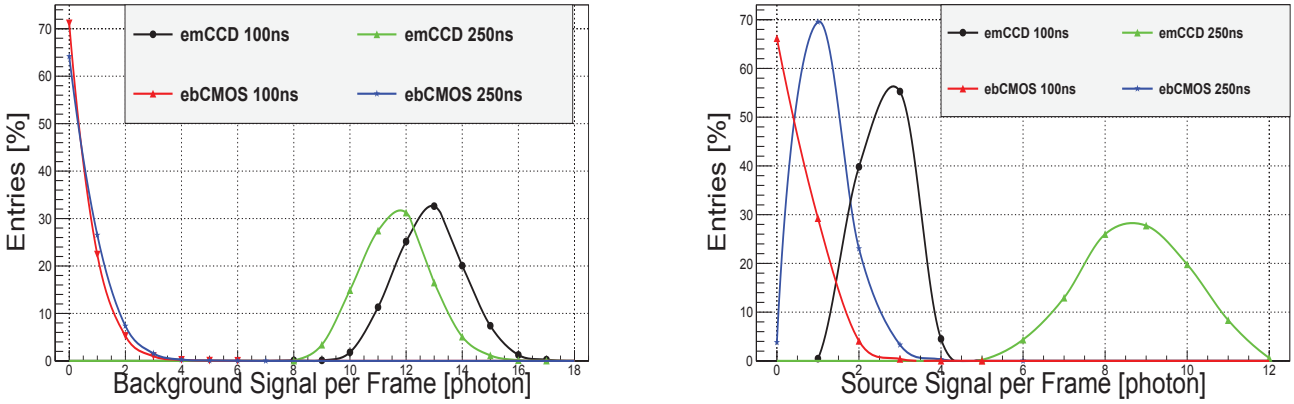
Le capteur sCMOS est illuminé par l'avant. La taille plus petite du pixel permet aussi de mieux échantillonner le point source. La valeur mesurée pour le capteur sCMOS sera utilisée comme référence de la taille du point source, en supposant qu'il n'y a pas de diffusion des charges. La valeur mesurée pour la fibre de 8 μm est supérieure à la moitié de la taille du pixel, limitant la précision de localisation. Pour la fibre de 400 μm, l'écart-type mesurée est de l'ordre de 13 μm soit 30.615 μm de largeur à mi-hauteur pour une taille théorique de point source de 40 μm.

Le capteur emCCD est éclairé en face arrière, ce qui peut induire une diffusion des charges et une augmentation de la PSF optique. La différence entre l'écart-type trouvé pour les caméras sCMOS et emCCD pour la fibre de 400 μm peut être expliquée par cette diffusion.

4.1.3 Signal reçu et quantification de l'efficacité quantique relative entre l'emCCD et l'ebCMOS

L'efficacité quantique relative entre l'emCCD et de l'ebCMOS est mesurée en utilisant le mode de comptage de photons. Pour cela deux acquisitions de 20 000 images sont effectuées pour deux intensités : I=0.1 et 0.25. Nous nous intéressons ensuite à la distribution du nombre de photons détectés par image.

Pour ne prendre en compte que le signal de la source, il faut retrancher le bruit de fond. Les Fig. 4.7a et Fig. 4.7b montrent les distributions du nombre moyen de photons reçus par image pour les deux détecteurs pour les deux intensités, respectivement dans une zone de bruit et dans la zone du point source.



(a) (b)

FIGURE 4.7 – Distribution moyenne du nombre de photons détectés par image pendant l'acquisition aux deux intensités ($I = 0.1$ et $I = 0.25$) : emCCD 227 fps, $G = 300$ et ebCMOS 125 fps, 2.8 kV. (a) Zone en dehors du point source. (b) Zone du point source.

La zone utilisée pour le bruit de fond est plus grande que celle du point source, ce qui explique la valeur du bruit. Cependant le bruit de fond varie très peu entre les deux intensités. Il provient donc essentiellement du bruit CIC pour l'emCCD et du courant d'obscurité photo-cathode pour l'ebCMOS.

Le courant d'obscurité de l'emCCD est de l'ordre de douze faux par image alors qu'il est de l'ordre de un pour une surface équivalente pour l'ebCMOS. Ce facteur douze est ce qui permet à l'ebCMOS d'avoir un meilleur rapport signal sur bruit que l'emCCD malgré la différence d'efficacité quantique.

Le bruit est normalisé par rapport à la surface du point source, puis est soustrait pour obtenir le signal en nombre de photons par seconde. Les résultats obtenus sont donnés dans la table 4.3.

Détecteur	emCCD	ebCMOS	emCCD	ebCMOS
Intensité du point source [Unité arbitraire]	0.1	0.1	0.25	0.25
Bruit [ph/sec/surf]	240	3.96	216	5
Signal [ph/sec]	352	44.1	1560	152
Rapport signal sur bruit	1.5	11	7.2	30

TABLE 4.3 – Signal moyen de la source et du bruit en nombre de photons par seconde. Le bruit de fond est normalisé en surface par rapport à celle de la source.

L'efficacité quantique relative est alors comprise entre 8 et 10.3. Pour la longueur d'onde utilisée ($\lambda = 640$ nm) l'efficacité quantique de l'emCCD est de l'ordre de 90 %, et celle de l'ebCMOS pour une photo-cathode S20 de l'ordre de 8 %, soit un rapport théorique

de 11.25. La baisse de l'efficacité quantique relative à faible signal de l'emCCD est due à l'efficacité quantique effective du comptage de photons qui n'est que de l'ordre de 60 % pour cette valeur de signal.

Bien que l'ebCMOS possède une plus faible efficacité quantique il possède un bruit nettement plus faible. Le rapport signal sur bruit de l'ebCMOS est 7 fois supérieur à celui de l'emCCD à faible signal.

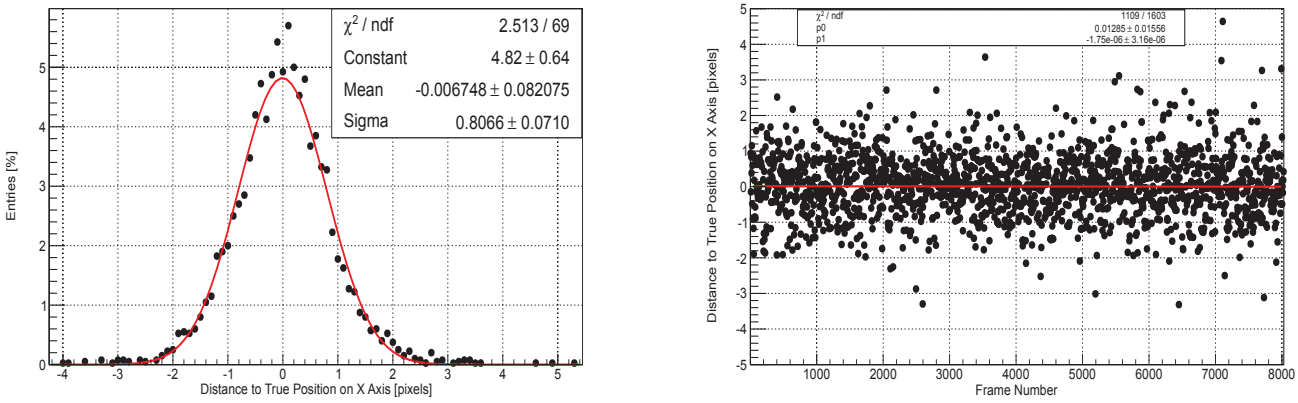
Pour une efficacité quantique équivalente, le capteur ebCMOS est plus de 30 fois moins bruyant que l'emCCD utilisé.

4.1.4 Méthode de calcul de la précision de localisation sur la position estimée

Nous nous intéressons à la précision de localisation de la position de la source de photons. La précision de localisation est mesurée sur des acquisitions de 20 000 images. La précision de localisation est définie comme l'écart-type de la distribution des positions obtenues. Pour cela, il faut :

1. Accumuler l'information disponible autour du point source (charge ou photons) pendant un nombre d'images T.
2. Mesurer la position estimée du point source par centre de gravité de la charge des pixels ou des photons détectés.
3. Effacer l'information et réitérer 1 et 2 pour 20 000 / T itérations.

La Fig. 4.8a montre la distribution obtenue pour $T = 5$ pour l'emCCD avec le point source à l'intensité $I = 0.1$. Les variations d'écart à la position vraie en fonction du lot d'images sont données sur la Fig. 4.8b.



(a) (b)

FIGURE 4.8 – Acquisition avec l'emCCD de 20 000 images du point source pour une intensité $I = 0.1$ à une cadence de 227 fps et un gain EM G=300 sur 31 × 31 pixels. (a) Distribution de l'écart à la position vraie du point source mesuré pour des amas de cinq images consécutives, et fit gaussien. (b) Suivi de l'écart à la position vraie du point source mesuré à chaque image au cours du temps et fit polynomial de degré 1.

Ainsi, pour T=5 et I=0.1, la précision de localisation de l'emCCD est de 12.9 μm. La Fig. 4.8b montre que la position mesurée est en moyenne identique à la position vraie, et que l'écart peut aller jusqu'à 5 pixels.

4.1.5 Méthode de calcul de l'efficacité et du taux de faux

La précision de localisation n'est pas le seul facteur important dans la localisation de particules, il faut aussi s'intéresser à l'efficacité et au taux de faux de la méthode. Pour cela, nous utilisons des lots d'images comme précédemment.

1. Accumuler l'information disponible (charge ou photons) pendant un nombre d'images T.
2. Appliquer des coupures sur la charge ou le nombre de photons pour détecter des sources et leurs positions.
3. Comparer ces positions à la position connue de la source. Une position compatible augmente alors le nombre de sources validées.
4. Effacer l'information et réitérer 1, 2 et pour 20 000 / T itérations.

Après accumulation de 20 000 images, n_i sources sont identifiées par l'algorithme. Ces n_i sources sont comparées à l'emplacement réelle du point source et n_v sont validées. Le nombre total de sources présentes sur l'ensemble de l'acquisition est n_p. Il n'y a ici qu'un point source, donc $n_p = 20000/T$.

L'efficacité η représente le rapport entre le nombre de sources identifiées et le nombre de sources présentes. La pureté ρ représente le rapport entre le nombre de sources validées et le nombre total de sources identifiées.

$$\eta = 100 \times \frac{n_v}{n_p} \tag{4.1}$$

$$\rho = 100 \times \frac{n_v}{n_i} \tag{4.2}$$

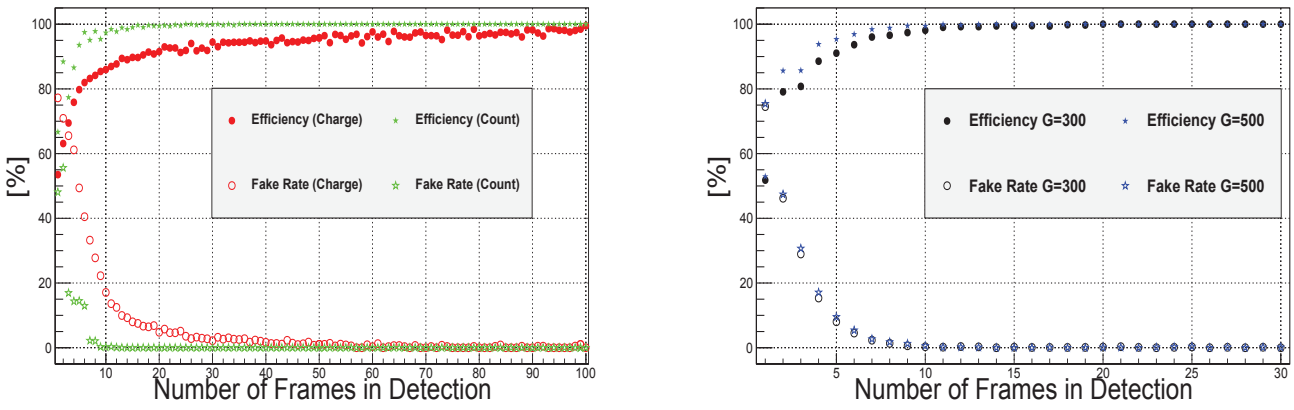
Le taux de faux est défini comme $100 - \rho$. Il correspond au nombre de sources détectées ne correspondant pas à la position vraie du point source, normalisé par rapport au nombre total de cibles détectées.

4.2 Comparaison des caméras ebCMOS, sCMOS et emCCD

4.2.1 Efficacité et taux de faux

La méthode de suivi est simple et recherche des accumulations de signal réparties dans une zone de la taille du point source. Pour une détection en charge, la valeur du rapport signal sur bruit des pixels est sommée. Pour une détection en photons, le nombre de photons est compté. Dans les deux cas, une valeur seuil est appliquée pour différencier le signal du bruit.

Cette méthode est utile dans le cas de l'ebCMOS pour étudier l'intérêt de la méthode de comptage de photons. Pour l'emCCD, elle permet de voir les avantages et inconvénients à augmenter le gain EM. Les résultats pour I=0.1 et 0.25 sont donnés sur la Fig. 4.9a pour l'ebCMOS en mode charge et en mode photons, et sur la Fig. 4.9b pour un gain emCCD G=300 et 500.



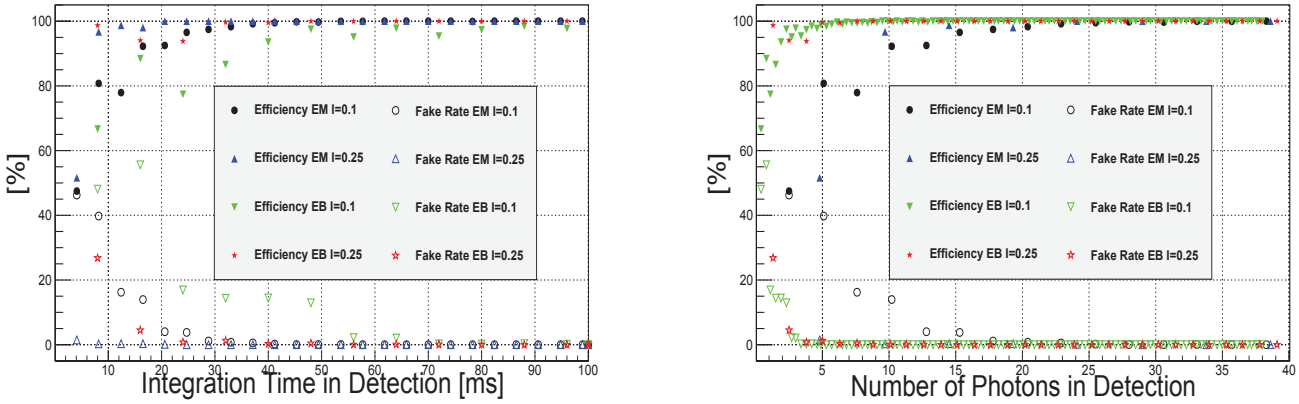
(a) (b)

FIGURE 4.9 – Évolution de l'efficacité du suivi et du taux de faux en fonction du nombre d'images utilisées pour le suivi pour une intensité $I = 0.1$. (a) ebCMOS avec sélection en charge et en méthode de comptage. (b) emCCD en mode charge avec deux gains différents (G=300 et G=500).

La méthode en comptage de photons permet une bien meilleure efficacité et un taux de faux réduit par rapport à la méthode en charge. Pour l'emCCD, l'avantage d'augmenter le gain n'est pas clair : l'efficacité augmente mais le taux de faux aussi.

La méthode de comptage de photons permet un meilleur suivi, elle sera donc utilisée pour comparer les deux détecteurs. Nous comparons les détecteurs en visualisant l'évolution de la précision de localisation en fonction du temps d'intégration, sur la Fig. 4.10a.

Afin de comparer les processus de multiplication et leurs bruits, il faut s'affranchir de l'efficacité quantique. La Fig. 4.10b montre l'évolution de l'efficacité et du taux de faux en fonction du nombre moyen de photons détectés par lot d'images.



(a) (b)

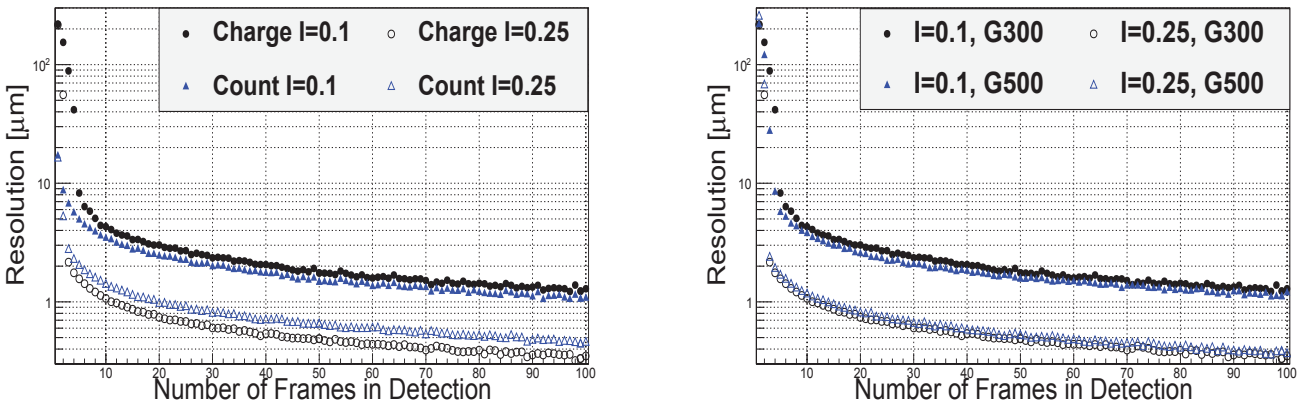
FIGURE 4.10 – Comparaison de l'ebCMOS et de l'emCCD en mode comptage de photons pour deux intensités (0.1 et 0.25) avec l'évolution de l'efficacité du suivi et du taux de faux : (a) En fonction du nombre d'images utilisées pour le suivi. (b) En fonction du nombre moyen de photons détectés dans le suivi.

En fonction du temps d'intégration, les deux détecteurs sont comparables malgré la différence d'efficacité quantique, même si l'ebCMOS souffre du manque de photons à faible temps d'intégration. Il lui faut en effet 50 ms à l'intensité I=0.1 pour obtenir une pureté équivalente à l'emCCD.

Le bruit plus important de l'emCCD est significatif si les efficacités sont comparées pour un nombre de photons détectés. Dans ce cas, il est nécessaire à l'emCCD à bas niveau de lumière de recevoir une dizaine de photons pour permettre une bonne efficacité et une bonne pureté, et une quinzaine pour avoir les mêmes performances que l'ebCMOS.

4.2.2 Précision de localisation du point source

Nous étudions la précision de la localisation du point source en fonction des détecteurs en suivant la même démarche. Les Fig. 4.11a et 4.11b montrent l'évolution de la précision de localisation en fonction du nombre d'images dans la détection pour l'emCCD pour I=0.1 et 0.25 (respectivement 1.55 et 6.9 photons détectés en moyenne par image), en comparant respectivement la méthode en charge et en comptage de photons puis en comparant l'effet du gain EM.



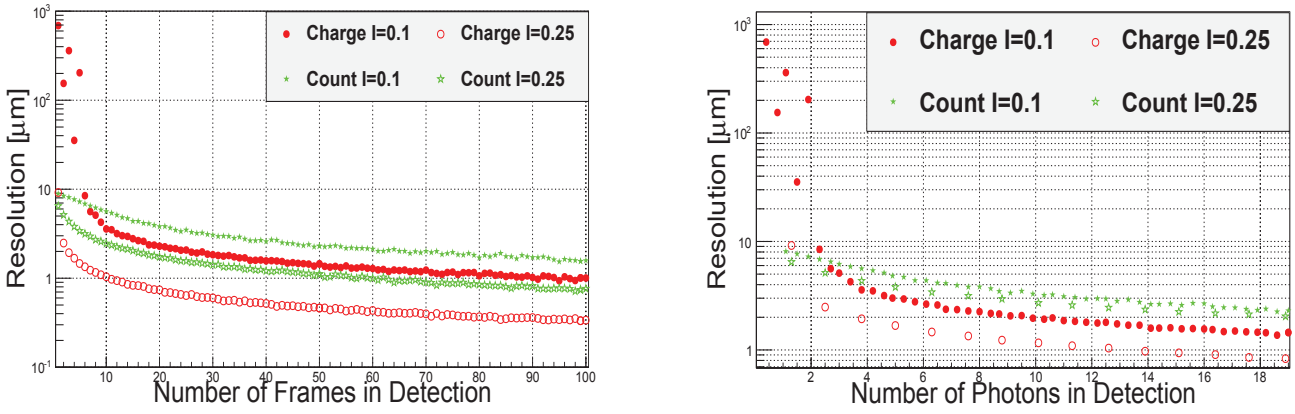
(a) (b)

FIGURE 4.11 – Évolution de la précision de localisation de la position du point source en fonction du nombre d'images utilisées pour le suivi, pour deux intensités (100 et 250). (a) Comparaison du fit de charge et du comptage de photons pour l'emCCD. (b) Comparaison des gains emCCD (300 et 500).

La méthode par comptage de photons est plus précise que la méthode en charge pour les faibles flux. En effet, plus le signal augmente plus la distribution de multiplication électronique est gaussienne, donc moins les pixels sont sensibles à l'ENF.

L'augmentation du gain EM pour une faible intensité permet une amélioration de la précision de localisation de l'ordre de 2 à 8 %. L'augmentation du gain augmente l'efficacité quantique effective, en améliorant le rapport signal sur bruit des pixels. Pour une intensité plus forte, l'augmentation du gain dégrade la précision de localisation, de 8 à 23 % à cause de l'augmentation du bruit CIC.

Les deux méthodes sont comparées aussi pour l'ebCMOS. La Fig. 4.12a montre l'évolution de la précision de localisation en fonction du nombre d'images, pour les deux intensités (respectivement 0.352 et 1.216 photons détectés en moyenne par image) pour les méthodes de comptage et de charge. La Fig. 4.12b montre cette évolution en nombre moyen de photons détectés.



(a) (b)

FIGURE 4.12 – Comparaison du fit de charge et du comptage de photons de l'ebCMOS avec l'évolution de la précision de localisation sur la mesure de la position du point source : (a) En fonction du nombre d'images utilisées pour le suivi. (b) En fonction du nombre moyen de photons détectés dans le suivi.

La méthode utilisant la charge devient rapidement plus précise que la méthode en comptage de photons. La méthode de détection de photons utilise la charge pour reconstruire la PSF de diffusion. Lorsque la charge s'accumule, il n'est plus nécessaire de reconstruire de clusters pour détecter les photons. Le rapport signal sur bruit des pixels devient alors suffisant.

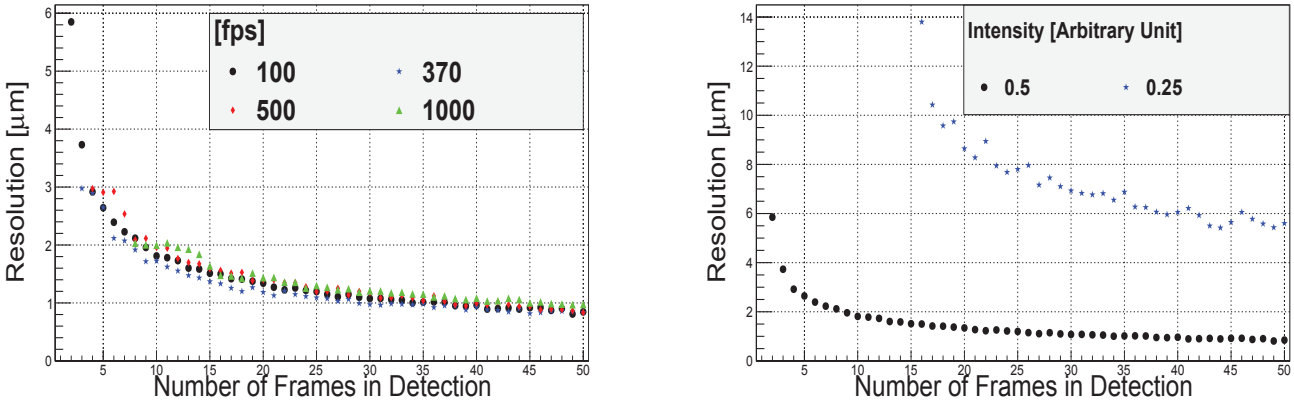
Pour un nombre moyen de photons faible, la méthode des clusters devient avantageuse. Elle permet de choisir uniquement les pixels apportant du signal, en utilisant le modèle de diffusion des charges secondaires. Ce cas de figure est typique de sources en mouvement, où il devient compliqué de sommer la charge pour fitter la PSF.

A faible nombre de photons pour le mode comptage, la précision de localisation n'augmente pas brutalement comme les courbes classiques en $1/\sqrt{\text{Signal}}$. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que le mode de comptage permet d'éliminer les images sans photons détectés, biaisant en un sens la moyenne Poisson de la source.

Précision de localisation du capteur sCMOS

Nous nous intéressons maintenant à la précision de localisation du sCMOS. En premier lieu, nous regardons l'influence de la vitesse d'acquisition sur la précision de localisation. Quatre fréquences de lecture sont étudiées : 100, 370, 500 et 1000 fps. L'intensité du pulse est adaptée pour obtenir un signal moyen constant pour les quatre acquisitions. La distribution de la précision de localisation en fonction du temps est donnée en Fig. 4.13a.

Nous nous intéressons ensuite à l'influence du signal sur la précision de localisation. La distribution de la précision de localisation en fonction du temps pour différentes intensités (0.1 et 0.25) est donnée en Fig. 4.13b.



(a) (b)

FIGURE 4.13 – (a) Distribution de la précision de localisation en fonction du temps pour différentes vitesses de lecture (100, 370, 500 et 1000 fps). (b) Distribution de la précision de localisation en fonction du temps pour différentes intensités (0.1 et 0.25), avec une vitesse de lecture de 100 fps.

La cadence de lecture n'a pas un impact significatif sur la précision de localisation. Cela correspond bien aux résultats obtenus précédemment pour le bruit induit par une augmentation de la vitesse de lecture.

La valeur de l'intensité apporte quant à elle un impact majeur sur la précision de localisation. Pour une intensité de 0.5, le nombre de photons par image dépasse suffisamment le bruit de lecture pour donner une précision de localisation suffisante. Pour l'intensité de 0.25, il faut au minimum 15 images pour commencer à s'affranchir du bruit de lecture. La limite de détection du sCMOS est atteinte : la précision de localisation ne suit pas complètement la loi en $1/\sqrt{\text{Signal}}$.

Comparaison des détecteurs

Comme les détecteurs n'ont pas la même cadence de lecture, nous nous intéressons à la précision de localisation en fonction du temps d'intégration. Les résultats sont donnés dans la Fig. 4.14.

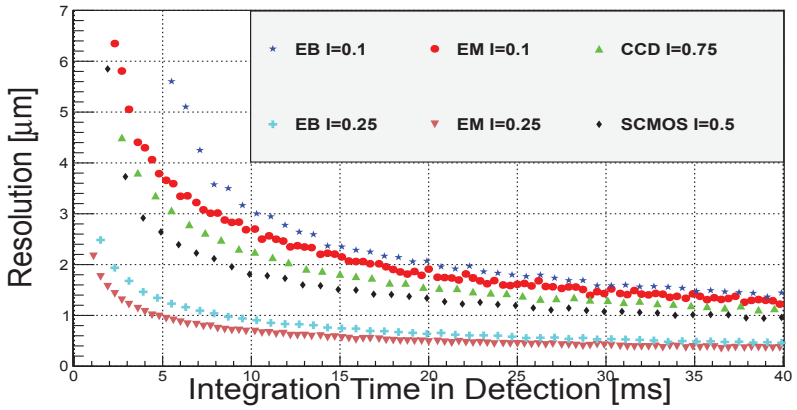


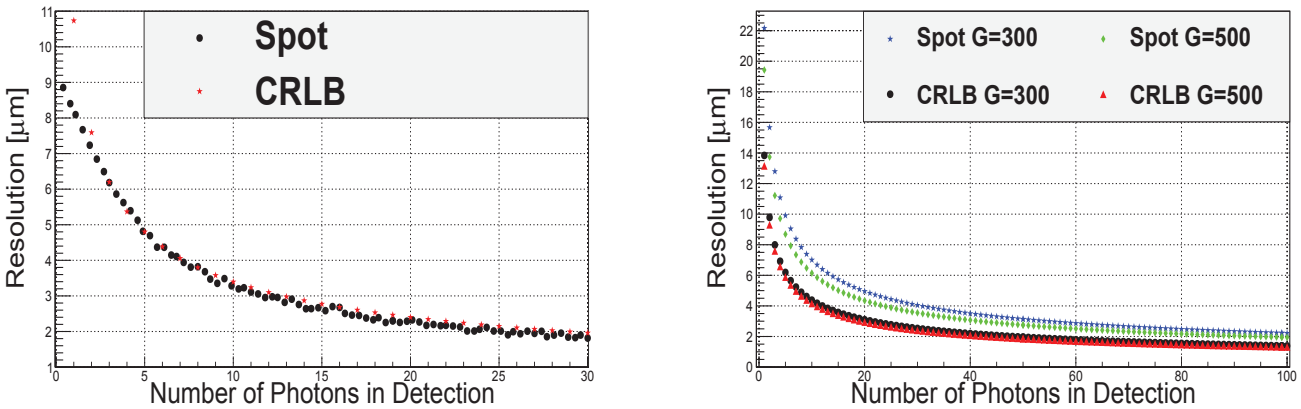
FIGURE 4.14 – Évolution de la précision de localisation en fonction du temps d'intégration. Comparaison des détecteurs ebCMOS, emCCD, CCD et sCMOS.

Les résultats obtenus montrent une forte similarité entre les caméras ebCMOS et emCCD. Pour un très bas flux, il faut respectivement 5 et 7.5 fois plus de photons aux caméras sCMOS et CCD pour obtenir des précisions de localisation équivalentes.

Les résultats sont comparables à ceux du calcul de limite de Cramér-Rao, avec l'emCCD ayant une meilleure précision de localisation. L'écart est suffisamment léger pour être annulé par l'utilisation d'une photo-cathode de dernière génération.

Comparaison avec les résultats du calcul de limite de Cramér-Rao

Nous nous intéressons à la différence entre les résultats obtenus par calcul de limite de Cramér-Rao et les résultats expérimentaux. Les comparaisons de précision de localisation en fonction du nombre de photons détectés sont données sur la Fig. 4.15 pour l'ebCMOS et l'emCCD.



(a) (b)

FIGURE 4.15 – Évolution de la précision de localisation en fonction du nombre de photons détectés. Comparaison des résultats expérimentaux avec les calculs de limite de Cramér-Rao. (a) ebCMOS. (b) emCCD.

Les résultats obtenus selon les deux méthodes sont très proches pour l'ebCMOS. Pour l'emCCD, il existe une différence non négligeable qui s'atténue avec le nombre de photons.

La limite de la comparaison est atteinte ici. Le nombre de photons détectés est le même, mais dans le cas du point source, le bruit de lecture est ajouté pour chaque image sommée afin d'obtenir un signal moyen plus important. Nous avons étudié cette méthode car nous nous intéressons au suivi dynamique de sources à bas niveau de lumière. L'intérêt de cette approche est de nous donner une précision de localisation minimale atteignable en ayant une bonne connaissance de la vitesse de la source.

Ce résultat montre par ailleurs que l'ebCMOS en mode comptage est relativement indépendant du bruit de lecture. Et comme le courant d'obscurité est très faible, les deux méthodes donnent des résultats très proches.

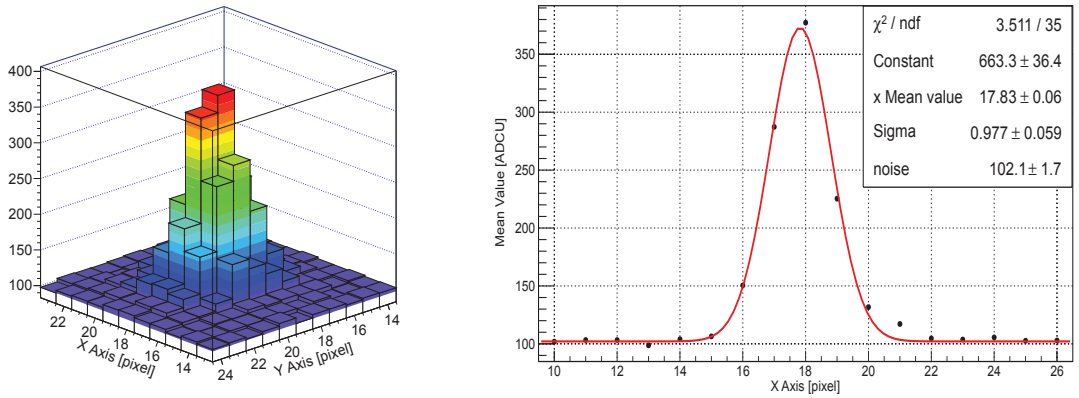
4.3 Mesure de l'effet du bruit de fond sur la précision de localisation

Les expériences de vidéo-microscopie sont généralement impactées par un fort bruit de fond. Il est alors nécessaire d'étudier l'influence du bruit de fond sur la précision de localisation.

4.3.1 Calibration du point source

Dans cette seconde expérience, nous utiliserons un objectif 50× pour former le point source, ainsi qu'une sphère intégrante pour ajouter le bruit de fond.

Les profils d'intensité du point source sont imagés par la caméra sCMOS à travers un objectif 10× placé au point focal de l'objectif 50×. Ils sont donnés par la Fig. 4.16



(a) (b)

FIGURE 4.16 – Profil d'intensité du point source focalisé par un objectif 50×. Image intégrée obtenue à travers un objectif 10× et la caméra sCMOS. (a) Profil 2D, l'échelle de couleur donne le nombre d'ADCU. (b) Profil 1D.

La largeur à mi-hauteur du point source à travers l'objectif 10× est de 15 μm, soit 1.5 μm, ce qui correspond à la tache de diffraction.

4.3.2 Génération et contrôle du bruit de fond

Nous nous intéressons aux différentes conditions de bruit de fond apporté par la sphère intégrante. L'acquisition est effectuée avec une caméra S20 à une cadence de 125 fps. Les différentes conditions expérimentales sont quantifiées en utilisant le mode comptage.

Quatre conditions de bruit sont étudiées, du cas sans bruit à un bruit ajouté très important par rapport au signal émis par le point source. La distribution du nombre de photons détectés par image pour chacune des conditions est donnée par la Fig. 4.17.

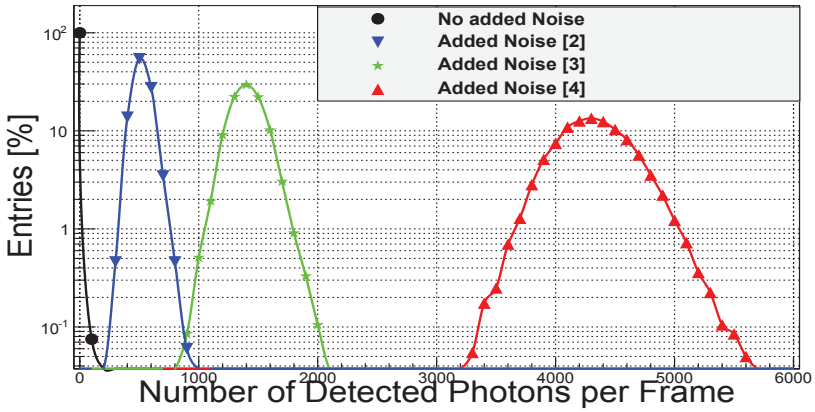
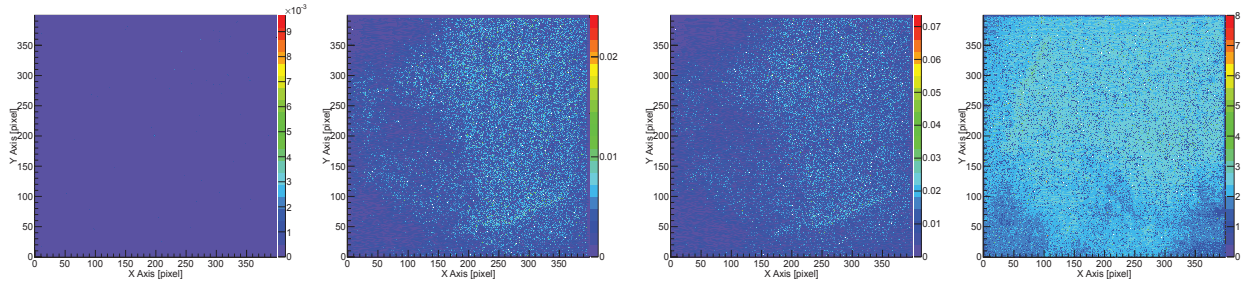


FIGURE 4.17 – Distribution du nombre de photons reçus pour les différents mode de bruit de fond avec la caméra ebCMOS en mode comptage, à 125 fps, 2.8 kV et une photo-cathode S20.

Le courant d'obscurité de la photo-cathode S20 est très faible, de l'ordre de 3 photons par image. Le point source s'étale sur moins de 100 pixels, soit un bruit de courant d'obscurité équivalent à 1,875 $\times 10^{-3}$ faux par image.

L'effet sur le capteur des différentes conditions de bruit de fond est donné par la Fig. 4.18, avec les images intégrées de photons sur 20 000 images du point source à l'intensité $I = 0.5$ pour les quatre conditions de bruit de fond.



(a) (b) (c) (d)

FIGURE 4.18 – Images intégrées de photons sur 20 000 images, pour le point source avec une intensité I=0.5, à 125 fps, 2.8 kV. L'échelle de couleur correspond au nombre moyen de photons détectés par pixel par image. (a) Sans bruit de fond ajouté. (b) Condition [2]. (c) Condition [3]. (d) Condition [4].

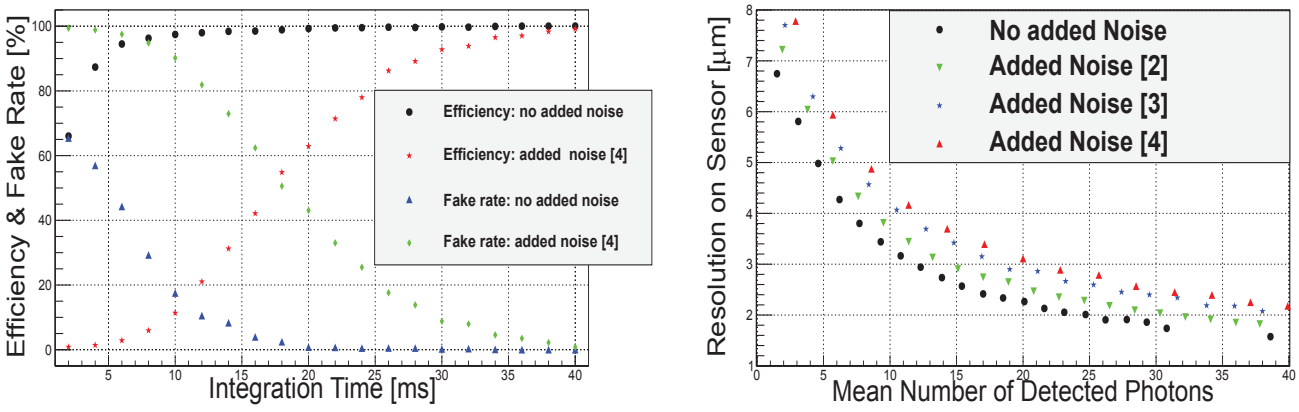
Le bruit de fond ajouté n'est pas complètement homogène car la sphère intégrante est légèrement décalée par rapport au plan du détecteur. La zone du point source s'étend sur quelques pixels au centre de la matrice (200,200). Dans le cas sans bruit, la valeur moyenne des pixels dans cette zone est de l'ordre de 3 $\times 10^{-3}$ photons par image. Le nombre moyen de photons détectés par image pour chaque condition est donné par la table 4.4.

ID du niveau de bruit	1	2	3	4
Nombre de photons moyen par image (I=500ns)	2.25	520	1407	4324

TABLE 4.4 – Nombre moyen de photons reçus par image de l'expérience du point source pour une intensité I=0.5, à 125 fps et une haute tension appliquée HV=2.8 kV.

4.3.3 Mesures de précision de localisation, d'efficacité et de taux de faux

Comme précédemment, les valeurs d'efficacité, de taux de faux et de précision de localisation sont mesurées pour les quatre conditions de bruit de fond. La Fig. 4.19a montre l'évolution de l'efficacité et du taux de faux en fonction du temps d'intégration, et la Fig. 4.19b montre l'évolution de la précision de localisation.



(a) (b)

FIGURE 4.19 – Mesures de position d'un point source avec la caméra ebCMOS pour une cadence de lecture de 125 fps et une haute tension à 2.8 kV. (a) Évolution de l'efficacité et du taux de faux du suivi en fonction du temps d'intégration sans bruit de fond et avec la condition de bruit [4]. (b) Évolution de la précision de localisation sur la position du point source en fonction du signal moyen reçu, pour les quatre niveaux de bruit.

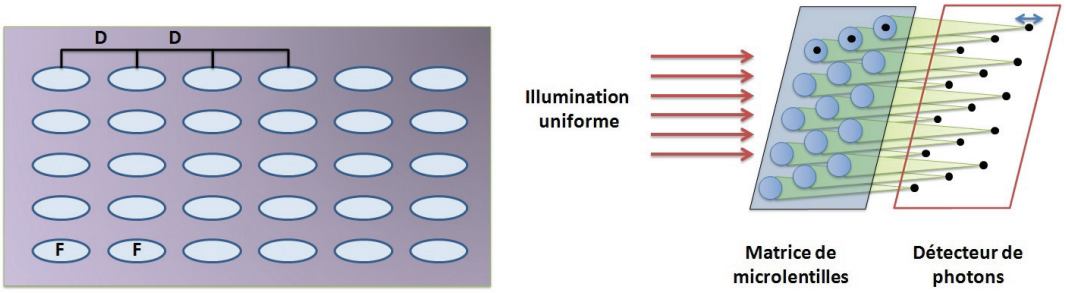
L'ajout du bruit de fond dégrade énormément l'efficacité et le taux de faux du suivi à faible temps d'intégration. Il faut accumuler de l'information sur 40 ms pour atteindre les mêmes valeurs avec et sans bruit de fond.

Le bruit de fond n'a cependant pas un impact fort sur la précision de localisation intrinsèque du détecteur à très peu de photons. La perte en précision de localisation est de l'ordre de 15 % autour de 1 photon par image et de 40 % vers 20 photons par image.

4.4 Étude du cas de points sources multiples formés par une matrice de microlentilles

4.4.1 Description du système

L'utilisation d'une matrice de microlentilles, schématisée par la Fig. 4.20a, permet le création d'un grand nombre de points sources. La Fig. 4.20b montre un schéma du montage expérimental. Les principaux paramètres de cette expérience sont résumés dans la table 4.5.



(a) (b)

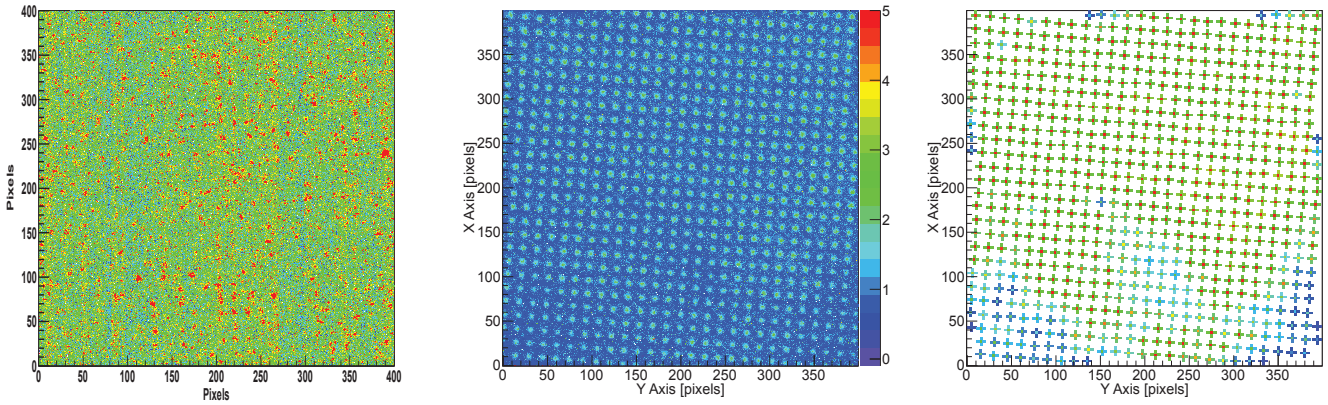
FIGURE 4.20 – (a) Matrice de microlentilles. (b) 640 points sources focalisés sur le détecteur. L'illumination n'est pas uniforme mais les points sources sont équidistants car les rayons sont parallèles.

Photo-cathode	Vitesse d'acquisition	Champ de vue	Courant d'obscurité	Pitch D	Rayon de courbure	Ouverture numérique
S20	250 fps	16 mm^2	15 Hz/mm^2	150 μm	10.518 mm	0.06

TABLE 4.5 – Données de l'expérience des microlentilles.

4.4.2 Mesure des bruits et calibration des points sources

Nous mesurons sur une matrice de 400 × 400 pixels (16 mm^2) 684 points sources dont le signal moyen est inférieur à 1 photon. Les sources sont localisées à l'aide de l'algorithme présenté précédemment en partie 4.2.1. Une image brute (4 ms de temps d'intégration) est donnée par la Fig. 4.21a. L'image intégrée (13.6 sec) est donnée par la Fig. 4.21b. L'image des positions des sources reconstruites est donnée par la Fig. 4.21c.



(a) (b) (c)

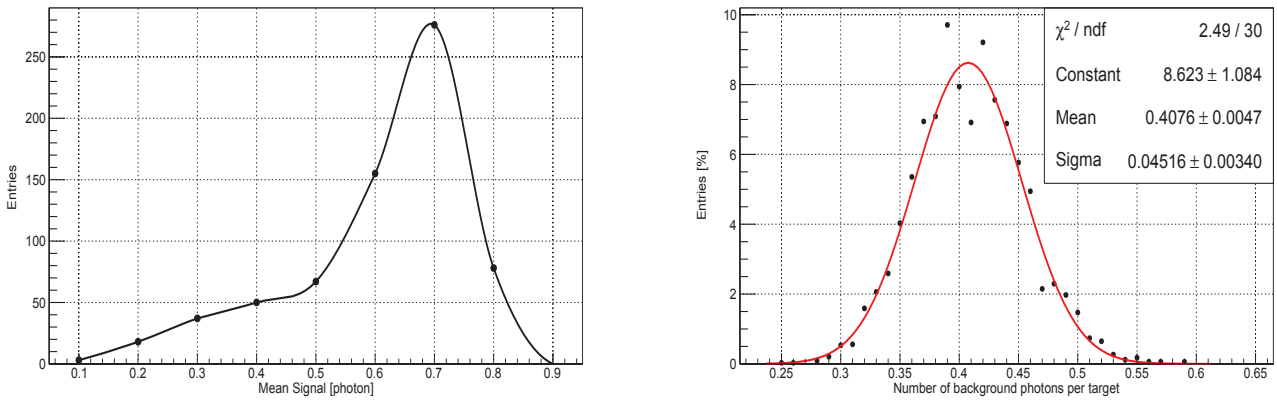
FIGURE 4.21 – Visualisation des points sources de microlentilles par l'ebCMOS à 125 fps avec une haute tension appliquée de 2.8 kV. (a) Une image brute en charge et (b) image intégrée sur 3 4000 images. L'échelle de couleur représente la charge du pixel. (c) Image des positions reconstruites par l'algorithme de localisation des sources. L'échelle de couleur représente le signal moyen de photons des sources.

Image par image, l'emplacement de certains points sources et le quadrillage global de la matrice de microlentilles est difficile à visualiser car le signal moyen de chaque source est inférieur à un photon. La matrice est clairement visible sur l'image intégrée. Dans ces conditions de faible bruit, l'ensemble des points sources est détecté après moins de vingt images.

Signal et bruits

Le signal moyen des points sources est inférieur à 1 photon détecté par image. La distribution des intensités moyennes des 684 points sources est donnée par la fig 4.22a. Malgré cette faible intensité, une bonne précision de localisation est possible avec le faible courant d'obscurité de la photo-cathode S20, avec moins d'un électron de courant d'obscurité par image et par point source.

Le reste du bruit est donné par les faux issus du bruit de lecture, en moyenne 0.5 faux par image et par la PSF totale qui empêche une séparation complète des points sources. La distribution du nombre de photons de bruit par image et par source est donnée par la Fig. 4.22b.



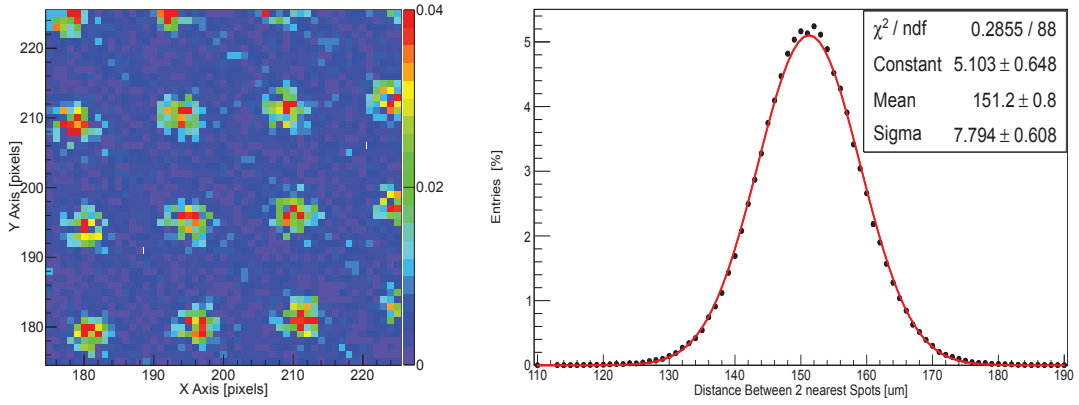
(a) (b)

FIGURE 4.22 – (a) Distribution de l'intensité moyenne des points sources des microlentilles, en photons détectés par image par point source. (b) Distribution du nombre moyen de photons de bruit, en photons par image et par point source.

Avec un bruit moyen autour de 0.4 photons par image et un signal moyen autour de 0.8, le rapport signal sur bruit est de l'ordre de 2. Un zoom de l'image intégrée en photons sur 50×50 pixels avec la Fig. 4.23a permet de voir le bruit de fond entre les points sources.

La distribution des intensités moyennes des point source est très étalée, révélant une non uniformité de l'illumination de la matrice de microlentilles.

La distance D est donnée par le fabricant. Une mesure expérimentale de D valide alors la mesure de la position et donne une précision de localisation. La distribution des distances D mesurée pour les 684 points sources est donnée dans la Fig. 4.23b. Le résultat est obtenu après 40 ms de temps d'intégration.



(a) (b)

FIGURE 4.23 – (a) Zoom 50×50 pixels sur l'image intégrée en photons. (b) Distribution de la distance entre les positions successives des points sources, mesurées après 20 images.

La valeur de D mesurée correspond à celle donnée par le fabricant, avec une précision de localisation de l'ordre de 8 μm après 40 ms d'intégration.

4.4.3 Précision de localisation, efficacité et pureté en fonction du signal

Afin de mesurer l'efficacité et la pureté du suivi sur les 684 sources, des mesures identiques à celles du point source ont été effectuées : la précision de localisation sur la position mesurée, l'efficacité et la pureté du suivi en fonction du nombre d'images sélectionnées. Une séparation est faite pour mesurer l'évolution de ces paramètres en fonction des intensités des points sources. Pour cela quatre sous-catégories sont créées et comparées à la moyenne des points sources (noir) :

1. Intensité supérieure à 0.8 photons détectés par image (cyan).
2. Intensité supérieure à 0.65 photons détectés par image (vert).
3. Intensité inférieure à 0.65 photons détectés par image (rouge).
4. Intensité inférieure à 0.5 photons détectés par image (bleu).

La Fig. 4.24 montre l'évolution de l'efficacité et du taux de faux du suivi des points sources de microlentilles en fonction du temps d'intégration utilisé pour le suivi.

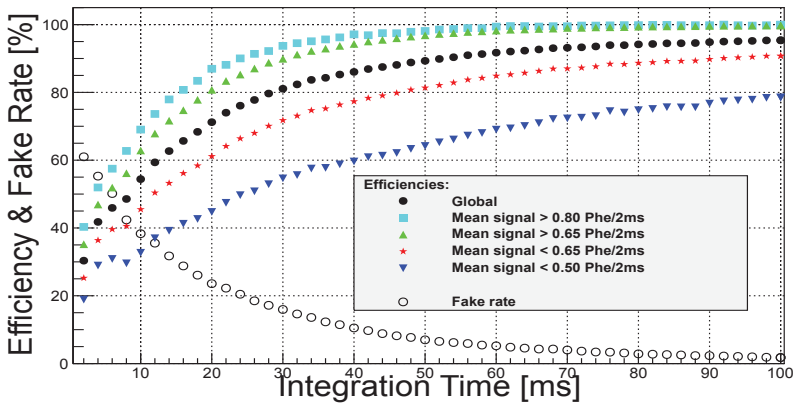
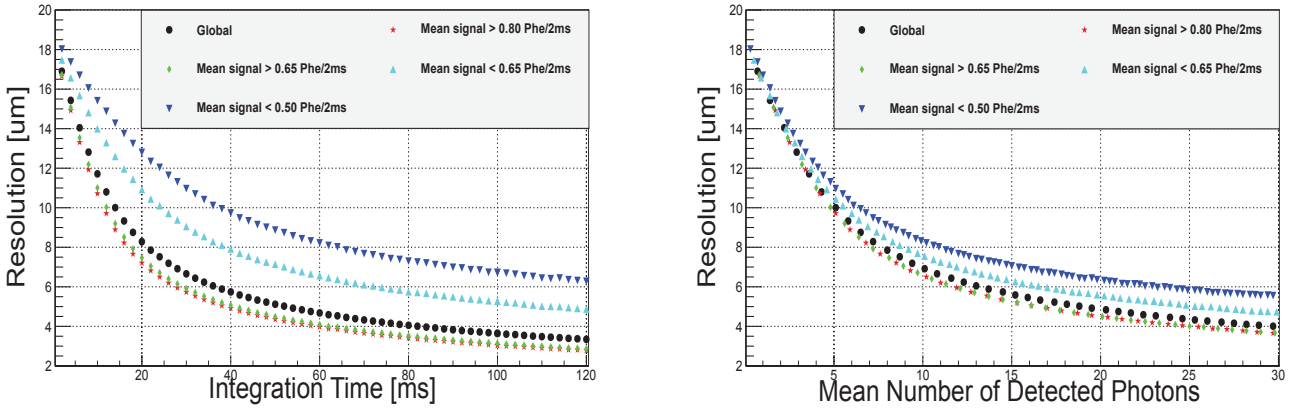


FIGURE 4.24 – Évolution du taux de faux et de l'efficacité du suivi en fonction du temps d'intégration.

Après 60 ms d'intégration, le taux de faux est inférieur à 5 % avec une efficacité supérieure à 90 %. L'efficacité dépend beaucoup de l'intensité des points sources. Une manière d'augmenter l'efficacité du suivi est d'utiliser le bruit de fond local pour choisir la valeur seuil de l'algorithme, afin de s'affranchir de la distribution spatiale de l'illumination.

Les Fig. 4.25a et Fig. 4.25b montrent l'évolution de la précision de localisation sur la position mesurée en fonction respectivement du temps d'intégration et du nombre moyen de photons détectés.



(a) (b)

FIGURE 4.25 – (a) Évolution de la précision de localisation de la position des points sources de microlentilles en fonction du temps d'intégration et de l'intensité des points sources. (b) Évolution de la précision de localisation de la position des points sources de microlentilles en fonction du nombre moyen de photons détectés.

L'évolution de la précision de localisation suit bien une loi proportionnelle à $1/\sqrt{\text{signal}}$ quelle que soit l'intensité moyenne des points sources. Plus l'intensité est forte, plus le gain en précision de localisation est rapide. Pour un faible nombre de photons, les précisions de localisation sont très proches pour toutes les intensités. L'écart se creuse avec l'accumulation des photons et du bruit.

Les points sources étant plus larges que celui créé dans la partie 4.3.3 précédente, la précision de localisation n'est pas aussi bonne, de l'ordre de 4 μm pour 30 photons reçus alors qu'elle est de 2 μm pour le point source unique.

Cette analyse est assez rapide pour se faire en ligne et permet donc de suivre plus de 600 sources en continu au photon unique avec une précision de localisation micrométrique.

Conclusion

Dans ce chapitre nous avons comparé expérimentalement la précision de localisation des trois caméras sCMOS, emCCD et ebCMOS.

Nous avons tout d'abord étudié l'influence du gain EM de l'emCCD qui permet une amélioration considérable de la précision de localisation à très bas niveau de lumière. Nous avons constaté par contre que l'augmentation de l'importance du gain CIC avec le gain électronique dégrade la pureté de la mesure.

En comparant les trois détecteurs dans les mêmes conditions de signal, les résultats obtenus par calcul de limite de Cramér-Rao sont confirmés. Pour un très bas niveau de lumière et des cibles immobiles, l'emCCD permet d'obtenir la meilleure précision de localisation.

Le détecteur ebCMOS possède une précision de localisation du même ordre de grandeur, malgré sa faible efficacité quantique (8 % pour la longueur d'onde utilisée). Nous avons vu dans l'expérience des microlentilles que le détecteur ebCMOS est capable de conserver cette précision de localisation sur plus de 600 sources pour une grande fréquence de lecture, à très bas niveau de lumière ($<$1 photon par image) grâce à un bruit capteur très faible.

Nous avons aussi étudié l'influence du bruit de fond, très commun en vidéo-microscopie. Il dégrade fortement la pureté de la mesure mais son influence sur la précision de localisation est limitée, permettant une précision de localisation proche de celle du cas sans bruit.

Des améliorations technologiques récentes permettraient à l'ebCMOS d'obtenir la précision de localisation de l'emCCD alliée à la vitesse du CMOS sur un grand champ de vue, permettant ainsi un suivi dynamique au photon unique.

Nous nous intéressons dans la partie suivante à cet aspect dynamique du suivi au photon unique, pour lequel une grande vitesse d'acquisition est nécessaire.

Bibliographie

[1] Raimund J Ober, Sripad Ram, and E Sally Ward. Localization accuracy in single-molecule microscopy. *Biophysical journal*, 86(2) :1185–200, February 2004. 78, 93, 95

[2] D L Snyder, M Hammoud, and R L White. Image recovery from data acquired with a charge-coupled-device camera. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics and image science*, 10(5) :1014–23, May 1993. 78

[3] Sripad Ram, E.Sally Ward, and RaimundJ. Ober. A stochastic analysis of distance estimation approaches in single molecule microscopy : quantifying the resolution limits of photon-limited imaging systems. *Multidimensional Systems and Signal Processing*, pages 1–40, 2012. 78, 80

[4] C.A. Haniff A.G. Basden and C.D. Mackay. Photon counting strategies with low light level ccds. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 2003. 78, 89

[5] Jonas Zmuidzinas. Cramér-Rao sensitivity limits for astronomical instruments : implications for interferometer design. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, image science, and vision*, 20(2) :218–33, February 2003. 78

[6] Jerry Nowakowski and Marek Elbaum. Fundamental limits in estimating light pattern position. *J. Opt. Soc. Am.*, 73(12) :1744–1758, Dec 1983. 78

[7] A. Papoulis. *Probability & statistics*. Prentice Hall, 1990. 82

[8] W.J. Metzger. *Statistical Methods in Data Analysis*. Fakulteit der Natuurwetenschappen, Katholieke Universiteit Nijmegen, 2000. 83

Troisième partie

Expériences et suivi dynamique de particules

Table des matières

5 Suivi de sources émettrices de photons et filtre de Kalman 137
5.1 Détection et suivi d'une source en détection de photo-électrons 137
5.1.1 Identification d'une source 139
5.1.2 Description du suivi de sources 140
5.1.3 Gestion de la combinatoire des positions nouvelles d'une source en construction 141
5.2 Filtre de Kalman avec détection de photons 142
5.2.1 Prédictions et filtre de Kalman 142
5.2.2 Équation d'état et innovation avec détection de photons 145
5.3 Mesure du coefficient de diffusion de particules libres 150
5.3.1 Description de la mesure 150
5.3.2 Influence des précisions temporelle et de localisation et optimisation 151
5.3.3 Comparaison théorique des détecteurs emCCD et ebCMOS pour la mesure du MSD 152
5.3.4 Amélioration de la précision avec le filtre de Kalman 154

Conclusion 155

6 Suivi de nanocristaux à très bas niveau de lumière et mesures de coefficients de diffusion 156
6.1 Description du système optique 156
6.1.1 Microscopie de fluorescence 156
6.1.2 Nanocristaux semiconducteurs 157
6.2 Description de l'expérience 159
6.2.1 Montage expérimental 159
6.2.2 Mesure du bruit de fond 159
6.3 Mesures de précision de localisation et détection du clignotement 162
6.3.1 Mesures de précision de localisation pour deux échantillons d'intensités différentes 162
6.3.2 Mesures de clignotement de Quantum Dots 165
6.3.3 Calibration des moteurs et précision sur la vitesse 167
6.4 Quantum Dots libres entre deux lames de verre : mesure du coefficient de diffusion 169
6.4.1 Signal et bruit de fond entre deux lames de verre 169
6.4.2 Mesure du coefficient de diffusion et calcul de la taille des QD . . . 171

Conclusion **174**

7 Étude de la nage de bactéries à la surface et calibration d'un évènement de tumbling **175**

7.1 Description du montage expérimental de la nage de bactéries observée par microscopie en champ sombre . . . 176

7.1.1 Description de la microscopie en champ sombre . . . 176

7.1.2 Montage expérimental et réglages de la caméra ebCMOS . . . 176

7.2 Mesure du bruit caméra et du bruit de fond microscope . . . 177

7.3 Suivi de bactéries . . . 178

7.3.1 Description du procédé expérimental de la culture de bactéries . . . 178

7.3.2 Détection d'une bactérie . . . 179

7.3.3 Mesures de précision sur des bactéries immobiles . . . 184

7.4 Étude de la nage de bactéries à la surface au grandissement 100× . . . 189

7.4.1 Étude de la différence entre les centres de gravité de la forme et de l'intensité . . . 189

7.4.2 Suivi de l'orientation du corps pendant la nage . . . 191

7.4.3 Détection d'événements "anormaux" au cours de la nage . . . 194

7.5 Perspectives sur l'utilisation du grandissement 20× pour le suivi de bactéries . . . 197

Conclusion **200**

Bibliographie **202**

Conclusion **203**

Liste des tableaux **206**

Liste des figures **207**

Dans cette partie, nous nous intéressons au suivi de sources en mouvement.

Pour cela, l'algorithme de suivi de sources multiples implémenté en incluant un filtre de Kalman sera décrit dans la partie 5. Nous verrons l'influence de la détection du photon sur le filtre de Kalman. Une simulation Monte-Carlo sera utilisée afin de tester les différents paramètres ainsi que les conditions limites de l'algorithme (rapport signal sur bruit, vitesse, changements de direction,...).

Les deux parties suivantes correspondent aux expériences réalisés sur le suivi de sources avec la caméra ebCMOS.

La première expérience, décrite dans la partie 6, a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Christophe Dujardin, David Amans, Gilles Ledoux et Florian Kulzer au centre Nanoptec.

Dans cette expérience nous suivrons des nanocristaux et nous mesurerons la précision de localisation obtenue sur des sources immobiles puis en mouvement forcé. Ensuite, nous mesurerons le coefficient de diffusion des nanocristaux en mouvement brownien entre deux lames.

La seconde expérience, décrite dans la partie 7, s'intéresse à la nage de bactéries en surface, au laboratoire Joliot Curie avec l'équipe de Laurence Lemelle en collaboration avec Christophe Place et Jean-François Palierne

Le but de cette expérience est d'utiliser la vitesse d'acquisition associée à la sensibilité de l'ebCMOS pour suivre image par image l'orientation spatiale de la bactérie. Cela permettra d'améliorer le modèle utilisé de nage de bactéries à la surface. Nous verrons aussi comment il est possible de détecter le *tumbling*, évènement réguler de réorientation du corps de la bactérie qui s'exprime différemment en surface et dans le volume.

Chapitre 5

Suivi de sources émettrices de photons et filtre de Kalman

Dans cette partie nous décrirons l'algorithme de suivi de sources en mouvement.

Le principe de l'algorithme est très simple, avec une utilisation restreinte de l'idée de suivi de sources multiples de Reid [1]. Celui-ci utilise des arbres de possibilités afin d'attribuer l'information la plus probable à chaque source. Pour des raisons de limitation du temps de calcul, cette méthode ne sera utilisée que pour l'initialisation et la validation des sources potentielles. Pour permettre une diminution de l'erreur de mesure, un filtre de Kalman spatio-temporel sera implémenté pour le suivi.

Dans la partie 5.1 nous décrirons l'algorithme de suivi utilisé pour des sources dynamiques. Dans la partie 5.2 nous verrons comment nous avons implémenté le filtre de Kalman à la détection du photon. Nous calculerons à l'aide d'une simulation Monte-Carlo les performances attendues de ce suivi ainsi que celles des capteurs ebCMOS et emCCD pour le suivi de particules libres en mouvement Brownien.

5.1 Détection et suivi d'une source en détection de photo-électrons

Le suivi spatio-temporel de sources en mouvement utilise plusieurs échelles temporelles :

1. **Image :** le temps de l'image est le temps de base du suivi.
2. **Suivi :** le temps du suivi correspond au temps nécessaire pour filtrer au mieux les sources. Il dépend des conditions de bruit de fond.
3. **Précision :** le temps de la précision correspond au temps nécessaire pour obtenir une précision de localisation donnée. Il dépend des conditions d'illumination et de bruit de fond, ainsi que des mouvements des sources. Il peut être calibré par les expériences sur bancs de test, par simulation Monte-Carlo ou avec le calcul de la limite de Cramér-Rao.
4. **Physique :** le temps physique correspond au temps caractéristique des phénomènes observés, comme par exemple la fréquence de tumbling des bactéries observées dans l'expérience de la partie 7.

Afin de développer un suivi plus efficace, toutes ces temporalités seront utilisées.

Les paramètres de l'algorithme sont fixés par le détecteur et le système optique : PSF spatiale, taille, vitesse et émission des sources, bruit de fond. Dans un premier temps, les sources seront supposées ponctuelles.

Pour chaque image, la liste des photo-électrons détectés est donnée en entrée de l'algorithme. Une source immobile est caractérisée par une accumulation spatiale de photons qui produit une forte densité comparativement au bruit de fond. Pour une source en mouvement, les photons ne s'accumulent pas spatialement sur la surface du capteur mais dans un volume 2D + t comprenant la dimension temporelle,

La Fig. 5.1 schématise les différents cas de figure simples du suivi de sources.

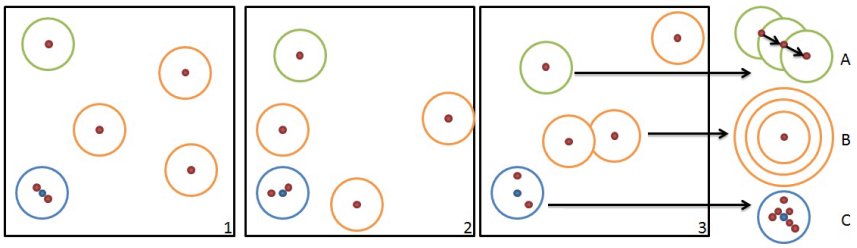


FIGURE 5.1 – Schéma de principe du suivi de sources par accumulation spatiotemporelle. Les points rouges correspondent à des photons, les bleus correspondent à la position reconstruire de la source fixe. Les cercles correspondent à l'espace estimé dans lequel les photons issus d'une même source impactent le détecteur. Le rayon du cercle est calculé à partir de la PSF du détecteur et de la taille de la source. Afin de suivre les sources immobiles (C) ou en mouvement (A), il faut d'abord les identifier et les distinguer du bruit (B). L'algorithme recherche des densités de photons supérieures au bruit de fond en accumulant l'information des images successives (ici 1,2 et 3). Dans le cas d'une source immobile dans une surface. Pour une cible en mouvement dans un espace à trois dimensions comprenant la surface et le temps (2D + t).

La première étape du suivi est l'identification des sources et l'élimination du bruit de fond en fonction du signal reçu.

1. Dans le cas du bruit de fond (B), chaque photon détecté n'est lié à aucun autre. Il n'y a pas d'accumulation donc ces photons sont éliminées.
2. Dans le cas d'une source fixe (C), l'accumulation des photons dans la surface est très supérieure au bruit de fond. La position mesurée de la source prend en compte tous les photons reçus précédemment.
3. Dans le cas d'une cible en mouvement non brownien (A), la position mesurée de la source correspond à la position estimée à l'image i. La prise en compte de l'information des photons des images précédentes se fait avec l'estimation de la vitesse de la source et donc de la position estimée à l'image $i+1$. Avec une mesure précise de la vitesse de la source, la détermination de la position est ramenée à un cas fixe.

5.1.1 Identification d'une source

Pour chaque nouvelle image, la liste des photons détectés est comparée à la liste des cibles. Chaque photon situé dans le cercle de PSF autour d'une source lui est associé. Un photon isolé crée une nouvelle cible potentielle.

Afin d'identifier les cibles, l'algorithme dispose des paramètres suivants pour chaque source potentielle :

- t Nombre d'images depuis la création.
- x, y Position mesurée.
- v_x, v_y Vitesse de déplacement.
- μ Nombre de photons accumulés.
- β Nombre de photons dans le voisinage local.
- p Nombre d'images consécutives sans photon reçu.
- x^-, y^- Position estimée.

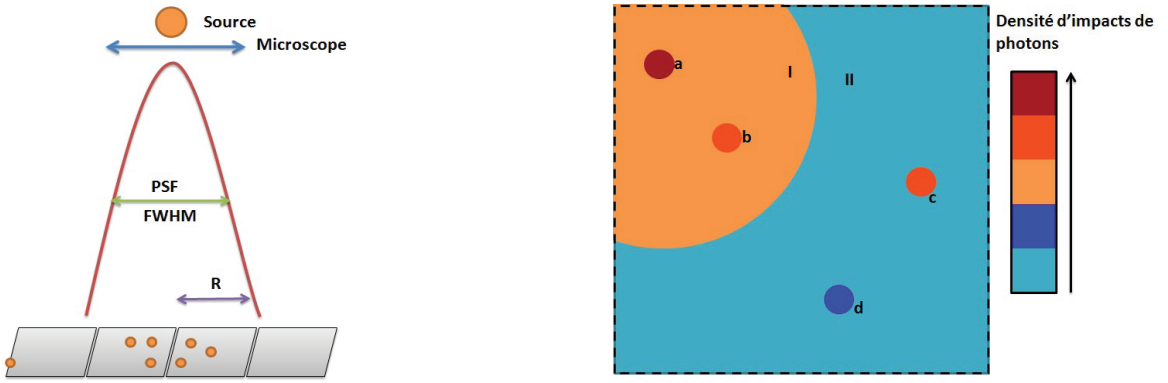
La difficulté du suivi de sources ne vient pas directement de la vitesse des sources, mais plutôt du rapport entre la vitesse et le rapport signal sur bruit par image. Plus le rapport signal sur bruit est important, plus il sera aisé de suivre des sources rapides.

Afin d'identifier au mieux les sources, il est nécessaire en premier lieu de mesurer le bruit moyen du capteur ainsi que sa distribution spatiale et temporelle. Dans le cas simple, les photons de bruit sont distribués aléatoirement sur la surface du détecteur.

Les paramètres variables du suivi sont :

- R_{psf} : rayon de la surface contenant 95 % du signal d'un point source observé par le système optique et sa PSF.
- R_{bg} : rayon du cercle dans lequel est mesuré le bruit de fond (bg pour *background*) proche de la source.
- t_{lim} : temps caractéristique de l'identification.
- S_{lim} : rapport signal sur bruit limite pour valider une source.

La Fig. 5.2 schématique l'impact de ces paramètres sur le suivi de sources.



(a) (b)

FIGURE 5.2 – (a) Détermination de R_{psf} par rapport à la PSF du détecteur. (b) Intérêt de la détermination du signal sur bruit local par rapport au bruit global. Avec un seuillage à 2, l'espace **I** va créer des faux entrainant une perte de pureté. Avec un seuillage à 4, la source **d** est éliminée, entrainant une perte d'efficacité.

Le rayon R_{psf} correspond à la surface dans laquelle sont détectés la majorité des photons d'une source unique. Un photon détecté à une distance inférieure à R_{psf} d'une source lui sera associé.

R_{bg} est le rayon caractéristique de la qualité de l'illumination. Il correspond à la surface dans laquelle est mesuré le bruit de fond autour d'une cible afin de calculer son rapport signal sur bruit. Si l'illumination est uniforme le bruit de fond est mesuré sur la matrice complète.

Le temps t_{lim} correspond à l'intervalle de temps entre deux tests de validation d'une source. Plus t_{lim} est grand, plus il est possible de séparer finement signal et bruit, mais plus le temps nécessaire à la validation ou à la suppression d'une nouvelle source augmente.

Le rapport S_{lim} est lié à t_{lim}. Plus t_{lim} est petit plus les fluctuations de signal et de bruit ont un poids relatif important. Afin de conserver une bonne pureté, il n'est possible d'utiliser un t_{lim} court que si le rapport signal sur bruit est très important.

Pour le suivi de nanocristaux décrit dans le chapitre suivant, R_{psf} correspond à 5 pixels (50 μm), R_{bg} à 30 pixels, t_{lim} à 10 images (40 ms) et S_{lim} à 3.

5.1.2 Description du suivi de sources

L'algorithme de suivi utilise les paramètres liés à l'expérience pour transformer la liste de photons en entrée en une liste de sources ayant l'un des états suivants : *Nouvelle*, *Validée*, *Pause* et *Bruit*.

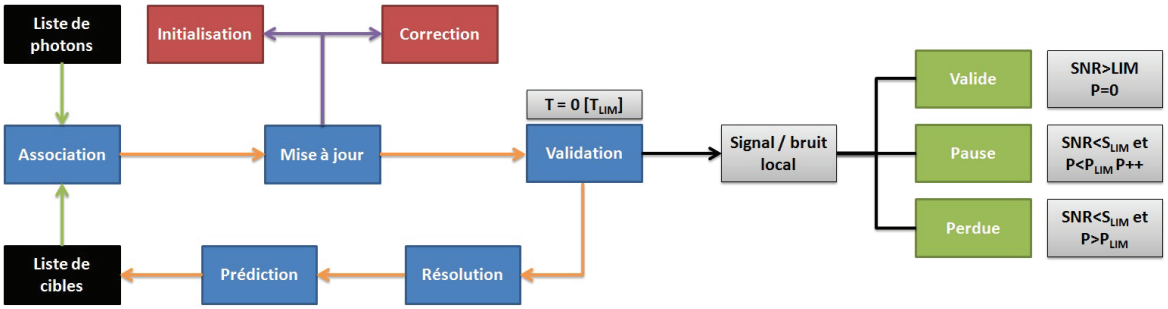


FIGURE 5.3 – Schéma de principe du suivi de sources par détection de la position de l'impact des photons/photo-électrons.

Pour chaque itération, l'algorithme schématisé par la Fig. 5.3 effectue les taches suivantes :

1. **Association :** Combinaison des photons détectés aux sources existantes et création de nouvelles sources potentielles.
2. **Update :** Mise à jour des paramètres des sources et de l'erreur attendue.
3. **Validation :** Validation des sources en fonction de leur signal accumulé et gestion des hypothèses formulées.
4. **Résolution :** Gestion des conflits suite aux croisements ou aux changements abruptes de trajectoires.
5. **Propagation :** Prédiction sur l'état à l'itération suivante.

5.1.3 Gestion de la combinatoire des positions nouvelles d'une source en construction

Chaque photon associé à une source possède une probabilité P d'être issu de la source. P est calculée à partir de la PSF spatiale, de la position et de la vitesse mesurée de la source. Selon la précision sur la position de la source, un poids est appliqué à cette nouvelle mesure dans le calcul de la position suivante. Le filtre de Kalman décrit dans la section 5.2.1 fonctionne sur ce principe.

Dans le cas de l'identification de sources, ce qui correspond à l'état *Nouvelle*, la statistique est insuffisante pour implémenter efficacement cette méthode. Durant cette étape, les poids appliqués sur les photons sont uniquement 0 et 1.

En combinant l'information mesurée sur plusieurs images consécutives, il est possible de filtrer les photons de bruit de ceux du signal. Pour chaque nouvelle image, plusieurs hypothèses sont formulées à partir de la combinatoire des poids 0 et 1 sur les photons. Pour chaque hypothèse, sa probabilité est calculée en fonction de la PSF. Après h itérations, le choix le plus probable est conservé. Une fois la phase d'identification terminée, la méthode du filtre de Kalman est appliquée.

Le principe de cette méthode développée par Reid [1] est schématisé par la Fig. 5.4 dans le cas d'une nouvelle source obtenant deux photons à t.

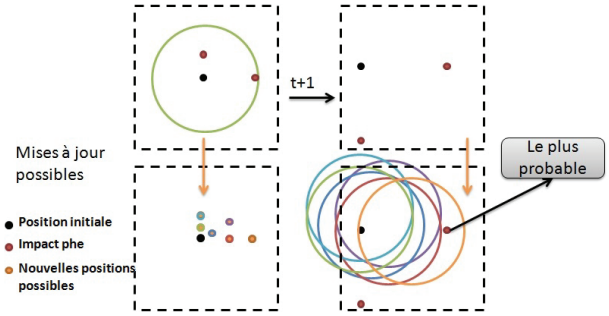


FIGURE 5.4 – Principe de sélection du signal dans la phase d'identification. Une source reçoit deux photons à t. En supposant qu'au moins un des photons provient de la source, six nouvelles positions sont possibles avec l'information obtenue. Plusieurs hypothèses sont possibles : l'utilisation des deux photons ou d'un seul ainsi que la pondération de la nouvelle information par l'ancienne. En utilisant l'information obtenue à l'image $t+1$, il est possible de trouver la position la plus probable et d'enlever le photon de bruit.

Cette méthode peut rapidement devenir très consommatrice de ressources CPU, c'est pourquoi il est nécessaire d'adapter le nombre d'itérations h à la densité de photons. Pour un grand nombre de photons, il devient irréaliste de filtrer finement les photons incidents et une méthode type filtre de Kalman semble plus appropriée.

5.2 Filtre de Kalman avec détection de photons

5.2.1 Prédictions et filtre de Kalman

Position du problème

Le filtre de Kalman [2] [3] utilise un modèle linéaire pour filtrer le bruit de mesure de données expérimentales (position, vitesse, ...) et obtenir une meilleure précision de localisation. L'information obtenue à chaque itération est associée à l'information de l'itération précédente (chaîne de Markov) pour améliorer la prédiction sur ces données.

Le filtre distingue deux processus et leur associe un indice de confiance. Le premier est la mesure et le second est le modèle qui permet d'extraire les paramètres des mesures. Le modèle est développé préalablement à la mesure.

Les indices de confiance sont utilisés pour calculer le poids appliqué à chaque nouvelle mesure. Pour chaque itération, la mesure est alors comparée à l'état prédit à l'itération précédente afin de mesurer l'erreur commise et de prédire un nouvel état du système.

Le filtre de Kalman se décompose en quatre phases :

1. Initialisation.
2. Prédiction.
3. Mesure.
4. Correction.

Seules les phases 2 à 4 sont répétées à chaque itération. La phase d'initialisation dépend du système observé.

L'entrée du filtre est le vecteur de mesure $\mathbf{y}$, correspondant à toutes les mesures du système. Ici le vecteur de mesure correction à la position reconstruite de la source à partir des photons mesurés et du déplacement mesuré de la source entre deux images successives.

La sortie du filtre est le vecteur d'état $\mathbf{x}$ donnant la valeur estimée des paramètres calculés. Les paramètres étudiés peuvent être identiques à ceux mesurés, ou ils peuvent émerger du modèle choisi.

Les mesures sont discrètes et donc l'information est apportée au filtre par itérations $t \in \mathbb{N}$. L'itération t peut correspondre à une image ou bien à un nouveau photon détecté.

Cette description du système est formalisée par les équations :

$$\mathbf{x}_{t+1} = A\mathbf{x}_t + \mathbf{w}_t \tag{5.1}$$
$$\mathbf{y}_{t+1} = H\mathbf{x}_t + \mathbf{v}_t \tag{5.2}$$

avec :

- $\mathbf{x}_t \in \mathbb{R}^n$ est le vecteur d'état du système à l'itération t.
- $\mathbf{y}_t \in \mathbb{R}^n$ est le vecteur de mesure à l'itération t.
- $\mathbf{w}_t \in \mathbb{R}^n$ est le vecteur de bruits aléatoires de l'équation d'état à l'itération t. Il correspond aux perturbations extérieures et aux erreurs de modélisation par exemple dans le cas d'une linéarisation du modèle ou d'un facteur négligé. Il est de distribution gaussienne de moyenne nulle et de covariance W_t.
- $\mathbf{v}_t \in \mathbb{R}^n$ est le vecteur de bruits aléatoires de la mesure à l'itération t. v est indépendant de w, de distribution gaussienne de moyenne nulle et de covariance V_t.
- $A \in \mathbb{R}^{n\times n}$ est la matrice de propagation de la mesure à l'état.
- $H \in \mathbb{R}^{n\times n}$ est la matrice qui lie l'état à la mesure.

Mise en équations

Les matrices de covariances des erreurs sur les prédictions sont utilisées pour définir la confiance du filtre :

- $\hat{\mathbf{x}}_{t+1}^{-}$: vecteur d'état prédit à l'instant t+1 connaissant toutes les mesures précédentes.
- P_{t+1}^{-} : matrice de covariance de l'erreur de prédiction associée.
- $\hat{\mathbf{x}}_t$: vecteur d'état estimé à l'instant t.
- P_t : matrice de covariance de l'erreur d'estimation associée.
- K_t : facteur du rapport entre prédiction et innovation, minimisant P_t, appelé gain Kalman.

Le schéma de principe du filtre de Kalman est donné par la Fig. 5.5.

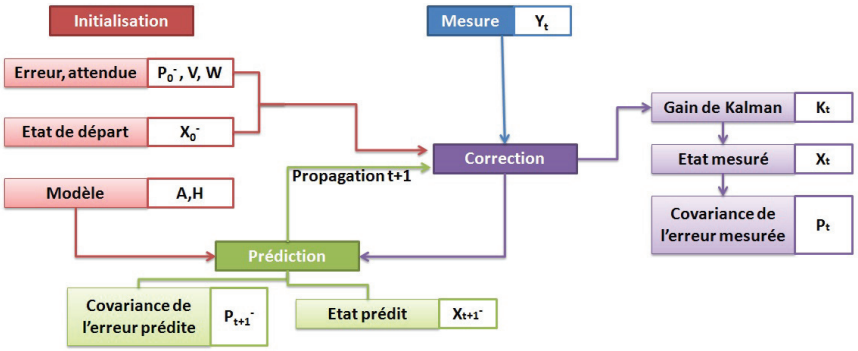


FIGURE 5.5 – Schéma de principe du filtre de Kalman en quatre étapes : 1) Initialisation des paramètres. 2) Prédiction. 3) Mesure. 4) Correction.

L'état prédit en $t+1$ est obtenu par propagation du système à l'état mesuré en t, comme le montre l'Eq. 5.3. L'erreur de mesure estimée ϵ_t *a priori* est décrite par l'Eq. 5.4, et sa matrice de covariance est décrite par l'Eq. 5.5 :

$$\hat{\mathbf{x}}_{t+1}^{-} = A_t \hat{\mathbf{x}}_t \tag{5.3}$$
$$\epsilon_t^{-} = \hat{\mathbf{x}}_t - \hat{\mathbf{x}}_t^{-} \tag{5.4}$$
$$P_t^{-} = \mathrm{E}\left[\epsilon_t^{-} \epsilon_t^{-T}\right] \tag{5.5}$$

avec E l'espérance mathématique.

P_t^{-} quantifie le degré de confiance sur la prédiction de l'état du système en prenant en compte l'erreur de mesure. Elle permet de calculer le poids du gain Kalman K_t avec l'Eq. 5.6 à appliquer sur l'innovation, donné par l'Eq. 5.7.

$$K_t = \frac{P_t^{-} H_t^T}{H_t P_t^{-} H_t^T + V_t} \tag{5.6}$$
$$\hat{\mathbf{x}}_t = \hat{\mathbf{x}}_t^{-} + K_t W_I \tag{5.7}$$
$$Q_I = \mathbf{y}_t - H_t \hat{\mathbf{x}}_t^{-} \tag{5.8}$$

avec l'innovation Q_I, la différence entre la mesure et la prédiction.

Afin de boucler le filtre, il est nécessaire de calculer la matrice de covariance de l'état prédit à $t+1$ avec l'Eq. 5.9 et la matrice de covariance de l'état mesuré à t par l'Eq. 5.10.

$$P_{t+1}^{-} = A_t P_t A_t^T + W_t \tag{5.9}$$
$$P_t = \left(I - K_t H_t\right) P_t^{-} \tag{5.10}$$

avec I la matrice identité.

Influence des paramètres

L'efficacité du filtre de Kalman à éliminer le bruit d'une mesure dépend essentiellement des trois paramètres suivants :

- W : Confiance dans le modèle de l'équation d'état.
- V : Confiance dans la mesure.
- P_0 : Confiance dans l'initialisation.

Ces paramètres conditionnent le gain Kalman K qui pondère l'ajout d'une nouvelle mesure par rapport au modèle. C'est le rapport entre ces trois paramètres qui est prédominant dans la réponse du filtre à une nouvelle mesure car comme le montre l'Eq. 5.11, le gain K ne dépend que de l'écart relatif entre ces paramètres.

$$K(aW, aV, aP_0) = K(W, V, P_0) \tag{5.11}$$
$$P(aW, aV, aP_0) = aP(W, V, P_0) \tag{5.12}$$

Par contre la mesure de l'erreur dépend de la valeur de ces paramètres comme le montre l'Eq. 5.12. Ces paramètres doivent être déterminés de façon réaliste pour obtenir un résultat statistique fiable. W et V sont donc calculés pour être les majorants du bruit.

L'influence de ces paramètres peut être appréciée qualitativement dans les régimes transitoire et permanent :

Régime transitoire : Le rapport entre V et P_0 conditionne la correction à l'erreur initiale. Si la confiance dans les mesures est plus grande que celle sur l'état initial ($V \ll P_0$), l'erreur initiale sera corrigée plus rapidement mais en étant plus sensible au bruit de mesure.

Régime permanent : Le poids de W par rapport à V donnera le "lissage" du signal en régime permanent. Plus la confiance dans le modèle est grande ($W \ll V$), plus les mesures seront atténuées donnant un résultat non fluctuant, mais en rendant le système plus lent à percevoir une perturbation.

5.2.2 Équation d'état et innovation avec détection de photons

Description de la méthode utilisée pour quantifier la précision de localisation obtenue

Une simulation Monte-Carlo de plusieurs centaines d'événements sera utilisée pour quantifier la précision de localisation obtenue par le suivi de sources. Pour chaque itération, une position, une vitesse et un nombre de photons seront simulés. Les photons émis seront distribués aléatoirement sur le segment de trajectoire de l'itération en cours.

Comment ajouter plusieurs photons d'une image dans l'équation d'état ?

En utilisant la détection de photons, deux modes itératifs t sont possibles pour alimenter le filtre de Kalman. La première est d'utiliser simplement le temps physique donné par le temps d'intégration et donc de faire correspondre t au numéro d'image. Dans ce cas l'information donnée au filtre de Kalman correspond à une moyenne des photons détectés. Dans ce cas, la donnée temporelle est conservée et la vitesse peut être associée à la position dans le modèle :

$$\mathbf{X}_1 = \begin{pmatrix} x \\ dx \\ y \\ dy \end{pmatrix} \tag{5.13}$$

$$A_1 = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \tag{5.14}$$

La seconde possibilité est d'associer l'itération à un photon. Dans ce cas la dimension temporelle n'est pas conservée. Il est alors nécessaire de scinder le filtre en deux sous-

filtres sur la position et la vitesse : $\mathbf{X}_2 = \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}$ (5.15) $\mathbf{V}_2 = \begin{pmatrix} dx \\ dy \end{pmatrix}$ (5.16)

$$A_2 = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (5.17)$$

Le filtre utilisé est très simple : la position des photons ne dépend que de la PSF donc $H = I$. La valeur du bruit de mesure V dépend de la valeur de la PSF et de la variance de la reconstruction de la position du photon. La valeur du bruit de propagation du modèle W dépend de l'expérience observée.

Si une source envoie plus d'un photon par image, vaut-il mieux donner tous les photons un par un au filtre de Kalman, ou bien une seule fois la moyenne des photons ? La Fig. 5.6 montre l'évolution de la précision de localisation après 20 images en fonction du nombre de photons par image et le mode d'itération utilisé. Les deux modes sont définis comme :

- **A :** les photons sont ajoutés un à un ;
- **B :** un seul photon moyennant les photons de l'image est donné au filtre de Kalman.

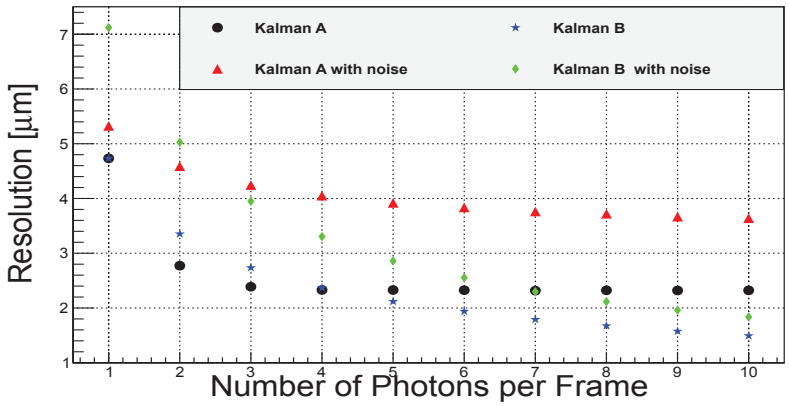


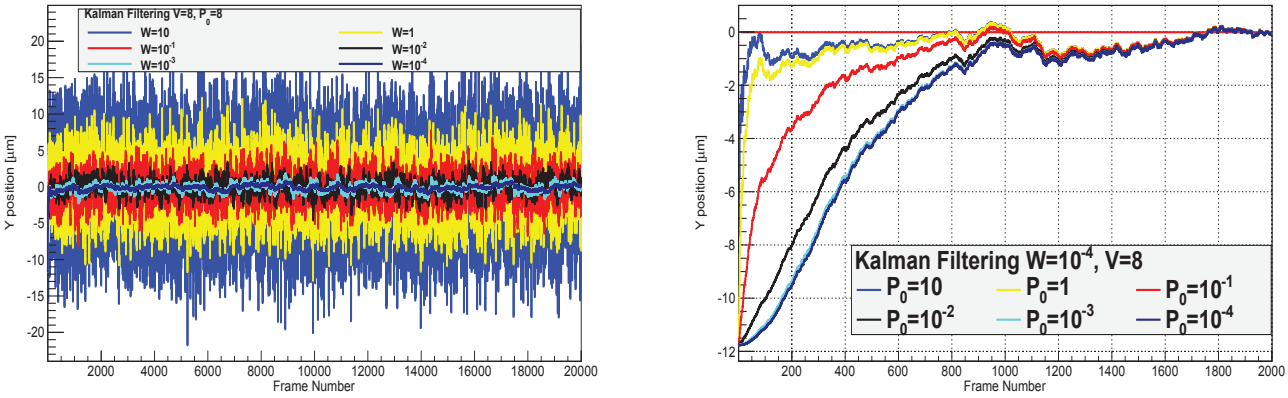
FIGURE 5.6 – Évolution de la précision de localisation après 20 images en fonction du nombre de photons par image selon le mode d'itération utilisé pour une source fixe, avec et sans bruit de fond (1 photon par image), la taille du pixel est de 10 μm, la PSF optique de 8 μm correspondant à un grandissement 100×.

Plus le nombre de photons par image augmente, plus il devient intéressant d'alimenter le filtre de Kalman par une position moyenne. C'est d'autant plus intéressant qu'il y a du bruit de fond. En effet, le fait d'ajouter les photons l'un après l'autre donne autant de poids au bruit de fond, alors qu'une position moyennée dilue l'influence du bruit de fond.

Dans le cas d'un bruit de fond équivalent au signal, il est préférable d'alimenter le filtre photon par photon afin d'utiliser au mieux les poids appliqués sur les nouvelles mesures.

Quantification de l'influence des paramètres V, W et P_0

L'influence des paramètres du filtre de Kalman sur le résultat final est étudié en visualisant l'évolution de la position calculée par le filtre de Kalman au cours du temps. La Fig. 5.7a montre l'influence du paramètre W à V et P_0 fixés et la Fig. 5.7b celle de l'erreur initiale P_0 à V et W fixés.



(a) (b)

FIGURE 5.7 – Évolution de la position estimée de la source selon l'axe Y par le filtre de Kalman en fonction du temps. La source est immobile en (0). (a) Variation du paramètre W, confiance dans l'équation d'état à V et P_0 fixés. (b) Variation du paramètre de l'erreur initiale P_0, à V et W fixés.

Le résultat du filtre ne dépend pas indépendamment de W et de V mais de leur rapport W/V, c'est pourquoi V est fixé dans cet exemple.

Les résultats montrent la variabilité de la position estimée en fonction des paramètres. Dans le cas de W, plus W est grand, moins le filtre donne de l'importance au modèle. Ce qui résulte en une variabilité de la position estimée très dépendante du bruit de mesure.

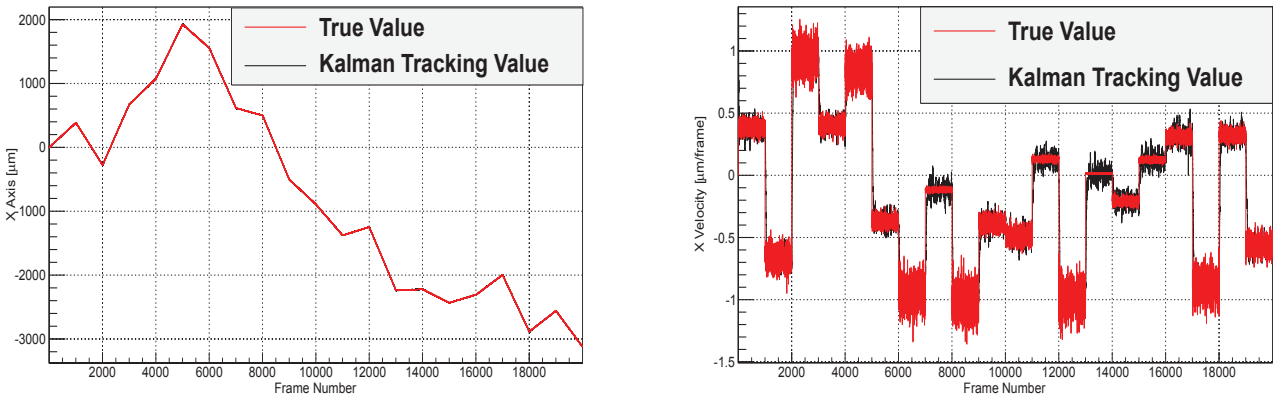
Dans le cas de l'erreur initiale, la variation de P_0 donne le confiance à l'initialisation, donc le temps d'adaptation à la nouvelle mesure.

L'inconvénient du filtre de Kalman est donc sa dépendance aux paramètres en entrée du filtre, qui doivent être déterminés selon l'expérience observée.

Précision sur la vitesse

Dans le cas d'une source en mouvement, la simulation est décomposée en pas. Pour chaque pas de la trajectoire, la vitesse de la source suit une gaussienne autour de la vitesse moyenne. Les photons peuvent être émis de chaque point de la trajectoire. L'orientation de la trajectoire change périodiquement afin de mesurer la réactivité du filtre.

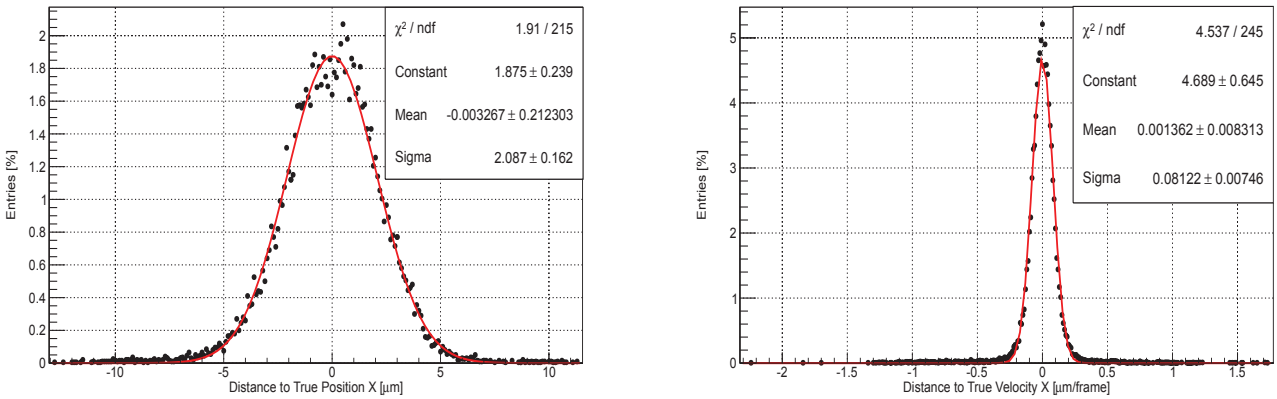
Un exemple de trajectoire est donné par la Fig. 5.8a, avec l'évolution de la position X au cours du temps. La Fig. 5.8b montre l'évolution de la vitesse au cours du temps. Pour les deux trajectoires, la valeur mesurée par le filtre de Kalman est donnée en noir. Dans cet exemple, la vitesse moyenne est inférieure à 1 μm par image sur capteur et le signal d'un photon par image.



(a) (b)

FIGURE 5.8 – Valeur vraie en rouge, valeur mesurée en noir. (a) Évolution de la position X de la source au cours du temps. (b) Évolution de la vitesse X de la source au cours du temps.

L'écart-type de la distribution de la distance à la valeur vraie permet de mesurer la précision de localisation de la position et de la vitesse de la source. La Fig. 5.9a montre la distribution de l'écart à la vraie position selon l'axe X, et la Fig. 5.9b l'écart à la vitesse. Pour les deux distributions, un fit gaussien est appliqué.

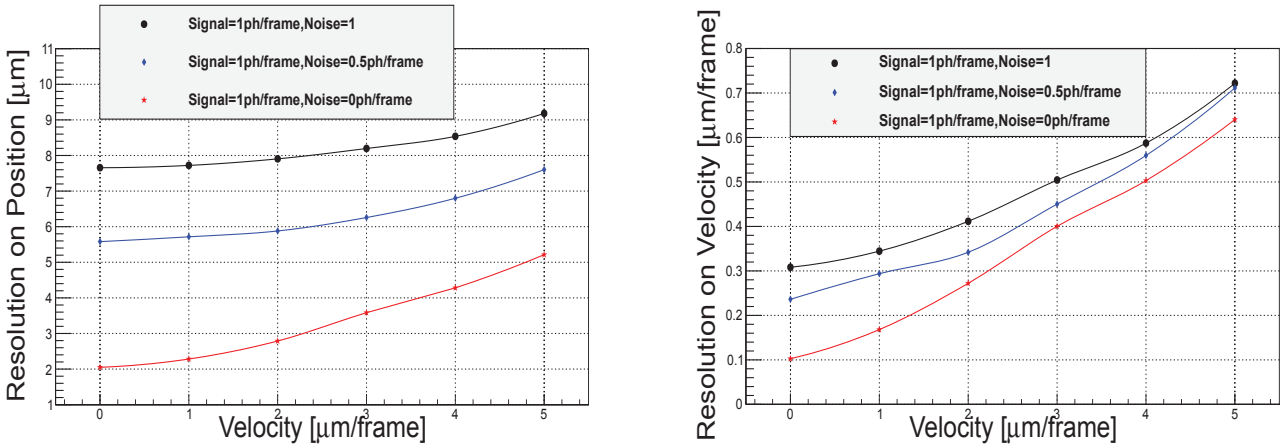


(a) (b)

FIGURE 5.9 – Distribution de l'écart à la valeur vraie pour 20 000 images et fit gaussien. (a) Position X. (b) Vitesse selon X.

La précision de localisation est de l'ordre de 2 μm en position et 0.08 μm/image en vitesse. Le filtre de Kalman associé au suivi permet d'obtenir une très bonne précision sur la vitesse en conservant une bonne précision de localisation. Le suivi est suffisamment réactif pour ne pas perdre la source lors des changements brusques de trajectoire.

La Fig. 5.10 montre l'évolution de la précision moyenne de localisation et de vitesse en fonction de la vitesse et du bruit de fond.

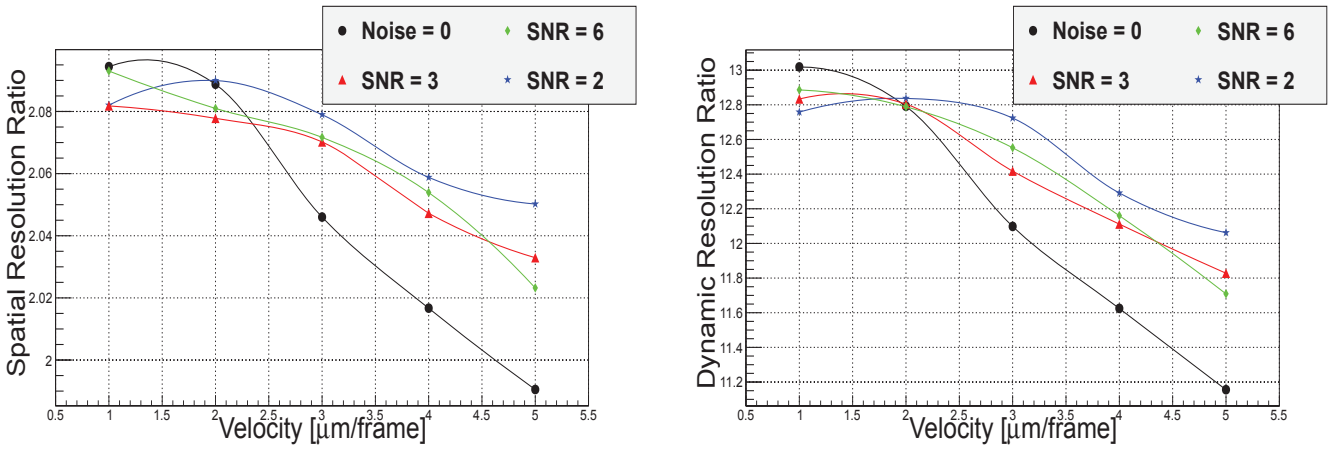


(a) (b)

FIGURE 5.10 – Évolution de la précision de localisation en fonction de la vitesse de la source, pour différents niveaux de bruit : 0 (rouge), 0.5 (bleu) et 1 (noir) photons par image, pour un signal d'un photon par image. (a) Précision de localisation sur la position. (b) Précision sur la vitesse.

La précision sur la position et la vitesse se dégrade avec la vitesse de la source et avec le bruit de fond. Le bruit de fond à une incidence plus forte que la vitesse sur la précision de localisation. La précision sur la vitesse est moins sensible à ce bruit de fond puisqu'il s'agit d'un mouvement d'ensemble.

L'apport du Kalman est mesuré en comparant la précision obtenue avec le filtre de Kalman à celle obtenue uniquement en utilisant les photons de chaque image pour mesurer la position de la source. La Fig. 5.11 montre le rapport entre ces deux précisions en fonction rapport signal sur bruit et de la vitesse de la source.



(a) (b)

FIGURE 5.11 – Évolution du rapport entre précision obtenue par un suivi image par image et précision obtenue par le filtre de Kalman, en fonction de la vitesse de la source et rapport signal sur bruit. (a) Rapport de la précision de localisation du suivi simple sur celle du suivi avec le filtre de Kalman. (b) Rapport de la précision dynamique du suivi simple sur celle du suivi avec le filtre de Kalman.

Le filtre de Kalman est plus intéressant dans un environnement bruité, lorsqu'un poids faible sur les photons de bruit permet de diminuer leur influence. Le filtre de Kalman améliore la précision de localisation d'un facteur 2 à petites vitesses (0.1 pixels par image) et d'un facteur 1.7 aux vitesses supérieures (1 pixel par image) dans un environnement non bruité et d'un facteur 1.9 en présence de bruit de fond. La précision dynamique est améliorée d'un facteur 13 à faible vitesse et d'un facteur 8 aux vitesses supérieures (10 en présence de bruit de fond).

Le filtre de Kalman permet de diminuer efficacement l'impact du bruit de reconstruction du signal ainsi que du bruit de fond. Ces résultats ont été obtenus pour des trajectoires droites mais le filtre peut être adapté à d'autres trajectoires en modifiant la matrice reliant la mesure aux positions estimées.

5.3 Mesure du coefficient de diffusion de particules libres

5.3.1 Description de la mesure

La mesure du coefficient de diffusion est différent du suivi de particules classiques. Il n'est pas possible d'obtenir une information sur la vitesse qui permet d'avoir une meilleure précision sur la position comme dans le cas précédent. Nous verrons par la suite deux méthodes utilisées pour améliorer la précision sur le coefficient de diffusion.

Le calcul du coefficient de diffusion D est effectuée à partir de la mesure du déplacement quadratique moyen ρ (MSD ou *Mean Square Displacement*) de la particule :

$$\rho(n) = \frac{1}{N-n+1} \sum_{k=1}^{N-n+1} (X_{k+n} - X_k)^2 \tag{5.18}$$

$$= 2dDn \tag{5.19}$$

avec n le nombre d'itérations entre deux positions, N le nombre de points du mouvement, d la dimension du mouvement et X_k la position de la particule à l'itération k.

Pour obtenir D, il faut mesurer le coefficient directeur de la droite $\rho(n)$. Cette mesure sera faite à partir d'une méthode des moindres carrés.

5.3.2 Influence des précisions temporelle et de localisation et optimisation

Plusieurs facteurs de mesure influencent la précision obtenue sur D :

- l'incertitude de reconstruction de la position σ_0 de la source image par image, appelée erreur statique ;
- l'incertitude dynamique σ créée par l'échantillonnage temporel fini de la trajectoire.

X. Michalet [4] et A.Berglund [5] ont modélisé l'influence de ces deux erreurs sur la mesure du MSD.

L'erreur dynamique dépend du coefficient de diffusion de la particule et du temps d'intégration d'une image :

$$\sigma \approx \sigma_0 \sqrt{1 + \frac{Dt_E}{s_0^2}} \tag{5.20}$$

avec t_E le temps d'intégration, D le coefficient de diffusion, s_0^2 est la variance de la PSF du détecteur.

L'erreur augmente avec D et le temps d'intégration. En effet, ces deux paramètres régissent la précision temporelle du mouvement.

Cette erreur est propagée dans la mesure du MSD [6] :

$$\rho(i\Delta t) = 2d\left(\sigma^2 - 2RD\Delta t\right) + 2dDi\Delta t \tag{5.21}$$

$$= \alpha + \beta i\Delta t \tag{5.22}$$

$$R = \frac{1}{\Delta t} \int_0^{\Delta t} S(t)\left[1 - S(t)\right] dt \tag{5.23}$$

avec i le nombre d'itérations entre deux positions, Δt la durée d'une image et $S(t)$ le pourcentage d'illumination d'une image au temps t. Pour une illumination constante, $R = \frac{1}{6}$.

Le résultat de l'Eq. 5.21 montre le biais introduit par ces erreurs dans la fonctions $\rho(n)$. Les paramètres $\sigma(D)$ et D ne sont pas connus *a priori*. Une estimation de D permettrait une meilleure définition de l'erreur de mesure et ainsi une meilleure connaissance de D par itération.

Afin d'améliorer la précision sur le coefficient de diffusion D, X. Michalet et A.Berglund ont utilisé un calcul de Cramér-Rao pour comparer deux méthodes :

- une méthode de maximum de vraisemblance ;
- un calcul des moindres carrés optimisé en déterminant le nombre idéal de points $p_{\min}$ à utiliser dans le calcul :

$$p_{\min} \approx E\left[2 + 2.3x^{0.52}\right] \tag{5.24}$$

$$x = \frac{\sigma^2}{D\Delta t} - 2R \tag{5.25}$$

Le calcul de Cramér-Rao a montré que le résultat est semblable pour les deux méthodes. Dans la suite, la méthode des moindres carrés optimisée sera utilisée pour calculer D.

Nous essayerons de voir si le comptage de photon permet de limiter l'influence du floutage. De plus, nous verrons l'influence de la précision temporelle par rapport à la précision de localisation à fort coefficient de diffusion : pour un fort D, est-ce que la diminution de l'erreur statique obtenue par accumulation de photons est suffisante pour réduire la perte de précision due au floutage ?

5.3.3 Comparaison théorique des détecteurs emCCD et ebCMOS pour la mesure du MSD

Les capteurs emCCD et ebCMOS en mode comptage de photons se distinguent par trois facteurs importants pour la mesure de D :

1. L'efficacité quantique de l'ebCMOS est plus faible, d'un facteur 3 à 4 pour des longueurs d'onde adaptées en ne prenant pas en compte l'efficacité quantique effective.
2. La cadence de lecture de l'ebCMOS est 15 fois plus grande que pour l'emCCD. L'erreur dynamique sur la mesure de D est moins importante mais l'erreur statique est plus grande car le nombre de photons diminue.
3. L'ebCMOS permet une détection des photons à une précision de 2 μm (pour un pixel de 10 μm de côté), alors que les photons détectés par l'emCCD le sont par pixels.

Afin de mesurer l'influence des ces différences sur la mesure du coefficient de diffusion, une simulation Monte-Carlo a été implémentée. Pour chaque particule, des pas δt de 2 $\times 10^{-1}$ ms ont été simulés. La distance parcourue entre chaque pas suit une distribution aléatoire gaussienne de variance σ_D :

$$\sigma_D = \sqrt{2D\delta t} \tag{5.26}$$

L'erreur sur la position pour le capteur ebCMOS est simulée par un écart à la position vraie aléatoire suivant une distribution gaussienne d'écart-type égal à la PSF du détecteur à laquelle il faut ajouter l'erreur de reconstruction du photon. Dans le cas de l'emCCD, seule la PSF optique est simulée. Par contre, la position du photon n'est mesurable qu'en unités de pixels de 16 μm.

Pour chaque pas simulé, un photon est émis. La probabilité que le détecteur le mesure dépend de son efficacité quantique, ici 25 % pour l'ebCMOS et 80 % pour l'emCCD. L'efficacité quantique effective et l'erreur de comptage des photons de l'emCCD n'ont pas été prises en compte dans la simulation.

La cadence de lecture choisie est de 2 ms (10 pas) pour l'ebCMOS et 30 ms (150 pas) pour l'emCCD, ce qui correspond aux valeurs utilisées pour une mesure en grand champ de vue pour les deux caméras.

La Fig. 5.12 montre la distribution des coefficients de diffusion mesurées pour l'emCCD et l'ebCMOS pour des trajectoires de 4 et 40 secondes pour quatre valeurs de D : 10^{-3}, 10^{-2}, 10^{-1} et 1 $\mu m^2 s^{-1}$.

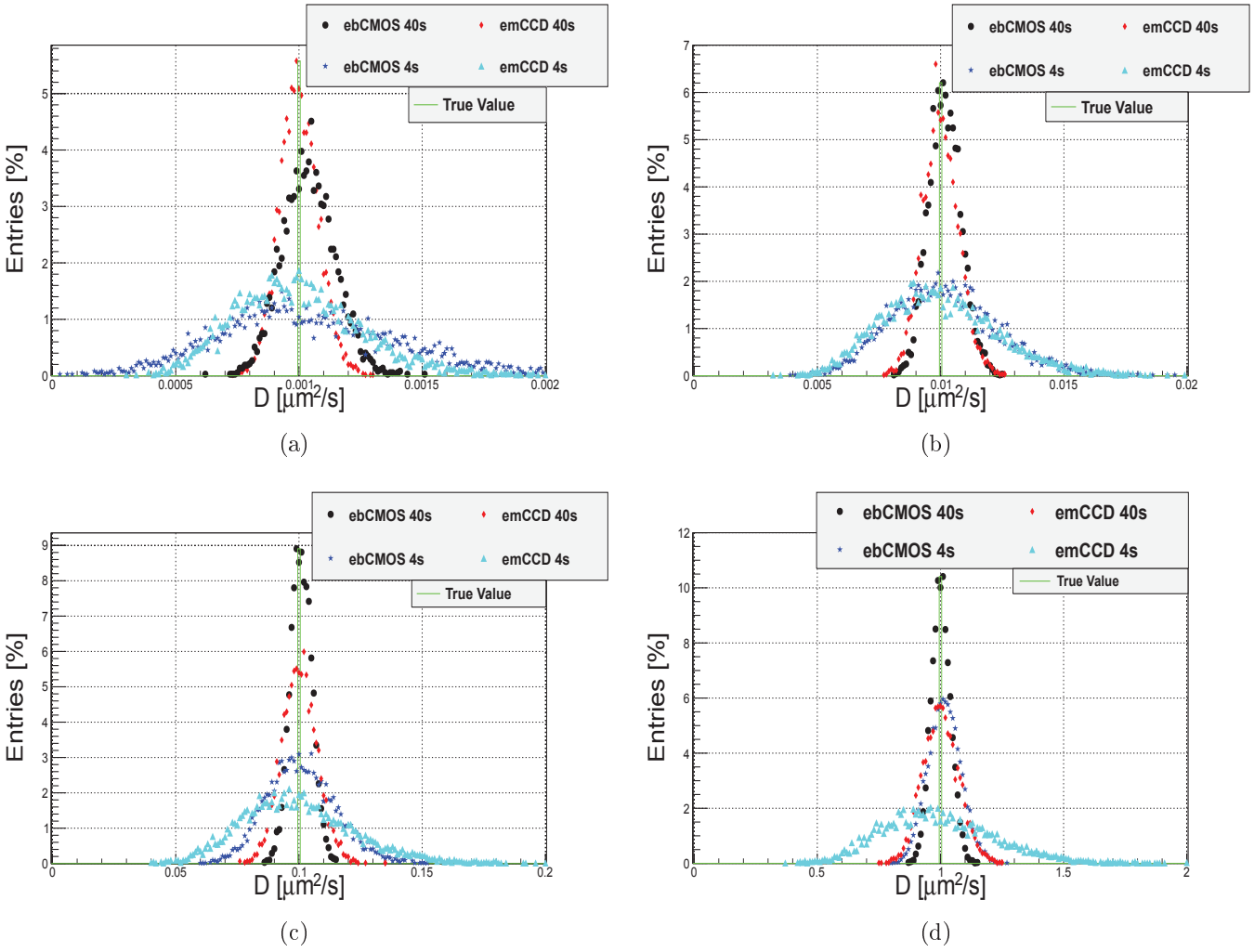


FIGURE 5.12 – Distribution des coefficients de diffusion mesurées pour l'emCCD et l'ebCMOS pour des trajectoires de 4 et 40 secondes. La valeur simulée du coefficient de diffusion est de (a) 10^{-3}, (b) 10^{-2}, (c) 10^{-1} et (d) 1 $\mu m^2 s^{-1}$.

Les écarts-types des distributions sont données par la table 5.1.

D [$\mu m^2 s^{-1}$]	Écart-type de la mesure de D [$\mu m^2 s^{-1}$]			
	emCCD 40 s	ebCMOS 40 s	emCCD 4 s	ebCMOS 4 s
10^{-3}	7.85×10^{-5}	1.04×10^{-4}	2.56×10^{-4}	3.65×10^{-4}
10^{-2}	7.23×10^{-4}	6.57×10^{-4}	2.33×10^{-3}	2.13×10^{-3}
10^{-1}	7.19×10^{-3}	4.40×10^{-3}	2.27×10^{-2}	1.38×10^{-2}
1	7.21×10^{-2}	3.93×10^{-2}	2.28×10^{-1}	6.70×10^{-2}

TABLE 5.1 – Écarts-types des mesures de coefficients de diffusions par simulation Monte-Carlo des capteurs emCCD et ebCMOS.

Pour des coefficients de diffusion de 10^{-3} à 10^{-2} $\mu m^2 s^{-1}$, la pixelisation et la cadence de lecture plus faible de l'emCCD permettent d'avoir une précision du même ordre de grandeur que l'ebCMOS avec sa faible efficacité quantique et sa PSF spatiale élargie. Dans ce cas, l'accumulation des photons permet une amélioration de l'erreur statique plus grande que la perte due au temps d'intégration.

Pour de plus grand coefficients de diffusion D, 10^{-1} à 1 $\mu m^2 s^{-1}$, la particule se déplace trop pour que l'augmentation du nombre de photons améliore suffisamment l'erreur statique. La précision obtenue pour l'emCCD se dégrade d'une facteur 2 par rapport à l'ebCMOS.

5.3.4 Amélioration de la précision avec le filtre de Kalman

Afin d'améliorer l'erreur statique et ainsi améliorer la précision sur D, Tseng et al.[7] ont montré qu'il était possible d'utiliser un filtre de Kalman. Le choix des paramètres du filtre W et V doivent s'adapter à la particule mesurée :

$$W = 2D\Delta t \tag{5.27}$$

$$S = W + 2V \tag{5.28}$$

avec S la variance de l'écart mesuré entre les points de la trajectoire.

Les résultats obtenus par Tseng *et al.* montrent une amélioration jusqu'à 70 % de l'erreur quadratique moyenne sur la reconstruction des trajectoires simulées dans le cas où l'erreur de mesure est 100 fois plus importante que la diffusion.

Cette approche sera implémentée pour l'ebCMOS dans un travail futur.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit l'algorithme utilisé pour le suivi de sources dynamiques.

Pour le suivi dynamique, une importance particulière est mise sur l'identification des sources potentielles, avec l'utilisation de tests probabilistes. L'utilisation du filtre de Kalman permet d'améliorer la précision sur la position et la vitesse lorsque les sources ont été validées, malgré le bruit de fond.

La vitesse de la source dégrade la précision malgré l'utilisation du filtre de Kalman, avec un passage de 2 μm de précision de localisation pour une source immobile à 5 μm pour une source évoluant à 5 μm/image sur capteur.

Dans le cas de la mesure du coefficient de diffusion, nous avons vu que les deux principaux facteurs limitants sont la précision sur la position de la source et le floutage lié à la cadence de lecture finie.

Pour des coefficients de diffusion faibles, l'emCCD et l'ebCMOS montrent des résultats semblables pour les simulations. Pour obtenir de meilleurs résultats pour l'ebCMOS dans ce cas, il est possible de sommer les photons détectés car le floutage est limité.

Pour des coefficients plus importants, il est nécessaire d'avoir un capteur rapide pour limiter le floutage. La faible cadence de l'emCCD dégrade la précision d'un facteur 2 dans des conditions parfaites par rapport à l'ebCMOS, malgré son efficacité quantique inférieure. Pour un signal plus important, le sCMOS serait alors intéressant.

Chapitre 6

Suivi de nanocristaux à très bas niveau de lumière et mesures de coefficients de diffusion

La vidéo-microscopie actuelle utilise des balises lumineuses afin de suivre des particules dans les systèmes biologiques. L'utilisation de nanocristaux (*Quantum Dots* ou QD) est très répandue [8],[9], [10][11] grâce à leur stabilité et leur adaptabilité.

Un des points faibles des QD, le clignotement (*blinking*) [12][13], état intermittent de coupure du signal, est cependant utile pour identifier les particules uniques.

L'expérience présentée dans ce chapitre porte sur le suivi par la caméra ebCMOS de QD libres entre deux lames au centre Nanoptec en collaboration avec l'équipe de Christophe Dujardin, David Amans, Gilles Ledoux et Florian Kulzer.

Dans les parties 6.1 et 6.2, nous décrirons le montage optique utilisé. Dans la partie 6.3 nous utiliserons le comptage de photons pour observer le blinking de QD sur un grand champ de vue. Nous mesurerons la précision sur la position et la vitesse des QD obtenue par l'algorithme de suivi.

Enfin, nous nous intéresserons dans la partie 6.4 aux QD libres entre deux lames de verre, en mesurant leur coefficient de diffusion. Nous retrouverons ainsi la taille de ces particules en utilisant la relation de Stokes-Einstein.

6.1 Description du système optique

6.1.1 Microscopie de fluorescence

Le phénomène de fluorescence se décrit par la désexcitation immédiate d'une molécule par émission de photons. L'excitation est produite par absorption de photons de longueur d'onde λ_A. La longueur d'onde d'émission λ_E est plus élevée car le photon émis est moins énergétique. La microscopie de fluorescence consiste à filtrer la longueur d'onde d'émission avec un miroir dichroïque pour ne recevoir que le signal provenant des marqueurs fluorescents. Son principe est schématisé par la Fig. 6.1.

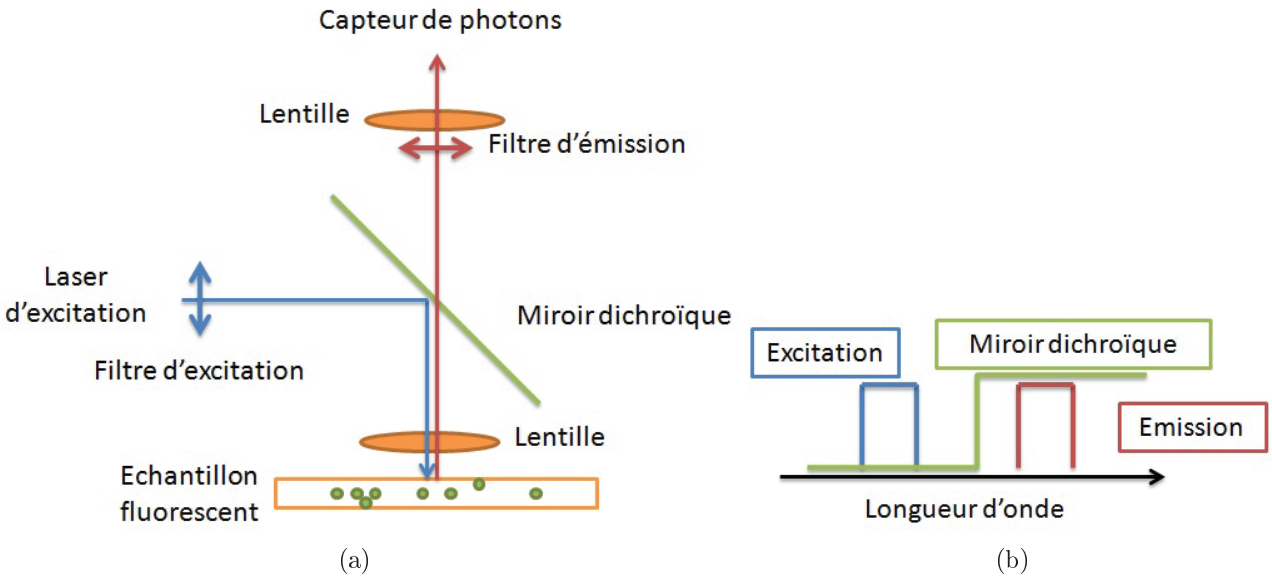


FIGURE 6.1 – (a) Principe de la microscopie de fluorescence. Un échantillon est combiné à des marqueurs fluorescents. Ces marqueurs sont excités par laser et se désexcitent par émission de photons. Un miroir dichroïque est utilisé pour filtrer la longueur d'onde d'émission reçue par le photo-détecteur. (b) Un miroir dichroïque est transparent pour une plage de longueur d'onde et réfléchissant pour le reste.

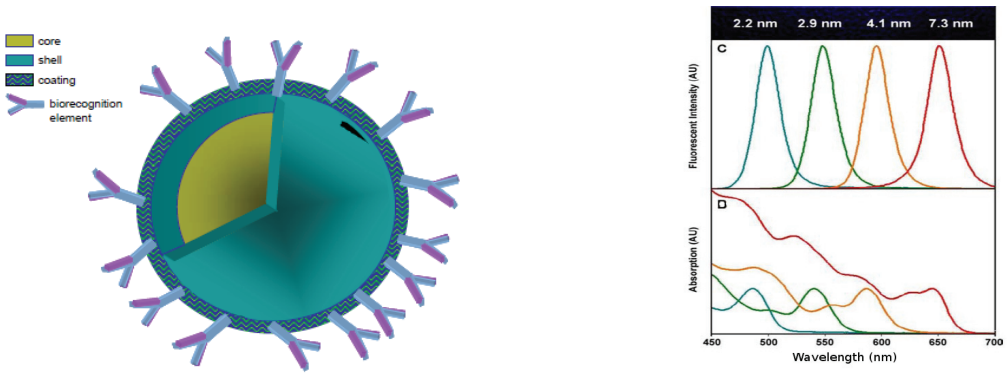
Il existe plusieurs groupes principaux de marqueurs fluorescents utilisés en microscopie de fluorescence [14] :

1. les protéines fluorescentes (*fluorescent proteins*) ;
2. les nanocristaux semiconducteurs (*quantum dots*).
3. les colorants fluorescents (*organic dyes*) ;

Dans la suite, nous décrirons particulièrement les *Quantum Dots* (QD) utilisés dans cette expérience.

6.1.2 Nanocristaux semiconducteurs

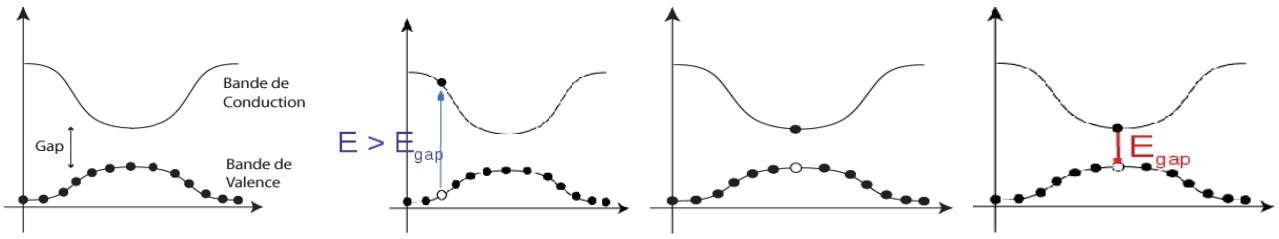
Les nanocristaux semiconducteurs ou QD (*Quantum Dots* ou boîte quantique) sont des nanoparticules (1 - 100 nm) composées par exemple d'un cœur de séléniure de cadmium (CdSe) recouvert d'une enveloppe de sulfure de zinc (ZnS). Un revêtement et des éléments biochimiques peuvent être ajoutés pour les combiner avec des systèmes biologiques. La Fig. 6.2 montre un schéma d'une QD ainsi que les spectres d'absorption et d'émission de deux QD de tailles différentes.



(a) (b)

FIGURE 6.2 – (a) Schéma représentatif d'une boîte quantique (QD). (b) Spectres d'absorption et d'émissions de QD de rayon 2.2, 2.9, 4.1 et 7.3 nm [11].

Les électrons d'une QD sont confinés dans les trois dimensions et la bande de valence est remplie. Ainsi, une QD se comporte comme un atome pour les transitions énergétiques. La Fig. 6.3 montre comment un électron peut passer dans un état excité de la bande de conduction avec l'énergie d'un photon incident puis se désexciter par l'émission d'un photon ayant l'énergie de la bande de valence. Comme la bande de valence de la QD est liée à sa taille, la longueur d'onde d'émission d'une QD dépendra aussi de sa taille comme le montre la Fig. 6.2.



(a) (b) (c) (d)

FIGURE 6.3 – (a) Schéma des bandes de conduction et de valence d'une QD. (b) Passage d'un électron excité de la bande de valence à la bande de conduction. (c) et (d) Désexcitation de l'électron par émission d'un photon d'énergie E_{gap}.

Les QD ont un meilleur rendement quantique et sont plus résistantes au photoblanchiment (perte de la fluorescence), possèdent un spectre d'absorption plus large et un spectre d'émission plus étroit que les protéines fluorescentes. Ils sont cependant plus gros et moins biocompatibles que ces dernières. De plus ils souffrent du phénomène d'intermittence de la fluorescence ou *blinking* lors d'une excitation continue qui les fait passer fréquemment d'un état allumé à éteint pendant un laps de temps variable.

6.2 Description de l'expérience

6.2.1 Montage expérimental

L'observation des QD [1] par l'ebCMOS a été faite en utilisant le montage de microscope achromatique [15] de l'équipe de Christophe Dujardin, David Amans, Gilles Ledoux et Florian Kulzer au centre Nanoptec [2] de Lyon. Le schéma du montage est donné par la Fig. 6.4. Les paramètres expérimentaux de la caméra sont donnés par la table 6.1.

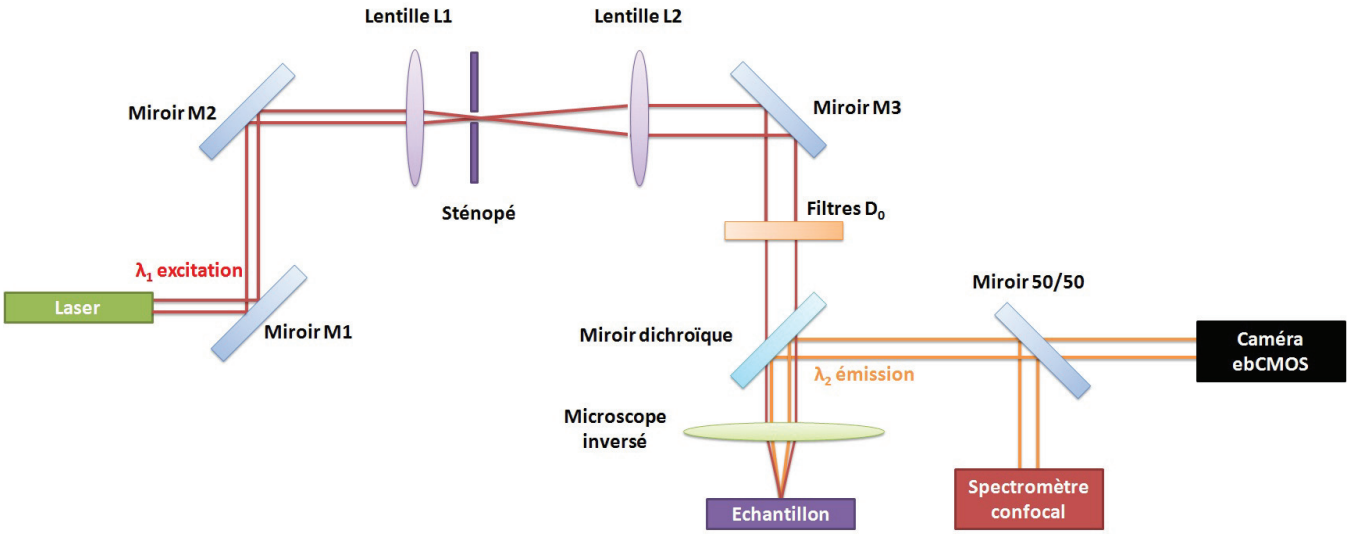


FIGURE 6.4 – Montage expérimental de l'expérience de suivi de QD avec le microscope achromatique de l'équipe de Christophe Dujardin, David Amans, Gilles Ledoux et Florian Kulzer au centre Nanoptec.

Cathode	Acquisition	Champ de vue caméra	Courant d'obscurité	Haute tension appliquée
S25	250 fps	16 mm^2 400×400 pixels	235 Hz/mm^2 9.3 $\times 10^{-5}$ evt/pixel/im	2.8 kV

TABLE 6.1 – Résumé des paramètres de la caméra ebCMOS pendant l'expérience de suivi de QD

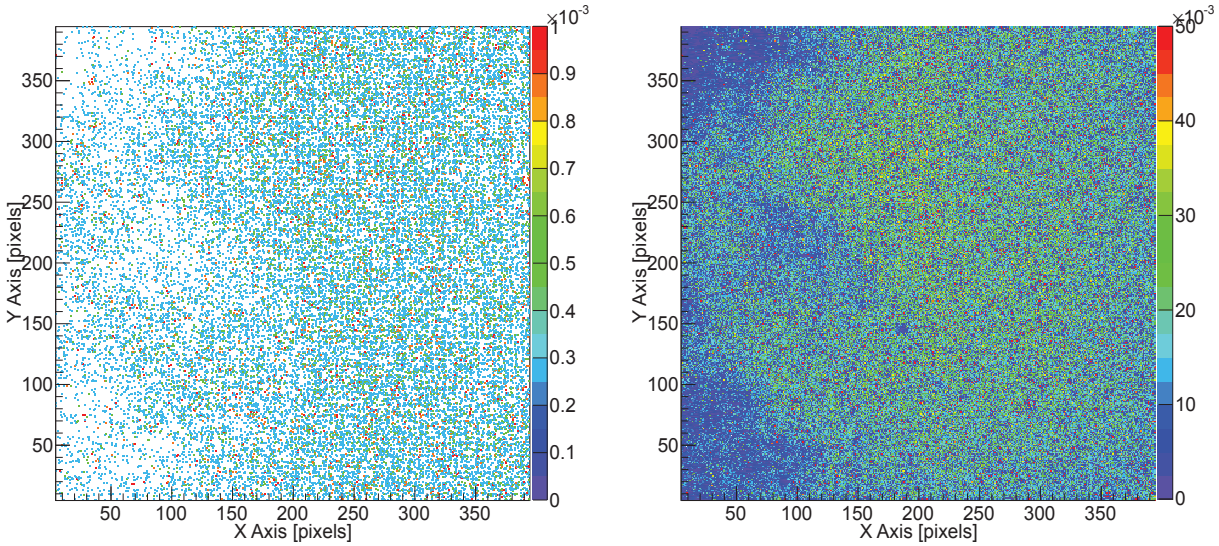
Dans la première partie de l'expérience de calibration de la précision de localisation, les QD seront fixés sur une lame de verre. Dans l'expérience de mesure du coefficient de diffusion, les QD seront libres dans une goutte déposée entre deux lames de verre.

6.2.2 Mesure du bruit de fond

Une mesure du bruit de fond a été effectuée sur deux acquisitions de 20 000 images. La première mesure le bruit caméra dans le noir. La seconde mesure le bruit de fond issu

1. Invitrogen® : pic d'émission 605 nm, excitation 473 nm, taille 10 - 20 nm, concentration $10^{-9}10^{-6}$
2. nanoptec.univ-lyon1.fr

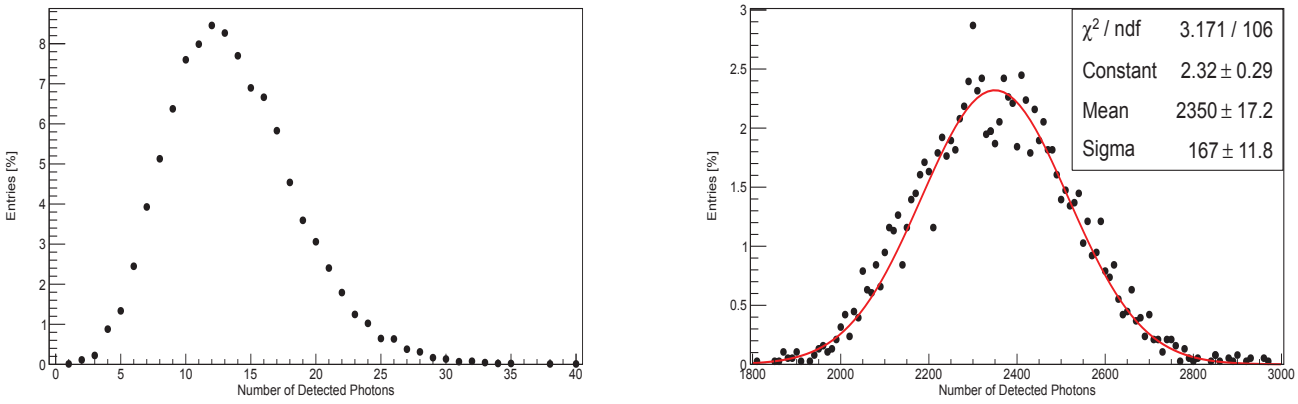
du laser. Les Fig. 6.5a et 6.5b montrent la distribution spatiale du bruit de fond pour ces deux acquisitions.



(a) (b)

FIGURE 6.5 – Bruit de fond mesuré sur 20 000 images. L'échelle de couleur correspond à la valeur moyenne du nombre de photons par image et par pixel. (a) Bruit de la caméra dans le noir. (b) Bruit de fond du microscope, laser en conditions expérimentales.

Le bruit de fond ajouté par le laser n'est pas homogène. Le rayon de mesure du bruit de fond local R_{bg} choisi sera de l'ordre de 30 pixels. La Fig. 6.6 montre la distribution du nombre de photons détectés par image pour les deux acquisitions.

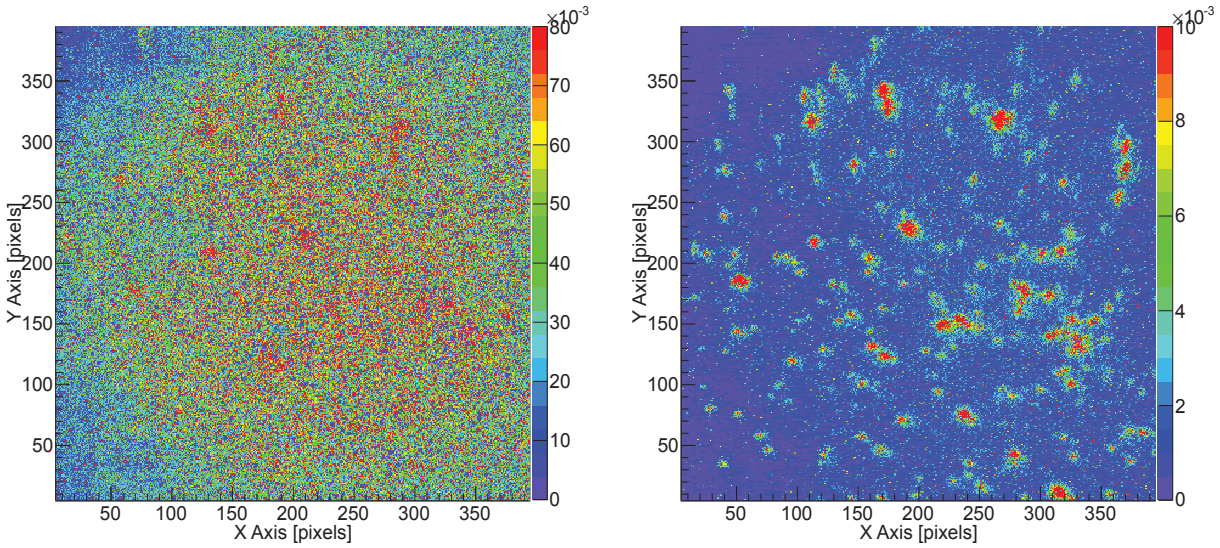


(a) (b)

FIGURE 6.6 – Distribution du nombre de photons détectés par image. (a) Bruit caméra dans le noir. (b) Bruit de fond du microscope, laser en conditions expérimentales.

Le bruit caméra est très faible, de l'ordre de 13 photons par image. Il est négligeable devant le bruit de fond du microscope qui est de l'ordre de 2350 photons par image.

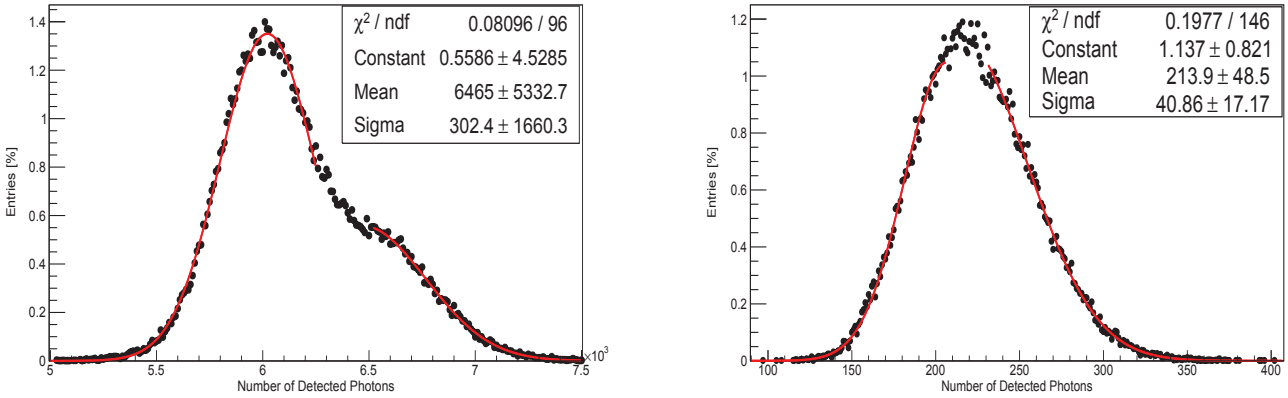
Un filtre passe bande de la longueur d'onde d'émission peut être ajouté devant la caméra pour diminuer le bruit de fond d'auto-fluorescence. Les images intégrées de deux acquisitions de QD fixées avec et sans filtre sont données dans la Fig. 6.7.



(a) (b)

FIGURE 6.7 – Image intégrée sur 20 000 images de QD. (a) Montage normal. (b) Ajout d'un filtre passe bande (610 nm)

Le bruit de fond et le signal diminuent fortement, mais dans des proportions différentes, ce qui augmente le rapport signal sur bruit. La distribution du nombre de photons détectés par image au cours de l'acquisition est donnée pour les deux acquisitions par la Fig. 6.8.



(a) (b)

FIGURE 6.8 – Distribution du nombre de photons détectés par image de QD fixées. (a) Conditions normales. (b) Ajout d'un filtre passe bande.

Le signal est divisé par un facteur 30 après insertion du filtre, passant de 6465 à 213 photons détectés en moyenne par image. Le rapport signal sur bruit est lui multiplié par un facteur 8.5. Les résultats sont résumés dans la table 6.2.

Signal moyen par image [ph]	Sans QD	Avec QD	Signal QD	SNR
Sans filtre	2 350	6 465	4 115	1.75
Avec filtre	13	213	200	15.38

TABLE 6.2 – Comparaison du signal moyen détecté avec et sans filtre avec et sans échantillon de QD et calcul du rapport signal sur bruit moyen sur toutes les QD.

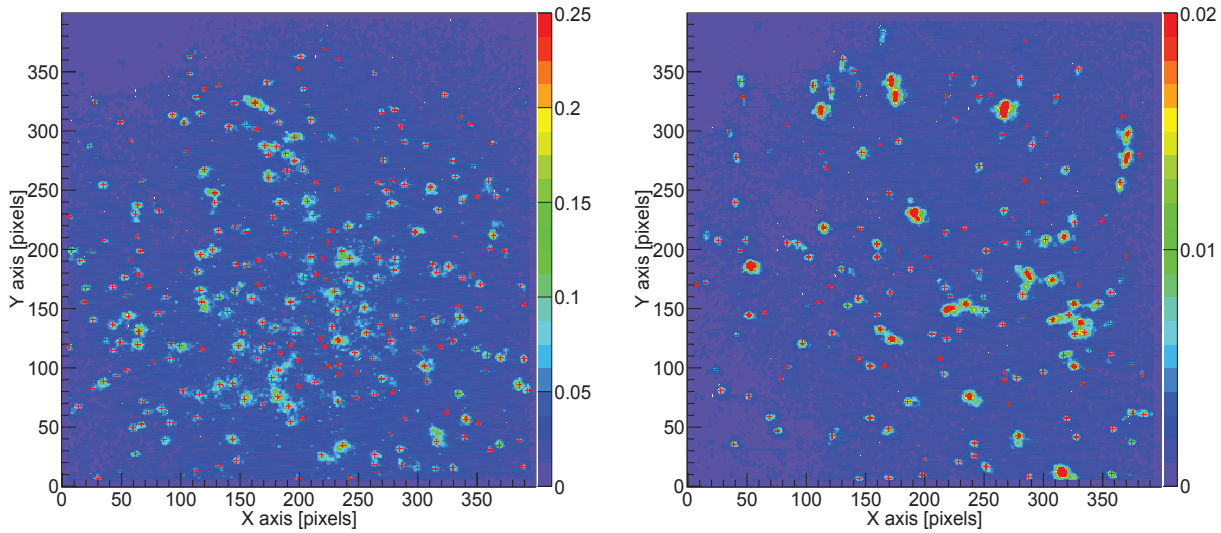
6.3 Mesures de précision de localisation et détection du clignotement

6.3.1 Mesures de précision de localisation pour deux échantillons d'intensités différentes

Les QD sont fixées, il est donc possible de connaitre leur position exacte après un grand nombre d'images. La méthode utilisée pour obtenir la précision de localisation sur la position des QD est identique à la méthode utilisée précédemment dans les parties 4.2, 4.3 et 4.4.

Deux conditions expérimentales sont étudiées, faisant varier l'intensité du laser d'un facteur 10 entre les échantillons **A** et **B**.

Les images de la Fig. 6.9a et 6.9b montrent les images intégrées de l'ensemble des deux acquisitions. Les croix représentent les sources mesurées et leur position, l'échelle de couleur représente le signal moyen du pixel en photons détectés.



(a) (b)

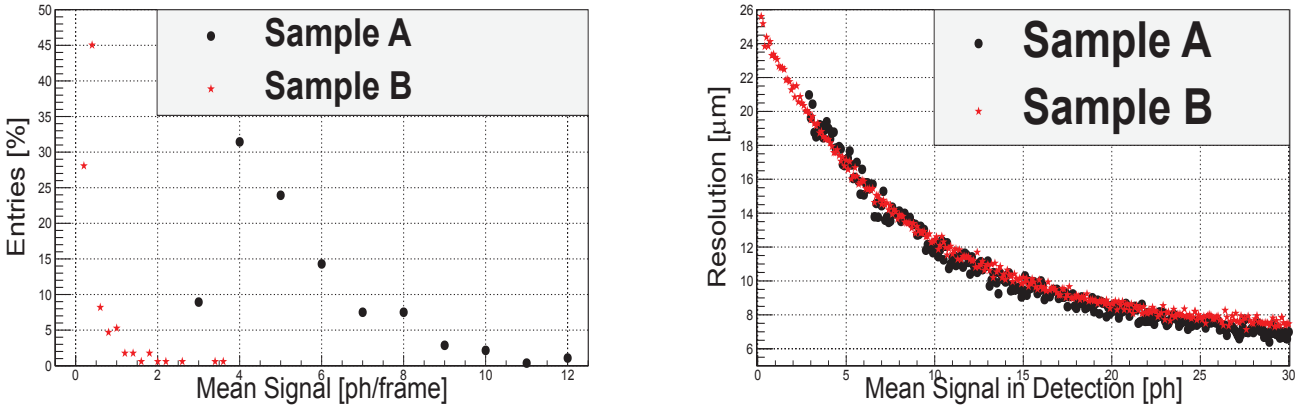
FIGURE 6.9 – Image intégrée en photons des QD fixées, l'échelle de couleur représente le signal moyen du pixel en photons. Les croix marquent le centre des sources. (a) Échantillon **A**. (b) Échantillon **B**.

280 QD sont mesurées pour l'échantillon **A** et 171 pour l'échantillon **B**. La Fig. 6.10a montre la distribution du signal moyen mesuré par les QD au cours de l'acquisition pour les deux échantillons. La table 6.3 résume les résultats obtenus.

	Nombre de QD	Signal moyen des QD
A	280	5 ph/image
B	171	0.5 ph/image

TABLE 6.3 – Données d'acquisition des deux échantillons de QD.

La Fig. 6.10b montre l'évolution de la précision de localisation sur la position des QD pour les deux échantillons en fonction du signal moyen reçu.

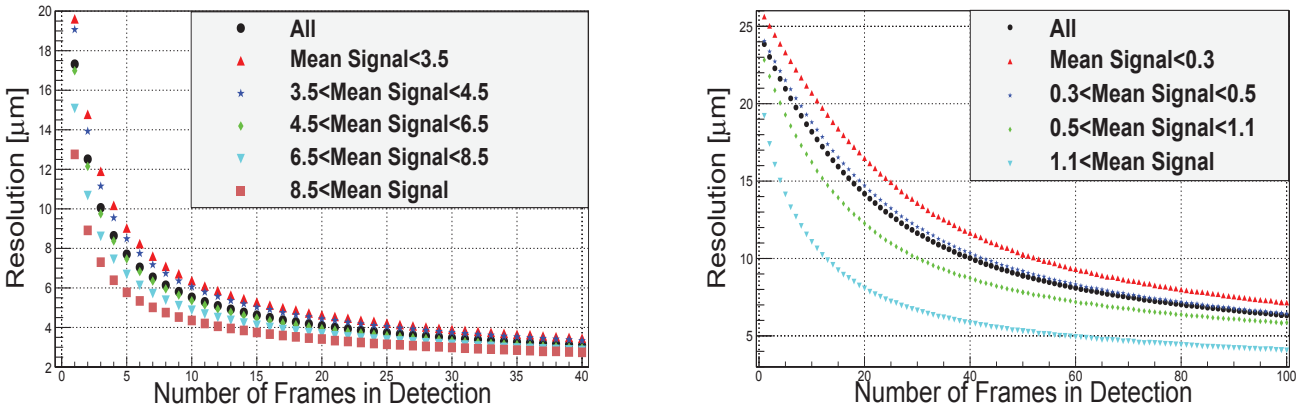


(a) (b)

FIGURE 6.10 – (a) Distribution du signal moyen par image des QD de l'échantillon. (b) Évolution de la précision de localisation moyenne sur capteur (pixel de 10 μm) sur la position des QD en fonction du signal moyen reçu.

Le signal moyen des QD de l'échantillon **A** est de 5 photons par image. Il est dix fois plus important que celui de l'échantillon **B**. La précision de localisation moyenne en fonction du nombre de photons reçus est comparable dans les deux échantillons. Augmenter l'intensité du laser n'augmente pas le rapport signal sur bruit de façon significative et n'améliore pas la précision de localisation à nombre de photons équivalent.

La Fig. 6.11 montre l'évolution de la précision de localisation des QD en fonction du nombre d'images utilisées dans la détection pour différents sous-ensembles de QD des deux échantillons. Les différents sous-ensembles et leur précision de localisation après une image sont donnés dans la table 6.4 pour l'échantillon **A** et la table 6.5 pour l'échantillon **B**.



(a) (b)

FIGURE 6.11 – Évolution de la précision de localisation moyenne sur la position des QD en fonction du nombre d'images utilisées dans la détection pour différents sous-ensembles de QD. (a) Échantillon **A**. (b) Échantillon **B**.

Échantillon **A**	Signal			Nombre	Précision à N images [μm]		
	Minimal	Maximal	Moyen	de QD	N =1	N =10	N =20
Ensemble	2.91	12.37	5.33	280	17.3	5.52	4.08
Sous-ensemble I	2.91	3.47	3.28	25	19.61	6.37	4.63
Sous-ensemble II	3.50	4.49	3.98	88	19.06	6.05	4.43
Sous-ensemble III	4.50	6.39	5.33	107	16.98	5.35	3.93
Sous-ensemble IV	6.50	8.46	7.44	42	15.07	4.87	3.67
Sous-ensemble V	8.52	12.37	9.85	18	12.75	4.35	3.41

TABLE 6.4 – Données des sous-ensembles de l'échantillon **A** : signal minimal, maximal et moyen, nombre et précision de localisation pour une image.

Échantillon **B**	Signal			Nombre	Précision à N images [μm]		
	Minimal	Maximal	Moyen	de QD	N =1	N =10	N =20
Ensemble	0.19	3.52	0.54	171	23.84	18.18	14.18
Sous-ensemble I	0.19	0.29	0.25	48	25.62	20.69	16.48
Sous-ensemble II	0.30	0.49	0.38	77	24.04	18.79	14.71
Sous-ensemble III	0.50	1.08	0.74	31	22.82	16.22	12.27
Sous-ensemble IV	1.17	3.52	1.90	15	19.21	11.06	8.06

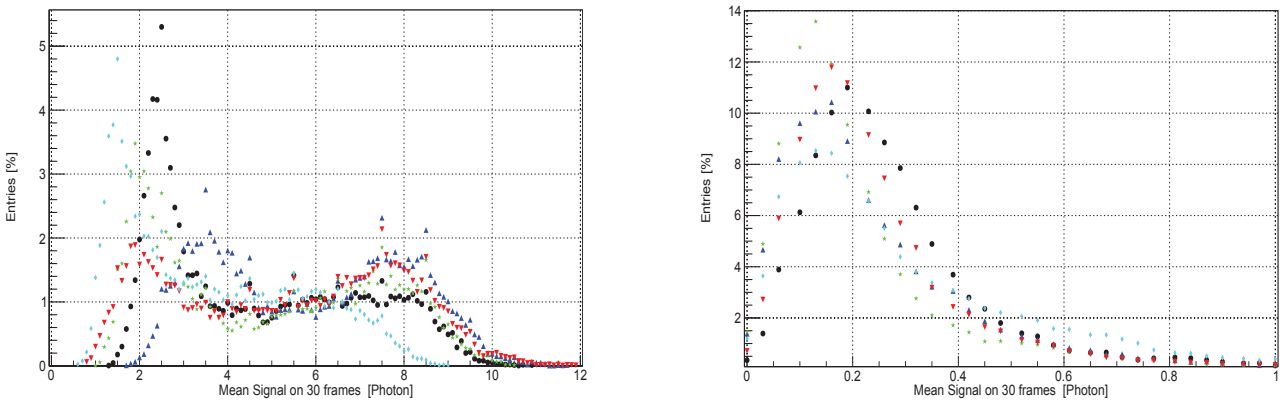
TABLE 6.5 – Données des sous-ensembles de l'échantillon **B** : signal minimal, maximal et moyen, nombre et précision de localisation pour une image.

Les résultats obtenus sont compatibles avec les résultats des expériences précédentes de la partie 4. Plus le signal moyen augmente, plus la précision de localisation s'améliore.

Après 30 images pour l'échantillon **A**, la précision de localisation est comprise entre 3 et 4 μm sur capteur (27 à 37 nm dans le plan objet). Il faut attendre 100 images pour que les QD les plus brillantes de l'échantillon **B** atteignent cette limite.

6.3.2 Mesures de clignotement de Quantum Dots

Le suivi du signal reçu des QD individuelles en photons au cours du temps permet de quantifier le blinking. Les Fig. 6.12a et 6.12b montrent la distribution du signal reçu de cinq QD sur l'ensemble des images pour les échantillons **A** et **B**.



(a) (b)

FIGURE 6.12 – Distribution du signal reçu moyen [ph/image] glissant sur 30 images (120 ms) de cinq QD sur l'ensemble des images : (a) Échantillon **A**. Visualisation des pics "ON" (7-8 photons) et "OFF" (2-4 photons) (b) Échantillon **B**.

Les données de l'échantillon **A** permettent d'identifier le blinking avec un signal "ON" aux alentours de 8 photons par image et un signal "OFF" du bruit de fond vers 2.5 photons.

Ces états "ON" et "OFF" peuvent être observés au cours du temps sur toutes les QD de l'échantillon. Il est ainsi possible d'étudier la statistique de blinking sur un grand champ de vue en continu. Un exemple est donné par la Fig. 6.13 pour dix QD.

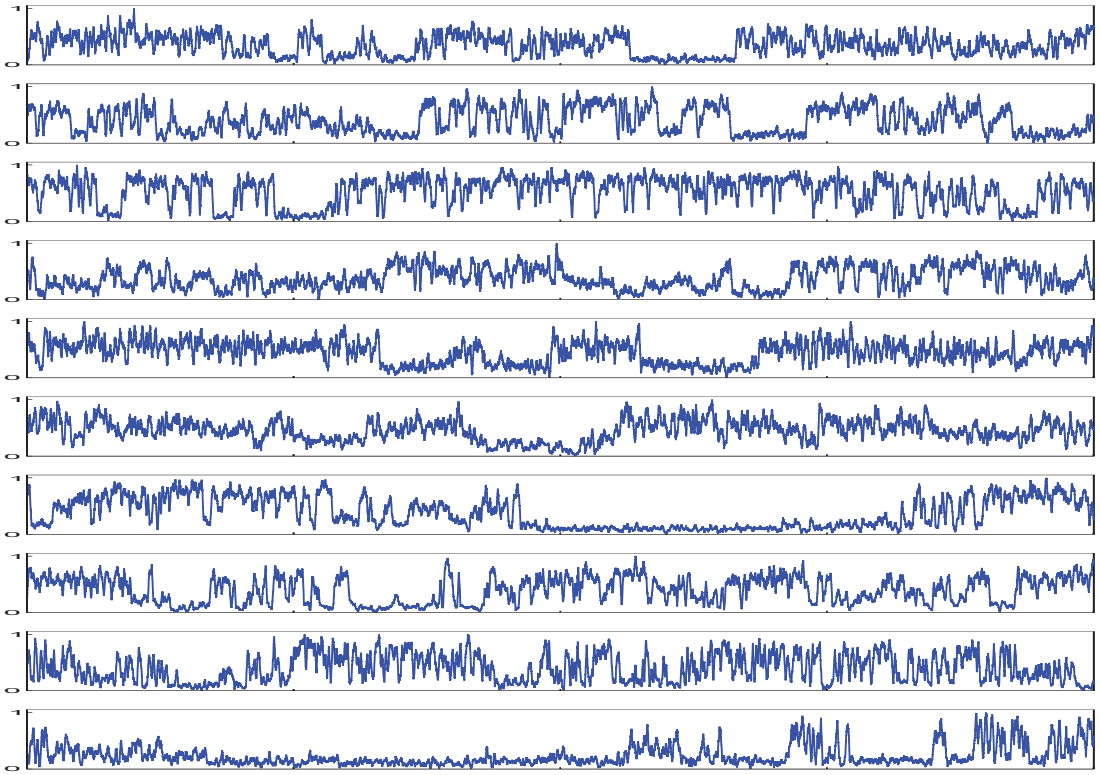


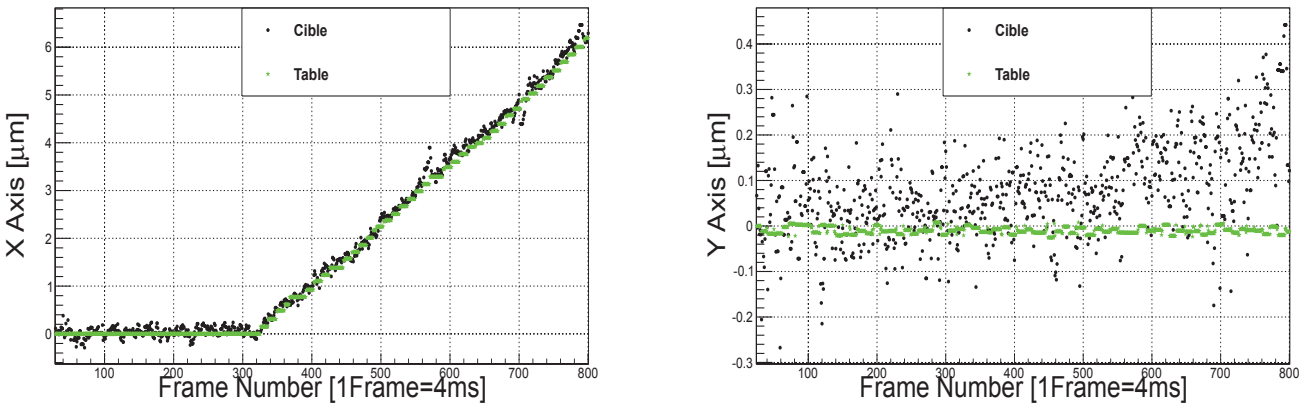
FIGURE 6.13 – Signal reçu moyen glissant sur 30 images [ph/image] pour dix QD de l'échantillon **A**. Le signal représenté pour chaque QD est la portion de signal comprise entre son maximum (1) et son minimum (0).

Ce résultat montre la preuve de concept du suivi rapide d'un grand nombre de QD en continu au cours du temps avec quantification du signal en photons. Une implémentation en ligne est tout à fait possible. Les tests effectués montrent que l'algorithme de détection de photons ne mobilise qu'un processeur sur seize. Pour des cibles immobiles, la localisation des sources est aussi très peu consommatrice de ressources.

6.3.3 Calibration des moteurs et précision sur la vitesse

Afin de tester l'algorithme de suivi en mouvement, les QD fixées sont déplacées par rapport à la caméra à l'aide d'une table XY qui mesure la position absolue du référentiel au cours du temps.

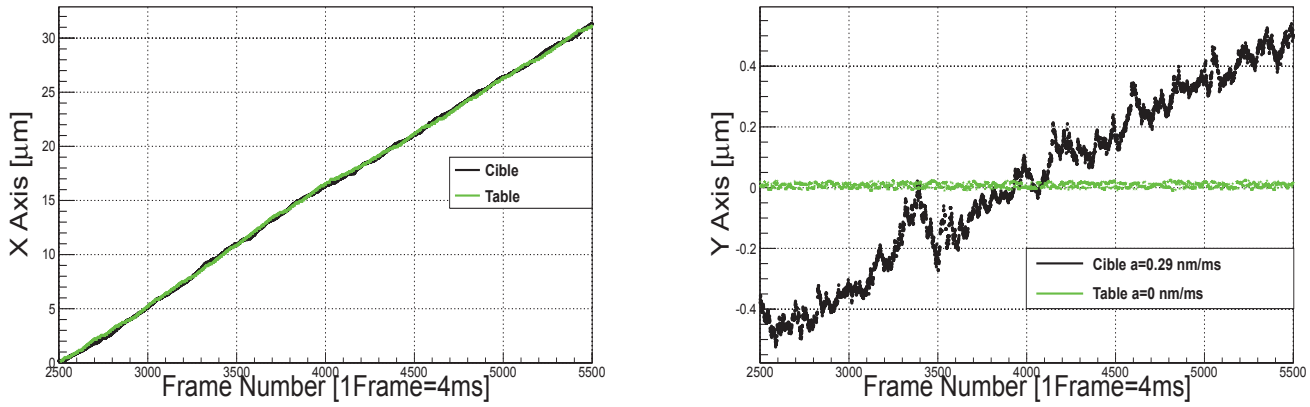
Le temps est calibré en détectant le déplacement des QD d'une part et du moteur d'autre part. Dans cette expérience, le déplacement se fait selon l'axe X. La Fig. 6.14 montre l'évolution de la position d'une QD et du moteur par rapport à leur position initiale selon les axes X et Y au cours du temps.



(a) (b)

FIGURE 6.14 – Écart à la position initiale au cours du temps pour la source et la table XY. (a) Axe X. (b) Axe Y.

Il est possible de mesurer le grandissement du sytème optique en comparant la vitesse mesurée à la vitesse des moteurs sur un nombre important d'images. Le grandissement calculé de cette façon est de 110×, identique à celui obtenu en utilisant une mire. La Fig. 6.15 montre le suivi de l'écart à la position initiale d'une QD et des moteurs pendant 3000 images pour les axes X et Y.

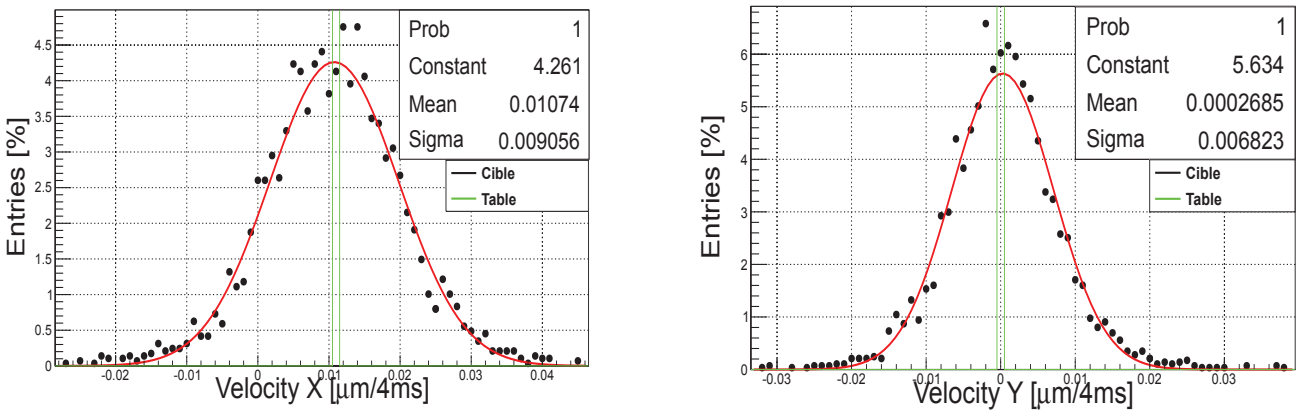


(a) (b)

FIGURE 6.15 – Écart à la position initiale au cours du temps pour la source et la table XY. (a) Axe X. (b) Axe Y.

La vitesse selon Y montre que les axes des moteurs et de la caméra ne sont pas parfaitement alignés. Les résultats obtenus montrent l'efficacité du suivi au photon.

La Fig. 6.16 montre la distribution de la vitesse mesurée image par image selon les axes X et Y. La vitesse mesurée par le moteur est montrée en comparaison.



(a) (b)

FIGURE 6.16 – Distribution de l'écart à la position initiale au cours du temps pour la source. La vitesse donnée pour la table X est donnée en vert. (a) Axe X. (b) Axe Y.

La précision pour cette QD sur la vitesse est de l'ordre de 9 $\times 10^{-3} \mu$m/4ms pour une vitesse de l'ordre de 1.07 $\times 10^{-2} \mu$m/4ms. La table 6.6 montre les résultats obtenus sur la vitesse pour la QD et les moteurs.

Axe	Vitesse du moteur [nm/4ms]	Vitesse mesurée [nm/4ms]
X	10.6	10.74
Y	3.02×10^{-5}	0.26

TABLE 6.6 – Comparaison entre la vitesse des moteurs et la mesure de la vitesse mesurée d'une QD.

La vitesse moyenne mesurée est très proche de celle donnée par les moteurs (1.35 % d'écart à la vitesse absolue) bien que la vitesse instantanée mesurée puisse s'écarter de manière significative de cette moyenne.

6.4 Quantum Dots libres entre deux lames de verre : mesure du coefficient de diffusion

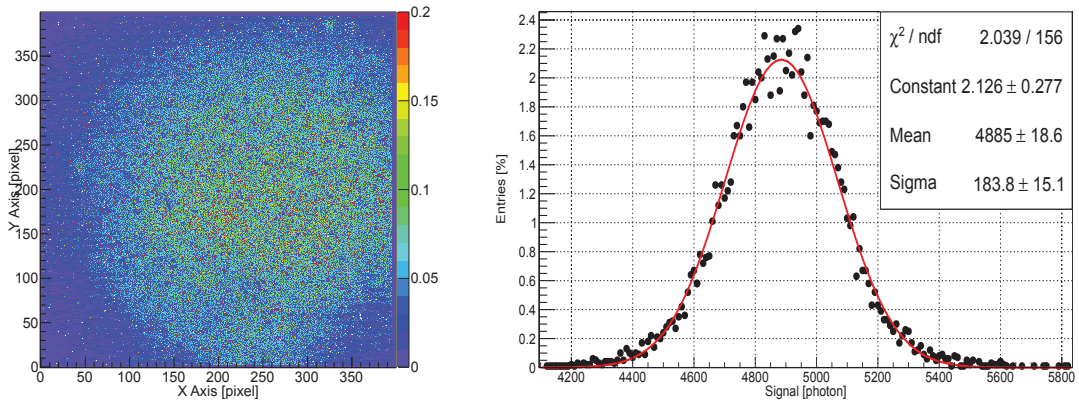
L'algorithme de suivi donne une bonne précision sur les positions et les vitesses des QD, nous permettant de l'utiliser pour suivre des QD libres dans une goutte entre deux lames de verre.

6.4.1 Signal et bruit de fond entre deux lames de verre

Pour permettre un suivi des QD libres entre deux lames de verre, un objectif 20 $\times$ est utilisé pour obtenir une profondeur de champ plus importante. Le bruit de fond augmente

car l'objectif capte plus de photons d'auto-fluorescence et ceux de QD hors champ, mais permet un suivi plus long.

La Fig. 6.17 montre le bruit de fond de cette expérience, sa distribution spatiale et le nombre de photons détectés par image.



(a) (b)

FIGURE 6.17 – Mesure du bruit de fond de l'expérience de QD libres entre deux lames. (a) Distribution spatiale du signal moyen reçu par pixel. L'échelle de couleur donne le nombre moyen de photons par pixels. (b) Distribution du nombre de photons détectés par image au cours de l'acquisition.

Le signal des QD est fort mais le rapport signal sur bruit est relativement faible, de l'ordre de 2. La Fig. 6.18 montre la distribution du signal moyen des treize QD suivies.

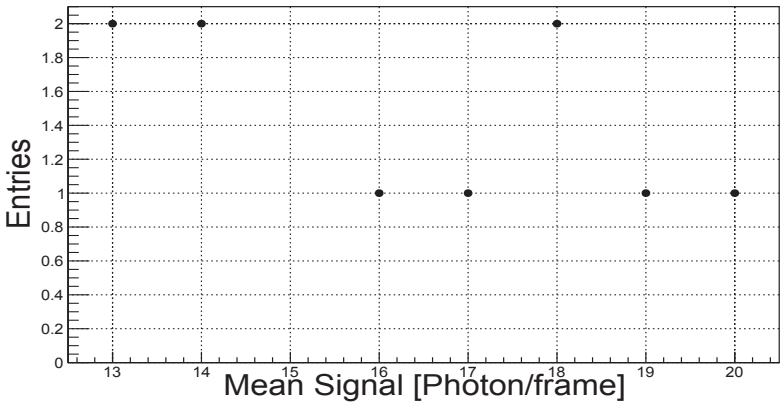
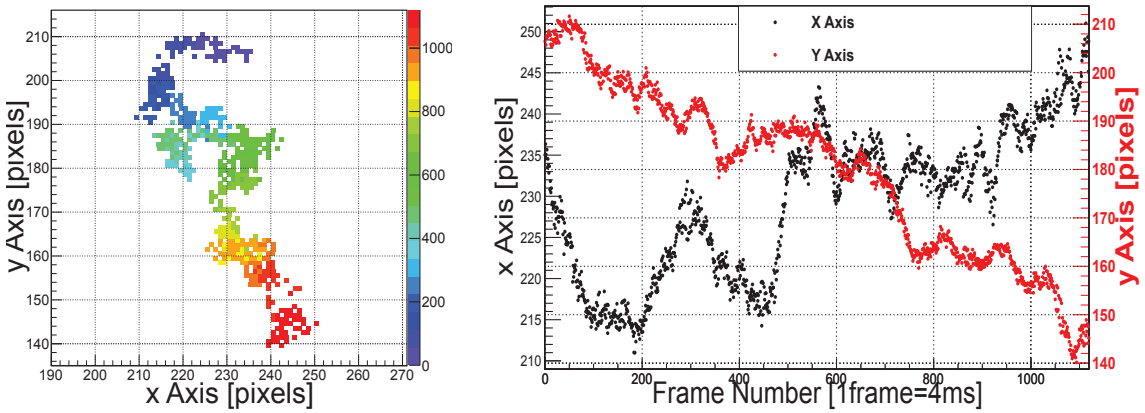


FIGURE 6.18 – Distribution du signal moyen des treize QD suivies en nombre de photons par image.

6.4.2 Mesure du coefficient de diffusion et calcul de la taille des QD

La Fig. 6.19a montre le suivi 2D d'une QD libre au cours du temps, l'échelle de couleur donnant le numéro d'image du suivi. La Fig. 6.19b montre l'évolution des positions X et Y au cours du suivi.



(a) (b)

FIGURE 6.19 – Visualisation du mouvement d'une QD libre en mouvement Brownien : (a) Mouvement XY au cours du temps. L'échelle de couleur correspond au numéro d'image du suivi. (b) Positions X et Y au cours du temps.

Le mouvement mesuré est typique d'un mouvement libre Brownien. Dans le cas d'un mouvement libre, l'évolution du MSD au cours du temps est une droite. La Fig. 6.20 montre l'évolution du MSD d'une des QD libres au cours du temps.

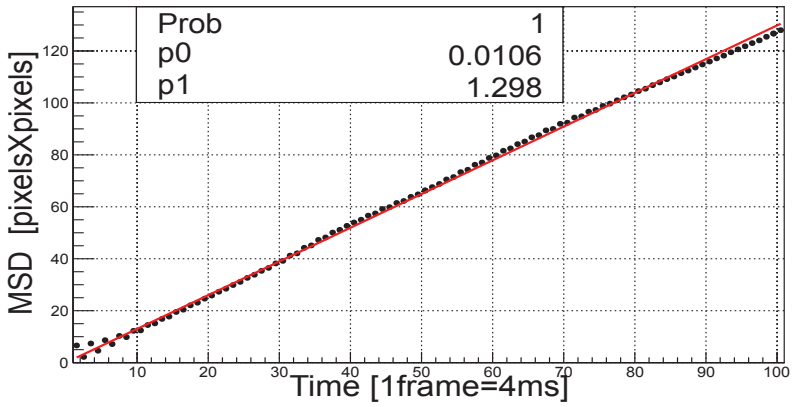


FIGURE 6.20 – Évolution du déplacement quadratique moyen (MSD) en fonction du temps, selon une droite de coefficient directeur 1.298 pixels^2/image.

Le fit est montré en exemple, l'utilisation de la méthode des moindres carrés optimisée citée précédemment dans la partie 5.3.2 a été implémentée pour ces calculs.

Le calcul du rayon de la particule à partir de son coefficient de diffusion s'effectue avec la formule de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B}{6\pi}\frac{T}{\eta r} \tag{6.1}$$

$$r = \frac{k_B}{6\pi}\frac{T}{\eta D} \tag{6.2}$$

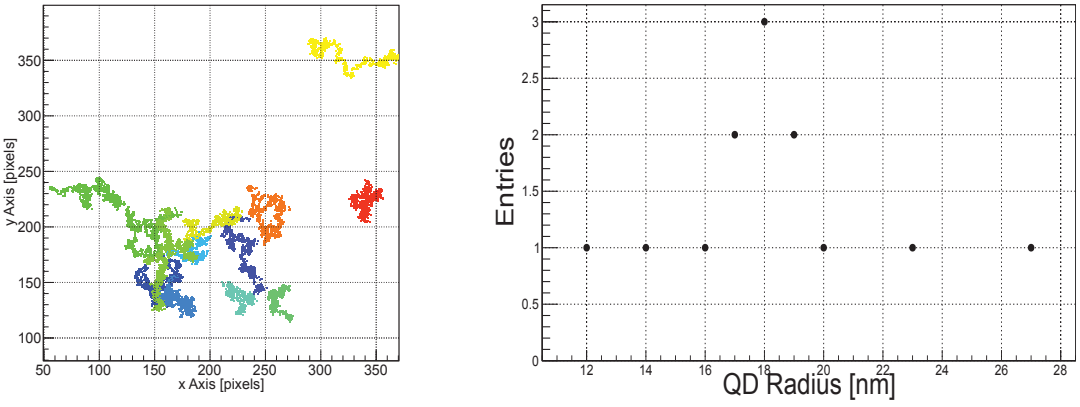
avec k_B la constante de Boltzmann , T la température, η la viscosité et r le rayon de la particule.

La viscosité du fluide dans cette expérience est proche de celle de l'eau. Il est donc possible de calculer r. La table 6.7 donne les valeurs numériques nécessaires au calcul du rayon de la particule.

Grandissement	k_B [J.K^{-1}]	T [K]	η [Pa.s]	D [m^2.s^{-1}]	d	r [nm]
20×	1.381×10^{-23}	293	10^{-3}	1.75×10^{-11}	2	**12.25**

TABLE 6.7 – Valeurs numériques utilisées dans le calcul du rayon de la particule à partir de la mesure de son coefficient de diffusion.

En utilisant ce calcul pour les treize trajectoires mesurées, dont la trace est donnée par la Fig. 6.21a, il est possible de retrouver la distribution des tailles de l'échantillon. Le résultat est donné par la Fig. 6.21b.



(a) (b)

FIGURE 6.21 – (a) Visualisation des mouvements reconstruits des QD en diffusion entre deux lames de verres. (b) Distribution des rayons des QD calculés à partir des coefficients de diffusion mesurés.

La distribution des tailles est compatible avec les données fournies par le fabricant. Il est donc possible de suivre des QD libres dont le coefficient de diffusion est de l'ordre de 1.75 $\times 10^{-11}$ m^2.s^{-1} soit 17.5 μm^2/s avec un temps d'intégration de 2 ms. Cela correspond à des conditions de floutage peu éloignées des conditions idéales calculées par X. Michalet [4] (5.7 ms pour $D = 1$ μm^2/s). Le comptage de photons permet une réduction de l'influence de ce paramètre car il nécessite pas de fit de la charge accumulée sur une image.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons observé des QD en mouvement avec un microscope achromatique en fluorescence.

Nous avons vu que les mesures de précision de localisation des chapitres précédents étaient toujours valables dans des conditions expérimentales. Les précisions de localisation obtenues sont proches des cas simulés dans les chapitres précédents, malgré le fort bruit de fond, avec dans le meilleur des cas une précision de localisation de 3 μm après 30 images (120 ms).

Nous avons pu observer le phénomène de clignotement des QD en utilisant le comptage de photons de l'ebCMOS avec un rapport signal sur bruit de l'ordre de 2. Cette analyse peut être implémentée en ligne, ce qui permettrait une étude du clignotement sur un grand champ de vue en continu.

Nous avons pu observer l'efficacité du suivi dynamique de sources dans ces conditions de fort bruit de fond, permettant une mesure de la vitesse moyenne précise à moins de 2 %.

En utilisant ce suivi, nous avons été capable de calculer la taille de nanoparticules en mesurant leur coefficient de diffusion, jusqu'à $D = 17.5\mu\text{m}^2/\text{s}$ au grandissement $20\times$. Cela correspond aux valeurs hautes des coefficients de diffusion observés en vidéo-microscopie.

Chapitre 7

Étude de la nage de bactéries à la surface et calibration d'un évènement de tumbling

La bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) est propulsée par en moyenne 6 flagelles accrochés aléatoirement sur son corps [16]. Ces filaments, lorsqu'ils tournent dans le sens anti-horaire, forment une hélice qui propulse la bactérie. Lorsqu'ils tournent dans le sens horaire, le faisceau se défait et la bactérie se réoriente dans un événement de *tumbling* [17]. Ces évènements déterminent la trajectoire aléatoire des bactéries.

Près de la surface, le frottement causé par le mouvement de l'eau modifie la trajectoire des bactéries, trajectoire qui devient circulaire, toujours dans le sens horaire. La force de frottement est dirigée perpendiculairement à l'axe de rotation de la bactérie et s'oppose à la contre-rotation du corps, créant un couple responsable de la rotation [18].

Le suivi de la nage de ces bactéries par une caméra rapide et sensible permettra une caractérisation des événements de tumbling et une amélioration du modèle hydrodynamique. La caméra ebCMOS permettra une détermination précise des contours des bactéries à chaque image de 2 ms.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à l'expérience de suivi de nage de bactéries à la surface avec l'équipe de Laurence Lemelle en collaboration avec Christophe Place et Jean-François Palierne du Laboratoire Joliot Curie à l'ENS de Lyon.

Dans les parties 7.1 et 7.2, nous décrirons les conditions expérimentales de microscopie en champ sombre. Puis nous verrons dans la partie 7.3 la méthode utilisée pour la détection et le suivi des bactéries.

La partie 7.4 montre les résultats obtenus au grandissements 100 ×. Les caractéristiques principales de la nage sont mesurés : vitesse, fréquence d'oscillation du corps et trajectoire. Certains types d'événements "anormaux" sont observés et quantifiés. La partie 7.5 montre la faisabilité du suivi au grandissements 20 ×.

7.1 Description du montage expérimental de la nage de bactéries observée par microscopie en champ sombre

7.1.1 Description de la microscopie en champ sombre

La microscopie en champ sombre permet d'observer un objet lumineux sur un fond noir, contrairement à la microscopie classique à fond clair qui permet d'observer des ombres sur un fond lumineux.

Le fond noir est obtenu par ajout d'un diaphragme circulaire entre la source de lumière et le condenseur. Le diaphragme permet d'obtenir un anneau de lumière qui sera focalisé par le condenseur sur l'échantillon avec un grand angle incident comme le montre la Fig. 7.1. Ainsi, le cône d'illumination ne sera pas capté par l'objectif. Seule la lumière diffusée par l'échantillon sera détectée, permettant ainsi d'avoir un contraste fort des bords de l'objet observé.

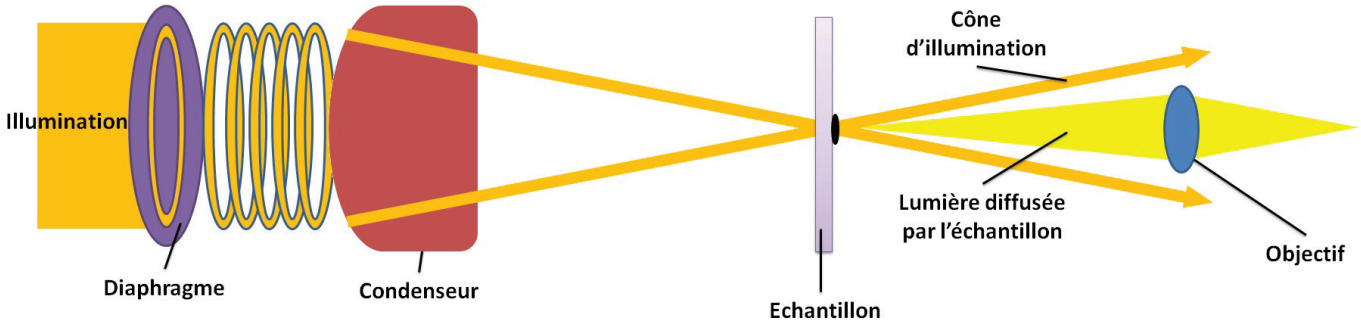


FIGURE 7.1 – Schéma de principe de la microscopie en champ sombre.

Ce mode de microscopie est idéal pour des détecteurs à bas niveau de lumière dont le but est de suivre des objets lumineux dans un environnement sombre.

7.1.2 Montage expérimental et réglages de la caméra ebCMOS

Les bactéries ont été observées à température ambiante (23 °C). L'imagerie en champ sombre a été effectuée avec un microscope inversé [1] équipé d'un objectif à huile ×100 [2] et un condenseur à huile [3]. L'illumination a été réalisée avec une lampe [4]. L'intensité à été choisie afin de correspondre à la limite de saturation de la caméra afin d'avoir un contour de bactérie le mieux déterminé possible. Un filtre rouge de contraste non fluorescent [5] a été ajouté sur le chemin optique pour diminuer la quantité de lumière incidente sur l'échantillon ainsi que pour supprimer les longueurs d'ondes inférieures à 530 nm, nocives à la motilité des bactéries en interférant avec les fonctions motrices [19].

1. DMIRBE Leica
2. HCX PL APO NA 1.4-0.7 Leica
3. Cytova® NA 1.2-1.4
4. Sunon® 12 V, 0.6 W
5. Cytoviva®

Deux autres grandissements sont disponibles : ×60 et ×20. La photo-cathode utilisée est une S20 avec un bruit très faible. Les paramètres du système optique et de la caméra utilisée sont résumés dans la table 7.1.

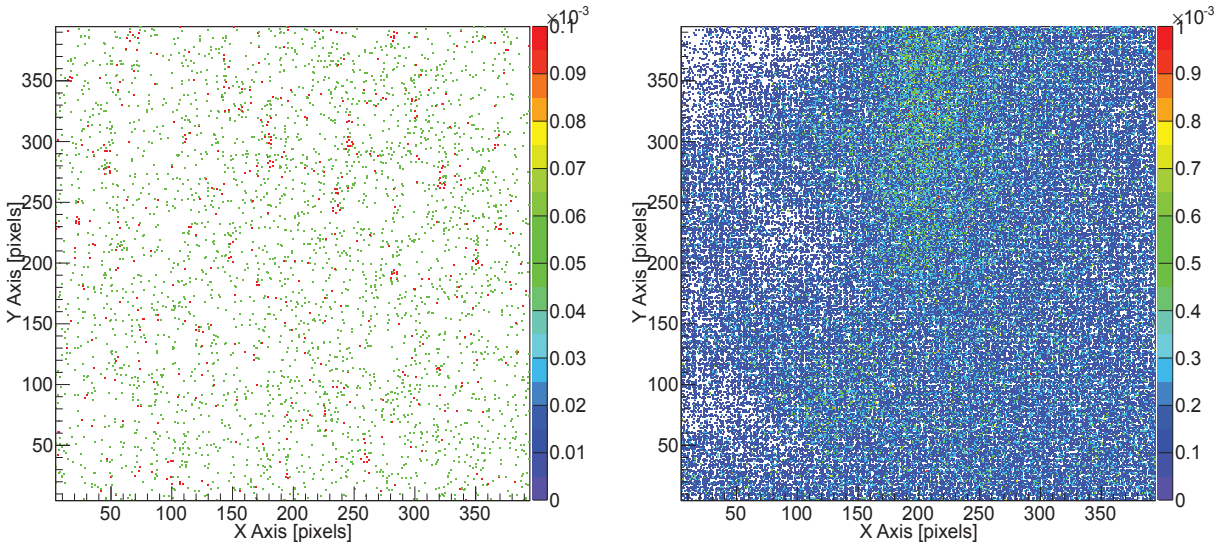
Caméra ebCMOS	Courant d'obscurité photo-cathode	Champ de vue capteur	Grandissements	Champ de vue objet
S20			×100	1 pixel = 100 nm
2.8 kV	15 Hz/mm^2	16 mm^2	×60	1 pixel = 166.67 nm
500 fps	6×10^{-6} evt/pixel/im	400×400 pixels	×20	1 pixel = 500 nm

TABLE 7.1 – Résumé des paramètres du système optique et de la caméra utilisés pour l'expérience de suivi de la nage de bactéries.

7.2 Mesure du bruit caméra et du bruit de fond microscope

Le bruit caméra et le bruit de fond sont mesurés par deux acquisitions de 20 000 images. La première est effectuée dans le noir et la seconde mesure le nombre de photons détectés par le microscope observant une goutte de solution sans bactéries éclairé en conditions nominales.

La Fig. 7.2 montre la distribution spatiale moyenne du bruit caméra et du bruit de fond microscope.

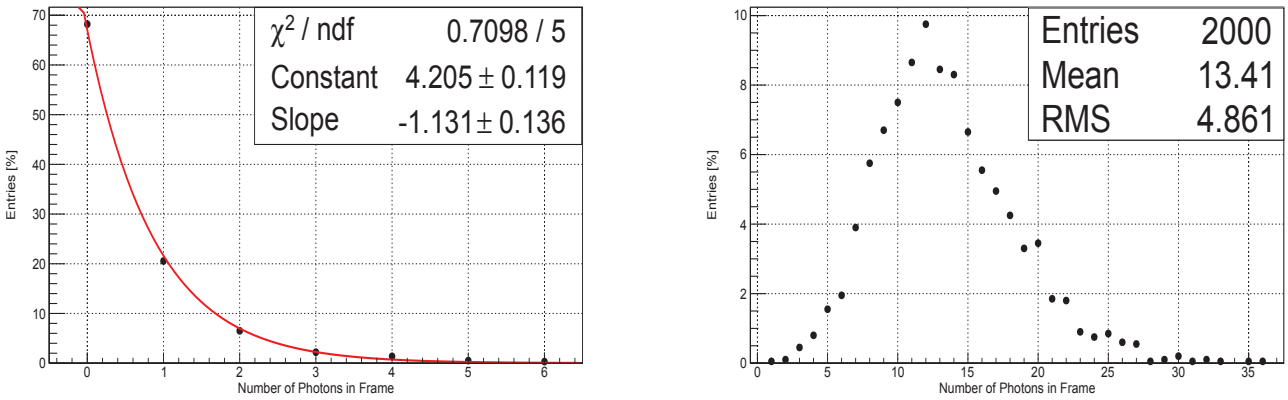


(a) (b)

FIGURE 7.2 – Distribution spatiale des photons détectés sur 20 000 images, à 500 fps et 2.8 kV. (a) Bruit caméra. (b) Bruit de fond du microscope, observation d'une goutte de solution sans bactéries éclairé en conditions nominales.

Le bruit de fond microscope est faible, entre 0.1 et 0.3 $\times 10^{-3}$ photons par pixel par image mais n'est pas distribué uniformément sur la caméra.

La Fig. 7.3 montre la distribution du nombre de photons détectés par image pour le bruit caméra et le bruit de fond microscope . Pour le bruit de fond de la caméra, un fit avec une distribution exponentielle est appliqué.



(a) (b)

FIGURE 7.3 – Distribution du nombre de photons détectés par image sur 20 000 images, à 500 fps et 2.8 kV. (a) Bruit caméra selon une distribution exponentielle. (b) Bruit de fond microscope, observation d'une goutte de solution sans bactéries éclairé en conditions nominales.

Le bruit de la photo-cathode S20 est très faible, avec moins d'un photon détecté en moyenne par image. Le bruit de fond du microscope est faible lui aussi, de l'ordre de 16 photons par image, soit une probabilité de 1 $\times 10^{-4}$ photons/pixel/image. L'ajout de bactéries dans le milieu ajoutera du bruit de fond par la diffusion hors champ.

7.3 Suivi de bactéries

7.3.1 Description du procédé expérimental de la culture de bactéries

Culture des bactéries

La souche AW474 de la bactérie *E. coli*, de type sauvage pour la motilité et la chimiotaxie et résistante à la Streptomycine [20], a été utilisée dans cette expérience. Les colonies de *E. coli* ont été obtenues en étalant les bactéries congelées sur une plate de gélose tryptone (10 g.L^{-1} tryptone [6], 8 g .L^{-1} NaCl [7], 15 g.L^{-1} Agar [8]) additionnée de 25

6. Difco®
7. Merck®
8. Becton Dickinson®

μg.mL^{-1} de streptomycine [9], incubée pendant la nuit à 37°C.

Des colonies isolées ont été inoculées dans un tube stérile de polypropylène dans un milieu de tryptone (TN) de 2 mL (4 g.L^{-1} tryptone [10], 2,5 g.L^{-1} NaCl [11] and 0.4 % glycerol [12]). Ces pré-cultures de *E. coli* ont été cultivées pendant une nuit à 32° C sous giration à 300 tours par minute (tr/min) avec un thermomixer [13].

Après une nuit, les bactéries ont été diluées dans 2 mL de TN frais jusqu'à une densité optique de 0.05 (OD 600 nm) et cultivées à 32°C et 300 tr/min pendant 3 h 40 pour atteindre la phase exponentielle de la culture des bactéries.

Préparation des lames

La suspension de bactéries cultivées pendant 3 h 40 jusqu'à une densité optique de 0.340 a été diluée deux fois avec du TN chauffé à 32°C. Un volume de 32 μL de bactéries a été scellé dans un écarteur de 100 μm placé entre une lamelle (22 $\times$ 22 mm) et une lame de microscope. La lamelle a été scellée avec soin afin d'éliminer les bulles d'air. Les échantillons ont été utilisés immédiatement pendant moins de 20 minutes.

7.3.2 Détection d'une bactérie

Modèle de déplacement d'une bactérie

Les bactéries *Escherichia coli* utilisées sont de forme ellipsoïde avec une taille moyenne de $2\times1\times1\mu$m et un faisceau de flagelles de l'ordre de 10 μm. Lorsque les moteurs tournent dans le sens anti-horaire, la bactérie est propulsée vers l'avant. La Fig. 7.4 schématise un modèle de propulsion de bactérie.

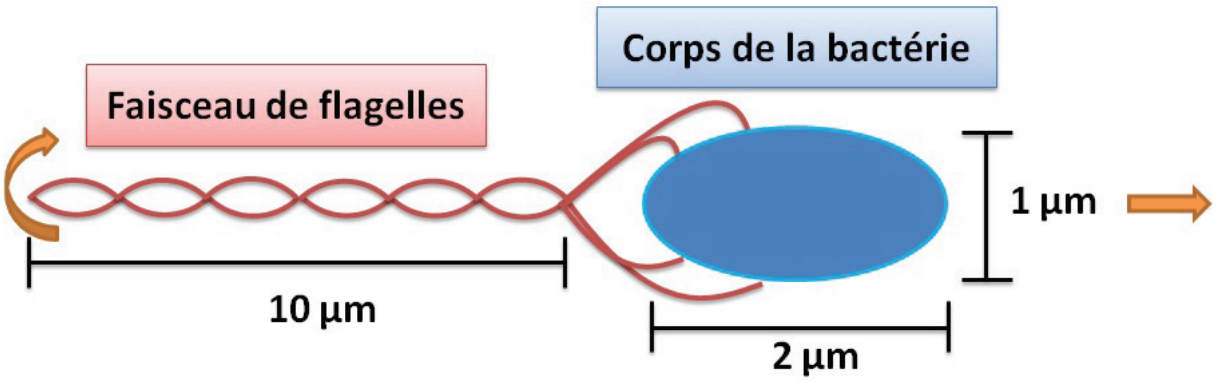


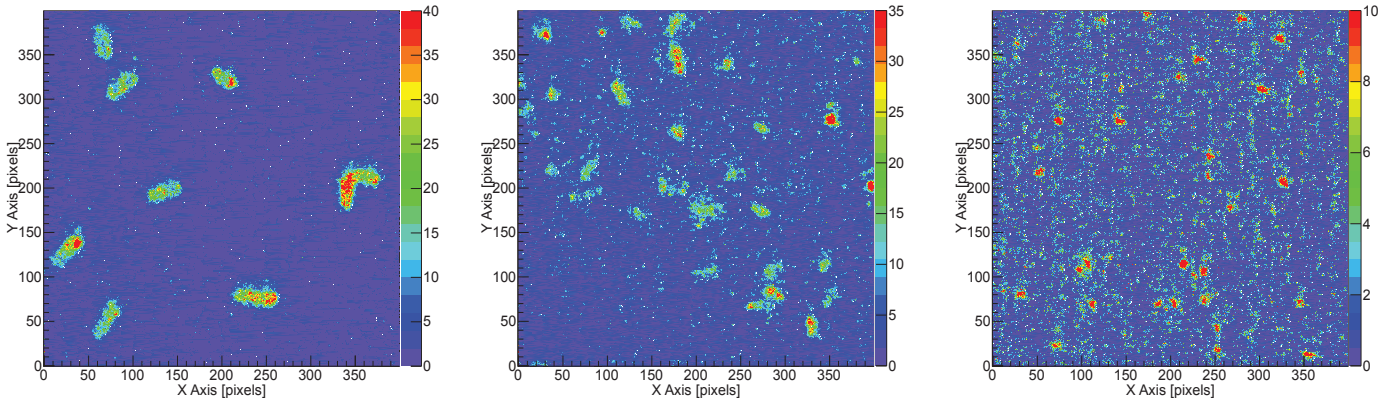
FIGURE 7.4 – Schéma de la propulsion d'une bactérie par son faisceau de flagelles. Lorsque les flagelles tournent dans le sens anti-horaire, ils forment un faisceau qui propulse la bactérie.

9. Sigma®
10. Difco®
11. Merck®
12. Promega®
13. Eppendorf ®

Au grandissement 100×, les bactéries auront une taille de l'ordre de 20 × 10 pixels, en ne prenant pas en compte la diffusion de la lumière. Elles se déplacent à une vitesse de l'ordre de 10 à 20 μm.s^{-1}, soit au grandissement 100× et un pixel de 10 μm de 100 à 200 pixels/s.

Principe de détection de bactéries

Une image brute de bactérie pour les trois grandissements est donnée dans la Fig. 7.5



(a) (b) (c)

FIGURE 7.5 – Une image brute de bactéries à 500 fps et 2.8 kV : (a) Grandissement ×100. (b) Grandissement ×60. (c) Grandissement ×20.

Le but de l'expérience est de suivre les bactéries au cours du temps et de mesurer à chaque image leur position et leur orientation. Pour cela, un traitement sera fait en 3 étapes :

1. **Filtrage gaussien :** un filtrage gaussien permet de corriger les défauts de certains pixels et ainsi de mieux définir la forme des bactéries.
2. **Contourage :** une délimitation des contours est nécessaire pour isoler les bactéries, qui, contrairement aux expériences précédentes, possèdent une dimension spatiale non négligeable devant la PSF optique. Tous les pixels à l'intérieur du contour seront utilisés pour la détermination de la position de la bactérie.
3. **ACP :** une analyse en composante principale (ACP) est effectuée pour obtenir l'angle que fait la bactérie avec l'horizontale.

Filtrage gaussien

Le filtrage gaussien consiste à homogénéiser l'information des pixels en moyennant la valeur d'un pixel avec celles de ses voisins, selon des coefficients obtenus par une distribution gaussienne. Les coefficients utilisés ici avec un écart-type de 1.4 sur 5 × 5 pixels

sont donnés par la matrice B_5 donnée par :

$$B_5 = \begin{pmatrix} 0.0121461 & 0.0261099 & 0.0336973 & 0.0261099 & 0.0121461 \\ 0.0261099 & 0.0561273 & 0.0724375 & 0.0561273 & 0.0261099 \\ 0.0336973 & 0.0724375 & 0.0934874 & 0.0724375 & 0.0336973 \\ 0.0261099 & 0.0561273 & 0.0724375 & 0.0561273 & 0.0261099 \\ 0.0121461 & 0.0261099 & 0.0336973 & 0.0261099 & 0.0121461 \end{pmatrix} \tag{7.1}$$

Contourage et centres de gravité

Avec un grandissement 100× et les différentes PSF (caméra + diffusion), la forme obtenue sur le capteur mesure 30×20 pixels. L'illumination est choisie afin de permettre une bonne définition de l'ensemble de la forme de la bactérie à chaque image afin de mesurer non seulement sa position au cours du temps mais aussi son orientation spatiale. Il en résulte un signal moyen équivalent à une centaine de photons par bactérie par image, avec un rapport signal sur bruit de 10.

Le contourage associe les pixels voisins ayant une valeur supérieure à un seuil donné s. Le filtrage des pixels bruyants et des retours ioniques est fait par un seuillage sur le nombre de pixels contenus dans un contour, autour de 700 en moyenne pour une bactérie au 100× alors qu'il est de l'ordre de 200 pour un retour ionique.

Au grandissement 20×, les bactéries ont une taille et un signal comparable à ceux d'un retour ionique, rendant ce seuillage inefficace. Pour ce grandissement, la suppression des retours ioniques ne se fera que par un filtrage temporel.

Pour chaque contour sélectionné, deux centres de gravité (COG) sont calculés à chaque image.

- **COG de la forme du contour :** le centre de gravité de la forme (x_f, y_f) donne un poids égal pour chaque pixel, seule la forme du contour est utilisée pour déterminer sa position.

$$x_f = \frac{1}{P} \sum_{k=1}^{P} x_k \tag{7.2}$$

  avec P le nombre de pixels dans le contour, x_k la position du pixel.
- **COG de l'intensité du contour :** le centre de gravité d'intensité (x_i, y_i) prend en compte la valeur de chaque pixel pour le calcul de la position.

$$x_i = \frac{1}{Q} \sum_{k=1}^{P} x_k \times q_k \tag{7.3}$$

$$Q = \sum_{k=1}^{P} q_k \tag{7.4}$$

  avec q_k l'intensité du pixel et Q la somme des intensités du contour.

Le COG d'intensité pourra être utilisé pour modéliser le déplacement des centres de diffusion de la bactérie.

Orientation des contours

L'orientation de la bactérie dans le plan (xy) est mesurée à chaque image pour chaque contour en utilisant une analyse en composantes principales (ACP) des pixels du contour. L'ACP utilise la matrice de covariance des positions des pixels pour définir un axe de dispersion maximal, correspondant à la longueur de la bactérie. La perpendiculaire à cet axe donne la largeur. Comme le rapport entre les deux est de deux, la mesure par l'ACP donne une bonne précision sur l'angle d'orientation du corps.

L'axe principal est porté par le vecteur propre de la matrice de covariance des pixels. La matrice de covariance donne la corrélation entre les deux axes. La matrice de passage qui diagonalise la matrice de covariance permet de minimiser cette corrélation. Par conséquent, dans le cas de positions, la matrice de passage est la matrice de rotation qui transpose l'axe principal de la forme en l'axe horizontal.

La matrice de covariance est constituée des covariances des positions selon les deux dimensions. Le poids de la charge du pixel q_k est ajouté aux positions pour obtenir l'orientation du profil d'intensité (θ_i). Si le poids est fixé à un pour tous les pixels, l'orientation mesurée est celle de la forme de la bactérie (θ_f)), moins sensible aux variations de l'illumination. La covariance Cov et la matrice de covariance C sont définies par :

$$\mathrm{Cov}(x,y) = \sum_{k=1}^{P} \frac{(x_k - \bar{x})(y_k - \bar{y})}{P-1} \tag{7.5}$$

$$C = \begin{pmatrix} \mathrm{Cov}(x,x) & \mathrm{Cov}(x,y) \\ \mathrm{Cov}(y,x) & \mathrm{Cov}(y,y) \end{pmatrix} \tag{7.6}$$

L'angle θ est obtenu par les vecteurs propres de C qui forment la matrice de passage R :

$$R = \begin{pmatrix} \cos\theta & -\sin\theta \\ \sin\theta & \cos\theta \end{pmatrix} \tag{7.7}$$

Après quelques lignes de calcul, une solution possible est :

$$N = \sqrt{1 + \frac{\left[\lambda_+ - \mathrm{Cov}(x,x)\right]^2}{\mathrm{Cov}(x,y)^2}} \tag{7.8}$$

$$\cos\theta = N^{-1} \tag{7.9}$$

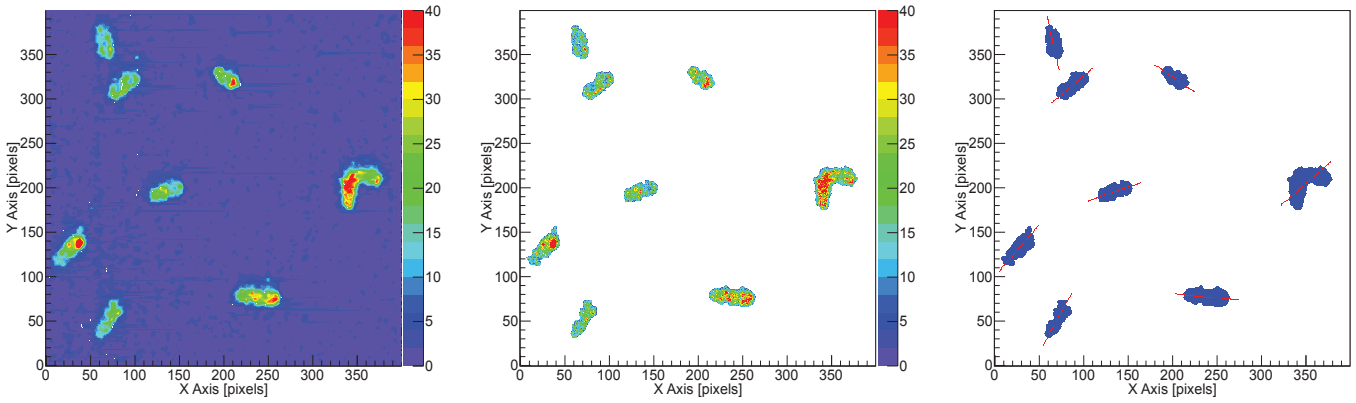
$$\sin\theta = \frac{\lambda_+ - \mathrm{Cov}(x,x)}{N \times \mathrm{Cov}(x,y)} \tag{7.10}$$

avec λ_+ la plus grande des valeurs propres et N le facteur de normalisation du vecteur propre.

Avec finalement l'angle de l'orientation du corps, θ, compris entre $\left[-\frac{\pi}{2}, \frac{\pi}{2}\right]$.

$$\theta[\pi] = \arcsin\left[\frac{\lambda_+ - \mathrm{Cov}(x,x)}{N \times \mathrm{Cov}(x,y)}\right] \tag{7.11}$$

Le résultat de ces trois étapes est illustré par la Fig. 7.6 pour le grandissement $100\times$.

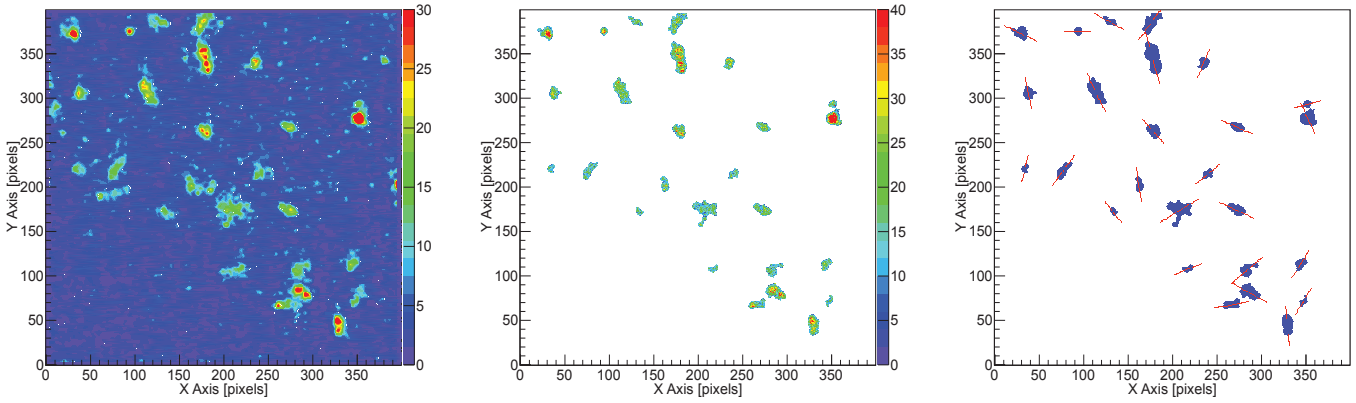


(a) (b) (c)

FIGURE 7.6 – Image de bactérie (1 ms d'intégration), grandissement 100× : (a) Image après filtrage gaussien. (b) Image contourée en intensité. (c) Détermination et représentation de l'orientation du corps de la bactérie.

L'orientation du corps par ACP est fausse dans le cas d'une bactérie en cours de division comme c'est le cas de la bactérie en [350 : 200] de la Fig. 7.6c. Nous nous intéressons uniquement à la nage donc les bactéries immobiles ou doubles sont éliminées.

Au grandissement 60×, cette méthode donne une précision plus faible car chaque contour est constitué d'un nombre inférieur de pixels. La Fig. 7.7 montre le résultat du suivi au grandissement 60×.

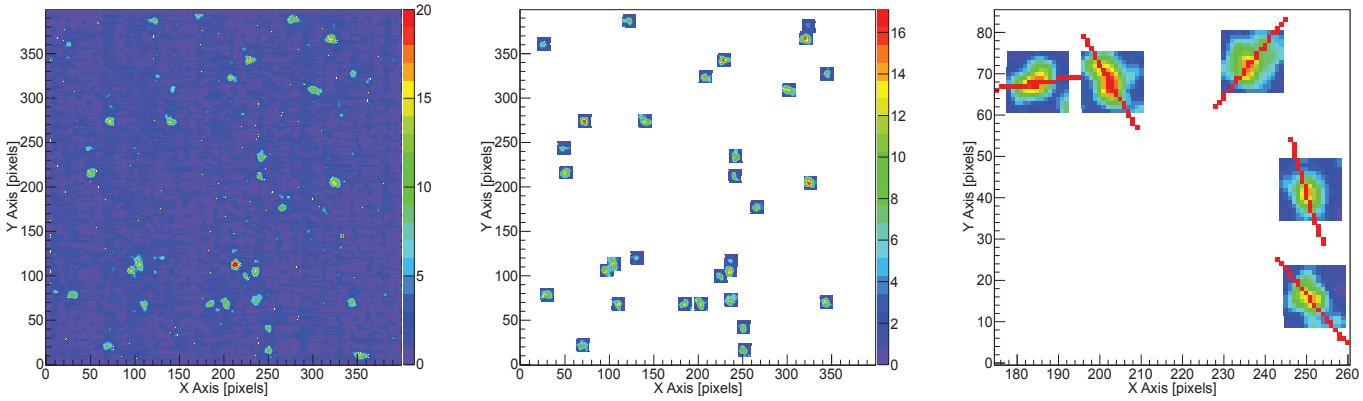


(a) (b) (c)

FIGURE 7.7 – Image de bactérie (1 ms d'intégration), grandissement 60× : (a) Image après filtrage gaussien. (b) Image contourée en intensité. (c) Détermination de l'orientation du corps de la bactérie.

Au grandissement 20×, le contourage n'est plus nécessaire, car les bactéries possèdent une taille de l'ordre de grandeur de celles de QD de la partie précédente. Le même traitement est appliqué ici.

La forme de la bactérie n'est plus assez marquée pour obtenir son orientation sans utiliser l'intensité des pixels. La Fig. 7.8 montre le résultat du suivi au grandissement 20×.



(a) (b) (c)

FIGURE 7.8 – Image de bactérie (1 ms d'intégration), grandissement 20× : (a) Image après filtrage gaussien. (b) Image contourée en intensité. (c) Détermination de l'orientation du corps de la bactérie pour un agrandissement sur 90 × 90 pixels.

7.3.3 Mesures de précision sur des bactéries immobiles

Utilisation d'une moyenne glissante

Pour permettre une limitation des différents bruits liés à la reconstruction des contours des bactéries, les résultats sont lissés en utilisant une moyenne glissante sur $2N+1$ images centrées autour de l'image en cours. La Fig. 7.9 permet de comprendre l'impact du lissage sur la mesure.

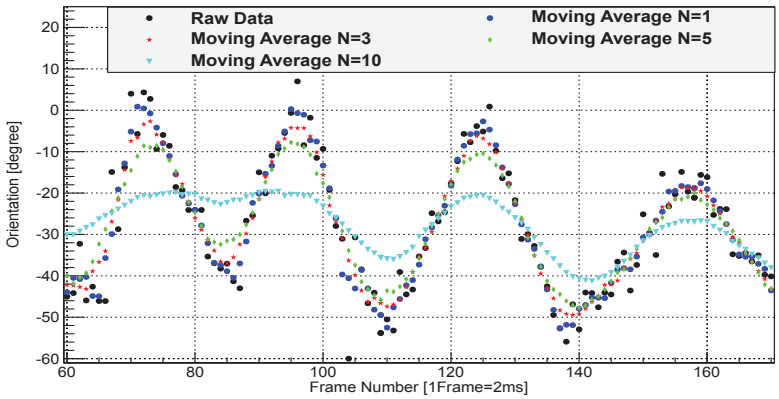


FIGURE 7.9 – Mesure de l'orientation de la bactérie en fonction du temps. Données brutes et données lissées par une moyenne glissante sur $2N+1$ images centrées autour de l'image courante.

Une moyenne glissante symétrique en temps a été choisie pour conserver les extremums locaux. La moyenne glissante lisse les fluctuations. Pour un N trop important, ces fluctuations sont quasiment effacées. Pour la suite, N sera fixé à 1 pour l'orientation du corps. Comme la position de la bactérie sera utilisée pour extraire la vitesse de la bactérie, N sera fixé à 5 pour la mesure de la position, afin de limiter le bruit.

Précision sur bactéries immobiles

Une mesure de précision sur la position, la vitesse et l'orientation du corps des bactéries ont été effectuées sur des bactéries immobiles. La "vitesse" mesurée correspond à la perte de précision de localisation due à la reconstruction de la forme à cause du bruit de fond, des retours ioniques ainsi que du bruit d'illumination.

Les bactéries sélectionnées sont présentes dans le champ de vue au moins 500 images en continu (1 s) et dont l'orientation du corps est stable pendant l'acquisition. La Fig. 7.10 montre l'image intégrée d'une bactérie immobile au grandissement 100 ×.

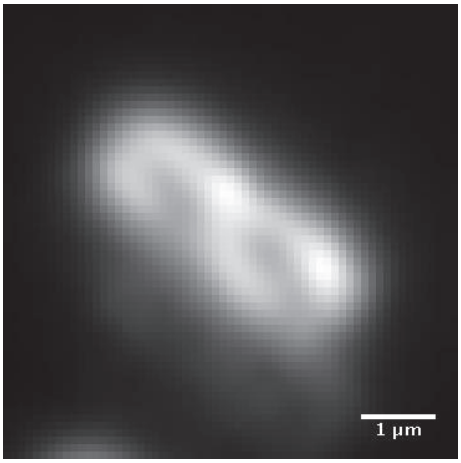
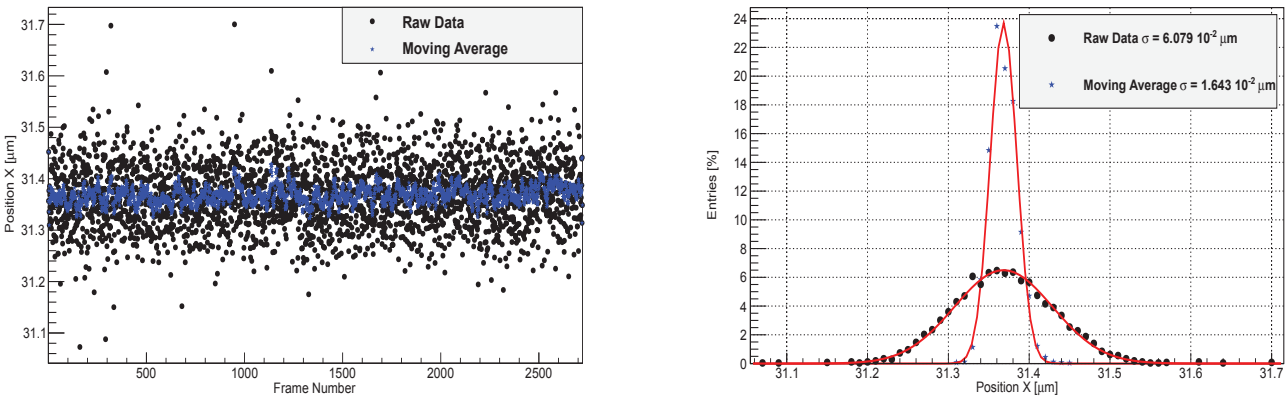


FIGURE 7.10 – Image intégrée d'une bactérie immobile au grandissement 100 ×.

Le suivi de la position reconstruite selon l'axe x en fonction du temps pour une bactérie immobile au grandissement 100× est montré sur la Fig. 7.11a. La Fig. 7.11b donne la distribution des positions dans l'espace objet.

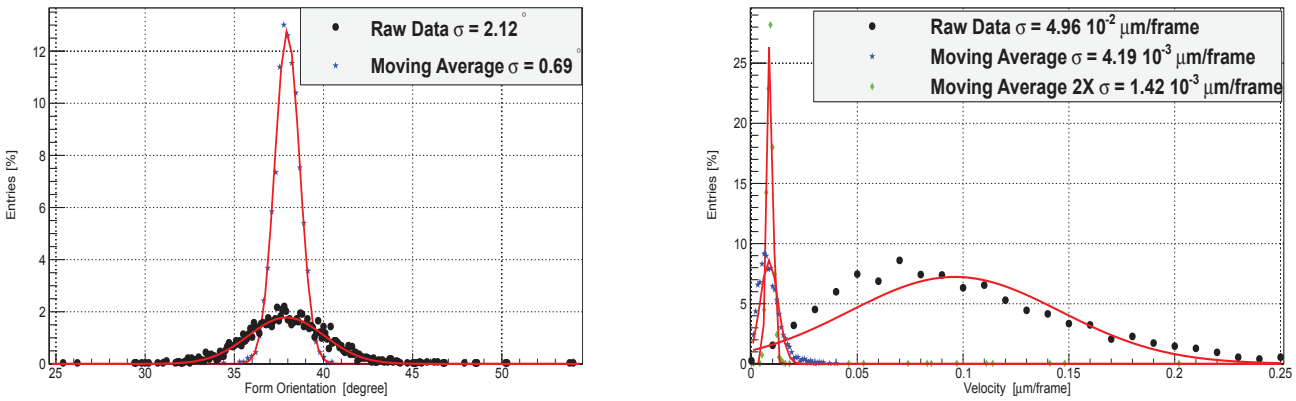


(a) (b)

FIGURE 7.11 – Mesure de précision sur une bactérie immobile au grandissement 100 ×. (a) Suivi de la position X en fonction du temps. (b) Distribution des positions reconstruites. Les courbes bleues sont les moyennes glissantes des courbes noires, avec N=5. Les résultats affichés sont ceux du fit gaussien obtenues pour la moyenne glissante.

La précision correspond à l'écart-type de la distribution. L'utilisation de la moyenne glissante permet une amélioration d'un facteur 3.7 de la précision, en passant de 6.07 $\times 10^{-2}$ à 1.64 $\times 10^{-2} \mu$m. La moyenne reste inchangée donc cette méthode n'introduit pas de biais sur les bactéries immobiles.

Les Fig. 7.12a et 7.12b donnent les distributions obtenues pour l'orientation du corps et la vitesse.



(a) (b)

FIGURE 7.12 – (a) Distribution des angles mesurés de l'orientation du corps à chaque image pendant l'acquisition. Les résultats affichés sont ceux du fit gaussien obtenus pour la moyenne glissante. (b) Distribution des vitesses du COG à chaque image. La vitesse brute (noir) est obtenue à partie des positions brutes alors que la vitesse avec moyenne glissante (bleu) est obtenue à partir des positions moyennées. La vitesse moyennée deux fois (vert) est obtenue en appliquant une moyenne glissante à la courbe de vitesse sur positions moyennes.

Les résultats obtenus pour l'orientation du corps sont semblables à ceux pour la position, avec une précision inférieure au degré.

Dans le cas de la vitesse, la valeur moyenne est modifiée. La vitesse obtenue après moyennage est plus proche de zéro, bien qu'elle ne s'annule pas. Cette vitesse correspond au minimum mesurable par cette approche.

Les résultats moyens obtenus sur l'ensemble des bactéries immobiles pour les trois grandissements sont résumés dans la table 7.2. Les paramètres ont été obtenus sur la forme sans utiliser l'intensité des pixels.

Précision	Position [μm]		Orientation [°]		Vitesse [μm/frame]		
Grandissement	Brute	Moyenne	Brute	Moyenne	Brute	Moyenne	2 Moyennes
100	0.077	0.032	3.21	1.45	0.068	0.012	0.010
60	0.22	0.10	33.05	13.2	0.29	0.097	0.092
20	2.16	2.75	28.5	21.7	1.63	0.30	0.12

TABLE 7.2 – Résultats moyens pour chaque grandissement de la précision sur la position, la vitesse et l'orientation du corps. L'étude a été faite sur plus de 50 bactéries immobiles et la mesure des données a été effectuée sur la forme sans utiliser l'intensité des pixels.

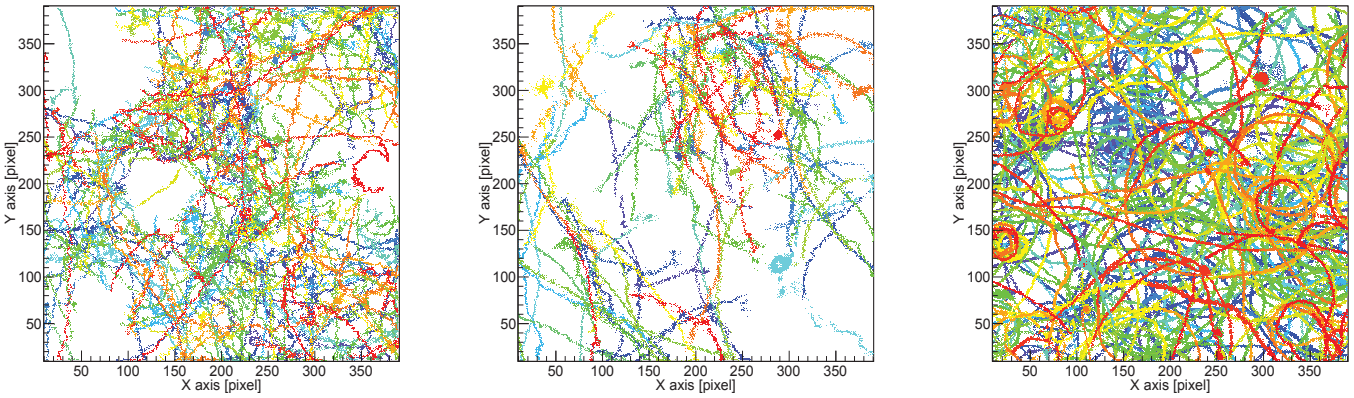
La précision sur la vitesse est meilleure que celle sur la position. Le minimum de vitesse mesurable est de 0.010 μm/image (2 ms) au grandissement 100×.

Trajectoires mesurées

La méthode de suivi est très simple. Les contours successifs sont associés par plus proche voisin image par image. Dans le cas d'un croisement de bactéries, le suivi est suspendu car la trajectoire est alors modifiée par un événement extérieur et ne correspond pas à une statistique de nage ou de tumbling.

Les trajectoires obtenues sont triées pour ne conserver que les bactéries présentes plus d'une seconde (500 images) devant le capteur et qui se sont déplacées d'au moins dix pixels.

La Fig. 7.13 montre la trace de chaque bactérie ainsi sélectionnée pour les trois grandissements. Le nombre d'images de chaque acquisition et le nombre de bactéries mesurées est résumé par la table 7.3.



(a) (b) (c)

FIGURE 7.13 – Trace des bactéries en mouvement mesurées pendant l'acquisition. Chaque couleur correspond à une bactérie. Grandissement : (a) 100×. (b) 60×. (c) 20×.

Grandissement	Nombre d'images	Nombre de bactéries en nage
100×	150 000	215
60×	75 000	91
20×	40 000	625

TABLE 7.3 – Nombre d'images et nombre de bactéries en mouvement par acquisition.

Le nombre de bactéries détectées est suffisant pour obtenir une statistique significative sur la nage de bactéries. Le grandissement 20× permet une augmentation significative du nombre de bactéries suivies ainsi que du temps passé dans le champ de vue.

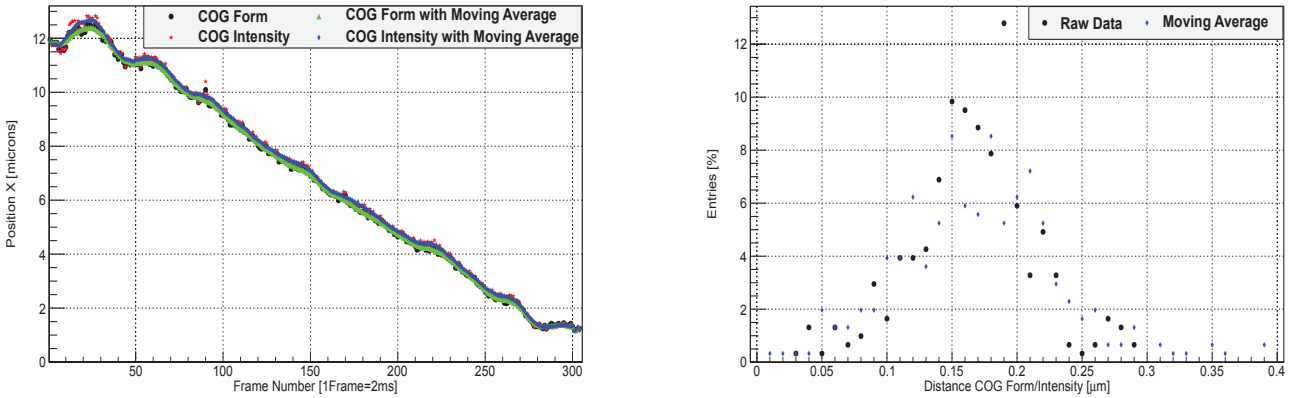
7.4 Étude de la nage de bactéries à la surface au grandissement 100×

Dans un premier temps, nous nous intéresserons au grandissement 100 ×, qui permet une meilleure précision sur la position, la vitesse et l'orientation du corps. L'objectif est de caractériser les paramètres principaux de la nage (trajectoire, vitesse et orientation du corps) afin de pouvoir détecter des événements "anormaux" qui pourraient être dus à une réorientation tumbling.

7.4.1 Étude de la différence entre les centres de gravité de la forme et de l'intensité

La première étude consiste à évaluer la différence entre les données obtenues à partir de la forme de la bactérie et celles à partir de son profil d'intensité. Le but est de trouver une différence qui permette d'obtenir une information supplémentaire en prenant en compte les centres de diffusion de la bactérie.

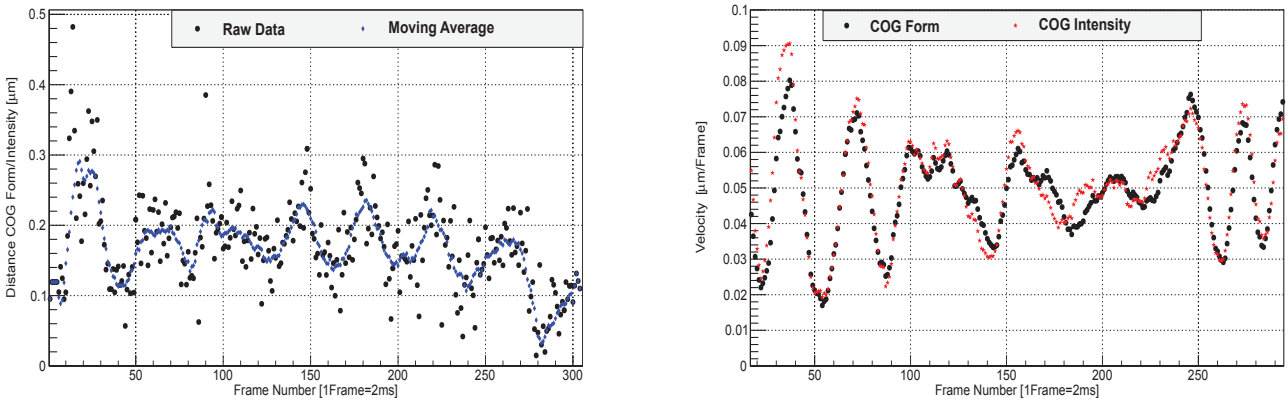
La Fig. 7.14a montre l'évolution de la position X en fonction du temps, pour les deux méthodes, avec et sans moyennage. La Fig. 7.14b montre la distribution de la distance entre ces deux positions pendant le suivi de la bactérie.



(a) (b)

FIGURE 7.14 – (a) Évolution de la position X en fonction du temps pour le COG forme et le COG intensité. (b) Distribution de la distance entre les deux COG lors du suivi.

L'écart entre les deux positions est compris entre 0.05 et 0.30 μm. La Fig. 7.15a montre l'évolution de l'écart entre les deux COG au cours du temps. La Fig. 7.15b montre l'évolution de la vitesse mesurée à partir de ces deux COG au cours du temps.



(a) (b)

FIGURE 7.15 – (a) Évolution de la distance entre les deux COG (forme et intensité) au cours du temps. (b) Évolution de la vitesse mesurée à partir des deux COG au cours du temps.

La distance entre les deux COG oscille autour de la valeur moyenne de 0.17 μm. Malgré cet écart, les vitesses calculées par les deux méthodes suivent les mêmes variations. L'écart est compris dans l'erreur de mesure (0.01 μm/image).

La mesure de cet écart peut nous permettre d'obtenir une information sur la diffusion du corps de la bactérie et aussi sur la position en trois dimensions de la bactérie. En effet, l'image obtenue sur la caméra est une projection de la forme de la bactérie, comme le montre la Fig. 7.16.

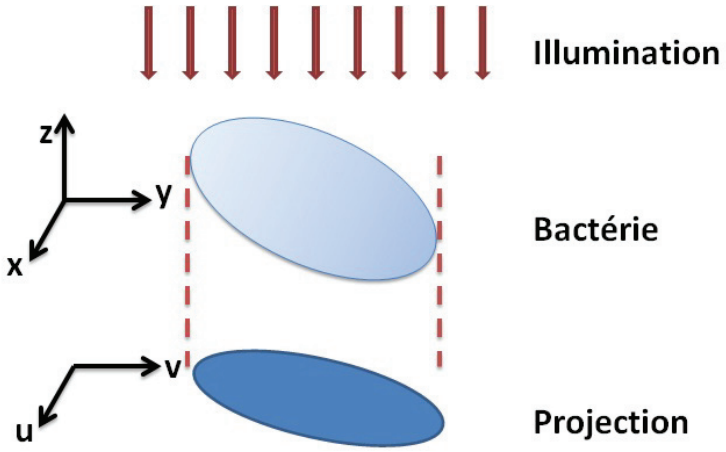


FIGURE 7.16 – Projection sur le capteur à deux dimensions de la forme de la bactérie à trois dimensions par l'illumination du champ sombre.

En développant un modèle de diffusion des différences parties constituantes de la bactérie, il peut être possible en combinant l'information d'intensité à celle de la forme de la projection d'obtenir sa position dans l'espace.

La Fig. 7.17 montre l'évolution de l'orientation du corps de la bactérie **A** comparée à la distance entre les deux centres de gravité x_i et x_f. La trajectorie de cette bactérie est donnée par la Fig. 7.18a.

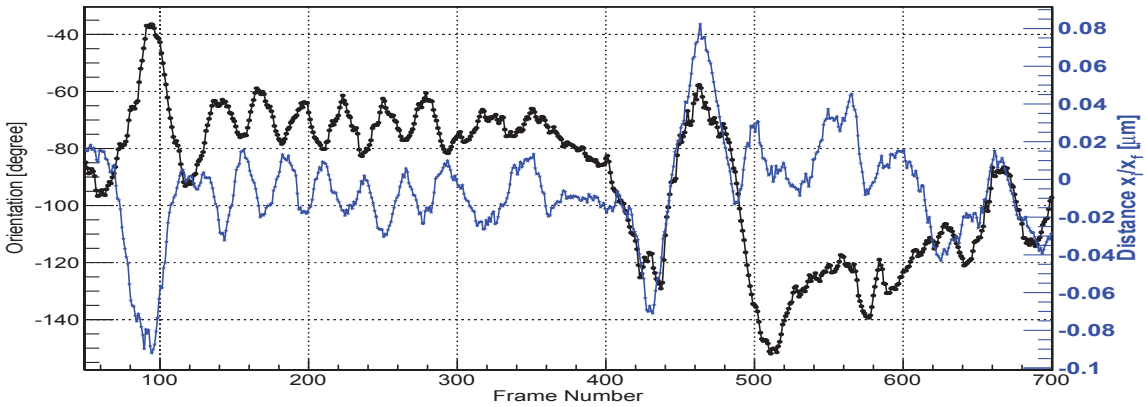
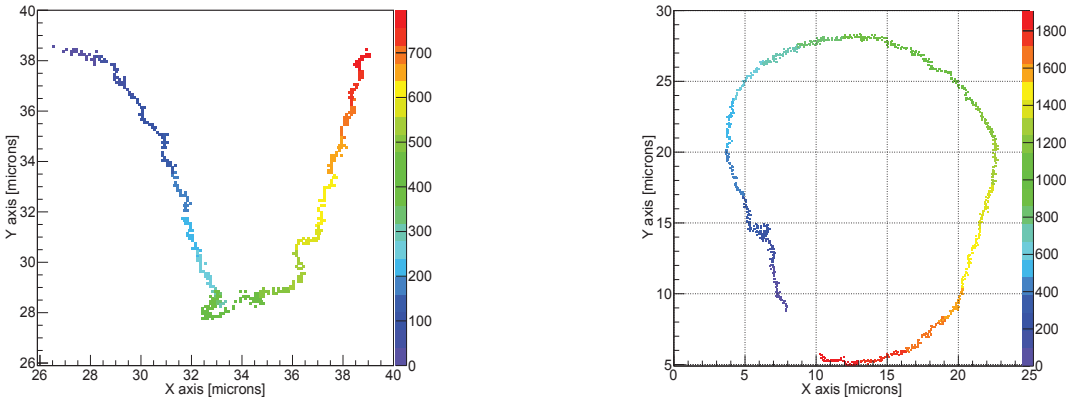


FIGURE 7.17 – Évolution de l'orientation du corps de la bactérie (noir) et de la distance entre les deux centres de gravité x_i et x_f (bleu) cours du du temps.

L'évolution de la distance entre les deux COG est en opposition de phase avec l'orientation du corps avant l'événement de changement de direction autour de l'image 440. Après cet événement, les deux paramètres sont en phase. Ce lien entre le mouvement du corps et la diffusion de la lumière montre l'information disponible sur la dimension perpendiculaire à la surface. Dans la suite, seul l'information obtenue en utilisant la forme de la bactérie sera étudiée.

7.4.2 Suivi de l'orientation du corps pendant la nage

La Fig. 7.18 montre deux trajectoires de bactéries au grandissement 100 ×.



(a) (b)

FIGURE 7.18 – Trajectoires de bactéries au grandissement 100×. L'échelle de couleur représente le numéro d'image. (a) **A** (b) **B**

Le suivi rapide à 500 fps permet de décomposer le mouvement de la bactérie afin de mesurer la fréquence d'oscillation de son corps. La bactérie est propulsée par un faisceau de flagelles qui oscillent à une fréquence de 200 Hz.

Les flagelles ne sont pas attachés symétriquement autour du corps de la bactérie. La force appliquée par les flagelles n'est pas parallèle à l'axe du corps, ce qui résulte en rotation du corps au cours du mouvement.

La Fig. 7.19 schématise un modèle réaliste de propulsion de la bactérie.

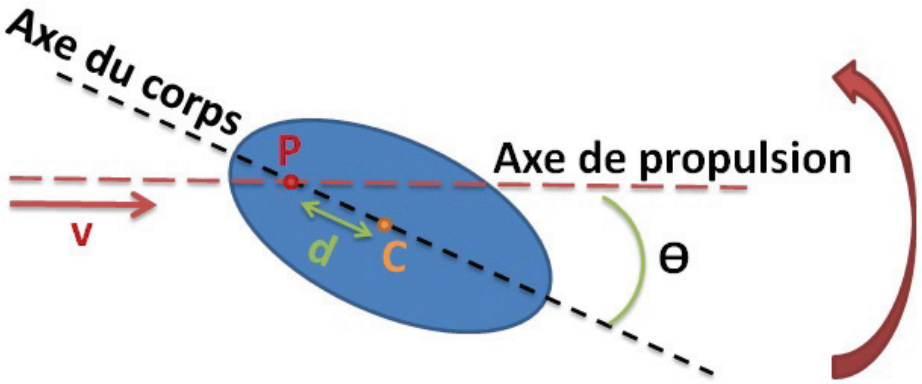


FIGURE 7.19 – Modèle de propulsion de la bactérie. Les flagelles sont répartis sur le corps de la bactérie. L'axe du faisceau de flagelle ne correspond pas à l'axe du corps à cause de l'asymétrie et au nombre fini des flagelles. Le point d'incidence de la force appliquée par les flagelles n'appartient pas non plus à l'axe du corps. La rotation du faisceau de flagelle est alors responsable d'une rotation du corps de la bactérie autour de l'axe de propulsion pendant le mouvement. Le point C représente le centre de la bactérie, le point P l'intersection entre l'axe du corps et l'axe de propulsion, v est la vitesse de la bactérie et θ l'angle de rotation du corps de la bactérie.

Cette oscillation est visible sur la Fig. 7.20 qui montre une succession d'images de la bactérie **B** par pas de 10 le long de sa trajectoire. Chaque ligne représente une période de rotation.

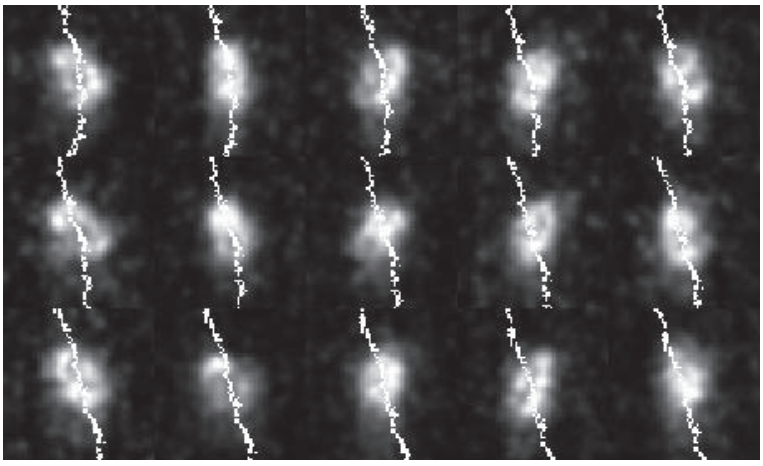


FIGURE 7.20 – Images successives d'une bactérie le long de sa trajectoire par pas de 10. Une ligne correspond à une période de rotation du corps.

La Fig. 7.21 montre le suivi de l'orientation du corps par rapport à la trajectoire de la bactérie au cours du temps, sur 1900 images (3.8 s).

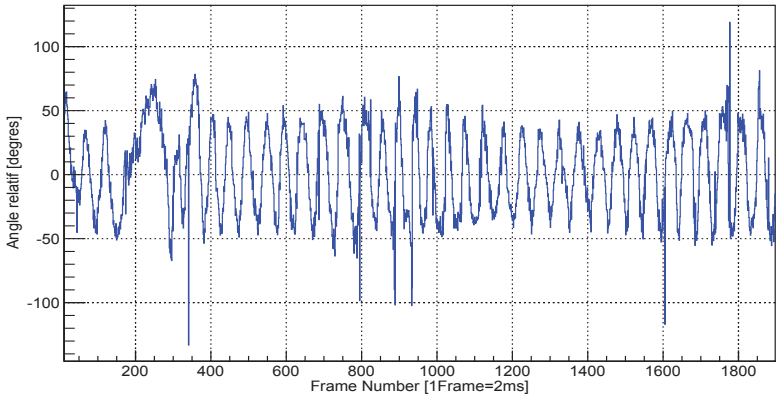


FIGURE 7.21 – Orientation du corps par rapport à la trajectoire de la bactérie **B** au cours du temps.

La projection de la rotation du corps sur la surface du détecteur pendant la nage est très régulière. L'incident autour de l'image 200 correspond à une réorientation du faisceau de flagelles (tumbling). La période de rotation du corps est ici de l'ordre de 93 ms soit une fréquence de 10.75 Hz. La rotation est comprise entre -50 et 50°, soit une amplitude de 100°.

En utilisant le modèle décrit précédemment, il devrait être possible de retrouver la position P et l'axe de propulsion à partir de l'amplitude et de la fréquence. Il faut pour cela le combiner au modèle de projection d'une ellipsoïde sur un plan. Le suivi de P permettrait une étude plus précise de la nage, en soustrayant l'effet de projection sur deux dimensions.

7.4.3 Détection d'événements "anormaux" au cours de la nage

Le phénomène de tumbling correspond à une réorientation du faisceau de flagelles qui a lieu toutes les secondes en moyenne et qui résulte dans le volume à une redirection de la bactérie. Le suivi de bactéries à la surface doit montrer si les conditions particulières d'hydrodynamique et d'électrostatique changent les effets et la fréquence du tumbling et comment ces changements conditionnent l'accumulation de bactéries (biofilms).

La Fig. 7.22 schématise le processus de tumbling le long de la nage de bactérie, responsable du ralentissement et d'un changement de direction.

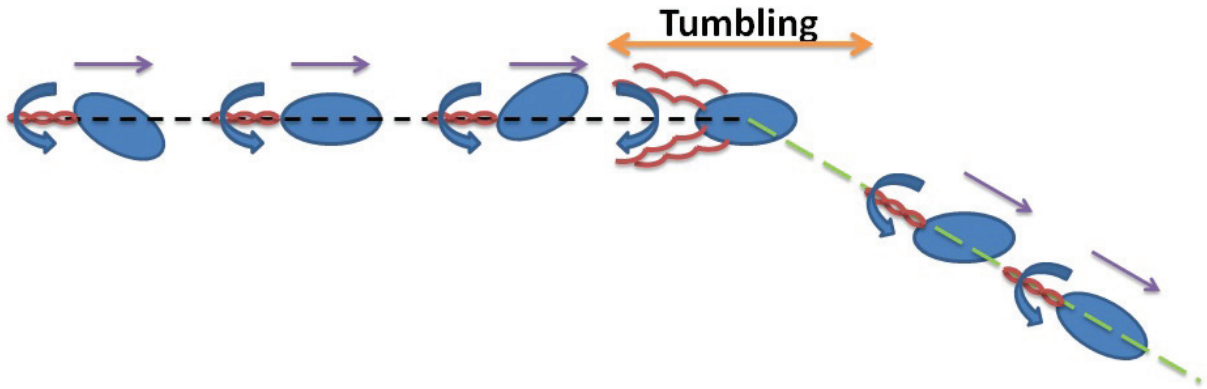


FIGURE 7.22 – Schéma de tumbling pendant la nage d'une bactérie. Lorsque les flagelles tournent dans le sens anti-horaire, ils forment un faisceau qui propulse la bactérie. Toutes les secondes en moyenne dans le volume, le sens de rotation est inversé et le faisceau se délie. Les flagelles reforment ensuite un faisceau. Le processus change l'orientation de la bactérie et résulte en un changement de sa direction. En moyenne, le phénomène de tumbling dure en moyenne 100 ms.

Dans le volume, le tumbling est caractérisé par un changement de trajectoire et dure en moyenne 100 ms. Ce n'est plus nécessairement le cas à la surface. L'objectif de l'expérience est de caractériser des événements "anormaux" afin de pouvoir déterminer s'ils peuvent être associés à des événements de tumbling à la surface. Pour cela, le caractère anormal sera observé par :

- une baisse brusque de la vitesse ;
- un changement de trajectoire ;
- un arrêt de la variation d'orientation du corps.

D'autres phénomènes différents du tumbling, comme l'adhésion temporaire à la surface, peuvent cependant présenter ces anormalités.

Détection d'événements par suivi de la vitesse

La Fig. 7.23 montre le suivi de la vitesse de la bactérie **B** au cours du temps.

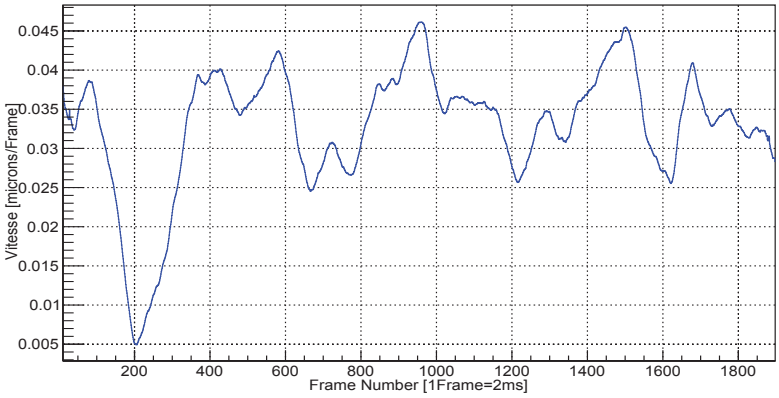


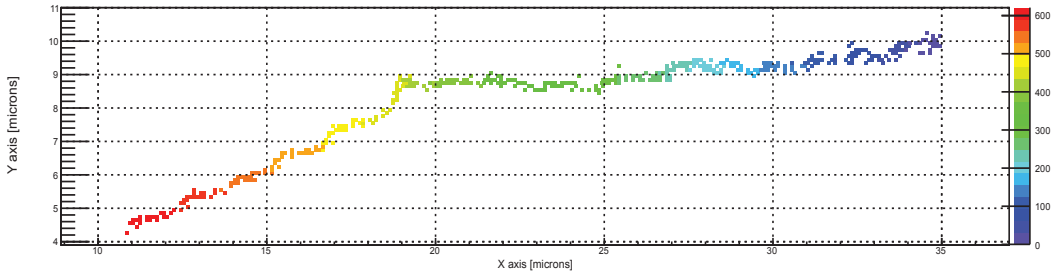
FIGURE 7.23 – Vitesse absolue de la bactérie **B** au cours du temps.

Un évènement anormal est visible autour de 200 images. Dans le volume, un tumbling ne dure en moyenne que 100 ms, soit 50 images. La durée cet événement, plus long (200 images), peut s'expliquer par un attachement temporaire à la surface.

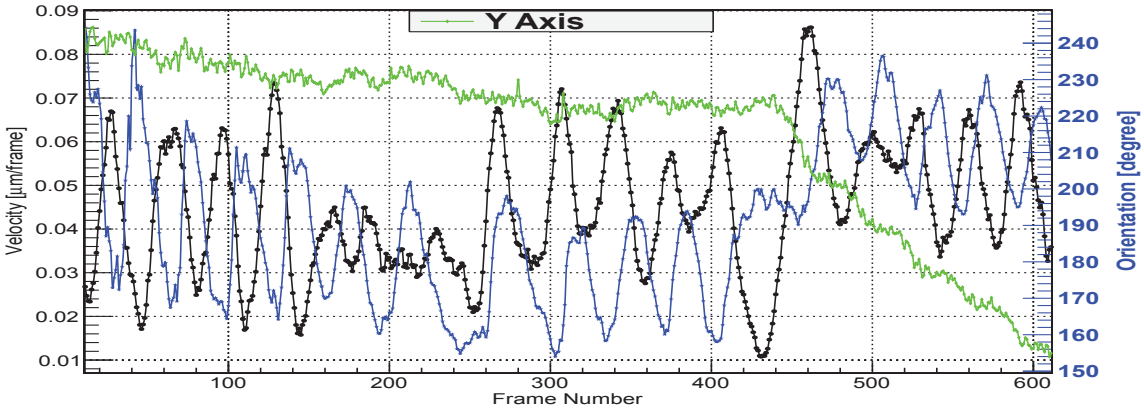
Le suivi dure près de 4 secondes, ce qui correspond en moyenne à 4 événements de tumbling dans le volume. Les événements de chutes de vitesse observées aux images 700, 1200 ou 1600 peuvent correspondre à des événements de tumbling.

Détection d'événements anormaux par changement de direction

La bactérie **C** présente un événement anormal de l'ordre de 100 ms autour de l'image 450 avec un changement brusque d'orientation. La Fig. 7.24a montre la trajectoire de la bactérie **C** au cours du temps. La Fig. 7.24b montre l'évolution de la position Y ainsi que la vitesse et l'orientation de la bactérie au cours du temps avant et après le tumbling.



(a)



(b)

FIGURE 7.24 – (a) Trajectoire de la bactérie **C**. L'échelle de couleur représente le numéro d'image. (b) Évolution de la position Y, de la vitesse et de l'orientation du corps de la bactérie **C** au cours du temps pendant un évènement de tumbling.

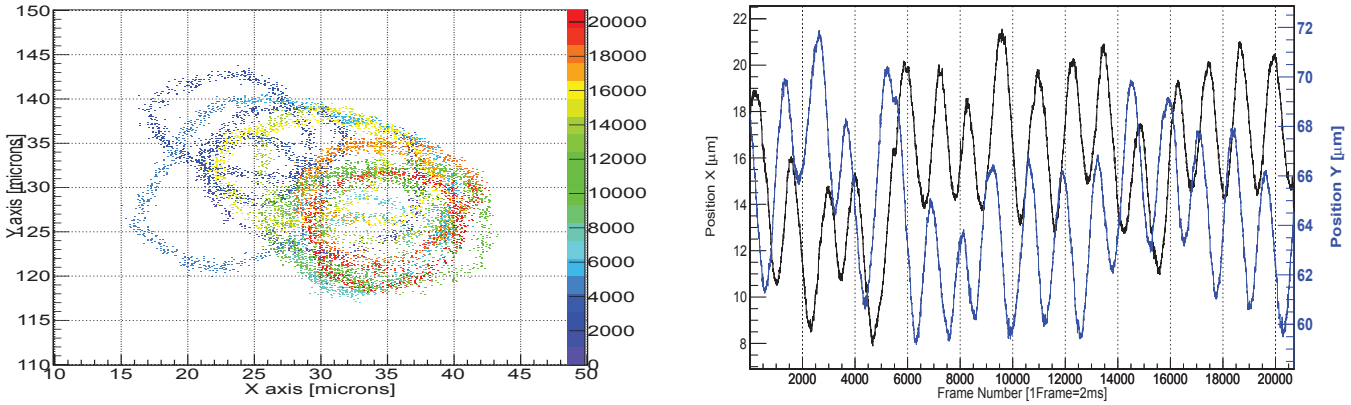
Le changement brusque de direction selon l'axe Y est typique d'une réorientation de la bactérie à cause d'un tumbling. La vitesse montre un minimum marqué juste avant la réorientation. La rotation du corps de la bactérie marque un arrêt pendant le tumbling. L'arrêt de la rotation commence à l'image 420 pour finir à l'image 460, ce qui correspond à 40 images soit 80 ms.

7.5 Perspectives sur l'utilisation du grandissement 20× pour le suivi de bactéries

En utilisant le grandissement 20×, le nombre et la durée des trajectoires augmentent fortement. Pour ce grandissement, seule la méthode de suivi utilisant l'intensité des pixels est disponible.

Le suivi de la nage à ce grandissement peut permettre une augmentation significative de la statistique de nage de bactéries dans les mêmes conditions expérimentales. La précision sur l'orientation est plus faible d'un facteur 15 et la vitesse d'un facteur 12. Est-il dans ce cas possible de détecter les événements anormaux en dehors du bruit ?

La Fig. 7.25 montre le suivi de la bactérie **D** au grandissement 20×, pendant plus de 20 000 images (40 s). La Fig. 7.25a montre la position reconstruite en deux dimensions et la Fig. 7.25b montre l'évolution des positions X et Y au cours du temps.

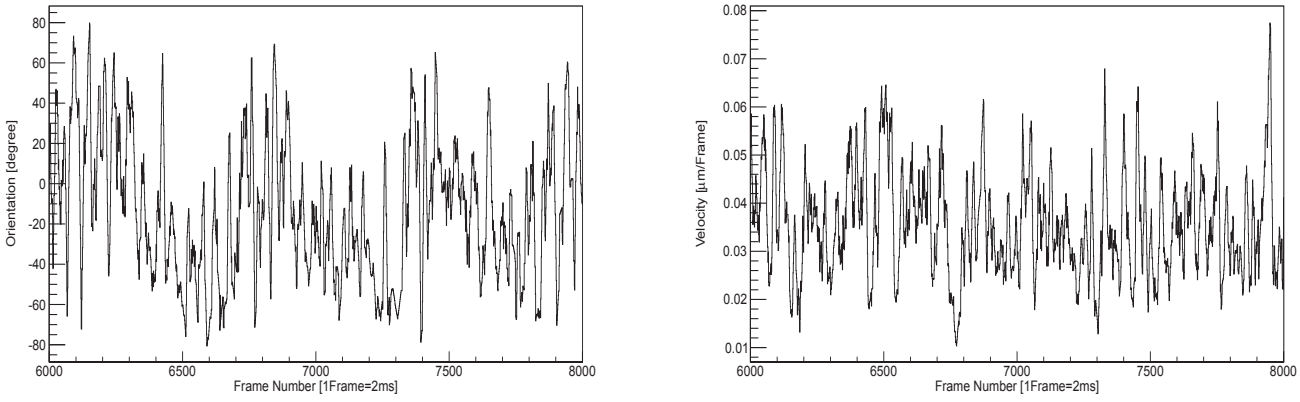


(a) (b)

FIGURE 7.25 – Évolution de la position d'une bactérie au grandissement 20 × sur 20 000 images (40s). (a) Trace du suivi à deux dimensions. L'échelle de couleur représente le numéro d'image. (b) Évolution selon les axes X (noir) et Y (bleu).

La durée du suivi permet d'observer un grand nombre de cycles et de calculer la fréquence d'oscillation de la trajectoire. La durée des trajectoires mesurées sont plus longues d'un ordre de grandeur en passant du grandissement 100 × au 20×.

La Fig. 7.26a montre l'évolution de l'orientation du corps et la Fig. 7.26b l'évolution de la vitesse au cours du temps. Un agrandissement sur 2000 images a été effectué pour plus de lisibilité.



(a) (b)

FIGURE 7.26 – (a) Évolution de l'orientation du corps de la bactérie au cours du temps. (b) Évolution de la vitesse de la bactérie au cours du temps.

Malgré la différence en précision, la vitesse mesurée pour la bactérie **D** est du même ordre de grandeur (0.04 μm/image) que celles mesurées au grandissement $100\times$ pour les bactéries **A**, **B** et **C**.

Les oscillations du corps sont visibles et donnent une fréquence du même ordre de grandeur qu'au $100\times$ (20 Hz). Des variations continues sont visibles sur la courbe de la vitesse, avec des creux au quart de la vitesse moyenne.

Ces résultats sont encourageant pour la poursuite de l'analyse au $20\times$

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons observé la nage de bactéries en champ sombre avec la caméra ebCMOS à une cadence de 500 fps au grandissements 100× et 20×. Le grandissement 60× intermédiaire n'a pas été utilisé car il n'apporte ni le champ de vue nécessaire au suivi long de bactéries comme le 20× ni la précision du 100×.

La vitesse associée à la sensibilité de la caméra nous a permis de mesurer l'oscillation du corps de la bactérie pendant la nage. Cette oscillation était difficilement mesurable à cause de la faible cadence de la caméra electron-bombarded-CCD (33 fps) utilisée précédemment par l'équipe de Laurence Lemelle. Ce suivi permettra d'améliorer le modèle hydrodynamique utilisé de la nage de la bactérie à la surface, en l'associant à l'information supplémentaire obtenue par la diffusion de la lumière.

L'étude de la nage nous a permis d'observer des événements anormaux qui pourraient être le résultat de la réorientation du corps de la bactérie via le tumbling. Le tumbling étant différent à la surface et dans le volume, il est nécessaire de suivre tous les paramètres disponibles à la recherche de ces événements anormaux.

Nous avons vu quelques exemples de ces événements, avec tout d'abord une baisse brusque de la vitesse, puis un changement de direction de la bactérie associé à une baisse de vitesse et un arrêt de l'oscillation du corps.

En utilisant le grandissement 20× associé à l'acquisition en continue de l'ebCMOS, il sera possible d'obtenir une très grande statistique de nage et de tumbling de bactéries à la surface.

Bibliographie

[1] Donald B. Reid. An algorithm for tracking multiple targets. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 24 :843–854, 1979. 137, 141

[2] Rudolph Emil Kalman. A new approach to linear filtering and prediction problems. *Transactions of the ASME–Journal of Basic Engineering*, 82(Series D) :35–45, 1960. 142

[3] D. Alazard. *Introduction au filtre de Kalman*. 2005. 142

[4] Xavier Michalet. Mean square displacement analysis of single-particle trajectories with localization error : Brownian motion in an isotropic medium. *Physical Review E*, 82(4) :041914+, October 2010. 151, 173

[5] Andrew J. Berglund. Statistics of camera-based single-particle tracking. *Phys. Rev. E*, 82 :011917, Jul 2010. 151

[6] Xavier Michalet and Andrew J. Berglund. Optimal diffusion coefficient estimation in single-particle tracking. *Phys. Rev. E*, 85 :061916, Jun 2012. 151

[7] Pei-Hsun Wu, Ashutosh Agarwal, Henry Hess, Pramod P. Khargonekar, and Yiider Tseng. Analysis of video-based microscopic particle trajectories using kalman filtering. *Biophysical Journal*, 98(12) :2822 – 2830, 2010. 154

[8] Jerry C. Chang and Sandra J. Rosenthal. Real-time quantum dot tracking of single proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 726 :51–62, 2011. 156

[9] Alexander R. Small. Theoretical limits on errors and acquisition rates in localizing switchable fluorophores. *Biophysical Journal*, 96(2) :L16 – L18, 2009. 156

[10] X Michalet, R Colyer, J Antelman, O H W Siegmund, Tremsin, J V Vallerga, and S Weiss. Single-quantum dot imaging with a photon counting camera. *Current pharmaceutical biotechnology*, 10(5) :543–58, August 2009. 156

[11] Maureen Walling, Jennifer Novak, and Jason R E Shepard. Quantum dots for live cell and in vivo imaging. *International journal of molecular sciences*, 10(2) :441–91, March 2009. 156, 158, 217

[12] Pavel A. Frantsuzov and R. A. Marcus. Explanation of quantum dot blinking without the long-lived trap hypothesis. *Phys. Rev. B*, 72 :155321, Oct 2005. 156

[13] Gennady Margolin, Vladimir Protasenko, Masaru Kuno, and Eli Barkai. Power law blinking quantum dots : Stochastic and physical models. 2005. 156

[14] Ben N. G. Giepmans, Stephen R. Adams, Mark H. Ellisman, and Roger Y. Tsien. The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function. *Science*, 312(5771) :217–224, April 2006. 157

[15] Mancini Cédric Régis. *Mise en place d'un microscope confocal achromatique*. PhD thesis, LPCML, 2010. 159

[16] H.C. Berg. *E. coli in Motion*. Biological and Medical Physics Series. Springer, 2003. 175

[17] L. Turner, W. S. Ryu, and H. C. Berg. Real-Time Imaging of Fluorescent Flagellar Filaments. *J. Bacteriol.*, 182(10) :2793–2801, May 2000. 175

[18] E Lauga, W R Di Luzio, G M Whitesides, and H A Stone. Swimming in circles : Motion of bacteria near solid boundaries. Technical Report cond-mat/0506675, Jun 2005. 175

[19] Robert Macnab and D.E. Koshland Jr. Bacterial motility and chemotaxis : Light-induced tumbling response and visualization of individual flagella. *Journal of Molecular Biology*, 84(3) :399 – 406, 1974. 176

[20] Wung-Wai Tso and Julius Adler. Negative chemotaxis in escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 118(2) :560–576, 1974. 178

Conclusion

Les détecteurs sensibles emCCD, ebCMOS et sCMOS ont chacun des espaces d'applications privilégiés : signal, bruit de fond, vitesse et champ de vue. Les modélisations de Cramér-Rao et les analyses sur bancs de test ont permis de comprendre comment les différentes stratégies d'amplification du rapport signal à bruit influencent la délimitation de ces espaces.

De par son faible bruit de lecture et son absence de gain, le sCMOS est particulièrement adapté aux conditions de fort bruit de fond et de signal moyen (10-20 photons par image). La présence d'une queue de distribution du bruit des pixels (10 % des pixels ont un bruit supérieur à 4 e- RMS) et son efficacité quantique (maximum à 57 %) ne permettent pas au sCMOS d'être sensible au photon unique, mais permet une bonne précision de localisation pour un signal de l'ordre de la dizaine de photons par image.

Le registre de gain de l'emCCD lui permet de mesurer le photon mais sa nature stochastique ne lui permet pas de compter précisément les photons incidents. La précision sur la position de chaque photon est limitée par la taille importante du pixel (16 μm) et le fort bruit de lecture réduit l'efficacité quantique effective à un niveau moyen (50 - 60 %).

Le facteur d'excès de bruit rend l'emCCD très sensible à une augmentation du bruit de fond, jusqu'à devenir moins résolu que le sCMOS dans des conditions extrêmes. De plus, le fort courant d'obscurité créé par l'amplification dégrade fortement le signal à très bas niveau de lumière.

Le principe de détection de l'ebCMOS repose sur la reconstruction de la distribution des électrons secondaires générés par impact de photo-électron accéléré. La méthode développée pour détecter le photon unique possède de très bonnes efficacités et pureté ($\approx$ 95 %) et permet une résolution intra-pixel (2 μm) sur l'impact du photo-électron (pour un pixel de 10 μm). Cette méthode est utilisée avec succès pour les expériences menées avec la caméra ebCMOS, par exemple l'étude de la bioluminescence avec un seuil de déclenchement très bas (14 photons par image).

La linéarité du processus d'amplification par photo-cathode permet de compter les photons incidents malgré la rétro-diffusion de certains photo-électrons (18 %). L'élargissement de la PSF optique dans le tube à vide et l'étalement des charges secondaires dans la couche épitaxiale ne permettent pas d'obtenir des images très résolues mais ne dégradent pas significativement la résolution sur la position de sources ponctuelles.

La mise en place de la modélisation statistique de chaque étage des trois détecteurs a permis le calcul de limite de Cramér-Rao donnant la résolution théorique maximale atteignable sur la position d'un point source.

Le calcul a montré l'influence du gain sur la résolution de l'emCCD, avec une amélioration d'un facteur supérieur à 10 dans des conditions de faible flux. La nature stochastique du gain dégrade cependant la résolution apportée par un gain théorique parfait de 25 %. Le facteur d'excès de bruit du gain est limitant dans le cas d'un bruit de fond important, avec un croisement des courbes de résolution de l'emCCD et du sCMOS lorsque le bruit de fond est de l'ordre de 3.5 photons par pixel par image de moyenne, avec un signal de 10 photons par image.

La calcul de Cramér-Rao a aussi montré que la PSF de diffusion des charges secondaires de l'ebCMOS était un avantage lorsque le nombre d'électrons secondaires, la taille de la PSF et le bruit de lecture des pixels était optimisé. Enfin, la comparaison théorique des trois détecteurs a montré que l'emCCD et l'ebCMOS ont des résolutions du même ordre de grandeur.

L'expérience de création d'un point source focalisé sur les détecteurs a permis de comparer les trois détecteurs expérimentalement et de comparer les résultats aux calculs de Cramér-Rao.

La résolution obtenue à faible intensité est comparable pour les détecteurs ebCMOS et emCCD, inférieure à 1 μm après 10 ms d'intégration pour une intensité I=0.25 (unité arbitraire) et inférieure à 2 μm après 20 ms pour une intensité I=0.1. Le capteur sCMOS nécessite un signal plus important pour obtenir une résolution semblable, 2 μm après 10 ms et 1 μm après 35 ms pour une intensité I=0.5.

Le concept du projet LUSIPHER (suivi de sources sur un grand champ de vue en continu à très bas niveau de lumière et grande cadence de lecture) a été validé par l'expérience des microlentilles, avec un suivi simultané de 684 points sources ayant un signal moyen inférieur à un photon par image.

La caméra ebCMOS a été utilisée pour réaliser deux expériences de vidéo-microscopie. La première consistait au suivi de QD en microscopie de fluorescence. Le comptage de photons a été utilisé pour mesurer le clignotement des QD au cours du temps. La détection de photons et le suivi de sources ont été implémentés en ligne. Une étude du clignotement en continu est réalisable pour étudier les effets de variations d'intensité du laser d'excitation.

L'algorithme de suivi dynamique a été testé sur ces QD en mouvement forcé avec une vitesse calculée très proche de celle mesurée par les moteurs (< 2 %). Cette validation a été suivi du suivi de QD libres entre deux lames de verre dans un liquide de viscosité proche de l'eau. Le coefficient de diffusion de ces QD mesuré (de l'ordre de 15 $\mu m^2/s$) est compatible avec la taille des QD (10 - 20 nm). Ce coefficient de diffusion fait partie des valeurs hautes des expériences de vidéo-microscopie actuelle.

La seconde expérience concerne la nage de bactéries à la surface en microscopie de champ sombre. L'objectif de cette expérience est de valider un modèle de nage afin de mettre en évidence des événements anormaux qui pourraient être révélateurs de la réorientation de bactéries (tumbling). Les phénomènes exceptionnels observés ont une échelle temporelle de l'ordre de 100 ms et la nage de la bactérie une fréquence de l'ordre de 20 Hz, nécessitant une grande cadence de lecture (500 fps). La bonne sensibilité de l'ebCMOS

a permis d'obtenir l'image du corps de la bactérie à chaque image afin de déterminer son orientation spatiale.

Le suivi de la position, de la vitesse et de l'orientation du corps ont permis d'apporter des informations supplémentaires au modèle de nage. Les résolutions obtenues étaient suffisantes à la détection des événements anormaux comme une baisse de la vitesse, un arrêt de variation du corps ou un changement de trajectoire.

Le suivi de particules à très bas niveau de lumière et haute cadence de lecture est possible avec le comptage de photons de l'ebCMOS. Des améliorations techniques sont envisagées : photo-cathode de nouvelle génération (40 - 50 % d'efficacité quantique), réduction de la taille du tube à vide (diminution de la PSF tube). Elles permettront d'obtenir des résolutions bien meilleures, supérieures à l'emCCD à la vitesse du CMOS.

L'intégration du suivi en ligne et son optimisation permettront des expériences en continu. La compression des données sauvegardés de cette manière (position des sources et intensité) autoriseront de très longues expériences. L'amélioration du suivi en ligne par intégration du filtre de Kalman et de tests probabilistes pourra se faire par l'utilisation du calcul sur carte graphique (GPU ou *Graphics Processing Unit*).

Liste des tableaux

1 Résumé des caractéristiques des trois détecteurs sCMOS, emCCD et ebCMOS. 8

1.1 Caractéristiques principales de la caméra Andor sCMOS Neo. 33
1.2 Évolution du nombre moyen de faux en fonction de la cadence de lecture pour la caméra sCMOS. 37
1.3 Caractéristiques principales de la caméra Andor emCCD iXon Ultra 897. . 38
1.4 Taux de faux photons par pixel et nombre moyen de faux par unité de temps et d'espace en fonction du gain EM appliqué. 41
1.5 Caractéristiques principales de la caméra ebCMOS LUSIPHER, pour la lecture du CMOS et l'amplification par photo-cathode. 46
1.6 Résumé des chiffres clés des trois caméras utilisées. 53

2.1 Distribution et évolution de la charge moyenne collectée dans le cluster selon sa taille. 57
2.2 Coupures utilisées en test de détection de photons sur les images de noir à 0 et 3 kV. 60
2.3 Mesure de précision de localisation, d'efficacité et de pureté de la reconstruction de photons pour les trois conditions de simulation. 65

3.1 Récapitulatif des paramètres par défaut des détecteurs. 93
3.2 Coefficient directeur de la perte en précision de localisation due au bruit de lecture et au bruit de fond pour le capteur CCD. La taille du pixel est de 16 μm. Le bruit de lecture est fixé à 10 e- RMS dans le cas de l'évolution du bruit de fond. 98
3.3 Coefficient directeur de la perte en précision de localisation due au bruit de lecture et au bruit de fond pour le capteur emCCD avec un gain de 300. La taille du pixel est de 16 μm. Le bruit de lecture est fixé à 49 e- RMS dans le cas de l'évolution du bruit de fond. 99

4.1 Nombre moyen de photons détectés par l'ebCMOS à 125 fps pour différentes intensités de la lampe. 108
4.2 Mesure de l'écart-type du profil d'intensité du point source au point focal, pour les trois détecteurs pour différentes tailles de fibre optique. 112
4.3 Signal moyen de la source et du bruit en nombre de photons par seconde. Le bruit de fond est normalisé en surface par rapport à celle de la source. 113
4.4 Nombre moyen de photons reçus par image de l'expérience du point source pour une intensité I=0.5, à 125 fps et une haute tension appliquée HV=2.8 kV. 124
4.5 Données de l'expérience des microlentilles. 126

5.1 Écarts-types des mesures de coefficients de diffusions par simulation Monte-Carlo des capteurs emCCD et ebCMOS. 154

6.1 Résumé des paramètres de la caméra ebCMOS pendant l'expérience de suivi de QD 159
6.2 Comparaison du signal moyen détecté avec et sans filtre avec et sans échantillon de QD et calcul du rapport signal sur bruit moyen sur toutes les QD. 162
6.3 Données d'acquisition des deux échantillons de QD. 163
6.4 Données des sous-ensembles de l'échantillon **A** : signal minimal, maximal et moyen, nombre et précision de localisation pour une image. 165
6.5 Données des sous-ensembles de l'échantillon **B** : signal minimal, maximal et moyen, nombre et précision de localisation pour une image. 165
6.6 Comparaison entre la vitesse des moteurs et la mesure de la vitesse mesurée d'une QD. 169
6.7 Valeurs numériques utilisées dans le calcul du rayon de la particule à partir de la mesure de son coefficient de diffusion. 172

7.1 Résumé des paramètres du système optique et de la caméra utilisés pour l'expérience de suivi de la nage de bactéries. 177
7.2 Résultats moyens pour chaque grandissement de la précision sur la position, la vitesse et l'orientation du corps. L'étude a été faite sur plus de 50 bactéries immobiles et la mesure des données a été effectuée sur la forme sans utiliser l'intensité des pixels. 187
7.3 Nombre d'images et nombre de bactéries en mouvement par acquisition. . 188

Table des figures

1.1 Les bandes d'énergie de valence et de conduction d'un métal se chevauchent, permettant la circulation des électrons. Dans un semi-conducteur, les bandes sont séparées par une différence d'énergie, le "gap". Pour libérer un électron, il faut apporter une énergie extérieure supérieure au gap. . . . 15
1.2 Schéma de principe d'un détecteur de photons de type CCD ou CMOS. Une paire électron-trou est créée par effet photoélectrique dans la zone sensible et les électrons sont guidés par le champ électrique de la zone de déplétion. Le nombre d'électrons capturés est en principe proportionnel au nombre de photons incidents. 16
1.3 Évolution de la tension mesurée par le transistor à la lecture des charges accumulées. Le pixel est mis à sa tension de référence en début de cycle. V_{ref} est mesurée et stockée. Les charges secondaires font baisser la tension jusqu'à une valeur V_{signal}. La charge accumulée est donc proportionnelle à $\Delta V = V_{ref} - V_{signal}$. 19
1.4 Transfert de la charge d'un pixel au pixel voisin dans un capteur CCD. (a) La charge accumulée par un pixel est piégée dans un puits de potentiel créé par application d'une tension (10V). (b) Un puits de potentiel est créé dans la zone adjacente, où les charges peuvent se déplacer. (c) Le premier puits est éliminé. Les charges sont transférées ainsi vers le pixel voisin. 20
1.5 Lecture de la matrice de pixels d'un capteur CCD. Les charges sont transférées de proche en proche jusqu'au registre de lecture, où la valeur de chaque pixel est mesurée. 20
1.6 Pixel CMOS 3T contenant un transistor de remise à la valeur de reset, un transistor de lecture (suiveur ou *source follower*) et un transistor d'adressage du pixel (sélection), permettant la lecture de la charge accumulée directement dans le pixel. 22
1.7 (a) Ajout d'un registre de gain entre le registre de lecture et le transistor de lecture. (b) Tension normale d'un CCD pour le transfert de charges. (c) Tension augmentée (40 - 60V) pour générer une ionisation par impact et augmenter le nombre de charges à la sortie du registre. 23
1.8 Distribution de l'amplification par ionisation par impact de l'emCCD (a) Probabilité d'obtenir n électrons secondaires en sortie du registre de gain en fonction du nombre m d'électrons primaires, selon l'Eq. 1.5 pour un gain de 300. (b) Probabilité d'obtenir n électrons mesurés en sortie du pixel avec un bruit de lecture ($\sigma = 50$ e-), pour un signal d'un électron en entrée (noir) ou sans signal (vert). La limite de 5 fois le bruit est donnée en rouge. La valeur est centrée en 0 car la valeur d'offset du signal est retranchée. . . . 24

1.9 Schéma de principe du détecteur ebCMOS. Un photon génère un électron dans la photo-cathode. L'électron est ensuite accéléré par le champ électrique généré par la haute tension dans le tube à vide. L'électron dépose l'énergie cinétique accumulée et génère un grand nombre d'électrons secondaires dans la couche sensible. 25
1.10 Schéma du trajet d'un photo-électron émis dans le tube à vide sous l'effet du champ électrique. Un photon impactant la photo-cathode génère un photo-électron, qui est libéré dans le tube à vide. Il est ensuite accéléré en direction des pixels par le champ électrique E. La vitesse radiale initiale des photo-électrons est à l'origine de l'étalement de la position initiale du photo-électron, créant une PSF modélisée par une fonction gaussienne. . . 28
1.11 (a) Schéma de la création et de la diffusion de charges secondaires dans la couche épitaxiale de l'ebCMOS. Un photo-électron accéléré impacte la couche épitaxiale avec une énergie typique de 3 keV. Il perd une partie de cette énergie dans la couche passivée puis dépose le reste dans la couche épitaxiale. Cette énergie sert à la création d'un grand nombre de paires électrons-trous qui diffusent thermiquement vers les pixels. (b) Visualisation du trajet d'un photo-électron rétrodiffusé. Après la sortie de la couche sensible, il est de nouveau accéléré par le champ électrique et impacte de nouveau la matrice. 31
1.12 Distribution de la probabilité du nombre d'électrons secondaires générés dans la couche épitaxiale et lus par le pixel avec (vert) et sans (noir) rétrodiffusion. Le signal suit une distribution de Poisson de moyenne 5, le bruit de lecture est de 8 e- RMS, V=2 800 V et E_{dead}=1 600 eV. 32
1.13 Efficacité quantique de la caméra Andor sCMOS Neo en fonction de la longueur d'onde. 33
1.14 Valeur moyenne par pixel pour une acquisition de 20 000 images sur 200×200 pixels à 100 images/seconde par la caméra sCMOS. (a) Distribution spatiale de la valeur moyenne par pixel. L'échelle de couleur donne le nombre moyen d'ADCU. (b) Distribution de la valeur moyenne par pixel. 34
1.15 Distribution de l'écart-type de la valeur de chaque pixel pour une acquisition de 20 000 images sur 200×200 pixels à 100 images/seconde par la caméra sCMOS. (a) Distribution spatiale de l'écart-type des valeurs des pixels. L'échelle de couleur donne l'écart-type du pixel. (b) Distribution de l'écart-type des valeurs des pixels. 35
1.16 Fonction cumulative du bruit de lecture du capteur sCMOS. 35
1.17 Réponse d'un pixel emCCD pour une acquisition dans le noir et des gain EM égaux à 1 et 1000. Les courbes correspondant à 3 et 5 fois le bruit de lecture sont données en référence. 36
1.18 Distribution du rapport signal sur bruit des pixels pour une acquisition de 500 images sur 200×200 pixels à 100 images/seconde par la caméra sCMOS. (a) Distribution moyenne du rapport signal sur bruit des pixels par image. (b) Distribution du nombre de pixels ayant une valeur supérieure à 5 fois leur bruit par image. 36
1.19 Influence de la cadence de lecture sur le bruit de lecture d'une acquisition de 2 000 images sur 100 × 100 pixels pour la caméra sCMOS. (a) Distribution du bruit de lecture des pixels. (b) Distribution du nombre de pixels ayant un rapport signal sur bruit supérieur à 5 par image. 37
1.20 Efficacité quantique de la caméra Andor emCCD iXon Ultra 897 en fonction de la longueur d'onde. 38

1.21 Valeurs moyennes des pixels pour une acquisition de 500 images sur 512 × 512 pixels à 10 images/seconde par la caméra emCCD sans gain. (a) Distribution spatiale des valeurs moyennes. (b) Distribution de la valeur moyenne de pixels avec un fit gaussien. 39
1.22 Distribution de l'écart-type de la valeur de chaque pixel pour une acquisition de 500 images sur 512 × 512 pixels à 10 images/seconde par la caméra emCCD sans gain.(a) Distribution spatiale. (b) Distribution en valeur. . . 39
1.23 Rapport signal sur bruit (SNR) des pixels pour une acquisition de 2 000 images sur 31 × 31 pixels à 227 images/seconde par la caméra emCCD pour des consigne de gain EM allant de 1 à 1000. (a) Distribution moyenne des valeurs de SNR des pixels par image. (b) Distribution moyenne du nombre de faux (SNR supérieur à 5) par image en fonction du gain EM. 40
1.24 Taux de faux pour une acquisition de 2 000 images sur 31 × 31 pixels par la caméra emCCD pour des gains allant de 0 à 1000. (a) Probabilité d'avoir un faux par pixel en fonction du gain EM et de la fréquence de lecture. (b) Évolution du taux de faux par unité de surface et par unité de temps en fonction du gain EM et de la fréquence de lecture. 41
1.25 (a) Photographie de la caméra LUSIPHER. (b) Photographie du capteur ebCMOS. La photo-cathode a un diamètre de 12 mm. L'ebCMOS contient deux matrices de 400 × 800 pixels de 10 μm, soit une zone sensible de 64 mm^2. 42
1.26 Schéma de la caméra LUSIPHER. (a) Lecture, pilotage et refroidissement. (b) Intégration du capteur. 43
1.27 Description de la chaîne de traitement des données du projet LUSIPHER, de la caméra et son contrôle à la sauvegarde en continu des images à 500 images/seconde 44
1.28 Photographie de la carte mère surmontée de la carte fille 10 Gbits/s Ethernet. 45
1.29 Image du logiciel IHM SWIFTER. 46
1.30 Calibration du facteur de conversion e-/ADCU en utilisant la distribution de la charge mesurée par les pixels pendant l'exposition à une source de Fer^{55}. Les deux pics correspondent aux deux raies d'émission K_α, donc dans ce cas l'intégralité de la charge a été déposée dans un seul pixel, permettant la conversion. 47
1.31 Calibration de l'efficacité de collection de la charge par comparaison de l'énergie collectée par un amas de 5 × 5 pixels pour le pic de la raie du Fer^{55}. Le rapport entre les deux nous donne l'efficacité de collection de la charge. 47
1.32 Moyennes et écart-types des valeurs des pixels pour une acquisition de 20 000 images sur 400 × 400 pixels à 125 images/seconde par la caméra ebCMOS dans le noir et 0 kV de haute tension. (a) Distribution de la valeur moyenne des pixels. (b) Distribution de l'écart-type à la valeur moyenne des pixels. Les courbes en rouge sont les fonctions utilisées pour la simulation Monte-Carlo. 48
1.33 Évolution de l'efficacité quantique des photo-cathodes en fonction de la longueur d'onde des photons incidents. 49
1.34 Image sommée (22 000 images) dans le noir avec reconstruction de photons pour l'ebCMOS à 125 fps, 400×400 pixels, S25. (a) Sans haute tension. (b) Avec haute tension nominale à 2.8 kV. 49

1.35 Mesure du taux de faux et du courant d'obscurité de la photo-cathode pour une acquisition de 22 000 images dans le noir à 125 fps sur 400 × 400 pixels avec une photo-cathode S25. (a) Acquisition sans haute tension : distribution du nombre de faux par image suivant une distribution exponentielle. (b) Acquisition avec une haute tension de 3 kV : distribution du nombre d'électrons accélérés du courant d'obscurité par image suivant une distribution gaussienne. 50
1.36 Mesure du courant d'obscurité de la photo-cathode S25, pour deux vitesses de lecture : 125 fps (10 MHz) et 250 fps (20 MHz). (a) Probabilité de mesurer un photon dans un pixel par image en fonction de la haute tension appliquée. (b) Taux de faux par unité de surface par unité de temps en fonction de la haute tension appliquée. 51
1.37 (a) Mesure de l'influence de la température du capteur sur le courant d'obscurité à 125 fps sur 400 × 400 pixels et une photo-cathode S25. Évolution du courant d'obscurité en fonction de la haute tension et de la température du capteur (10, 15 et 20 °C). (b) Évolution de l'écart-type du nombre de photons du courant d'obscurité par image en fonction du nombre moyen de photons de courant d'obscurité. La distribution suit une loi en $\sqrt{x}$. . . 51
1.38 Distribution de probabilité des PSF. (a) PSF de diffusion des charges secondaires dans le CMOS. (b) PSF des photo-électrons dans le tube à vide. 52

2.1 Exemple de détection des impacts de photo-électrons par la méthode des clusters pour une acquisition dans le noir à 125 fps avec une haute tension appliquée de 2.8 kV. (a) Image du rapport signal sur bruit de 50 × 50 pixels (b) Position des impacts photo-électrons détectés. 56
2.2 Évolution de la charge moyenne cumulée des pixels voisins du cluster, classés par ordre décroissant selon leur signal ADCU après soustraction de la valeur moyenne du pixel dans le noir. 58
2.3 Étapes de la méthode de détection d'un événement photo-électron. En utilisant la matrice de SNR des pixels, un cluster de photo-électron vérifie trois critères : un SNR suffisant, un maximum local et un nombre suffisant de pixels voisins ayant reçu un signal significatif. Cette méthode permet aussi de mesurer la position de l'impact avec un centre de gravité et un comptage du nombre d'impacts locaux avec la linéarité du gain. 59
2.4 (a) Mesure dans le noir du nombre de pixels ayant un SNR supérieur à 2 dans un cluster 5×5 autour d'un maximum local ayant un SNR supérieur à 3. En vert sans haute tension, en noir à 3 kV. (b) Nombre moyen de photons mesurés par image dans le noir à 0 (vert) et 3 (noir) kV sur 20 000 images en fonction des coupures appliquées. Pour toutes les coupures, $s_c = 3$. Les valeurs des coupures sont données dans la table 2.2. 60
2.5 Distribution de la charge cumulée dans une sous-matrice de 5×5 pixels autour du pixel central, mesurée sur 20 000 images dans le noir avec une haute tension de 3 kV. Trois méthodes utilisées pour la sélection du pixel central : la méthode des clusters (noir), la sélection par le pixel central ayant un SNR supérieur à 3 et le maximum local (bleu) et une sélection aléatoire (vert). 61
2.6 (a) Charge en unités ADC des pixels d'un événement photo-électron à 3 kV (b)Position reconstruite du centre de l'impact à partir du centre de gravité des charges. 62

2.7 (a) Distribution des centres de gravité de photon par rapport au pixel central sans correction (noir) et après application de la fonction η (vert). 20 000 images de courant d'obscurité à 3 kV. (b) Fonction de correction η. 63
2.8 (a) Distribution du nombre de photons par image. Nombre de photons simulés (marron), nombre de photons détectés (noir), nombre de photons validés (bleu). (b) Distribution de la position vraie des photons correctement détectés par rapport au pixel d'impact. Fit en p_1x+p_0. 64
2.9 Trois conditions de simulation. (a) Distribution de la charge mesurée dans Q_5 des photons détectés. (b) Distribution de l'écart à la position vraie des photons détectés. 65
2.10 Distribution de la charge mesurée dans Q_5. (a) Comparaison entre le signal du spot et une zone sans signal. (b) Comparaison des distributions pour trois intensités : 1, 3 et 5 (unité arbitraire). 66
2.11 Distribution de la charge des pixels dans des clusters de 5×5 pixels (noir) ou dans des contours au nombre libre de pixels (rouge) à 8 kV 67
2.12 20 000 images dans le noir, 3 kV, 125 fps, 400×400 pixels. (a) Distribution moyenne de la charge d'un retour ionique dont le pixel le plus brillant est centré. (b) Distribution moyenne du nombre de retours ioniques détectés par image pendant l'acquisition. 68
2.13 Charge déposée dans les pixels par un événement de retour ionique. (a) Charge moyenne collectée dans les couronnes successives centrées sur le pixel le plus brillant. (b) Évolution de la charge sommée moyenne des pixels classés dans leur ordre d'importance. 68
2.14 (a) Photographie du montage embarqué LuSEApher. (b) Image intégrée sur 200 images d'un événement de bioluminescence à 62.5 fps et 2.8 kV. . 69

3.1 Distribution de probabilité spatiale de la PSF optique 2D, longueur d'onde $\lambda = 520$ nm, Ouverture Numérique O.N.= 1.4. (a) Pour des sources isolées, une déconvolution permet une bonne mesure du centre d'émission de la source. (b) Pour deux sources distantes de $d = 300$ nm, la reconstruction des centres d'émission devient bruitée par le chevauchement des PSF. (c) Pour deux sources distantes de $d = 200$ nm, les deux sources sont plus difficilement distinguables. 80
3.2 Distribution de probabilité d'une fonction de Bessel J_1 (noir) pour $\lambda = 520$ nm et une ouverture numérique O.N.= 1.4 et d'une fonction gaussienne d'écart-type $\sigma = 81.73$ nm (vert). La différence entre les deux distributions est donnée en rouge. 81
3.3 (a) Schéma de l'efficacité de collection géométrique du microscope. La source émet généralement des photons dans toutes les directions. Seuls les photons dans un certain angle solide parviennent jusqu'au capteur. (b) Schéma de la perte de photons issus de la source par diffusion dans le milieu. Les photons peuvent interagir avec le milieu dans lequel la source est contenue avant d'arriver jusqu'au capteur. 82
3.4 Paramètres et distributions principales utilisées dans l'analyse de Cramér-Rao. 84
3.5 Précision de localisation de la position de la source obtenue avec la limite de Cramér-Rao. (a) Visualisation 2D en fonction de la position de la source par rapport au centre du pixel [pixel 16μm, bruit de lecture 10e-]. (b) Évolution de la précision de localisation suivant la position de la source selon l'axe X, en fonction du gain emCCD appliqué [pixel 16μm, bruit de lecture 49e-] . . 94

3.6 Perte de précision de localisation sur la position de la source par rapport à la précision de localisation minimale en fonction de l'écart-type de la PSF optique. (a) CCD. En fonction de la taille du pixel : 5, 10, 15 et 20 μm. La courbe en cyan est celle de l'emCCD à gain 300. (b) En fonction du gain emCCD : G=1, 50, 100 et 300. 95
3.7 Perte de précision de localisation de la position de la source par rapport à la précision de localisation minimale en fonction de l'écart-type de la PSF de diffusion dans le CMOS. 96
3.8 Perte de précision de localisation de la position de la source par rapport à la précision de localisation minimale en fonction de la valeur du bruit de lecture. (a) Sans gain emCCD pour trois valeurs de signal : 5, 10 et 15 photons par image. (b) Gain emCCD G=300 pour deux valeurs de signal : 1 et 5 photons par image. 97
3.9 Perte de précision de localisation de la position de la source par rapport à la précision de localisation minimale en fonction de la valeur moyenne du bruit de fond par image et par pixel en photons. (a) Sans gain emCCD pour trois valeurs de signal : 5, 10 et 15 photons par image. (b) Gain emCCD G=300 pour deux valeurs de signal : 1 et 5 photons par image. 98
3.10 Évolution de la précision de localisation en fonction du bruit de fond moyen par pixel, pour les capteurs sCMOS et emCCD avec un signal moyen de 10 photons par image. 99
3.11 Évolution de la précision de localisation en fonction du signal, pour un gain idéal constant (bleu) et pour la distribution stochastique (noir) pour l'emCCD avec G=300. 100
3.12 Évolution de la précision de localisation en fonction du gain appliqué, pour différentes valeurs de signal pour la caméra emCCD. 101
3.13 Évolution de la précision de localisation sur la position de la source en fonction du nombre moyen de photons par image. Sans rétrodiffusion (noir) et avec (rouge) pour la caméra ebCMOS. 102
3.14 ebCMOS : Évolution de la précision de localisation sur la position de la source en fonction du nombre moyen de photons par image pour la méthode en comptage de charges (bleu) et celle de détection des photo-électrons (marron). 103
3.15 Évolution de la précision de localisation en fonction du nombre moyen de photons détectés (a) ou émis (b), pour les caméras emCCD, ebCMOS en mode comptage et sCMOS. 104

4.1 Schéma du montage de la génération d'un point source. Une fibre optique de diamètre D (=8, 50 ou 400 μm) focalise la lumière pulsée par une LED à travers un objectif inversé ($\times$10 ou $\times$50) sur la matrice de pixels du détecteur. Une sphère intégrante peut être ajoutée pour augmenter le bruit de fond. 107
4.2 Nombre moyen de photons détectés par l'ebCMOS à 125 fps pour différentes intensités de la lampe. Le fit nous donne 0.40 phe/image/I ou 100 phe/s/I. 107
4.3 Profil en intensité du point source utilisant une fibre optique de diamètre 8 μm focalisé par un objectif 10$\times$ et observé à travers un objectif 50$\times$ par la caméra sCMOS : (a) en 2D. L'échelle de couleur correspond au nombre de coups. (b) en 1D selon l'axe X. 108

4.4 Images intégrées à différents z. Les écarts sont données en μm par rapport au point focal. L'échelle de couleur donne le nombre d'ADCU.
ebCMOS à 125 fps et 3 kV, pixel = 10 μm : (a) Δz= -180. (b) Δz= -90. (c) Δz=0. (d) Δz= 90. (e) Δz= 180.
emCCD sans gain à 10 fps, pixel = 16 μm : (f) Δz= -100. (g) Δz= -50. (h) Δz=0. (i) Δz= 50. (j) Δz= 100.
sCMOS à 100 fps, pixel = 6.5 μm : (k) Δz= -70. (l) Δz= -40. (m) Δz=0. (n) Δz= 40. (o) Δz= 70. 110
4.5 Évolution du rapport de l'intensité du pixel maximum en fonction de Δz par rapport à l'intensité maximale à Δz=0. (a) Distributions pour les trois détecteurs emCCD (EM), sCMOS et ebCMOS pour une fibre optique de 8 μm. (b) Distributions pour le détecteur sCMOS pour trois tailles de fibre optique, 8, 50 et 400 μm. 111
4.6 Évolution de l'écart-type du profil d'intensité des points sources en fonction deΔz. (a) Distributions pour les trois détecteurs emCCD (EM), sCMOS et ebCMOS pour une fibre optique de 8 μm. (b) Distributions pour le détecteur sCMOS pour trois tailles de fibre optique, 8, 50 et 400 μm. . . . 111
4.7 Distribution moyenne du nombre de photons détectés par image pendant l'acquisition aux deux intensités (I = 0.1 et I = 0.25) : emCCD 227 fps, G = 300 et ebCMOS 125 fps, 2.8 kV. (a) Zone en dehors du point source. (b) Zone du point source. 113
4.8 Acquisition avec l'emCCD de 20 000 images du point source pour une intensité I = 0.1 à une cadence de 227 fps et un gain EM G=300 sur 31 $\times$ 31 pixels. (a) Distribution de l'écart à la position vraie du point source mesuré pour des amas de cinq images consécutives, et fit gaussien. (b) Suivi de l'écart à la position vraie du point source mesuré à chaque image au cours du temps et fit polynomial de degré 1. 114
4.9 Évolution de l'efficacité du suivi et du taux de faux en fonction du nombre d'images utilisées pour le suivi pour une intensité I = 0.1. (a) ebCMOS avec sélection en charge et en méthode de comptage. (b) emCCD en mode charge avec deux gains différents (G=300 et G=500). 116
4.10 Comparaison de l'ebCMOS et de l'emCCD en mode comptage de photons pour deux intensités (0.1 et 0.25) avec l'évolution de l'efficacité du suivi et du taux de faux : (a) En fonction du nombre d'images utilisées pour le suivi. (b) En fonction du nombre moyen de photons détectés dans le suivi. 117
4.11 Évolution de la précision de localisation de la position du point source en fonction du nombre d'images utilisées pour le suivi, pour deux intensités (100 et 250). (a) Comparaison du fit de charge et du comptage de photons pour l'emCCD. (b) Comparaison des gains emCCD (300 et 500). 118
4.12 Comparaison du fit de charge et du comptage de photons de l'ebCMOS avec l'évolution de la précision de localisation sur la mesure de la position du point source : (a) En fonction du nombre d'images utilisées pour le suivi. (b) En fonction du nombre moyen de photons détectés dans le suivi. . . . 119
4.13 (a) Distribution de la précision de localisation en fonction du temps pour différentes vitesses de lecture (100, 370, 500 et 1000 fps). (b) Distribution de la précision de localisation en fonction du temps pour différentes intensités (0.1 et 0.25), avec une vitesse de lecture de 100 fps. 120
4.14 Évolution de la précision de localisation en fonction du temps d'intégration. Comparaison des détecteurs ebCMOS, emCCD, CCD et sCMOS. 121

4.15 Évolution de la précision de localisation en fonction du nombre de photons détectés. Comparaison des résultats expérimentaux avec les calculs de limite de Cramér-Rao. (a) ebCMOS. (b) emCCD. 121
4.16 Profil d'intensité du point source focalisé par un objectif 50×. Image intégrée obtenue à travers un objectif 10× et la caméra sCMOS. (a) Profil 2D, l'échelle de couleur donne le nombre d'ADCU. (b) Profil 1D. 122
4.17 Distribution du nombre de photons reçus pour les différents mode de bruit de fond avec la caméra ebCMOS en mode comptage, à 125 fps, 2.8 kV et une photo-cathode S20. 123
4.18 Images intégrées de photons sur 20 000 images, pour le point source avec une intensité I=0.5, à 125 fps, 2.8 kV. L'échelle de couleur correspond au nombre moyen de photons détectés par pixel par image. (a) Sans bruit de fond ajouté. (b) Condition [2]. (c) Condition [3]. (d) Condition [4]. 124
4.19 Mesures de position d'un point source avec la caméra ebCMOS pour une cadence de lecture de 125 fps et une haute tension à 2.8 kV. (a) Évolution de l'efficacité et du taux de faux du suivi en fonction du temps d'intégration sans bruit de fond et avec la condition de bruit [4]. (b) Évolution de la précision de localisation sur la position du point source en fonction du signal moyen reçu, pour les quatre niveaux de bruit. 125
4.20 (a) Matrice de microlentilles. (b) 640 points sources focalisés sur le détecteur. L'illumination n'est pas uniforme mais les points sources sont équidistants car les rayons sont parallèles. 126
4.21 Visualisation des points sources de microlentilles par l'ebCMOS à 125 fps avec une haute tension appliquée de 2.8 kV. (a) Une image brute en charge et (b) image intégrée sur 3 4000 images. L'échelle de couleur représente la charge du pixel. (c) Image des positions reconstruites par l'algorithme de localisation des sources. L'échelle de couleur représente le signal moyen de photons des sources. 127
4.22 (a) Distribution de l'intensité moyenne des points sources des microlentilles, en photons détectés par image par point source. (b) Distribution du nombre moyen de photons de bruit, en photons par image et par point source. . . 128
4.23 (a) Zoom 50 × 50 pixels sur l'image intégrée en photons. (b) Distribution de la distance entre les positions successives des points sources, mesurées après 20 images. 128
4.24 Évolution du taux de faux et de l'efficacité du suivi en fonction du temps d'intégration. 129
4.25 (a) Évolution de la précision de localisation de la position des points sources de microlentilles en fonction du temps d'intégration et de l'intensité des points sources. (b) Évolution de la précision de localisation de la position des points sources de microlentilles en fonction du nombre moyen de photons détectés. 130

5.1 Schéma de principe du suivi de sources par accumulation spatiotemporelle. Les points rouges correspondent à des photons, les bleus correspondent à la position reconstruire de la source fixe. Les cercles correspondent à l'espace estimé dans lequel les photons issus d'une même source impactent le détecteur. Le rayon du cercle est calculé à partir de la PSF du détecteur et de la taille de la source. Afin de suivre les sources immobiles (C) ou en mouvement (A), il faut d'abord les identifier et les distinguer du bruit (B). L'algorithme recherche des densités de photons supérieures au bruit de fond en accumulant l'information des images successives (ici 1,2 et 3). Dans le cas d'une source immobile dans une surface. Pour une cible en mouvement dans un espace à trois dimensions comprenant la surface et le temps (2D + t). 138
5.2 (a) Détermination de R_{psf} par rapport à la PSF du détecteur. (b) Intérêt de la détermination du signal sur bruit local par rapport au bruit global. Avec un seuillage à 2, l'espace **I** va créer des faux entrainant une perte de pureté. Avec un seuillage à 4, la source **d** est éliminée, entrainant une perte d'efficacité. 140
5.3 Schéma de principe du suivi de sources par détection de la position de l'impact des photons/photo-électrons. 141
5.4 Principe de sélection du signal dans la phase d'identification. Une source reçoit deux photons à t. En supposant qu'au moins un des photons provient de la source, six nouvelles positions sont possibles avec l'information obtenue. Plusieurs hypothèses sont possibles : l'utilisation des deux photons ou d'un seul ainsi que la pondération de la nouvelle information par l'ancienne. En utilisant l'information obtenue à l'image $t+1$, il est possible de trouver la position la plus probable et d'enlever le photon de bruit. . . 142
5.5 Schéma de principe du filtre de Kalman en quatre étapes : 1) Initialisation des paramètres. 2) Prédiction. 3) Mesure. 4) Correction. 144
5.6 Évolution de la précision de localisation après 20 images en fonction du nombre de photons par image selon le mode d'itération utilisé pour une source fixe, avec et sans bruit de fond (1 photon par image), la taille du pixel est de 10 μm, la PSF optique de 8 μm correspondant à un grandissement 100×. 146
5.7 Évolution de la position estimée de la source selon l'axe Y par le filtre de Kalman en fonction du temps. La source est immobile en (0). (a) Variation du paramètre W, confiance dans l'équation d'état à V et P_0 fixés. (b) Variation du paramètre de l'erreur initiale P_0, à V et W fixés. 147
5.8 Valeur vraie en rouge, valeur mesurée en noir. (a) Évolution de la position X de la source au cours du temps. (b) Évolution de la vitesse X de la source au cours du temps. 148
5.9 Distribution de l'écart à la valeur vraie pour 20 000 images et fit gaussien. (a) Position X. (b) Vitesse selon X. 148
5.10 Évolution de la précision de localisation en fonction de la vitesse de la source, pour différents niveaux de bruit : 0 (rouge), 0.5 (bleu) et 1 (noir) photons par image, pour un signal d'un photon par image. (a) Précision de localisation sur la position. (b) Précision sur la vitesse. 149

5.11 Évolution du rapport entre précision obtenue par un suivi image par image et précision obtenue par le filtre de Kalman, en fonction de la vitesse de la source et rapport signal sur bruit. (a) Rapport de la précision de localisation du suivi simple sur celle du suivi avec le filtre de Kalman. (b) Rapport de la précision dynamique du suivi simple sur celle du suivi avec le filtre de Kalman. 150
5.12 Distribution des coefficients de diffusion mesurées pour l'emCCD et l'ebCMOS pour des trajectoires de 4 et 40 secondes. La valeur simulée du coefficient de diffusion est de (a) 10^{-3}, (b) 10^{-2}, (c) 10^{-1} et (d) 1 $\mu m^2 s^{-1}$. . . . 153

6.1 (a) Principe de la microscopie de fluorescence. Un échantillon est combiné à des marqueurs fluorescents. Ces marqueurs sont excités par laser et se désexcitent par émission de photons. Un miroir dichroïque est utilisé pour filtrer la longueur d'onde d'émission reçue par le photo-détecteur. (b) Un miroir dichroïque est transparent pour une plage de longueur d'onde et réfléchissant pour le reste. 157
6.2 (a) Schéma représentatif d'une boîte quantique (QD). (b) Spectres d'absorption et d'émissions de QD de rayon 2.2, 2.9, 4.1 et 7.3 nm [11]. 158
6.3 (a) Schéma des bandes de conduction et de valence d'une QD. (b) Passage d'un électron excité de la bande de valence à la bande de conduction. (c) et (d) Désexcitation de l'électron par émission d'un photon d'énergie E_{gap}. 158
6.4 Montage expérimental de l'expérience de suivi de QD avec le microscope achromatique de l'équipe de Christophe Dujardin, David Amans, Gilles Ledoux et Florian Kulzer au centre Nanoptec. 159
6.5 Bruit de fond mesuré sur 20 000 images. L'échelle de couleur correspond à la valeur moyenne du nombre de photons par image et par pixel. (a) Bruit de la caméra dans le noir. (b) Bruit de fond du microscope, laser en conditions expérimentales. 160
6.6 Distribution du nombre de photons détectés par image. (a) Bruit caméra dans le noir. (b) Bruit de fond du microscope, laser en conditions expérimentales. 160
6.7 Image intégrée sur 20 000 images de QD. (a) Montage normal. (b) Ajout d'un filtre passe bande (610 nm) 161
6.8 Distribution du nombre de photons détectés par image de QD fixées. (a) Conditions normales. (b) Ajout d'un filtre passe bande. 162
6.9 Image intégrée en photons des QD fixées, l'échelle de couleur représente le signal moyen du pixel en photons. Les croix marquent le centre des sources. (a) Échantillon **A**. (b) Échantillon **B**. 163
6.10 (a) Distribution du signal moyen par image des QD de l'échantillon. (b) Évolution de la précision de localisation moyenne sur capteur (pixel de 10 μm) sur la position des QD en fonction du signal moyen reçu. 164
6.11 Évolution de la précision de localisation moyenne sur la position des QD en fonction du nombre d'images utilisées dans la détection pour différents sous-ensembles de QD. (a) Échantillon **A**. (b) Échantillon **B**. 164
6.12 Distribution du signal reçu moyen [ph/image] glissant sur 30 images (120 ms) de cinq QD sur l'ensemble des images : (a) Échantillon **A**. Visualisation des pics "ON" (7-8 photons) et "OFF" (2-4 photons) (b) Échantillon **B**. . 166
6.13 Signal reçu moyen glissant sur 30 images [ph/image] pour dix QD de l'échantillon **A**. Le signal représenté pour chaque QD est la portion de signal comprise entre son maximum (1) et son minimum (0). 167

6.14 Écart à la position initiale au cours du temps pour la source et la table XY. (a) Axe X. (b) Axe Y. 168
6.15 Écart à la position initiale au cours du temps pour la source et la table XY. (a) Axe X. (b) Axe Y. 168
6.16 Distribution de l'écart à la position initiale au cours du temps pour la source. La vitesse donnée pour la table X est donnée en vert. (a) Axe X. (b) Axe Y. 169
6.17 Mesure du bruit de fond de l'expérience de QD libres entre deux lames. (a) Distribution spatiale du signal moyen reçu par pixel. L'échelle de couleur donne le nombre moyen de photons par pixels. (b) Distribution du nombre de photons détectés par image au cours de l'acquisition. 170
6.18 Distribution du signal moyen des treize QD suivies en nombre de photons par image. 170
6.19 Visualisation du mouvement d'une QD libre en mouvement Brownien : (a) Mouvement XY au cours du temps. L'échelle de couleur correspond au numéro d'image du suivi. (b) Positions X et Y au cours du temps. 171
6.20 Évolution du déplacement quadratique moyen (MSD) en fonction du temps, selon une droite de coefficient directeur 1.298 pixels^2/image. 171
6.21 (a) Visualisation des mouvements reconstruits des QD en diffusion entre deux lames de verres. (b) Distribution des rayons des QD calculés à partir des coefficients de diffusion mesurés. 172

7.1 Schéma de principe de la microscopie en champ sombre. 176
7.2 Distribution spatiale des photons détectés sur 20 000 images, à 500 fps et 2.8 kV. (a) Bruit caméra. (b) Bruit de fond du microscope, observation d'une goutte de solution sans bactéries éclairé en conditions nominales. . . 177
7.3 Distribution du nombre de photons détectés par image sur 20 000 images, à 500 fps et 2.8 kV. (a) Bruit caméra selon une distribution exponentielle. (b) Bruit de fond microscope, observation d'une goutte de solution sans bactéries éclairé en conditions nominales. 178
7.4 Schéma de la propulsion d'une bactérie par son faisceau de flagelles. Lorsque les flagelles tournent dans le sens anti-horaire, ils forment un faisceau qui propulse la bactérie. 179
7.5 Une image brute de bactéries à 500 fps et 2.8 kV : (a) Grandissement $\times$100. (b) Grandissement $\times$60. (c) Grandissement $\times$20. 180
7.6 Image de bactérie (1 ms d'intégration), grandissement 100$\times$: (a) Image après filtrage gaussien. (b) Image contourée en intensité. (c) Détermination et représentation de l'orientation du corps de la bactérie. 183
7.7 Image de bactérie (1 ms d'intégration), grandissement 60$\times$: (a) Image après filtrage gaussien. (b) Image contourée en intensité. (c) Détermination de l'orientation du corps de la bactérie. 183
7.8 Image de bactérie (1 ms d'intégration), grandissement 20$\times$: (a) Image après filtrage gaussien. (b) Image contourée en intensité. (c) Détermination de l'orientation du corps de la bactérie pour un agrandissement sur 90 $\times$ 90 pixels. 184
7.9 Mesure de l'orientation de la bactérie en fonction du temps. Données brutes et données lissées par une moyenne glissante sur $2N+1$ images centrées autour de l'image courante. 185
7.10 Image intégrée d'une bactérie immobile au grandissement 100$\times$. 185

7.11 Mesure de précision sur une bactérie immobile au grandissement 100 ×. (a) Suivi de la position X en fonction du temps. (b) Distribution des positions reconstruites. Les courbes bleues sont les moyennes glissantes des courbes noires, avec N=5. Les résultats affichés sont ceux du fit gaussien obtenues pour la moyenne glissante. 186
7.12 (a) Distribution des angles mesurés de l'orientation du corps à chaque image pendant l'acquisition. Les résultats affichés sont ceux du fit gaussien obtenus pour la moyenne glissante. (b) Distribution des vitesses du COG à chaque image. La vitesse brute (noir) est obtenue à partie des positions brutes alors que la vitesse avec moyenne glissante (bleu) est obtenue à partir des positions moyennées. La vitesse moyennée deux fois (vert) est obtenue en appliquant une moyenne glissante à la courbe de vitesse sur positions moyennes. 187
7.13 Trace des bactéries en mouvement mesurées pendant l'acquisition. Chaque couleur correspond à une bactérie. Grandissement : (a) 100 ×. (b) 60×. (c) 20×. 188
7.14 (a) Évolution de la position X en fonction du temps pour le COG forme et le COG intensité. (b) Distribution de la distance entre les deux COG lors du suivi. 189
7.15 (a) Évolution de la distance entre les deux COG (forme et intensité) au cours du temps. (b) Évolution de la vitesse mesurée à partir des deux COG au cours du temps. 190
7.16 Projection sur le capteur à deux dimensions de la forme de la bactérie à trois dimensions par l'illumination du champ sombre. 190
7.17 Évolution de l'orientation du corps de la bactérie (noir) et de la distance entre les deux centres de gravité x_i et x_f (bleu) cours du du temps. 191
7.18 Trajectoires de bactéries au grandissement 100 ×. L'échelle de couleur représente le numéro d'image. (a) **A** (b) **B** 192
7.19 Modèle de propulsion de la bactérie. Les flagelles sont répartis sur le corps de la bactérie. L'axe du faisceau de flagelle ne correspond pas à l'axe du corps à cause de l'asymétrie et au nombre fini des flagelles. Le point d'incidence de la force appliquée par les flagelles n'appartient pas non plus à l'axe du corps. La rotation du faisceau de flagelle est alors responsable d'une rotation du corps de la bactérie autour de l'axe de propulsion pendant le mouvement. Le point C représente le centre de la bactérie, le point P l'intersection entre l'axe du corps et l'axe de propulsion, v est la vitesse de la bactérie et θ l'angle de rotation du corps de la bactérie. 193
7.20 Images successives d'une bactérie le long de sa trajectoire par pas de 10. Une ligne correspond à une période de rotation du corps. 193
7.21 Orientation du corps par rapport à la trajectoire de la bactérie **B** au cours du temps. 194
7.22 Schéma de tumbling pendant la nage d'une bactérie. Lorsque les flagelles tournent dans le sens anti-horaire, ils forment un faisceau qui propulse la bactérie. Toutes les secondes en moyenne dans le volume, le sens de rotation est inversé et le faisceau se délie. Les flagelles reforment ensuite un faisceau. Le processus change l'orientation de la bactérie et résulte en un changement de sa direction. En moyenne, le phénomène de tumbling dure en moyenne 100 ms. 195
7.23 Vitesse absolue de la bactérie **B** au cours du temps. 196

7.24 (a) Trajectoire de la bactérie **C**. L'échelle de couleur représente le numéro d'image. (b) Évolution de la position Y, de la vitesse et de l'orientation du corps de la bactérie **C** au cours du temps pendant un évènement de tumbling. 197
7.25 Évolution de la position d'une bactérie au grandissement 20× sur 20 000 images (40s). (a) Trace du suivi à deux dimensions. L'échelle de couleur représente le numéro d'image. (b) Évolution selon les axes X (noir) et Y (bleu). 198
7.26 (a) Évolution de l'orientation du corps de la bactérie au cours du temps. (b) Évolution de la vitesse de la bactérie au cours du temps. 198