

*ÉCOLE DOCTORALE MATHÉMATIQUES, SCIENCES DE L'INFORMATION ET DE  
L'INGÉNIEUR (MSII) – ED 269*

**LABORATOIRE DES SCIENCES DE L'INGÉNIEUR, DE L'INFORMATIQUE  
ET DE L'IMAGERIE (ICUBE UMR 7357)**

**THÈSE** présentée par :

**Audrey LEONG-HOI**

soutenue le : **2 DÉCEMBRE 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**  
Discipline / Spécialité : Electronique, microélectronique, photonique

**Étude des techniques de super-résolution  
latérale en nanoscopie et développement  
d'un système interférométrique nano-3D**

THÈSE dirigée par :

**Dr. MONTGOMERY Paul**

**Pr. SERIO Bruno**

Directeur de recherche, CNRS, ICube (Strasbourg)

Professeur des Universités, Université Paris Ouest, LEME (Paris)

RAPPORTEURS :

**Dr. GORECKI Christophe**

**Pr. PICART Pascal**

Directeur de recherche, CNRS, FEMTO-ST (Besançon)

Professeur des Universités, LAUM (Le Mans)

---

AUTRES MEMBRES DU JURY :

**Pr. HAEBERLE Olivier**

**Dr. TWARDOWSKI Patrice**

Professeur des Universités, MIPS (Mulhouse)

Maître de conférence, Télécom Physique Strasbourg, ICube (Strasbourg)



*A mes parents...*



---

# Remerciements

---

Ces trois années de recherche n'auraient pas pu se réaliser sans l'aide ni le soutien de nombreuses personnes qui m'ont encouragée de près ou de loin, que ce soit par leurs conseils ou simplement par leur présence ou leur bonne humeur.

En premier lieu, je tiens à exprimer ma gratitude à mon directeur de thèse, **Paul Montgomery**, pour avoir encadré mon travail de recherche. Je le remercie également pour tous les conseils qu'il m'a donnés, pour sa grande disponibilité ainsi que pour toutes les heures qu'il a consacrées à la relecture et à la correction de mes articles. J'ai beaucoup apprécié l'enthousiasme qu'il exprimait à chacune de mes idées et à chacun de mes résultats.

Je souhaiterais évidemment remercier mon co-directeur de thèse, **Bruno Serio**, pour m'avoir encouragée et donné l'envie de réaliser une thèse sur la microscopie super-résolue à travers ses cours et après son encadrement lors de mon stage de fin d'étude. Je lui suis également reconnaissante pour sa disponibilité malgré la distance entre nos lieux de travail à chaque fois que j'ai sollicité son aide, ainsi que pour ses encouragements, son enthousiasme et son optimisme lors de mes premières communications internationales aux conférences SPIE Bruxelles et Munich.

Mes remerciements vont également à mon co-encadrant, **Patrice Twardowski**, pour sa disponibilité, pour l'ambiance de travail très agréable et sa très grande ouverture d'esprit.

Il va de soi que sans la très bonne ambiance présente dans **l'équipe IPP**, ce travail de thèse ne se serait pas déroulée de façon aussi plaisante. C'est pour cela que j'adresse mes remerciements à tous les membres de l'équipe. Je remercie plus particulièrement **Camille Hairaye, Marion Gstalter, Julien Zelgowski, Rémy Claveau** et **Stéphane Perrin** pour tout le temps que nous avons passé à discuter, pour les repas du midi et pour leurs conseils avisés. Je suis également reconnaissante envers **Sylvain Lecler, Pierre Pfeiffer, Yoshitake Takakura, Manuel Flury** et **Wilfried Uhring** pour leurs nombreux conseils, leur ouverture d'esprit ainsi que pour l'intérêt qu'ils ont manifestée pour mon travail de recherche à chaque fois que j'ai sollicité leur aide.

J'exprime ma gratitude à tous les amis qui m'ont soutenue de manière concrète et également implicitement de par leur présence. Je suis plus particulièrement reconnaissante envers mes parents, ma sœur et mon frère, ainsi qu'envers **la famille Dufay et Rebholtz**, qui m'ont apportée tout leur soutien moral et affectif durant ces trois années.

Enfin, je remercie vivement **Térence Dufay** pour ses nombreux conseils, son soutien affectif, sa présence et notamment pour sa patience lors de mes moments de stress.



---

## Résumé en anglais

---

With the 2014 Nobel Prize for chemistry, far field fluorescent optical nanoscopy has been brought to the forefront with stimulated emission depletion microscopy (STED) and single molecule microscopy being able to reveal intra-cellular details of tens of nm. While fluorescent techniques and other labelling methods such as those using gold nanoparticles allow the imaging of specific proteins and certain structures, they are generally very invasive for living samples. There now exists a growing number of unlabelled optical nanoscopy techniques, several techniques and principles having already been developed in materials science at the beginning of the 1990's. Unlabelled superresolution and nanodetection techniques stand out in particular amongst optical nanoscopy techniques since they provide respectively real improved resolving power and unresolved nanostructure detection power without the use of invasive markers. In order to be able to better apprehend the many different optical nanoscopy techniques that exist, we recently introduced a classification scheme and underlined the difference between superresolution techniques and those using nanodetection. Nanodetection techniques can be classified into four sub-categories that make use of the contrast, phase, deconvolution or nanomarkers to achieve nanodetection. High sensitivity phase measurement using interference microscopy demonstrates how nanostructured surfaces and structures can be characterized in biomaterials, laser textured stainless steel and  $\mu\text{m}$  defects within thin Mylar polymer films. There are a growing number of far field optical nanoscopy techniques that do not require labelling but that are capable of resolving nanostructures below 100 nm in size or providing useful information of nanostructures down to nm and sub-nm measurement sensitivity.

Among them, interference microscopy is a well-established non-invasive imaging technique for three-dimensional imaging. There are two main ways of using interference microscopy to measure samples according to whether observations are performed on the surface or inside a layer. First, coherence scanning interferometry (CSI) provides rapid, contactless measurements of surface roughness using the single fringe envelope associated with the surface. Second, full-field optical coherence tomography (FF-OCT) is another associated technique that can be used to measure the thickness and internal structures of transparent layers by detection of multiple fringe envelope signals. However, some sample characteristics such as the transparency or the high surface roughness can make structural analysis a challenge for any technique. Basic post processing methods, such as image averaging, and dark and flat corrections, can be used to improve the quality of the fringe images by increasing the signal to noise ratio. Likewise, the image contrast can be enhanced by combining images with different exposures.

In this research project, I have developed a protocol “IMage Processing Optimization for fringe Visibility Enhancement (IMPROVE)-Protocol” using an optimized combination of image processing techniques and a new hybrid high dynamic range (HDR) technique to enable normally unmeasured features to be observed. The result is an enhancement of the signal-to-noise ratio (SNR) in images, resulting in an improvement in the lateral resolution of the system and the increase of its power of detection, enabling new sub-diffraction sized structures to be detected.

The final part of my work has involved in the development of an exciting new super-resolution technique using glass microspheres under a classical microscope to be able to observe structures of a size that is inferior to the diffraction limited resolution of the system. By adding interference fringes through the microspheres, the 3D reconstruction of the nano-object is possible, resulting in an optical far field "nano-3D" system and representing an entirely new high resolution 3D microscopy technique.



---

# Table des matières

---

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>V</b>
<b>RÉSUMÉ EN ANGLAIS .....</b>	<b>VII</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>XVII</b>
<b>LISTE DES EQUATIONS .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>LISTE DES ABBREVIATIONS ET DES ACRONYMES.....</b>	<b>XIX</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<b>CHAPITRE 1. ETAT DE L'ART SUR LA MICROSCOPIE OPTIQUE ET INTRODUCTION A UN NOUVEAU DOMAINE : LA NANOSCOPIE OPTIQUE .....</b>	<b>5</b>
<hr/>	
<b>1.1 FONDAMENTAUX EN MICROSCOPIE OPTIQUE ET HISTORIQUE DU DOMAINE .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 RESOLUTION ULTIME DU MICROSCOPE OPTIQUE.....</b>	<b>11</b>
1.2.1 Résolution latérale en microscopie .....	11
1.2.2 Résolution axiale en microscopie.....	15
1.2.3 Résolution en 3D.....	16
<b>1.3 ETUDE COMPARATIVE DES MICROSCOPIES OPTIQUE ET CHAMP PROCHE.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4 TECHNIQUES CLASSIQUES POUR SE RAPPROCHER DE LA RESOLUTION ULTIME EN MICROSCOPIE OPTIQUE.....</b>	<b>21</b>
1.4.1 Réduction de la longueur d'onde.....	21
1.4.2 Augmentation de l'ouverture numérique de l'objectif .....	22
1.4.3 Augmentation de l'ouverture numérique par l'utilisation d'objectifs à immersion .....	23
1.4.4 Limitations des techniques actuelles dues au bruit et théorème de Nyquist-Shannon ....	23
<b>1.5 INTRODUCTION AU DOMAINE DE LA NANOSCOPIE OPTIQUE.....</b>	<b>24</b>
1.5.1 Emergence d'une nouvelle notion : la nanoscopie optique .....	24
1.5.2 Nanoscopie en champ proche.....	24
1.5.3 Nanoscopie en champ lointain .....	25

---

<b>1.6</b>	<b>METHODES DE RECONSTRUCTION 3D EN MICROSCOPIE INTERFEROMETRIQUE PAR ANALYSE DE FRANGES D'INTERFERENCE .....</b>	<b>42</b>
1.6.1	Principe du décalage de phase .....	42
1.6.2	Principe de détection de l'enveloppe des franges.....	44
<b>1.7</b>	<b>CONCLUSION SUR L'ETAT DE L'ART EN NANOSCOPIE .....</b>	<b>48</b>

---

<b>CHAPITRE 2. ÉTUDE DES MÉTHODES DE RECONSTRUCTION 3D PAR ANALYSE DE FRANGES PROJÉTÉES ET DÉVELOPPEMENT D'UN PROFILOMÈTRE MINIATURISÉ BASÉ SUR UN PROJECTEUR PICO-DLP .....</b>	<b>51</b>
--	-----------

---

<b>2.1</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>54</b>
<b>2.2</b>	<b>PRINCIPE DU DECALAGE DE PHASE .....</b>	<b>54</b>
2.2.1	Détermination de la phase relative par décalage de phase .....	54
2.2.2	Détermination de la phase absolue : déroulement de la phase .....	55
<b>2.3</b>	<b>AMELIORATION DES IMAGES POUR LA RECONSTRUCTION 3D.....</b>	<b>60</b>
2.3.1	Correction gamma .....	60
2.3.2	Traitement d'images pour optimiser le rapport signal à bruit .....	60
<b>2.4</b>	<b>SIMULATIONS : INFLUENCE DU BRUIT SUR LES IMAGES .....</b>	<b>61</b>
<b>2.5</b>	<b>RESULTATS EXPERIMENTAUX .....</b>	<b>65</b>
<b>2.6</b>	<b>COMPARAISONS DES METHODES DE DEROULEMENT DE LA PHASE .....</b>	<b>67</b>
<b>2.7</b>	<b>CONCLUSION DU CHAPITRE.....</b>	<b>68</b>

---

<b>CHAPITRE 3. METHODES ET ALGORITHMES DE TRAITEMENT D'IMAGES POUR AMELIORER LE POUVOIR DE DETECTION ET LA RESOLUTION LATERALE EN MICROSCOPIE INTERFEROMETRIQUE .....</b>	<b>69</b>
---	-----------

---

<b>3.1</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>72</b>
<b>3.2</b>	<b>TYPES DE CAPTEURS PHOTOGRAPHIQUES.....</b>	<b>75</b>
3.2.1	Capteurs CCD.....	75
3.2.2	Capteurs CMOS.....	75
<b>3.3</b>	<b>PRINCIPES DU TRAITEMENT D'IMAGES.....</b>	<b>78</b>
3.3.1	Transformations LUT .....	78
3.3.2	Moyennage d'images.....	79
3.3.3	Corrections du FPN .....	81
3.3.4	Technique HDR.....	83
3.3.5	Combinaison des techniques : IMPROVE-Protocol.....	87
<b>3.4</b>	<b>MONTAGE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>88</b>
3.4.1	Le système .....	88
3.4.2	Implémentation du logiciel.....	89
3.4.3	Temps de traitement .....	90

<b>3.5</b>	<b>RESULTATS SUR DES MICROBILLES DE 4 <math>\mu</math>M DE DIAMETRES DANS DU SU-8.....</b>	<b>90</b>
<b>3.6</b>	<b>RESULTATS SUR DES ECHANTILLONS D'HYDROXYAPATITE .....</b>	<b>93</b>
<b>3.7</b>	<b>CONCLUSION DU CHAPITRE.....</b>	<b>97</b>
<hr/>		
<b>CHAPITRE 4. NANOSCOPIE INTERFEROMETRIQUE PAR JET PHOTONIQUE .99</b>		
<hr/>		
<b>4.1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>102</b>
<b>4.2</b>	<b>DE LA NANOSCOPIE 2D A LA NANOSCOPIE INTERFEROMETRIQUE 3D PAR JET PHOTONIQUE .....</b>	<b>102</b>
4.2.1	Nanoscopie 2D à travers des microsphères .....	102
4.2.2	Nanoscopie holographique à travers des microsphères.....	106
4.2.3	Nanoscopie interférométrique 3D avec des objectifs Linnik .....	107
4.2.4	Nanoscopie interférométrique 3D à objectif Mirau par jet photonique .....	108
<b>4.3</b>	<b>MICROSCOPE NANO-3D INTERFEROMETRIQUE DEVELOPPE A IPP.....</b>	<b>110</b>
<b>4.4</b>	<b>PREMIERS RESULTATS NANO-3D .....</b>	<b>111</b>
4.4.1	L'échantillon utilisé : un prototype d'étalon de résolution .....	111
4.4.2	Résultats en lumière blanche.....	113
<b>4.5</b>	<b>MESURES SUR UN RESEAU DE HfO<sub>2</sub> DE 580 NM .....</b>	<b>117</b>
4.5.1	L'échantillon utilisé : réseau métal-diélectrique .....	117
4.5.2	Mesures directes (sans microsphères) par microscopies interférométriques.....	117
4.5.3	Mesure par interférométrie nano-3D.....	118
<b>4.6</b>	<b>MESURES SUR L'ETALON CALIBRE .....</b>	<b>119</b>
4.6.1	Etalon calibré par le PTB .....	119
4.6.2	Mesures directes par microscopies interférométriques et par AFM.....	119
4.6.3	Mesure par interférométrie nano-3D.....	120
<b>4.7</b>	<b>CONCLUSION DU CHAPITRE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>122</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>125</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>		<b>129</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>141</b>
<b>CURRICULUM VITAE DETAILLE.....</b>		<b>XXI</b>
<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS .....</b>		<b>XXV</b>



## Liste des figures

Figure 1-1. Composition d'un microscope (modèle Leica DMR-X à IPP). .....	8
Figure 1-2. Modèle simplifié d'un microscope. ....	9
Figure 1-3. Schéma des dimensions angulaires d'un objet sans et à travers un objectif.....	9
Figure 1-4. Dates marquantes jusqu'à l'invention du microscope optique. ....	10
Figure 1-5. Les microscopes de Robert Hooke et Antoni Van Leeuwenhoek. ....	10
Figure 1-6. Critère de résolution à deux points : observation des PSF de deux sources ponctuelles. ....	12
Figure 1-7. Exemple d'une PSF et de la largeur à mi-hauteur. ....	13
Figure 1-8. FTM théorique pour un système optique imageur cohérent ou incohérent .....	15
Figure 1-9. Schéma de la FWHM de la PSF pour la résolution latérale et la résolution axiale. ....	16
Figure 1-10. Image 3D et profil de deux rainures parallèles de 200 nm de largeur .....	17
Figure 1-11. Profils d'un réseau carré en silicium (SiMetrics RS-N) de 300 nm de période et de hauteur 140 nm .....	18
Figure 1-12. Représentation des domaines d'application des différentes techniques de microscopie en fonction de leur résolution latérale. ....	19
Figure 1-13. Schéma de fonctionnement d'un AFM.....	21
Figure 1-14. Réponse théorique d'un bord pour ON=0,15, ON=0,45 et ON=0,95. ....	22
Figure 1-15. Effets sur les rayons en fonction de l'indice de réfraction. ....	23
Figure 1-16. Evolution de la résolution optique au cours du temps.....	24
Figure 1-17. Schéma de classification pour les techniques de super-résolution et de nano-détection.....	26
Figure 1-18. Graphique des techniques de super-résolution et de nano-détection en fonction de la résolution latérale réelle et de la taille du plus petit objet pouvant être détecté. ....	27
Figure 1-19. Schéma de la microscopie confocale à balayage.....	28
Figure 1-20. Schéma de la microscopie sous illumination structurée.....	28
Figure 1-21. Schéma de la microscopie à déplétion par émission stimulée.....	29
Figure 1-22. Image d'un <i>E. coli</i> avec la technique STED.....	29
Figure 1-23. Schéma de la microscopie de localisation par photoactivation. ....	30
Figure 1-24. Image d'une membrane de lysosome avec la technique PALM. ....	30
Figure 1-25. Image des filaments d'actine individuels dans une cellule COS-7 (marquée avec des fluorophores Alexa 647-phalloïdine) avec un microscope STORM 3D à double objectif .....	30
Figure 1-26. Reconstruction 3D avec un microscope interférométrique. ....	31
Figure 1-27. Schéma de la microscopie tomographique numérique .....	32
Figure 1-28. Reconstruction par TDM.....	33
Figure 1-29. Schéma de la microscopie SL. ....	34
Figure 1-30. Images d'un tissu de l'intestin d'un rat.....	34
Figure 1-31. Schéma de la technique de microscopie utilisant une microsphère comme lentille.....	35

Figure 1-32. Résultats de la technique SMON dans l'eau avec des microsphères de BaTiO <sub>3</sub> de 100 µm de diamètre. ....	36
Figure 1-33. Schéma de la technique TSOM. ....	37
Figure 1-34. Mesure d'un composant microélectronique nanométrique en utilisant la technique TSOM. ....	37
Figure 1-35. Schéma de la technique SEEC.....	38
Figure 1-36. Observation de traces laissées par des bactéries en mouvement .....	39
Figure 1-37. Différentes configuration d'un microscope interférométrique. ....	40
Figure 1-38. Mesures de rugosités de nano surfaces avec la technique CSI. ....	41
Figure 1-39. Caractérisation de surfaces 3D nanométriques avec la technique FF-OCT. ....	42
Figure 1-40. Méthode de détection du pic de la frange d'interférence par la PFSM .....	44
Figure 1-41. Méthode de détection du pic de la frange d'interférence par la FSA .....	46
Figure 1-42. Schéma de la construction d'interférogrammes sur une couche transparente à l'aide des signaux de franges avec un système FF-OCT.....	47
Figure 1-43. Etapes de la technique CPM. ....	47
Figure 2-1. Schéma de la technique SIM dans son premier mode. ....	56
Figure 2-2. Motifs de franges sinusoïdales pour la technique à 3 sauts avec un décalage de $2\pi/3$ .....	56
Figure 2-3. Motifs en escalier pour la technique de déroulement de phase à 3 sauts (décalage de $2\pi/3$ ). ....	57
Figure 2-4. Profils des différentes phases pour la méthode de Wang et al.....	58
Figure 2-5. Stair intensity pour P=50 px et largeur d'image = 300 px. ....	59
Figure 2-6. Profils des phases pour la méthode <i>Stair Intensity</i> . ....	59
Figure 2-7. Comparaison des franges sans et avec correction gamma. ....	60
Figure 2-8. Simulation de la reconstruction 3D d'un bloc. ....	62
Figure 2-9. Histogramme du bruit de notre système. ....	62
Figure 2-10. Sensibilité au bruit (de moyenne 0 et de variance 0,001) pour la méthode de Wang et al.....	63
Figure 2-11. Sensibilité au bruit (de moyenne 0 et de variance 0,001) pour la méthode « Stair intensity ».....	63
Figure 2-12. Comparaison de la sensibilité au bruit (de moyenne 0 et de variance 0,001) pour les deux méthodes. ....	64
Figure 2-13. Photo du système SIM développé.....	65
Figure 2-14 : Reconstruction macroscopique avec la méthode à 3 et 5 sauts avec la correction gamma 2,2. ....	65
Figure 2-15. Schéma de l'implémentation de la technique .....	66
Figure 2-16. Reconstruction 3D par projection de franges par la méthode de Wang et al. ....	66
Figure 2-17. Reconstruction 3D par projection de franges par la méthode <i>Stair intensity</i> . ....	66
Figure 2-18. Comparaison des profils avec les différentes méthodes. ....	67
Figure 3-1. Schéma de fonctionnement d'une caméra CCD.....	75
Figure 3-2. Schéma de fonctionnement d'une caméra CMOS.....	76
Figure 3-3. Images des deux caméras utilisées dans ce chapitre.....	76
Figure 3-4. Histogrammes d'une image <i>flat</i> prise avec chaque caméra. ....	77

Figure 3-5. Histogrammes d'une image résultante de la différence entre deux images <i>flat</i> , prises consécutivement, avec le même temps d'exposition avec les deux caméras.....	77
Figure 3-6. Les fonctions de transfert après transformations LUT. ....	78
Figure 3-7. Images XZ d'un film de polymère de Mylar après une transformation LUT .....	79
Figure 3-8. SNR à un pixel donné pour 10 images moyennées N fois avec une caméra CCD. ....	80
Figure 3-9. Amélioration de la capacité de détection du système avec d'image XZ en fausse couleur d'un film de polymère de Mylar de 6 $\mu\text{m}$ d'épaisseur .....	80
Figure 3-10. Histogrammes d'une image uniforme pour les 4 méthodes. ....	82
Figure 3-11. Réduction d'un artefact due à une particule de poussière après corrections <i>Dark</i> et <i>Flat</i> sur un échantillon de Mylar de 3 $\mu\text{m}$ d'épaisseur.....	83
Figure 3-12. Amélioration de la résolution latérale. ....	83
Figure 3-13. Illustration de la technique HDR en photographie .....	84
Figure 3-14. Principe de la technique HDR. ....	85
Figure 3-15. Réponse du système {Basler-Mylar} et calibration des coefficients de pondération pour la technique HDR. ....	85
Figure 3-16. Détection d'une structure dans une image XZ HDR. ....	86
Figure 3-17. Amélioration de la résolution latérale. ....	86
Figure 3-18. Détection d'exo-planètes après application de la technique LOCI .....	87
Figure 3-19. Représentation schématique du système FF-OCT utilisé.....	89
Figure 3-20. Etapes pour l'acquisition, le traitement et l'analyse des signaux de franges. ....	89
Figure 3-21. Programme Labview pour générer des images HDR. ....	90
Figure 3-22. Représentation schématique de l'échantillon SU8-Microsphères.....	91
Figure 3-23. Calibration du système: la réponse de l'intensité de la caméra CCD (Basler) en fonction du temps d'exposition.....	91
Figure 3-24. Evolution des améliorations après corrections par IMPROVE-Protocol. ....	92
Figure 3-25. Images d'une couche d'HA par MEB confirmant la présence d'une couche hétérogène sur la surface .....	93
Figure 3-26. Mesure d'une surface d'HA par AFM.....	94
Figure 3-27. Mesure d'une surface d'HA par FF-OCT .....	94
Figure 3-28. Modèle d'une couche d'HA. ....	94
Figure 3-29. Calibration du système: la réponse de l'intensité de la caméra CMOS (Photonfocus) en fonction du temps d'exposition. ....	95
Figure 3-30. Image 3D image d'une couche d'HA .....	96
Figure 3-31. Evolution des signaux de franges et des mesures de hauteur sur un profil après l'application de la technique « IMPROVE-Protocol ». ....	96
Figure 3-32. Evolution et amélioration des franges brutes sur les images XZ et des images tomographiques après l'application de la technique « IMPROVE-Protocol ». ....	97
Figure 4-1. Membrane d'oxydes anodiques d'aluminium (AAO).....	103
Figure 4-2. Imagerie à travers une microsphère en réflexion. ....	103
Figure 4-3. Etude des lentilles thermiquement remodelées. ....	104
Figure 4-4. Schéma du système de contrôle de la microsphère par une micropipette de verre. ....	105
Figure 4-5. Image d'un réseau en polymère à travers une microbille.....	105
Figure 4-6. Image de carrés d'or à travers une microbille.....	105

Figure 4-7. Schéma de la technique de microscopie holographique basée sur l'utilisation d'une microsphère .....	106
Figure 4-8. Résultats expérimentaux sur le réseau de 1,2 $\mu\text{m}$ de période. ....	106
Figure 4-9. Super-résolution 3D par NFWLI. ....	107
Figure 4-10. Détermination de la position du plan de l'image virtuelle (ligne en pointillée) par simulations 2D par éléments finis (FEM) .....	109
Figure 4-11. Reconstruction 3D de structures d'un disque Blu-Ray à travers une microsphère de 11 $\mu\text{m}$ et un microscope interférométrique de type Mirau.....	109
Figure 4-12. Schéma du microscope interférométrique nano-3D. ....	110
Figure 4-13. Placement grossier des microsphères sous l'objectif du microscope optique classique Zeiss.....	111
Figure 4-14. Standard de résolution de type RS-N (de SiMETRICS GmbH).....	112
Figure 4-15. Disposition des microsphères de 24 $\mu\text{m}$ de diamètre sur les différents réseaux.....	112
Figure 4-16. Réseaux observés avec le microscope optique classique Zeiss .....	113
Figure 4-17. Réseaux de périodes (a-b) 1,2 $\mu\text{m}$ et (c-d) 0,6 $\mu\text{m}$ observés à travers une microsphère de 24 $\mu\text{m}$ de diamètre dans l'air en lumière blanche avec le Leitz-Linnik.....	113
Figure 4-18. Réseau de période 1,2 $\mu\text{m}$ mesuré avec le microscope Leitz-Linnik en lumière blanche .....	114
Figure 4-19. Réseau de période 0,6 $\mu\text{m}$ mesuré avec différentes techniques.....	115
Figure 4-20. Détermination des propriétés de l'image à travers une microsphère de 24 $\mu\text{m}$ de diamètre éclairée par une onde plane à $\lambda = 500 \text{ nm}$ (du haut vers le bas de la figure) en utilisant une simulation 2D FEM.....	116
Figure 4-21. Schéma en vue de face du réseau multi-couches. ....	117
Figure 4-22. Réseau métal-diélectrique de période 580 nm.....	117
Figure 4-23. Réseau métal-diélectrique de 580 nm de période observé à travers une microsphère de 24 $\mu\text{m}$ de diamètre dans l'air en lumière blanche avec le Leitz-Linnik.....	118
Figure 4-24. Réseau métal-diélectrique de 580 nm de période mesuré avec le microscope Leitz-Linnik en lumière blanche .....	118
Figure 4-25. Schéma de l'étalon calibré.....	119
Figure 4-26. Etalon de résolution calibré par le PTB mesuré avec un AFM .....	120
Figure 4-27. Champ de 600 nm de période nominale de l'étalon de résolution calibré par le PTB.....	120
Figure 4-28. Réseau de périodes 3 $\mu\text{m}$ observé à travers une microsphère de 24 $\mu\text{m}$ de diamètre dans l'air en lumière blanche avec le Leitz-Linnik .....	121
Figure 4-29. Réseau de période 0,8 $\mu\text{m}$ mesuré avec le Leitz-Linnik en lumière blanche avec des objectifs x50 (ON = 0,85).....	121
Figure 4-30. Réseau de période 0,6 $\mu\text{m}$ mesuré avec le Leitz-Linnik en lumière blanche avec des objectifs x50 (ON = 0,85) avec une microsphère de 23 $\mu\text{m}$ . ....	122



## Liste des tableaux

Tableau 1-1. Définition de la résolution théorique d'un système optique en fonction du critère et de la cohérence de l'illumination. ....	12
Tableau 1-2. Tableau des abréviations des techniques de nanoscopie optique. ....	26
Tableau 1-3. Equation de la phase relative correspondant à la technique de décalage à 3, 4 et 5 sauts. ....	43
Tableau 1-4. Facteurs de visibilité associés à la technique de décalage de phase à 3, 4 et sauts. ....	43
Tableau 2-1. Valeur RMS des mesures de surface selon l'écart-type du bruit pour les deux méthodes. ....	62
Tableau 3-1. Résumé des principales caractéristiques des deux caméras. ....	76
Tableau 3-2. Caractéristiques de l'image <i>flat</i> et des histogrammes de la figure 2. ....	77
Tableau 3-3. Équations et échelles de couleurs associés aux transformations LUT. ....	78
Tableau 3-4. Largeurs à mi-hauteur pour les histogrammes obtenus avec les 4 méthodes. ....	82
Tableau 3-5. Coefficients $w_i$ correspondant à chaque temps d'exposition. ....	86
Tableau 3-6. Coefficients correspondant à chaque temps d'exposition pour le système Basler-SU8-Microsphères. ....	91
Tableau 3-7. Valeurs SNR d'un profil sur des image XY SDR et HDR avec des corrections <i>Dark</i> et <i>Flat</i> . ....	92
Tableau 3-8. Coefficients correspondant à chaque temps d'exposition pour le système Photonfocus-couches d'HA. ....	95
Tableau 4-1. Hauteurs nominales et mesurées par l'AFM, le Zygo et le Leitz-Linnik en lumière blanche. ....	115
Tableau 4-2. Caractéristiques des champs de l'étalon de résolution calibré par le PTB. ....	119

## Liste des équations

Eq. (1-1) .....	8	Eq. (2-8) .....	57
Eq. (1-2) .....	8	Eq. (2-9) .....	57
Eq. (1-3) .....	9	Eq. (2-10) .....	58
Eq. (1-4) .....	11	Eq. (2-11) .....	58
Eq. (1-5) .....	14	Eq. (2-12) .....	59
Eq. (1-6) .....	14	Eq. (2-13) .....	59
Eq. (1-7) .....	15	Eq. (2-14) .....	59
Eq. (1-8) .....	16	Eq. (2-15) .....	59
Eq. (1-9) .....	17	Eq. (2-16) .....	59
Eq. (1-10) .....	17	Eq. (2-17) .....	59
Eq. (1-11) .....	22	Eq. (2-18) .....	59
Eq. (1-12) .....	22	Eq. (2-19) .....	60
Eq. (1-13) .....	23	Eq. (2-20) .....	60
Eq. (1-14) .....	23	Eq. (2-21) .....	61
Eq. (1-15) .....	42	Eq. (2-22) .....	61
Eq. (1-16) .....	43		
Eq. (1-17) .....	43	Eq. (3-1) .....	76
Eq. (1-18) .....	44	Eq. (3-2) .....	77
Eq. (1-19) .....	45	Eq. (3-3) .....	79
Eq. (1-20) .....	45	Eq. (3-4) .....	79
Eq. (1-21) .....	45	Eq. (3-5) .....	81
Eq. (1-22) .....	45	Eq. (3-6) .....	81
Eq. (1-23) .....	46	Eq. (3-7) .....	82
		Eq. (3-8) .....	82
Eq. (2-1) .....	54	Eq. (3-9) .....	84
Eq. (2-2) .....	54	Eq. (3-10) .....	86
Eq. (2-3) .....	54	Eq. (3-11) .....	88
Eq. (2-4) .....	56	Eq. (3-12) .....	91
Eq. (2-5) .....	57	Eq. (3-13) .....	95
Eq. (2-6) .....	57		
Eq. (2-7) .....	57		

## Liste des abréviations et des acronymes

### **A**

AFM: Atomic Force Microscopy, 20, 21, 93, 94, 95, 107, 108, 110, 111, 114, 115, 117, 119, 120, 122

### **B**

BAS: Bulgarian Academy of Sciences, 93

### **C**

CAO: Computer Aided Design, 54

CCD: Charge-Coupled Device, 8, 23, 62, 74, 75, 76, 77, 86, 88, 91

CMOS: Complementary Metal-Oxide-Semiconductor, 75, 76, 77, 88, 90, 95, 108, 110

CPM: Coherence Probe Microscopy, 2, 40, 47, 49

CSI: Coherence Scanning Interferometry, v, 40, 45, 68, 102

### **D**

DHM: Digital Holographic Microscopy, 32

DLP: Digital Light Projector, 51, 56, 58, 60, 68

### **F**

FEM: Finite Element Method, 108, 109, 116

FF-OCT: Full-Field Optical Coherence Tomography, v, 41, 42, 69, 72, 74, 80, 84, 87, 88, 94, 95, 97

FFT: Fast Fourier Transform, 40, 44, 45

FPGA: Field-Programmable Gate Array, 67, 98, 126

FPN: Fixed Pattern Noise, 72, 81

FSA: Five-Sample-Adaptive non linear algorithm, 2, 40, 41, 44, 46, 49

FSL: Far field SuperLens, 31

FTM: Fonction de Transfert de Modulation, 14, 15

FTO: Fonction de Transfert Optique, 14, 18

FWHM: Full Width at Half Maximum, 13, 14, 16, 82

### **H**

HA: Hydroxyapatite, 93, 94, 95, 96, 98

HDR: High Dynamic Range, vi, 3, 73, 74, 83, 84, 86, 88, 90, 91, 92, 93, 95, 96, 97, 98, 126

### **I**

IMPROVE: IMage Processing Optimization for fringe Visibility Enhancement, vi, 2, 3, 69, 74, 87, 88, 90, 91, 95, 96, 97, 98, 126

IPP: Instrumentation et Procédés Photoniques, iii, 1, 3, 21, 41, 47, 95, 102, 108, 110, 123, 127

IR: Infra-Rouge, 75

ITF: Instrument Transfer Function, 18

### **L**

LEME: Laboratoire Energétique Mécanique Electromagnétisme, 1

LSCM: Laser Scanning Confocal Microscopy, 28

LST: Laser Scanning Tomography, 32

LUT: Look-Up Table, 78, 79, 90

### **M**

MaCEPV: Matériaux pour Composants Électroniques et Photovoltaïques, 1

MEB: Microscopie Electronique à Balayage, 20, 36, 93, 94, 104, 105, 107, 108, 109

MTF: Modulation Transfer Function, 14

### **N**

NFWLI: Near-Field Assisted White-Light Interferometry, 107, 108

**O**

OTF: Optical Transfer Function, 14

**P**

PALM: Photo-Activated Localization  
Microscopy, 27, 29, 30

PFSM: Peak Fringe Scanning Microscopy,  
2, 40, 41, 44, 45, 46, 49

PML: Perfectly Matched Layer, 108

PNL: Photonic nano-jet lens, 99

PRNU: Photo Response Non Uniformity,  
72, 81

PSF: Point Spread Function, 11, 13, 14, 15,  
16, 17, 22, 28, 30, 32

PSM: Phase-shifting Microscopy, 2, 3, 32,  
40, 49, 102, 111, 122, 127

**R**

RMS: Root Mean Square, 58, 61, 64, 81

**S**

S.I.: Stair Intensity, 58, 61

SEEC: Surface Enhanced Ellipsometric  
Contrast, 26, 38, 39, 125

SIM: Structured illumination Microscopy,  
2, 28, 55, 56, 64, 68, 125, 126

SL: Scattering Lens, 25, 31

SMON: Submerged Microsphere Optical  
Nanoscopy, 26, 35, 36, 48, 125

SNOM: Scanning Near-field Optical  
Microscope, 20, 24, 25

SNR: Signal-to-Noise Ratio, vi, 3, 42, 49,  
61, 69, 74, 79, 80, 84, 87, 88, 91, 95, 97,  
98, 126

STED: STimulated Emission Depletion, v,  
27, 29

STM: Scanning Tunneling Microscope, 20

STORM: STochastic Optical  
Reconstruction Microscopy, 27, 30

**T**

TDM: Tomographic Digital Microscopy,  
25, 31, 32, 33, 125

TSOM: Through-focus Scanning Optical  
Microscopy, 27, 31, 36, 37, 38

**U**

UV: Ultra-Violet, 20, 21, 22, 75

**W**

WLSI: White Light Scanning  
Interferometry, 40, 41

---

# Introduction générale

---

*Equipped with his five senses, man explores the universe around  
him and calls the adventure science.*  
- *Edwin P. Hubble, 1929.*

Cette thèse sur la super-résolution en microscopie interférométrique, dirigée par Paul Montgomery, de l'équipe Instrumentation et Procédés Photoniques (IPP) du laboratoire ICube, et codirigée par Bruno Serio du laboratoire LEME (« Laboratoire Energétique Mécanique Electromagnétisme ») à Paris, m'a été proposée à la suite de mon stage de fin d'étude portant sur l'étude et le développement d'un système de reconstruction tridimensionnelle de surface par microscopie sous illumination structurée, dirigé par Bruno Serio. Ce stage consistait à réaliser un prototype de système optique capable de reconstruire un objet microscopique en trois dimensions par projection de franges et par la méthode de décalage de phase. Mon projet de recherche se trouve dans la continuité de ce stage et fait partie du thème « Micro et nano photonique instrumentale », un des quatre thèmes de l'équipe IPP, avec des applications en matériaux pour la microélectronique, en collaboration avec l'équipe MaCEPV (Matériaux pour Composants Électroniques et Photovoltaïques) d'ICube, et dans l'avenir, en imagerie biomédicale (thème « Instrumentation photonique pour la santé »). Le groupe de Paul Montgomery a une très grande expérience dans le domaine de la microscopie optique, ayant développé de nombreux systèmes de microscopies 3D et 4D et utilisant divers algorithmes de reconstruction de surfaces sur LabView. Mon sujet de thèse consiste à étudier les techniques de super-résolution pour améliorer la résolution latérale en nanoscopie et de développer un système interférométrique nano-3D, ainsi qu'à améliorer les instruments optiques microscopiques disponibles au laboratoire.

Pendant longtemps, la limite de résolution d'un microscope optique était limitée à 400 nm dans le visible à cause des effets de la diffraction de la lumière. Mais à partir des années 1990 des techniques dites de super-résolution, capables de dépasser cette limite, sont apparues. En 2014, le Prix Nobel de Chimie a été décerné à Eric Betzig, Stefan W. Hell et William Moerner pour leurs travaux, donnant une nouvelle dimension à la microscopie optique en utilisant des molécules fluorescentes. Il est maintenant possible d'atteindre une résolution latérale inférieure à 30 nm et théoriquement d'aller encore plus loin. En conséquence, la microscopie haute résolution est devenue nanoscopie. La nanoscopie optique en champ lointain est une des nouvelles techniques

d'imagerie haute résolution, aujourd'hui largement utilisée en biophysique et en imagerie médicale, pour imager et caractériser des nanostructures, tout en conservant tous les avantages de l'imagerie optique en champ lointain comme un vaste champ, la visualisation et l'analyse en temps réel, ainsi que la possibilité d'évolution vers une plus grande précision.

Ce mémoire de thèse est composé de quatre grands chapitres.

Le premier chapitre fait état de l'art des techniques de microscopie liées à ce projet, et discute également des définitions de la résolution latérale et axiale en 2D et en 3D. De plus, une distinction est présentée entre les différentes techniques de nanoscopie optique en champ lointain : les techniques de super-résolution et les techniques de nano-détection. Les techniques de super-résolution permettent une réelle amélioration de la résolution latérale et peuvent être capables de fournir des détails à plus haute résolution. Concernant les techniques de nano-détection, bien que limitées par la diffraction, elles peuvent dans de nombreux cas faire apparaître des nanostructures pour les rendre observables voire caractérisables, sans nécessairement pouvoir résoudre tous les détails. La microscopie interférométrique fait partie des techniques de nano-détection et utilise la phase pour extraire les informations nanométriques 3D de surfaces dans la direction Z. Cette technique peut être utilisée pour l'analyse de surface ou encore en tomographie optique, pour obtenir des tranches et des volumes de couches transparentes ou semi-transparentes sans marquage. En outre dans ce chapitre, quelques algorithmes de reconstruction 3D avec un microscope interférométrique seront présentés : l'algorithme de décalage de phase (« Phase-shifting Microscopy » PSM) des franges d'interférence ou encore les méthodes basées sur le principe de détection de l'enveloppe des franges d'interférence. Parmi les algorithmes analysant cette enveloppe et permettant de reconstruire les surfaces en 3D, plusieurs seront considérés dans ces travaux : CPM (« Coherence Probe Microscopy »), PFSM (« Peak Fringe Scanning Microscopy »), FSA (« Five-Sample-Adaptive non linear algorithm »).

Dans le second chapitre, plusieurs méthodes permettant la reconstruction en 3D d'objets à partir de l'analyse de franges projetées ont été étudiées et seront présentées. Parmi elles, une méthode consiste à déterminer la phase du front d'onde réfléchi en appliquant un décalage de phase connu. Elle peut être utilisée en microscopie SIM (« Structured illumination Microscopy ») sur des franges projetées à l'aide d'un dispositif de projection. Nous avons développé un prototype basé sur un projecteur miniature afin de projeter les motifs de franges et nous avons également mis au point un nouvel algorithme plus rapide pour reconstruire la phase absolue d'un objet. Bien que les résultats macroscopiques soient encourageants, nous avons compris que l'application de la technique SIM à la microscopie interférométrique était possible mais nécessiterait le développement de toute une instrumentation spécifique.

Dans le troisième chapitre, une nouvelle procédure rigoureuse « IMPROVE-Protocol », en nanoscopie optique sans marquage est présentée. Cette procédure a été mise en place, afin de pouvoir observer des détails microscopiques non résolus dans des matériaux. Elle est basée sur l'utilisation de techniques de traitement d'images soigneusement choisies pour améliorer la sensibilité de détection des structures et des détails à l'intérieur de couches transparentes. La combinaison des méthodes de traitement d'images proposée permet d'imager des structures de taille micrométriques et sub-micrométriques contenues dans la couche, initialement perdues dans le bruit et donc à peine observables. Parmi les méthodes de traitement d'images utilisées, le moyennage d'images permet une augmentation de la stabilité des acquisitions en réduisant le bruit temporel. Ensuite, l'utilisation de l'image « dark », obtenue par en bloquant du chemin d'illumination du système optique, et la correction « Flat » sont appliquées afin de réduire le bruit spatiale des images permettant ainsi une compensation des erreurs dues aux défauts sur les

optiques tels que des particules de poussière. Les résultats de la technique hybride « High Dynamic range » (HDR) permet une amélioration du contraste, rendant ainsi les détails sombres d'une zone sous-exposée de l'échantillon observables et inversement permettant aux zones surexposées de ne plus être saturées. Les résultats sont obtenus tout d'abord sur des films de polymère de Mylar d'épaisseur 3  $\mu\text{m}$  et 6  $\mu\text{m}$  contenant des structures de vide de taille  $\mu\text{m}$  ou sub- $\mu\text{m}$ . Puis la technique « IMPROVE-Protocol » a été appliquée à des films de 25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de résine photosensible SU-8 dans lequel des microsphères de silice de 4  $\mu\text{m}$  de diamètre ont été insérées. Enfin, cette même technique a été utilisée sur des échantillons d'hydroxyapatite rugueux et poreux, difficilement mesurables. Les résultats ont montré une amélioration du SNR allant de 4 à 9 dB, donc d'un facteur 2 à 3. De plus, cela a permis une réduction des artéfacts sur les images, ainsi qu'une amélioration de la résolution latérale permettant ainsi au système de se rapprocher de la limite théorique de diffraction d'un microscope optique en lumière blanche, à savoir 0,4  $\mu\text{m}$ .

Enfin, dans le quatrième et dernier chapitre, nous nous sommes intéressés à une nouvelle technique de super-résolution qui consiste à imager des objets en 2D à travers une microsphère dans l'air ou en immersion permettant ainsi d'atteindre une résolution latérale de 50 nm. L'idée que nous avons eu a été de combiner cette technique de super-résolution latérale 2D par nano-jet photonique avec la haute résolution axiale de la microscopie interférométrique, en utilisant une configuration de type Linnik. Cette idée est le fruit du savoir-faire de l'équipe IPP sur la microscopie interférométrique et les jets photoniques. Cette technique permet par conséquence d'atteindre une résolution latérale bien inférieure à la limite de résolution de 400 nm en lumière visible tout en gardant la résolution axiale nanométrique avec la technique PSM. Au même moment, cette idée a été développée ailleurs avec une configuration de type Mirau mais également avec un Linnik en éclairage Köhler avec la technique basée sur la détection de l'enveloppe des franges. Cette technique « nano-3D » est pressentie pour devenir un nouveau mode de mesures 3D à haute résolution et pouvant avoir des retombées importantes dans d'autres domaines.





---

# Chapitre 1. Etat de l'art sur la microscopie optique et introduction à un nouveau domaine : la nanoscopie optique

---

*For the rest of my life, I will reflect on what light is.  
- Albert Einstein, 1917.*

## RESUME DU CHAPITRE

La nanoscopie optique en champ lointain fait écho aux nouvelles techniques d'imagerie haute résolution, aujourd'hui largement utilisée en biophysique et en imagerie biomédicale, pour imager et caractériser des nanostructures, tout en conservant tous les avantages de l'imagerie optique en champ lointain comme un grand champ de visualisation, une possibilité d'analyse en temps réel, ainsi qu'une possibilité d'évolution vers une plus grande précision. Une distinction est introduite pour classer les différentes techniques de nanoscopie optique en champ lointain en deux groupes : les techniques de super-résolution et les techniques de nano-détection. Un développement important concerne la super-résolution en trois dimensions. Un des défis futurs de la microscopie super-résolue sera d'éviter l'utilisation des marqueurs fluorescents. La microscopie interférométrique est une technique de nano-détection sans marquage. Elle utilise l'analyse des informations contenues dans la phase enregistrée pour en extraire des informations sur la présence d'objets de phase de dimensions nanométriques dans la direction de l'axe optique Z pour une reconstruction de surfaces en 3D. Cette technique peut être utilisée pour l'analyse de surface ou encore en tomographie optique, pour obtenir des tranches et des volumes de couches transparentes ou semi-transparentes.

Dans ce chapitre, après un rappel des généralités concernant la microscopie optique, nous allons présenter l'état de l'art de quelques techniques de super-résolution et de nano-détection développées au cours de ces dernières années.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont fait l'objet des publications et des conférences suivantes :

- P. Montgomery, A. Leong-Hoï, F. Anstotz, D. Mitev, L. Pramatarova, O. Haeberle. From superresolution to nano-detection: overview of far field optical nanoscopy techniques for nanostructures, *Journal of Physics: Conference Series*, IOP Publishing, Vol. 682:012010, février 2016. ( SNIP : 0.247, SJR : 0.211 )
- P. Montgomery, A. Leong-Hoï. Emerging optical nanoscopy techniques, *Nanotechnology, Science and Applications*, Dove Medical Press, Vol. 2015:8:31–44, septembre 2015. ( SNIP : 3.666, SJR : 2.078 ). Video: <http://youtu.be/IU2jATHQwA>
- P.C. Montgomery, P. Chapuis, A. Leong-Hoï, F. Anstotz, A. Rubin, J. Bachnagel, C. Gauthier, G. Reiter & G.B. McKenna, Optical nanoscopy characterization of nanofilms, WG4-Workshop “Membrane and Liquid Crystal Nanostructures“ (ME-LI-NA 2016), Bulgarie, 2016.
- T. Hikov, E. Pecheva, P. Montgomery, F. Antoni, A. Leong-Hoï, T. Petrov, Precise femtosecond laser ablation of dental hard tissue: preliminary investigation on adequate laser parameters, the 19th International School of Condensed Matter Physics, Varna, Bulgaria, 2016.
- G. Gianto, P. Montgomery, F. Salzenstein, A. Leong-Hoï, Study of robustness of 2D fringe processing in Coherence Scanning Interferometry for the characterization of a transparent polymer film, ICA, Indonesia, 2016.
- F. Le Normand, F. Antoni, F. Aweke, D. Muller, S. Zafeiratos, W. Luo, J. Hulik, P. Pfeiffer, A. Leong-Hoï, R. Claveau, M. Abdesselam, P. Montgomery. Graphene-based films on Diamond Like Carbon: preparation, characterization and optoelectronics, dans *E-MRS Spring Meeting Symposium EE: Carbon- and Nitrogen-Containing Nanostructured Thin Films*, European Materials Research Society (Eds.), Lille, France, mai 2016.
- P. Montgomery, A. Leong-Hoï, F. Anstotz, H. Liu, B. Simon, M. Debailleul, O. Haeberle. Overview of unlabelled far field optical nanoscopy techniques for nanometrology, dans *Optical Micro- and Nanometrology, SPIE Photonics Europe*, Bruxelles, Belgium, avril 2016.
- M. Husneni, A. Leong-Hoï, R. Claveau, P. Montgomery, F. Anstotz. Performance comparison of air and immersion Linnik objectives in coherence scanning interferometry, dans *The 9th International Conference on Nanophotonics (ICNP 2016)*, Taipei, Taiwan, mars 2016.
- A. Leong-Hoï, P. Montgomery, P. Pfeiffer, F. Anstotz. Les techniques émergentes de nanoscopie optique, dans *XXIIIe congrès général de la Société Française de Physique (SFP)*, Strasbourg, France, août 2015.
- A. Leong-Hoï, P. Montgomery, B. Serio, P. Twardowski. La nanoscopie en champ lointain, dans *18ème conférence Horizons de l'Optique, Optique Bretagne 2015*, Rennes, France, juillet 2015.
- P. Montgomery, A. Leong-Hoï, R. Claveau, M. Flury, F. Anstotz, H. Liu, B. Simon, M. Debailleul, O. Haeberle. Review of label-free far field optical nanoscopy techniques for the characterization of nanomaterials, dans *Energy, Materials, Nanotechnology (EMN) 2D Materials Meeting*, San Sebastian, Spain, mai 2016.

**PLAN DU CHAPITRE**

<b>1.1</b>	<b>FONDAMENTAUX EN MICROSCOPIE OPTIQUE ET HISTORIQUE DU DOMAINE .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2</b>	<b>RESOLUTION ULTIME DU MICROSCOPE OPTIQUE.....</b>	<b>11</b>
1.2.1	Résolution latérale en microscopie .....	11
1.2.1.1	<i>Résolution à deux points .....</i>	<i>11</i>
1.2.1.2	<i>La réponse impulsionnelle incohérente.....</i>	<i>13</i>
1.2.1.3	<i>Définition dans l'espace de Fourier : la fonction de transfert optique et le théorème de Nyquist.....</i>	<i>14</i>
1.2.2	Résolution axiale en microscopie.....	15
1.2.3	Résolution en 3D.....	16
<b>1.3</b>	<b>ETUDE COMPARATIVE DES MICROSCOPIES OPTIQUE ET CHAMP PROCHE.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4</b>	<b>TECHNIQUES CLASSIQUES POUR SE RAPPROCHER DE LA RESOLUTION ULTIME EN MICROSCOPIE OPTIQUE.....</b>	<b>21</b>
1.4.1	Réduction de la longueur d'onde.....	21
1.4.2	Augmentation de l'ouverture numérique de l'objectif.....	22
1.4.3	Augmentation de l'ouverture numérique par l'utilisation d'objectifs à immersion .....	23
1.4.4	Limitations des techniques actuelles dues au bruit et théorème de Nyquist-Shannon ...	23
<b>1.5</b>	<b>INTRODUCTION AU DOMAINE DE LA NANOSCOPIE OPTIQUE.....</b>	<b>24</b>
1.5.1	Emergence d'une nouvelle notion : la nanoscopie optique .....	24
1.5.2	Nanoscopie en champ proche.....	24
1.5.3	Nanoscopie en champ lointain .....	25
1.5.3.1	<i>Distinction entre les techniques de super-résolution et de nano-détection.....</i>	<i>25</i>
1.5.3.2	<i>Nanoscopie en fluorescence.....</i>	<i>27</i>
1.5.3.2.1	<i>Microscopie confocale à balayage.....</i>	<i>28</i>
1.5.3.2.2	<i>Microscopie sous illumination structurée.....</i>	<i>28</i>
1.5.3.2.3	<i>Microscopie à déplétion par émission stimulée.....</i>	<i>29</i>
1.5.3.2.4	<i>Techniques de fluorescence stochastiques et de super-localisation.....</i>	<i>29</i>
1.5.3.3	<i>Techniques de nanoscopie optique sans marquage .....</i>	<i>31</i>
1.5.3.3.1	<i>Microscopie tomographique numérique .....</i>	<i>32</i>
1.5.3.3.2	<i>Microscopie par lentille de diffusion.....</i>	<i>33</i>
1.5.3.3.3	<i>Super-lentilles de Pendry et la technique SMON .....</i>	<i>35</i>
1.5.3.3.4	<i>Technique de déconvolution TSOM.....</i>	<i>36</i>
1.5.3.3.5	<i>Technique SEEC pour augmenter le contraste .....</i>	<i>38</i>
1.5.3.3.6	<i>Microscopie interférométrique en lumière blanche .....</i>	<i>39</i>
<b>1.6</b>	<b>METHODES DE RECONSTRUCTION 3D EN MICROSCOPIE INTERFEROMETRIQUE PAR ANALYSE DE FRANGES D'INTERFERENCE.....</b>	<b>42</b>
1.6.1	Principe du décalage de phase.....	42
1.6.2	Principe de détection de l'enveloppe des franges .....	44
1.6.2.1	<i>Technique PFSM.....</i>	<i>44</i>
1.6.2.2	<i>Algorithme basé sur la transformée de Fourier rapide : Zygo.....</i>	<i>45</i>
1.6.2.3	<i>Technique FSA.....</i>	<i>46</i>
1.6.2.4	<i>Technique CPM.....</i>	<i>47</i>
<b>1.7</b>	<b>CONCLUSION SUR L'ETAT DE L'ART EN NANOSCOPIE .....</b>	<b>48</b>

## 1.1 Fondamentaux en microscopie optique et historique du domaine

D'après son étymologie, le mot microscopie provient du grec ancien *mikros*, qui veut dire petit et *skopein* qui désigne les actions de dire ou examiner. Il s'agit en fait de l'observation d'objets invisibles à l'œil nu. Ainsi, un microscope optique, placé entre un objet de petites dimensions et un détecteur, permet de grossir l'image optique de cet objet. Cet appareil utilise des lentilles optiques afin de former une image agrandie de l'objet en contrôlant le faisceau lumineux.

Un microscope est typiquement composé de cinq principaux éléments (cf. [figure 1-1](#)) :

1. Le statif qui supporte et maintient les divers mécanismes et tubes optiques.
2. L'éclairage (une source lumineuse de type laser, lampe halogène ou à filament tungstène ou encore LED).
3. L'objectif qui permet le grossissement en réalisant une image réelle agrandie de l'objet.
4. La platine qui est le support sur lequel est posé l'échantillon à observer.
5. La tête d'observation permettant l'observation avec un œil ou les deux yeux (dans le cas d'une utilisation d'oculaires pour réaliser une loupe monoculaire ou binoculaire), ou avec un capteur tel qu'une caméra CCD pour enregistrer l'image pour la projeter agrandie sur un écran de résolution plus adaptée.

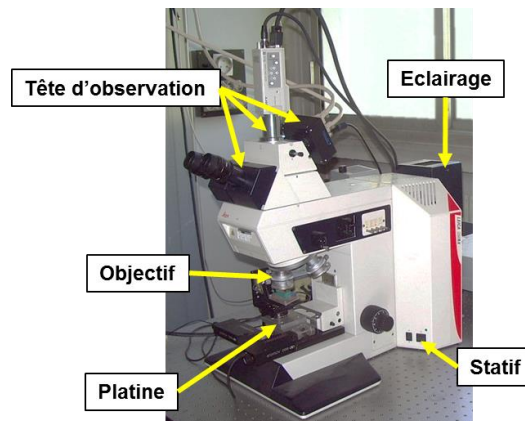


Figure 1-1. Composition d'un microscope (modèle Leica DMR-X à IPP).

Un microscope modélisé dans sa forme la plus simplifiée, comme représenté dans la [figure 1-2](#), est constitué d'une association de deux lentilles minces convergentes jouant respectivement les rôles d'objectif et d'oculaire. Le rôle de l'objectif est de former une image réelle agrandie de l'objet. Le rôle de l'oculaire est de jouer le rôle d'une loupe pour agrandir encore cette image en réalisant une image virtuelle pour la rendre observable par l'œil.

L'objectif ( $L_1$ ), placé en  $O_1$  près de l'objet  $[AB]$  et de petite distance focale  $f_1$  génère une image intermédiaire réelle  $[A_1B_1]$  renversée et agrandie. Pour calculer le grossissement, la formule de conjugaison de Descartes est utilisée et s'écrit :

$$\frac{1}{f_1} = \frac{1}{O_1A_1} - \frac{1}{O_1A} \Leftrightarrow \frac{1}{O_1A_1} = \frac{1}{f_1} + \frac{1}{O_1A}. \quad \text{Eq. (1-1)}$$

Le grossissement transversal après l'objectif est donc :

$$\gamma_1 = \frac{A_1B_1}{AB} = \frac{O_1A}{O_1A_1}. \quad \text{Eq. (1-2)}$$

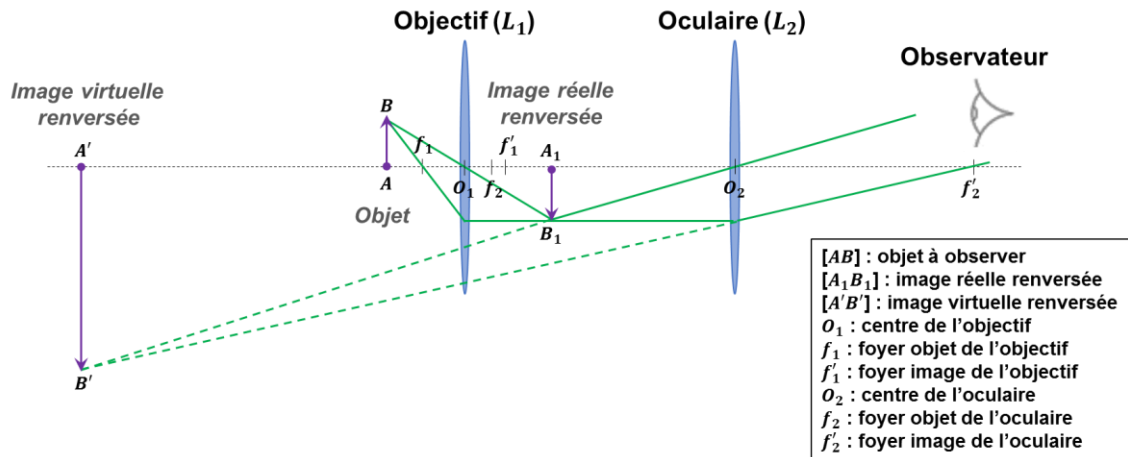


Figure 1-2. Modèle simplifié d'un microscope.

L'oculaire (L<sub>2</sub>) fonctionne comme une loupe et forme l'image finale virtuelle renversée encore plus agrandie, notée [A'B'], à partir de l'image intermédiaire [A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>]. Pour que l'œil, placé au foyer image de l'oculaire (L<sub>2</sub>), puisse observer l'image virtuelle A'B', formée à l'infini, i.e. sans accommodation, il faut placer l'oculaire (L<sub>2</sub>) de telle sorte à ce que le foyer objet F<sub>2</sub> coïncide avec l'image intermédiaire A<sub>1</sub>B<sub>1</sub> de l'objectif. En général, si l'on souhaite que l'œil accommode, i.e. l'image finale formée est à distance finie, la distance entre l'œil et l'objet doit être d'au moins 25 cm. La plupart du temps, l'oculaire est généralement remplacé par une caméra. Les objectifs sont les éléments clés pour déterminer la qualité d'un microscope optique. En effet, la qualité de l'image observée par l'utilisateur est principalement fixée par les caractéristiques de l'objectif. Le grossissement commercial,  $G$ , d'un objectif de microscope est le rapport de l'angle formé par les points extrêmes de l'objet et l'œil de l'observateur avec l'objectif ( $\beta$ ) et sans l'objectif ( $\alpha$ ), comme illustré dans la figure 1-3 :

$$G = \frac{\beta}{\alpha}. \quad \text{Eq. (1-3)}$$

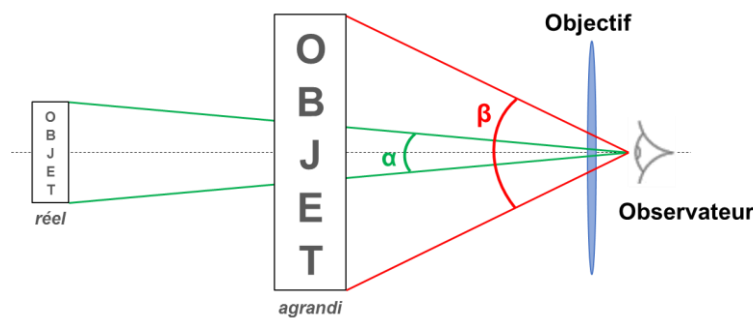


Figure 1-3. Schéma des dimensions angulaires d'un objet sans et à travers un objectif.

La figure 1-4 présente quelques dates marquantes de l'histoire reliées à l'invention du microscope. La plus ancienne lentille de verre poli retrouvée remonte au XII<sup>ème</sup> siècle avant Jésus Christ à Ninive au Kurdistan mais son utilisation reste encore indéterminée (Wastiaux & Locquin, 1994). D'après la littérature, des moyens grossissants tels que des boules de verre remplies d'eau ou des émeraudes taillées en lentille concave ont déjà été utilisés dès le I<sup>er</sup> siècle pour voir plus gros. Mais ce n'est qu'à la fin du XIII<sup>ème</sup> siècle que Roger Bacon prouva scientifiquement l'effet grossissant des lentilles sur des lettres et commença à les utiliser en tant que loupe pour corriger la vue. Le premier microscope composé fut inventé en 1590 par Zacharias Janssen. Puis, plusieurs améliorations s'en suivirent.

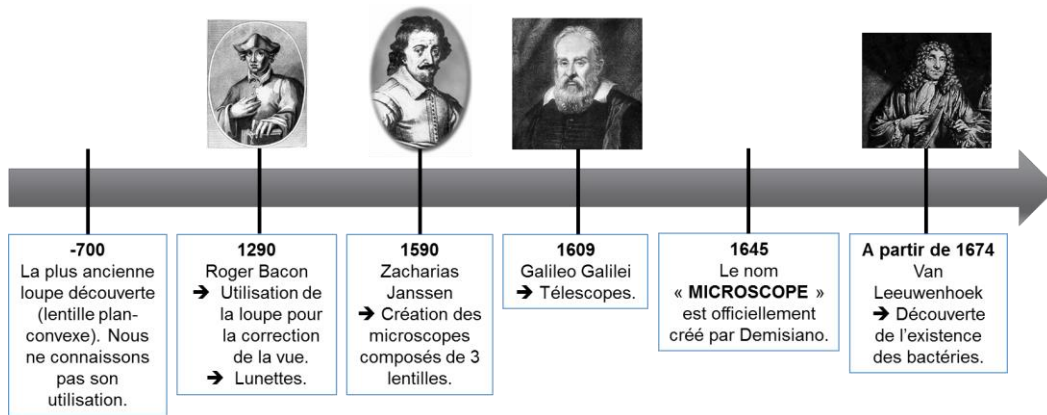


Figure 1-4. Dates marquantes jusqu'à l'invention du microscope optique.

En 1609, Galileo Galilei (connu sous le nom de Galilée) construisit un microscope composé en utilisant une lentille convexe et une lentille concave, ce qui créa le télescope. Mais le nom "microscope" n'est officiellement apparu qu'en 1645, introduit par Demisiano. En 1665, Robert Hooke publia dans *Micrographia* des dessins provenant d'observations de poux et de cellules végétales réalisées avec un microscope qu'il avait fabriqué permettant un grossissement de 30x (cf. figure 1-5(a)) (Hooke, 2003).

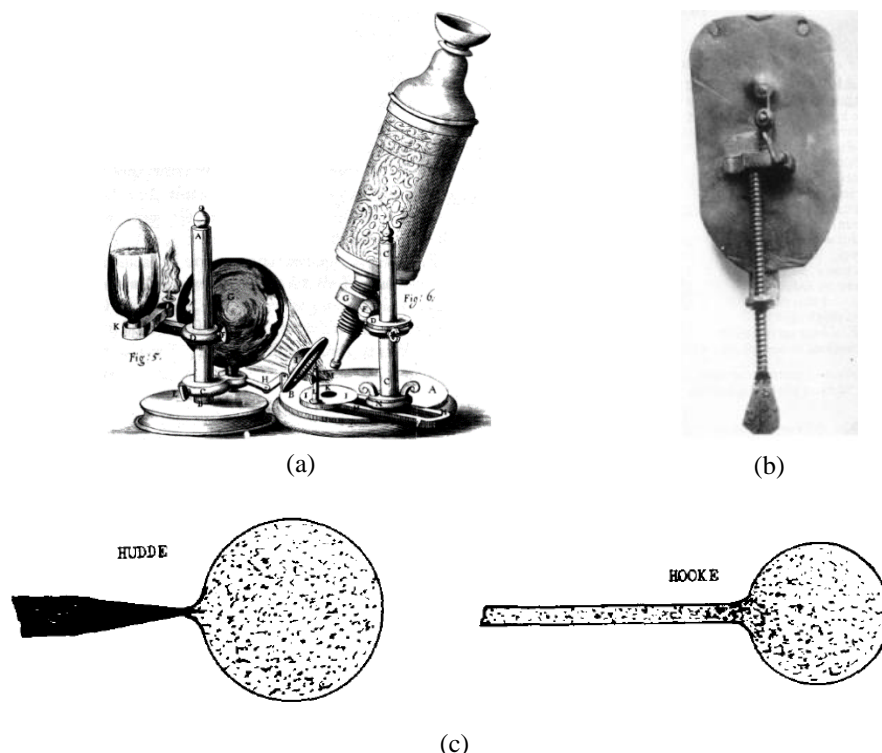


Figure 1-5. Les microscopes de Robert Hooke et Antoni Van Leeuwenhoek. (a) Microscope de Robert Hooke (Hooke, 2003). (b) Microscope de Antoni Van Leeuwenhoek. (c) Les lentilles utilisées dans (b) peuvent être fabriquées en chauffant un morceau de verre avec la pointe d'une aiguille (Hudde), ou en chauffant l'extrémité d'une fibre de verre (Hooke) (Zuylen, 1981).

En 1675, Antoni Van Leeuwenhoek fut le premier à décrire les bactéries. Le microscope de Van Leeuwenhoek ne ressemblait pas aux microscopes que l'on trouve habituellement dans les laboratoires de nos jours. Il était composé d'une sphère de verre de quelques micromètres de diamètre, jouant le rôle d'une lentille de petite distance focale (1 à 2 mm), montée entre des plaques métalliques, comme illustré dans la figure 1-5(b). Le microscope devait être placé très

proche de l'œil. Malgré les difficultés de fabrication (figure 1-5(c)), un avantage de son système était le grossissement pouvant atteindre x266 (Zuylen, 1981). Au milieu du XVIII<sup>ème</sup> siècle, des corrections ont été apportées aux microscopes composés pour corriger les aberrations chromatiques de ces systèmes optiques. Depuis cette époque, le microscope optique est similaire à ceux que nous connaissons aujourd'hui. La microscopie devint donc l'une des réalisations scientifiques les plus importantes puisqu'elle conduisit à une meilleure compréhension des sciences de la vie en permettant d'observer des bactéries ou des cellules du sang (Weisenburger & Sandoghdar, 2015).

## 1.2 Résolution ultime du microscope optique

Le terme « résolution » d'une technique optique désigne la plus petite valeur pouvant être mesurée, dans une dimension donnée (spatiale ou temporelle). Donc, la résolution spatiale correspond la distance minimale pouvant être mesurée entre deux points de l'espace, alors que la résolution temporelle est la durée minimale entre deux évènements. Dans cette section, nous allons, plus particulièrement, nous intéresser aux résolutions spatiales (latérales et axiales) des microscopes optiques. Les critères rappelés ci-dessous supposent que le système optique se comporte comme un système linéaire invariant et isoplanétique (au moins localement) vis-à-vis de l'intensité lumineuse émise par deux sources ponctuelles pour le cas incohérent et vis-à-vis de l'amplitude lumineuse pour le cas cohérent.

### 1.2.1 Résolution latérale en microscopie

Le microscope optique, comme tout instrument optique, est limité par la diffraction de la lumière. On parle alors de résolution spatiale d'un microscope (Den Dekker & Van den Bos, 1997; Pichon, 2008). En 1873, Ernst Abbe définit la limite de résolution d'un microscope optique comme la distance latérale minimale entre deux objets permettant de les observer de manière distincte. Cette distance est donnée par  $d = \lambda / (2NA)$ , où  $\lambda$  est la longueur d'onde de la lumière et NA l'ouverture numérique de l'objectif. En augmentant NA et en diminuant  $\lambda$ , la limite classique des microscopes optiques est de 200 nm. Il existe plusieurs façons de la déterminer : avec le critère de résolution à deux points, la réponse impulsionnelle incohérente (en anglais PSF : *Point Spread Function*) du système optique, les définitions basées sur le théorème de Fourier ou encore celles basées sur le théorème de Nyquist.

#### 1.2.1.1 Résolution à deux points

Le critère de résolution à deux points correspond à la capacité d'un système imageur (un œil ou un instrument optique) à distinguer deux sources ponctuelles de luminosités égales et séparés d'une distance minimale. Or, lorsque deux points distincts sont très proches, ils auront pour images, à travers un système imageur, non plus des points mais des taches (taches d'Airy pour un système sans aberrations) qui se chevauchent et qui, si elles ne sont pas suffisamment séparées, pourront donc ne plus être distinguées l'une de l'autre. Expérimentalement, l'intensité normalisée d'une tache d'Airy correspond à la PSF du système. Les critères de résolution à deux points se basent sur l'observation du recouvrement des PSF provenant de deux sources ponctuelles d'intensité égale. Il en découle trois critères : le critère de Rayleigh, d'Abbe et celui de Sparrow. La distance entre les deux taches issues des sources ponctuelles est donnée par la relation suivante :

$$R_K = K * \frac{\lambda}{NA} \quad \text{Eq. (1-4)}$$

avec  $NA$  l'ouverture numérique de l'objectif de microscope ( $NA = n \times \sin\theta$  où  $\theta$  est le demi-angle du cône de lumière qui peut entrer dans l'objectif et  $n$  l'indice de réfraction du milieu entre l'objectif et l'objet),  $\lambda$  la longueur d'onde de la source lumineuse et  $K$  est une constante, variant entre 0,47 et 1, selon le critère et le degré de cohérence de la source lumineuse utilisée.

Le [tableau 1-1](#) donne la définition de la résolution latérale théorique d'un système optique en fonction du critère et de la cohérence de l'illumination ([Colonna De Lega & de Groot, 2012](#)). La [figure 1-6](#) montre la cartographie 2D des intensités, un profil des deux taches d'Airy et de la somme des deux profils ainsi que la représentation 3D en intensité de deux sources ponctuelles pour les trois critères dans le cas de sources incohérentes.

Tableau 1-1. Définition de la résolution théorique d'un système optique en fonction du critère et de la cohérence de l'illumination.

Cas : sources ponctuelles incohérentes			Cas : sources ponctuelles cohérentes	
Rayleigh	Abbe	Sparrow	Abbe	Sparrow
$R_R = 0,61 * \frac{\lambda}{NA}$	$R_A = 0,5 * \frac{\lambda}{NA}$	$R_S = 0,47 * \frac{\lambda}{NA}$	$R_{A'} = \frac{\lambda}{NA}$	$R_{S'} = 0,73 * \frac{\lambda}{NA}$

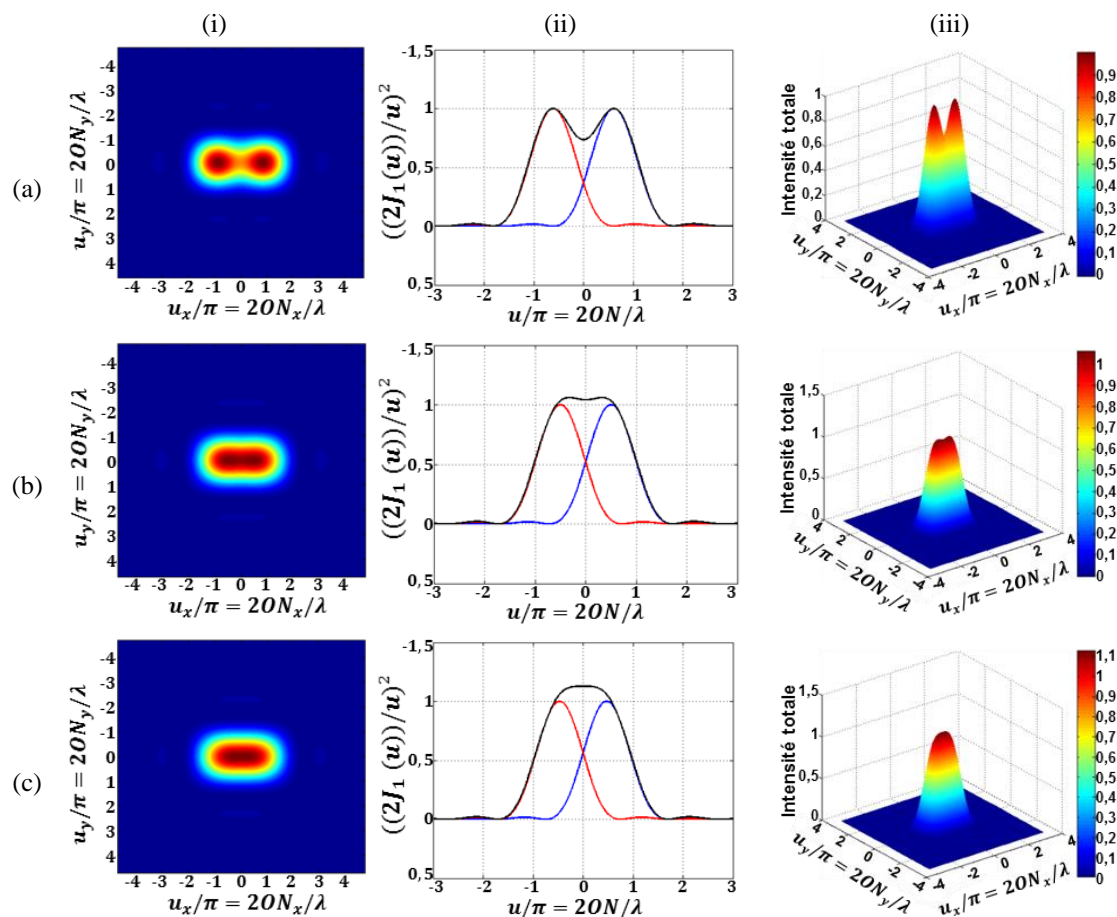


Figure 1-6. Critère de résolution à deux points : observation des PSF de deux sources ponctuelles. (a) Critère de Rayleigh, (b) critère de Abbe et (c) critère de Sparrow, avec (i) la cartographie 2D des intensités, (ii) un profil des deux taches d'Airy et de la somme des deux profils et (iii) la représentation 3D en intensité des deux taches d'Airy.



En 1873, Ernst Abbe publia sa formule et définit la limite de diffraction comme étant la plus grande période de réseau de diffraction qui ne pouvait être détectée par le système optique. Cette définition de la résolution correspond à la fréquence de coupure spatiale du système optique lorsqu'il est considéré comme un filtre linéaire. C'est généralement le cas lorsque l'ouverture numérique de l'objectif est faible et que l'illumination est totalement cohérente ou incohérente. En pratique, les systèmes optiques ont, le plus souvent, un éclairage partiellement cohérent, mais le filtrage linéaire reste une approximation utile pour comprendre le comportement attendu d'un instrument donné.

En 1896, Lord Rayleigh redéfinit la limite de résolution proposée auparavant par Ernst Abbe. Tel que Rayleigh a défini son critère, deux points sont résolus si le centre de la tache du premier point source coïncide avec la position du premier zéro de la tache de l'autre point source diffracté (Born & Wolf, 1999). Le critère de Rayleigh est le plus souvent utilisé et cité en optique (astronomie, microscopie...) car il assure que les points images sont séparés à sa valeur.

Le critère de Sparrow modifie légèrement celui de Rayleigh. En effet, depuis le XIX<sup>ème</sup> siècle, on utilise de plus en plus des systèmes de détection électroniques permettant d'observer les objets au microscope. La limite de résolution de ces détecteurs est alors donnée par la distance entre deux sources ponctuelles pour lesquelles la dérivée du second ordre de la distribution d'intensité de la tache s'annule (Cremer & Masters, 2013). La limite de résolution définie par le critère de Sparrow correspond à la distance pour laquelle il n'est pas possible de résoudre deux sources ponctuelles mais au-dessus de laquelle cela est possible. Le critère de Sparrow est communément utilisé dans les applications en microscopie. Les critères de résolution à deux points donnent une indication sur la limite de résolution d'un système optique. Cependant, ils ne prennent pas en compte le bruit introduit par le système sur les images, qui influe sur le pouvoir de résolution du système optique.

### 1.2.1.2 La réponse impulsionnelle incohérente

La réponse impulsionnelle incohérente ou PSF est la réponse du microscope à une source ponctuelle et correspond donc à l'intensité d'une tache d'Airy si on considère le système optique parfait, i.e. sans aberrations. Selon le théorème de Rayleigh, la distance des maxima des PSF est une valeur essentielle dans la détermination de la résolution et il est donc important que les maxima soient bien séparés l'un de l'autre. Cela implique que la résolution est d'autant meilleure que le diamètre des taches d'Airy est petit. Donc une autre façon de déterminer expérimentalement le pouvoir de résolution d'un instrument optique est de mesurer la largeur à mi-hauteur (en anglais FWHM : *Full Width at Half Maximum*) de la PSF, comme illustré dans la figure 1-7.

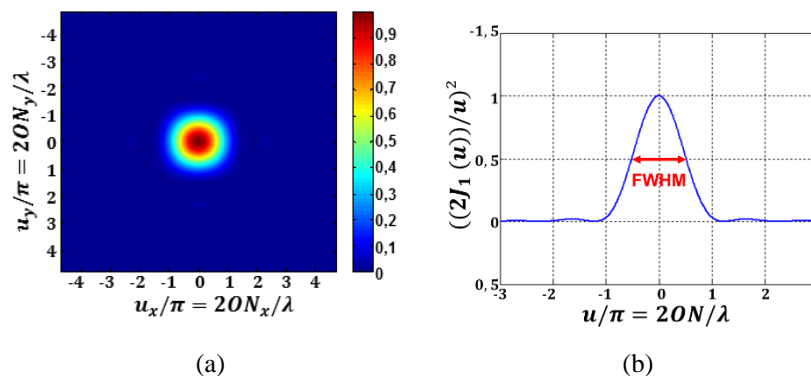


Figure 1-7. Exemple d'une PSF et de la largeur à mi-hauteur. (a) cartographie 2D des intensités, (b) profil de la PSF et largeur à mi-hauteur.

Par conséquent, deux points objets peuvent être résolus si leur distance de séparation est supérieure à la FWHM de la PSF du système. Cette technique a été largement utilisée pour déterminer le pouvoir de résolution des systèmes de nanoscopie (Heintzmann & Ficz, 2006). Dans de nombreuses applications telles que les sciences biologiques, il est nécessaire de mesurer la taille de petits objets. La plus petite taille qui peut être déterminée par un microscope est appelée résolution de taille. La résolution de la taille est généralement liée à la valeur FWHM du système (Baddeley et al., 2010).

### 1.2.1.3 Définition dans l'espace de Fourier : la fonction de transfert optique et le théorème de Nyquist

Un autre critère pour évaluer le pouvoir de résolution d'un microscope est celui basé sur la fonction de transfert optique (FTO), appelée en anglais *Optical Transfer Function* (OTF) (Colonna De Lega & de Groot, 2012) qui correspond à la transformée de Fourier de la PSF (Williams & Becklund, 1989). Le module de la FTO donne la fonction de transfert de modulation (FTM), appelée en anglais *Modulation Transfer Function* (MTF) qui peut être obtenue en mesurant le rapport des contrastes de l'image à l'objet. Si l'objet est supposé de contraste unitaire. La FTM devient :

$$FTM = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}}. \quad \text{Eq. (1-5)}$$

Pour mesurer la FTM d'un système optique, on peut utiliser des mires de résolution avec des réseaux de fréquences différentes (en lignes/mm). Un exemple de mesure d'une FTM d'une mire de motifs de forme sinusoïdale (« Reflection sinusoidal test pattern array M-13-60 ») est donné en annexe 1.

Lorsque l'on considère un système optique sans aberrations, la FTM peut être reliée à la taille de la tache de diffraction, qui dépend de l'ouverture numérique  $ON$  du système et de la longueur d'onde d'illumination  $\lambda$  et s'écrit :

$$FTM = \frac{2(\varphi - \cos(\varphi) \sin(\varphi))}{\pi} \quad \text{Eq. (1-6)}$$

avec  $\varphi = \text{acos}\left(\frac{\lambda * f}{2 * ON}\right)$ , où  $f$  est la fréquence spatiale en lignes par millimètre. Un exemple de FTM théorique pour  $\lambda = 600$  et  $ON = 0,85$  est donné par la figure 1-8, dans laquelle sont positionnées les fréquences de coupure selon les différents critères présentés dans la section 1.2.1.1 de ce chapitre.

Ernst Abbe avait développé l'hypothèse selon laquelle la limite de résolution d'un instrument optique, à savoir la taille du plus petit détail que l'on peut résoudre grâce au système, peut être obtenue en trouvant la taille de la plus petite grille en termes de lignes par mm qui peut être imagée par le système (Abbe, 1873). Par exemple 1000 lignes/mm dans l'espace objet correspondent à une résolution de 1  $\mu\text{m}$ . Ce postulat peut être expliqué par la théorie de Jean Baptiste Fourier selon laquelle tout objet continu dans le temps ou dans l'espace peut être mathématiquement défini comme la superposition de fonctions harmoniques de fréquences différentes. En effet, en 1967, McCutchen étudia les effets des ouvertures de diaphragmes des systèmes optiques par analyse de Fourier (McCutchen, 1967). Le principe de son étude résidait sur le fait d'illuminer un objet avec la plus petite image de diffraction d'un point source et découvrit que l'image d'un objet résultait de la convolution du spectre spatial de l'objet avec la fonction d'autocorrélation du cône d'éclairage.

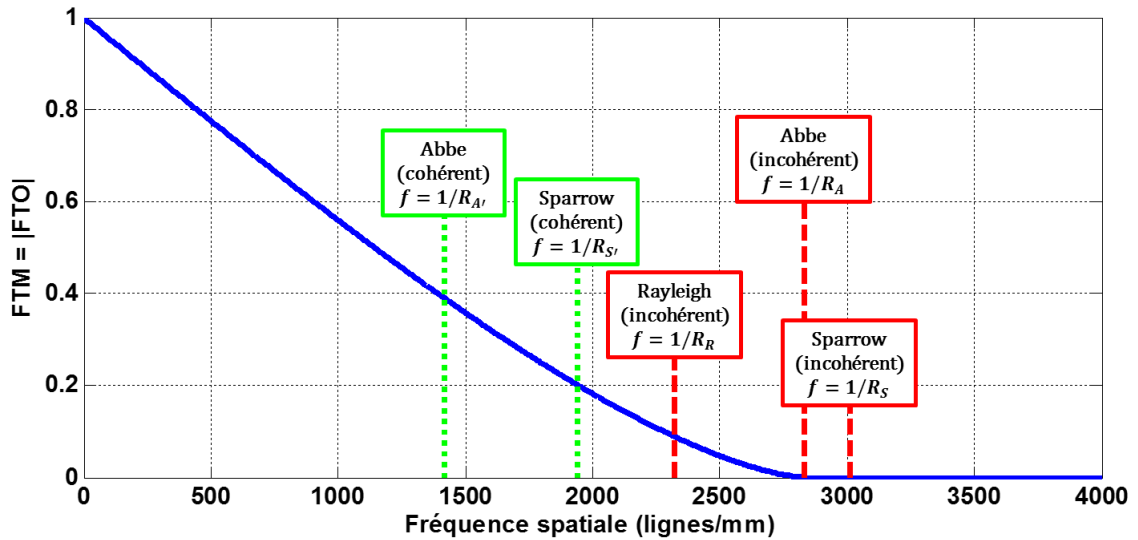


Figure 1-8. FTM théorique pour un système optique imageur cohérent ou incohérent ( $\lambda = 600 \text{ nm}$  et  $ON = 0,85$ ).

De plus, le théorème d'échantillonnage de Nyquist-Shannon peut être utilisé pour évaluer la transmission de signaux. Une méthode consiste à se baser sur ce théorème pour définir les conditions nécessaires afin d'obtenir une image à une résolution donnée (Shannon, 1949). Selon la théorie de Fourier présentée précédemment, il en résulte que la fréquence la plus élevée d'une des fonctions harmoniques, composant l'objet qui peut être transmise, détermine la résolution. En effet, dans le domaine spatial, un système imageur agit comme un filtre passe bas et au-delà d'une certaine fréquence spatiale, la fonction de transfert du système est nulle. C'est cette fréquence de coupure qui détermine la limite de diffraction de l'instrument. Cependant, l'utilisation de ce critère dépend de la structure à résoudre. En outre, un facteur important influençant la résolution latérale est l'intervalle d'échantillonnage latéral de l'instrument optique, généralement exprimé en termes d'espacement des pixels dans l'espace objet. En effet, il est en général nécessaire que la taille d'un pixel de la caméra du système dans l'espace objet soit bien plus petite que le rayon de la tache d'Airy (ou au moins égale), dans le cas contraire cela peut produire des images floues et la résolution est alors limitée par la caméra (de Groot, 2015a).

Le terme « résolution » est souvent interprété de différentes manières par différents auteurs mais ne doit pas être confondu avec la détection, la localisation ou encore la sensibilité. Cependant, en microscopie, il est parfois plus facile de détecter une structure ou de mesurer sa position (Serio et al., 2004) que de résoudre les plus petits détails. Cette discussion fera l'objet de la section 1.5.3.1.

### 1.2.2 Résolution axiale en microscopie

La résolution axiale d'un microscope est la résolution en profondeur et dépend de la longueur de cohérence temporelle de la source d'illumination et de l'ouverture numérique des objectifs utilisés. Comme pour la résolution latérale, la résolution axiale peut être déterminée à partir de la PSF du système en mesurant sa largeur à mi-hauteur (Dubois et al., 2004) et peut être définie par la relation suivante :

$$R_{axiale} = \frac{2 * \ln(2)}{n\pi} * \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda} \quad \text{Eq. (1-7)}$$

avec  $n$  indice de réfraction du milieu,  $\lambda$  la longueur d'onde centrale de la source et  $\Delta\lambda$  la largeur spectrale totale à mi-hauteur de la source (Dubois et al., 2002). Or, la longueur de cohérence

temporelle de la source est donnée par  $Lc = v/\Delta\lambda$  où  $v$  est la vitesse de propagation de l'onde. Par conséquent, l'utilisation d'une source d'illumination avec un spectre large, donc avec une longueur de cohérence faible, peut améliorer la résolution axiale du système.

Lorsque les objectifs ont de grandes ouvertures numériques, la résolution axiale du système dépend principalement de l'ouverture numérique des objectifs (Dubois et al., 2002) et peut être approximée par la relation suivante :

$$R_{axiale} \approx \frac{0.44 \lambda}{n(1 - \cos\alpha)} \quad \text{Eq. (1-8)}$$

avec  $\alpha$  le demi-angle du cône d'ouverture et  $\lambda$  la longueur d'onde centrale d'illumination. En pratique, il existe différentes méthodes pour mesurer la résolution latérale et axiale.

Une première méthode consiste à utiliser des billes en or ou fluorescentes dont le diamètre est compris entre 100 nm et 200 nm, donc plus petites que la longueur d'onde et qui vont agir comme des sources ponctuelles. Leur image à travers le microscope va représenter la PSF du système. En mesurant la FWHM du profil d'intensité suivant les directions  $x$  et  $z$ , on obtient respectivement la résolution latérale et axiale du système optique (Juette et al., 2008), comme illustré sur le schéma de la figure 1-9.

Une autre méthode pour déterminer la résolution latérale et généralement utilisée dans le cas particulier du microscope interférométrique consiste à observer le profil d'intensité le long d'un bord droit. La distance latérale entre 10% et 90% (ou entre 20% et 80% selon la norme utilisée) de l'intensité maximale est alors mesurée et correspond à la résolution latérale du système optique (Fauver et al., 2005). Pour mesurer la résolution axiale, une séquence d'images est enregistrée en balayant l'échantillon sur l'axe vertical. Puis, le profil d'intensité sur un pixel de la séquence d'images est analysé. Ce profil d'intensité a la forme d'un signal sinusoïdal, appelé interférogramme. La résolution axiale correspond à la FWHM de l'enveloppe de cet interférogramme (Dubois et al., 2004; Izatt et al., 1994).

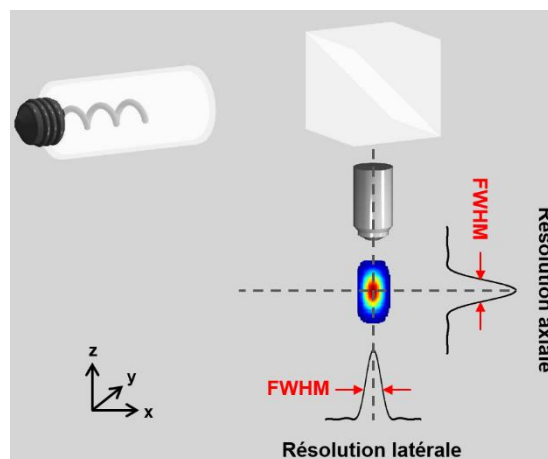


Figure 1-9. Schéma de la FWHM de la PSF pour la résolution latérale et la résolution axiale.

### 1.2.3 Résolution en 3D

A l'origine, la résolution d'un microscope optique a été définie pour caractériser la capacité de l'instrument à discerner de petites structures situées dans le plan objet, à savoir en deux dimensions. Cependant, l'applicabilité des concepts classiques du calcul de la résolution sont en débat lorsqu'il s'agit de les appliquer à la mesure quantitative en trois dimensions (Boedeker et

al., 2010; de Groot et al., 2012). En effet, l'inconvénient des définitions, fondées sur le critère de Rayleigh ou sur celui de Sparrow en éclairage incohérent, est qu'elles ne sont pas directement liées à la topographie de la surface mesurée. Il a donc fallu reconsidérer la définition de la résolution appliquée à des systèmes d'imagerie 3D.

Le premier réflexe aurait pu être de considérer les largeurs à mi-hauteur des PSF dans les 3 directions ( $FWHM_x$ ,  $FWHM_y$  et  $FWHM_z$ ). Cependant, comment pourrait-on comparer le pouvoir de résolution de deux microscopes 3D ? En 1992, un premier critère appelé volume d'observation  $V_{obs}$  a été proposé (Hell & Stelzer, 1992; Lindek et al., 1994) et est donné par :

$$V_{obs} = \frac{4\pi}{3} * \frac{FWHM_x}{2} * \frac{FWHM_y}{2} * \frac{FWHM_z}{2} = \frac{\pi}{6} * FWHM_x * FWHM_y * FWHM_z \quad \text{Eq. (1-9)}$$

En ce qui concerne les microscopes interférométriques 3D, par principe la mesure de hauteur d'une surface est reliée à la phase par la relation suivante :

$$\phi = \frac{4\pi}{\lambda} * h \quad \text{Eq. (1-10)}$$

avec  $\phi$  la phase,  $h$  la hauteur, et  $\lambda$  la longueur d'onde. Lorsque l'on additionne les fronts d'onde de structures très proches, les décalages de phase dus aux variations de hauteur sur la surface ne s'additionnent pas, mais ce sont les amplitudes complexes qui s'ajoutent. La figure 1-10(b) montre une image d'une couche de silicium contenant deux sillons de quartz (Huebner et al., 2005), prise avec un microscope électronique. La figure 1-10(a) est l'image 3D correspondante prise avec un microscope interférométrique. On peut distinguer les deux sillons, bien qu'ils apparaissent flous. Le pouvoir de résolution du microscope interférométrique 3D devient insuffisant pour résoudre cet échantillon à partir du moment où les deux sillons ne sont plus discernables mais apparaissent comme un seul et large sillon, du fait de la limite de résolution optique.

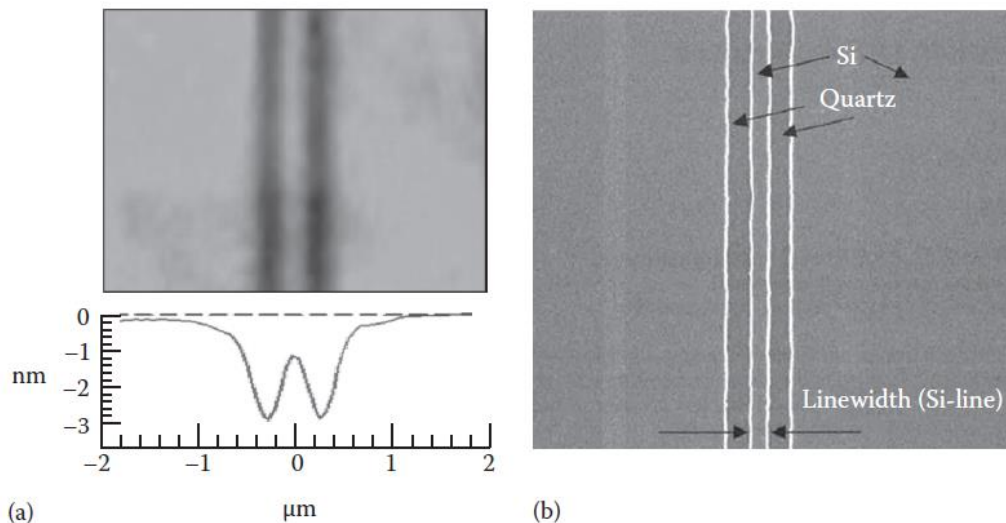


Figure 1-10. Image 3D et profil de deux rainures parallèles de 200 nm de largeur (a) observée avec un microscope Supracon AG utilisant un objectif de Mirau x200 ( $ON = 0,85$ ) et (b) observée au MEB. La séparation des rainures (centre à centre) est de 400 nm (de Groot et al., 2012).

Lorsque la distance de séparations de deux structures est très proche de la limite la résolution classique du microscope optique, la réponse du système ne peut plus être supposée linéaire. La définition classique de la résolution peut être appliquée aux systèmes optiques 3D seulement pour des échantillons en dessous d'une certaine hauteur, définie comme la hauteur pour laquelle la

réponse du système est linéaire et est égale à quelques dizaines de nanomètres pour les microscopes interférométriques classiques dans le visible (de Groot & Lega, 2006). Cette hauteur ne limite évidemment pas la gamme de hauteur mesurable par l'instrument optique qui peut être de plusieurs dizaines (voire centaines) de microns. Elle s'applique seulement dans le cas de bords droits espacés d'une distance très proche de la limite de résolution latérale du système (de Groot, 2015b).

La fonction de transfert d'un instrument (en anglais ITF : *Instrument Transfer Function*) est la fonction qui décrit la réponse d'un système en fonction d'un signal de fréquence d'entrée. En général, l'ITF est appliqué pour des systèmes linéaires. Cependant, beaucoup d'instruments de métrologie 3D ne sont pas linéaires à des fréquences élevées, comme par exemple le profilomètre à stylet. Néanmoins, dans le cas de profilomètres optiques, l'ITF peut être considérée linéaire pour certaines conditions bien définies (de Groot & Lega, 2006). En effet, comme tout système convertissant la phase du front d'onde en information de hauteur, les interféromètres sont des systèmes non linéaires. Mais, en interférométrie dans le cas où la hauteur des objets est très petite par rapport à  $\lambda/4$ , la phase de l'objet est convertit en amplitude, alors la limite de la résolution latérale du microscope 3D correspond à la résolution en 2D du microscope optique et l'ITF est égale la FTO du système (Colonna De Lega & de Groot, 2012). Par conséquent, un moyen d'obtenir la limite de résolution d'un interféromètre dans ce cas particulier serait de déterminer la fréquence spatiale pour laquelle l'ITF est à 50% du maximum mesuré. La définition de cette fréquence de coupure optique est décrite dans la norme ISO 25178-604 (ISO 25178-604, 2013).

Une autre façon de déterminer la limite de résolution d'un microscope 3D est de trouver la fréquence ou période d'un réseau (ou surface sinusoïdale) pour laquelle la hauteur mesurée est égale à 50% de la hauteur nominale réelle de la surface (de Groot, 2015a; Leach, 2011). En pratique, la résolution latérale en microscopie 3D dépend de la hauteur de l'objet étudié, de sa forme (réseaux carrés ou sinusoïdales), de l'éclairage et de l'algorithme de reconstruction 3D. La figure 1-11 montre les mesures réalisées sur un réseau carré en silicium de 300 nm de période et de 140 nm de hauteur. La courbe en bleu représente la hauteur de ce réseau mesurée avec un microscope interférométrique de type Linnik avec deux objectifs de grossissement x100 (ON = 0,9) en LED bleue ( $\lambda = 460$  nm) avec un algorithme de détection de l'enveloppe des franges (cf. section 1.6.2) et donc sans utiliser la phase.

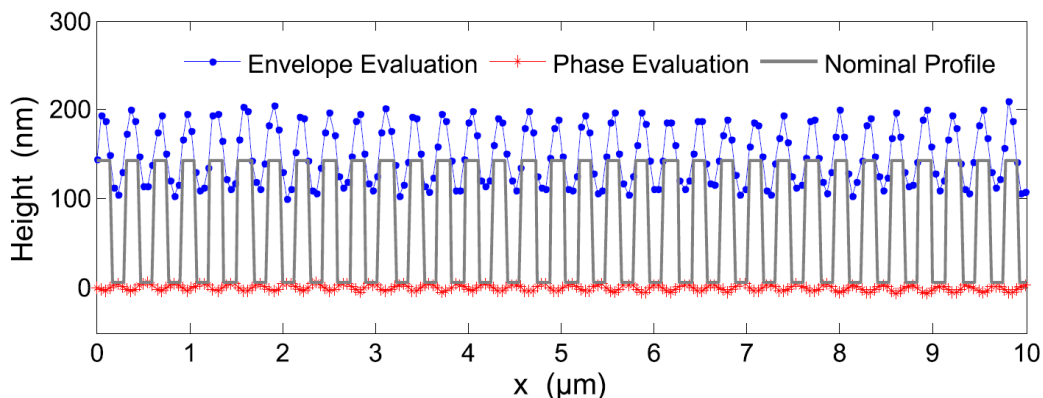


Figure 1-11. Profils d'un réseau carré en silicium (SiMetrics RS-N) de 300 nm de période et de hauteur 140 nm obtenus avec l'algorithme de détection de l'enveloppe des franges (bleu) et de décalage de phase (rouge). La hauteur réelle du réseau est donnée en noir (Lehmann et al., 2016).

La courbe en rouge montre les mesures obtenues avec un autre algorithme, utilisant cette fois-ci la phase (cf. section 1.6.1). Alors que le critère de Rayleigh donne une résolution latérale

théorique de 312 nm, les mesures en bleu montrent que les structures périodiques du réseau (légèrement en-dessous de la limite de résolution théorique) sont latéralement résolues, avec une hauteur égale à 50% de la hauteur réelle. Cependant, les mesures de hauteurs obtenues en utilisant la phase (en rouge) ont une amplitude bien en-dessous du critère des 50% de la hauteur réelle et donc selon ce critère de résolution 3D, ce réseau n'est pas latéralement résolu, même si on peut distinguer les périodes du réseau (Lehmann et al., 2016).

On peut également considérer le pouvoir de résolution axiale d'un microscope 3D, qui peut être  $< 1$  nm, pour une mesure nanométrique de rugosité d'une surface, ou la mesure d'une marche, à condition d'avoir une surface plane autour, couvrant une distance plus grande que la limite de diffraction donnée par le critère de Rayleigh (Seppä et al., 2013).

### 1.3 Etude comparative des microscopies optique et champ proche

Il existe de nombreux types de microscopies. On peut considérer les trois grandes familles de microscopies les plus couramment utilisées : la microscopie optique, la microscopie électronique et la microscopie à sonde locale. Ces trois techniques ne sont pas forcément concurrentes car elles n'ont pas toujours le même domaine d'application (cf. figure 1-12).

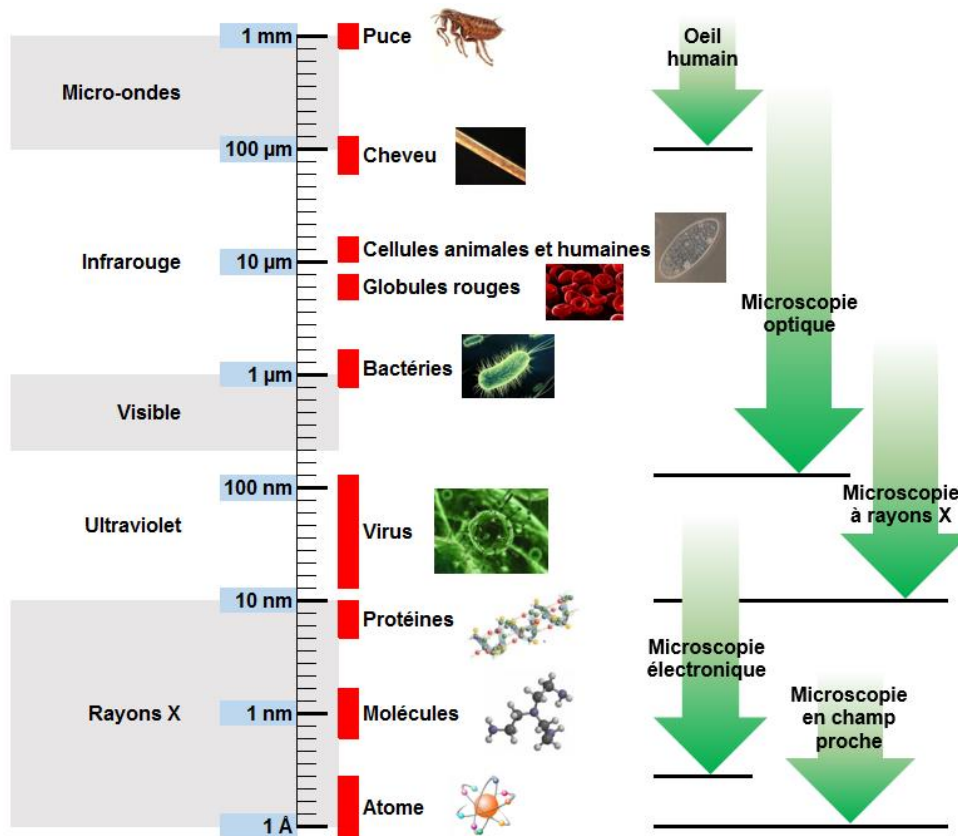


Figure 1-12. Représentation des domaines d'application des différentes techniques de microscopie en fonction de leur résolution latérale.

La microscopie optique consiste à utiliser un faisceau lumineux qui va interagir avec l'objet à observer et dont la réflexion sous éclairage épiscopique ou la transmission sous éclairage diacopique va être enregistrée par un détecteur matriciel. Etant donné qu'elle possède de nombreux paramètres modifiables tels que la longueur d'onde ou la polarisation par exemple, il existe donc de nombreuses possibilités d'exploiter cette technique en imagerie. Cependant, la

microscopie optique étant limitée en résolution jusqu'à 200 nm avec une source de lumière en ultra-violet (UV), augmenter le grossissement pour observer un objet de taille en-dessous de cette limite n'augmenterait pas la résolution pour autant mais ne mènerait qu'à diminuer la netteté de l'image.

En 1924, Louis de Broglie a formulé dans sa thèse l'hypothèse que toutes les particules devaient avoir une longueur d'onde. Afin de parvenir à voir des détails plus petits, l'idée a été d'utiliser une particule ayant une longueur d'onde plus petite que celle du photon UV : l'électron. Le premier microscope électronique fut réalisé en 1932 par E. Ruska et M. Knoll. La microscopie électronique consiste à utiliser un faisceau d'électrons et à récupérer les informations provenant de l'interaction de ces électrons avec l'échantillon. La microscopie électronique à balayage (MEB) (Masters, 2009) est une technique couramment utilisée pour l'analyse des surfaces. Elle a les avantages d'avoir une grande résolution puisqu'il est possible de travailler à l'échelle nanométrique, avec un champ de vision allant de quelques micromètres cubes à quelques centimètres cubes et une grande profondeur de champ allant jusqu'à plusieurs centaines de micromètres. Cependant, cette technique a comme inconvénients d'être très coûteuse, de nécessiter la mise sous vide, d'être difficile à calibrer et de ne pouvoir mesurer que des échantillons conducteurs sans surcoût important. Un échantillon de nature non conducteur peut tout de même être étudié au microscope électronique mais seulement après avoir déposé une mince couche d'or, ce qui empêche l'observation d'échantillons vivants, qui doivent être en outre chimiquement fixés et déshydratés avant de pouvoir être observés. En outre, il y a un risque de dégradation des échantillons à étudier à cause des bombardements électroniques souvent intenses dans le vide. Néanmoins, aujourd'hui il existe le microscope électronique environnemental, sous vide partiel, qui permet l'analyse d'échantillons biologiques.

Il est également possible d'utiliser la microscopie électronique avec des rayons X. Cette technique est appelée microscopie à rayons X. L'utilisation de la microscopie à rayons X mous permet l'étude d'échantillons biologiques directement, c'est-à-dire sans devoir les préparer au préalable. Sa résolution est meilleure que celle de la microscopie optique mais ne surpasse pas celle de la microscopie électronique et peut atteindre 15 nm (Chao et al., 2005).

Ensuite, dans notre histoire, il a fallu attendre les années 1980 pour voir la naissance d'un autre type de microscopie haute résolution : la microscopie à sonde locale ou aussi appelée microscopie en champ proche. Cette technique utilise un capteur sonde (pointe très fine) qui vient interagir directement avec la surface de l'objet à observer. Sa résolution peut atteindre l'échelle atomique mais les échantillons observés sont généralement restreints à des surfaces relativement planes. Parmi les techniques de microscopies en champ proche, on retrouve la microscopie à effet tunnel (en anglais STM : *Scanning Tunneling Microscope*), la microscopie optique en champ proche (en anglais SNOM : *Scanning Near-field Optical Microscope*), qui utilise la présence d'ondes optiques évanescentes à la périphérie immédiate d'une surface, qui sont captées par une fibre taillée en pointe (Betzig et al., 1986), ou encore la microscopie à force atomique (en anglais AFM : *Atomic Force Microscopy*). L'AFM est composé d'une pointe positionnée sous un bras de levier, réalisé à partir d'une poutre encastrée libre calibrée et en silicium (cf. figure 1-13). L'échantillon est déplacé au-dessous de cette pointe avec ou sans contact. Lorsque le cluster d'atomes constituant le bout de la pointe se rapproche de la surface de l'échantillon, ils s'attirent : c'est l'interaction de Van der Waals. La déflexion du bras de levier est alors mesurée par la déviation d'un faisceau laser réfléchi par un miroir et récupéré par une photodiode. L'amplitude de la déflexion en est alors enregistrée à chaque position X et Y permettant ainsi d'obtenir une cartographie des forces d'interaction entre la pointe et la surface et donc d'obtenir une image 3D



de l'échantillon à observer (Binnig et al., 1986). Deux modes de fonctionnement ont été développés : les modes contact et sans contact diffèrent des points de vue de la détection. En effet, le mode sans contact consiste à mesurer des décalages de fréquence de résonance de la poutre mise en vibration en fonction de sa position à la surface. Le microscope AFM XE-70 de Park Systems disponible à ICube (plateau technique de l'équipe IPP), est placé dans une enceinte permettant d'empêcher toute vibration sonore extérieure de perturber les mesures. Sa pointe de 2 nm de rayon permet de balayer une surface de 25x25  $\mu\text{m}$  pour 256x256 pixels, avec une résolution latérale de 0,1  $\mu\text{m}$ . Bien que l'AFM a l'avantage d'avoir une résolution nanométrique, cette technique a les inconvénients d'avoir un champ réduit à quelques centaines de  $\mu\text{m}^2$ , un temps de mesure relativement long et une usure rapide de la pointe.

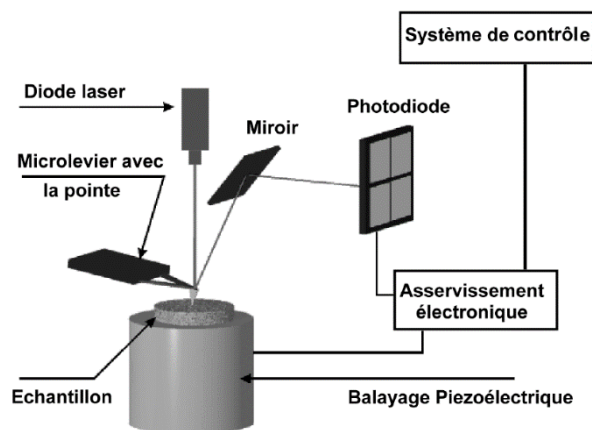


Figure 1-13. Schéma de fonctionnement d'un AFM (Benatmane, 2002).

## 1.4 Techniques classiques pour se rapprocher de la résolution ultime en microscopie optique

Afin de se rapprocher au plus près de la limite de résolution, on peut soit réduire la longueur d'onde (Chang & Kino, 1998; Montgomery & Montaner, 1999), soit augmenter l'ouverture numérique de l'objectif ou par immersion en augmentant l'indice de réfraction du milieu entre l'objectif et l'objet à observer (Friskin Gibson & Lanni, 1992).

### 1.4.1 Réduction de la longueur d'onde

Une source lumineuse cohérente UV de grande intensité peut être utilisée avec un objectif de grande ouverture numérique pour améliorer la résolution latérale. En effet, en utilisant une lumière de faible cohérence et à large bande spectrale dans un microscope interférométrique, on balaye une enveloppe étroite de franges sur la surface de l'échantillon, ce qui donne par conséquent une profondeur nanométrique et une résolution latérale améliorée comparée à un microscope classique.

Afin de résoudre de petits détails, des sources lumineuses de faibles longueurs d'onde doivent être utilisées. Cependant, elles ont tendance à avoir des longueurs de cohérence plus élevées, ce qui rend l'enveloppe des franges plus large et réduit donc la résolution. Alors qu'une source lumineuse à large bande spectrale est généralement utilisée pour obtenir une enveloppe de franges plus étroite, il a été montré avec une source laser rouge (Montgomery et al., 1997), qu'utiliser des objectifs de grande ouverture numérique et de faible profondeur de champ permet de contrôler la forme de l'enveloppe des franges.

L'enveloppe des franges est utilisée comme sonde optique en identifiant le point de cohérence maximale entre la lumière du faisceau de référence et celle du faisceau objet se trouvant au pic de l'enveloppe en utilisant un traitement d'image. Comme la position du plan est connue par calibration, la position de la surface à ce point peut être déterminée. La résolution axiale dépend de la largeur de l'enveloppe des franges qui peut être déterminée soit à partir de la longueur de cohérence de la source lumineuse, soit à partir de la profondeur de champ de l'objectif. Cette profondeur de champ correspond généralement à 80% de l'intensité maximale de l'image obtenue avec le microscope. Elle s'exprime de la façon suivante :

$$DOF = \frac{n\lambda}{ON} \quad \text{Eq. (1-11)}$$

avec  $\lambda$  la longueur d'onde,  $n$  l'indice de réfraction du milieu, et  $ON$  l'ouverture numérique. L'enveloppe des franges est plus étroite pour une profondeur de champ plus petite et une ouverture numérique plus grande. Pour un grandissement plus grand et une ouverture numérique plus élevée, des sources lumineuses de longueurs d'ondes plus petites avec des longueurs de cohérence plus faibles peuvent être utilisées pour améliorer la résolution latérale. Chang et al. ont démontré comment réaliser un interféromètre de Mirau dans le domaine de l'UV (325 nm) avec des objectifs à faible distance de travail (100  $\mu\text{m}$ ), avec une ouverture numérique de 0,95 (Chang & Kino, 1998).

#### 1.4.2 Augmentation de l'ouverture numérique de l'objectif

Des objectifs à grande ouverture numérique peuvent être utilisés avec le microscope de Linnik (Dubois et al., 2002; Pfortner & Schwider, 2001) pour améliorer la résolution latérale. La résolution latérale d'un système imageur correspond à la largeur à mi-hauteur de la PSF  $h(u)$ , communément appelé fonction d'Airy :

$$h(u) = \left[ \frac{2J_1(u)}{u} \right]^2, \text{ avec } u(r) = \frac{2\pi}{\lambda} r NA. \quad \text{Eq. (1-12)}$$

Mais dans le cas d'un microscope interférométrique (comme pour un microscope confocal), l'intensité de la PSF est donné par  $h^2(u)$  (Dubois et al., 2002). La réponse théorique du bord d'un objet est donc obtenue en calculant le produit de convolution d'une fonction porte par le carré de la fonction d'Airy  $h^2(u)$ . La figure 1-14 présente la réponse théorique d'un bord droit en fonction de l'ouverture numérique d'un objectif de microscope pour  $ON = 0,15$ ,  $ON = 0,45$  et  $ON = 0,95$ . On remarque que plus l'ouverture numérique est grande, plus la pente du bord droit se rapproche de  $90^\circ$ .

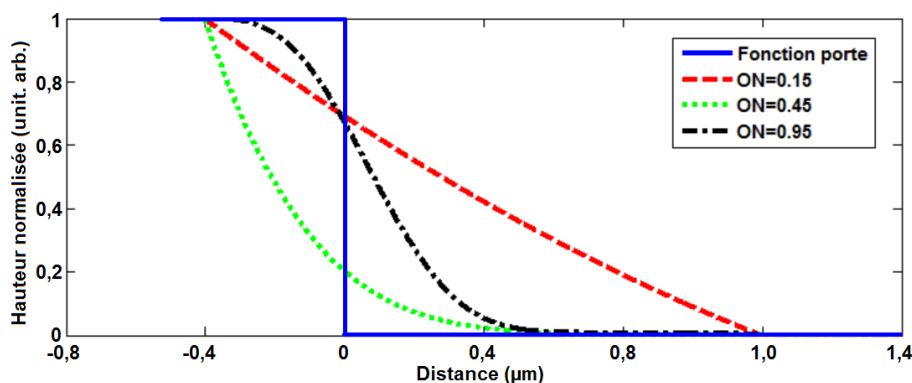


Figure 1-14. Réponse théorique d'un bord pour  $ON=0,15$ ,  $ON=0,45$  et  $ON=0,95$ .

Il est possible d'atteindre une résolution axiale au-dessous du nanomètre et une résolution latérale proche de la limite de diffraction. En outre, l'ouverture numérique de l'objectif peut être reliée à la profondeur de champ ainsi qu'au grossissement. Par conséquent, les objectifs à grande ouverture numérique permettent d'améliorer la résolution du microscope, mais, en contrepartie, la distance de travail ainsi que la faible profondeur de champ et le champ de vision sont réduites.

### 1.4.3 Augmentation de l'ouverture numérique par l'utilisation d'objectifs à immersion

L'indice de réfraction  $n$  est lié à l'ouverture numérique  $ON$  de la façon suivante :

$$ON = n \sin(\alpha) \quad \text{Eq. (1-13)}$$

avec  $\alpha$  le demi-angle du cône d'ouverture de l'objectif. Les objectifs travaillant dans l'air ( $n = 1$ ) ont une  $ON$  limitée à 0,95. Pour augmenter l' $ON$  et avoir un meilleur pouvoir séparateur on introduit de l'eau ( $n = 1,33$ ) ou de l'huile ( $n = 1,52$ ) entre l'objectif et l'échantillon à étudier. Les objectifs travaillant dans ce type de liquide sont appelés objectifs à immersion (Frisken Gibson & Lanni, 1992). Ils permettent d'observer des détails plus fins et peuvent atteindre une  $ON$  de 1,40 pour les objectifs apochromatiques, c'est-à-dire qui ont été corrigés des aberrations chromatiques. La figure 1-15 montre les effets sur les rayons en fonction de l'indice de réfraction.

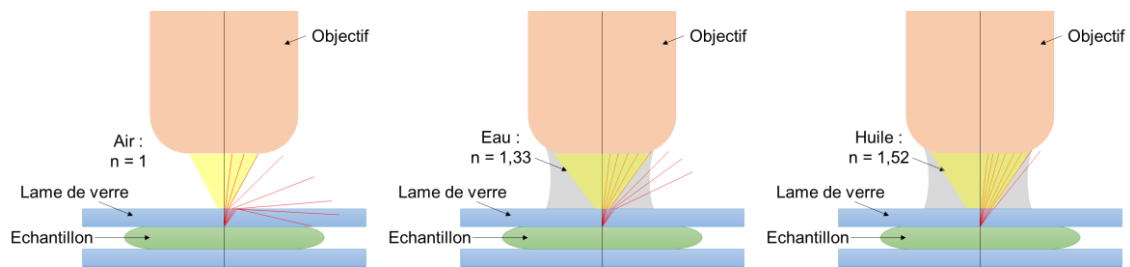


Figure 1-15. Effets sur les rayons en fonction de l'indice de réfraction.

### 1.4.4 Limitations des techniques actuelles dues au bruit et théorème de Nyquist-Shannon

Les critères de résolution donnent une indication théorique sur la limite de résolution d'un système optique. Cependant, cette résolution n'est généralement pas atteinte en pratique à cause des aberrations géométriques (aberration sphériques, astigmatisme, distorsion, etc.) et chromatiques dues aux lentilles (Mahajan, 2011) ainsi que l'utilisation de matrices de capteurs électroniques dont l'emploi est généralisé dans les microscopes actuels. Or, les critères de résolution ne prennent pas en compte le bruit introduit par le système sur les images, qui influe sur le pouvoir de résolution et la limite de détection du système optique. En effet tout système électronique présente un bruit minimum. Pour un capteur photographique électronique, ce bruit limite sa capacité de détection. Le bruit le plus important dans tout système électronique est le bruit thermique, également appelé bruit de résistance, ou encore bruit de Johnson-Nyquist. Aux bornes d'une résistance en équilibre thermique, le bruit thermique généré peut être exprimé par la formule de Nyquist suivante :

$$\overline{v_b^2} = 4k_b \cdot T \cdot R \cdot \Delta f \quad \text{Eq. (1-14)}$$

avec  $\overline{v_b^2}$  la variance de la tension aux bornes de la résistance  $R$ ,  $k_b = 1,3806 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température absolue de la résistance exprimée en Kelvin et  $\Delta f$  la bande passante considérée. Ce bruit thermique peut être approximé par un bruit blanc gaussien et induit des erreurs de mesures appelé bruit de mesure dû aux charges et aux décharges d'une

capacité dans un circuit et est donc particulièrement élevé pour des capteurs à transferts de charge (CCD : *charge coupled device*) (Johnson, 1928; Nyquist, 1928).

En outre du bruit généré par le système, d'autres sources extérieures de dégradations peuvent intervenir, comme des vibrations extérieures ou encore une illumination non uniforme. L'ensemble de ces bruits forme ce qu'on appelle en traitement du signal le bruit de fond. Plus le signal décroît vers le bruit de fond, plus il sera difficile de récupérer l'information transportée (Shannon, 2001). Une solution pour diminuer autant que possible le bruit thermique est de refroidir le système et dans certains cas, des techniques de traitement du signal peuvent être appliquées afin de réduire le bruit de fond (Galbraith & Galbraith, 2011). Certaines de ces techniques de traitement d'images feront l'objet d'une étude plus approfondie présentée au chapitre 3.

## 1.5 Introduction au domaine de la nanoscopie optique

### 1.5.1 Emergence d'une nouvelle notion : la nanoscopie optique

Pendant longtemps, les scientifiques pensaient donc que la limite de résolution d'un microscope optique était de 200 nm, mais à partir des années 1990 des techniques dites de super-résolution, capables de dépasser cette limite, sont apparues, améliorant ainsi la résolution de façon exponentielle (cf. figure 1-16). Il est maintenant possible d'atteindre une résolution latérale inférieure à 30 nm et théoriquement d'aller encore plus loin. En effet, en 2014, le Prix Nobel de Chimie a été décerné à Eric Betzig, Stefan W. Hell et William Moerner pour leurs travaux, donnant une nouvelle dimension à la microscopie optique en utilisant des molécules fluorescentes (Ehrenberg, 2014). En conséquence, la microscopie haute résolution est devenue ce qu'on appelle aujourd'hui la « nanoscopie ». Il existe deux grandes catégories de nanoscopie optique : en champ proche et en champ lointain (Montgomery & Leong-Hoi, 2015).

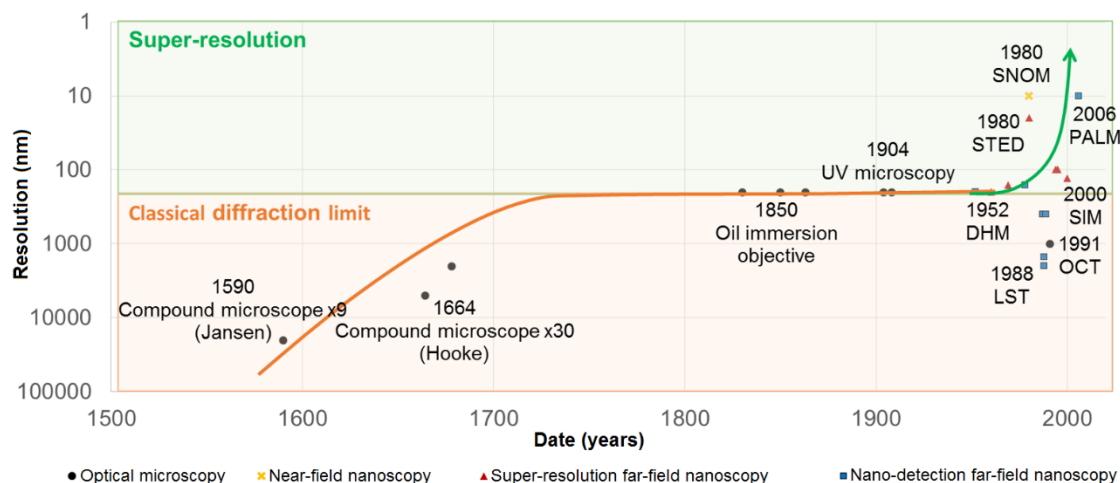


Figure 1-16. Evolution de la résolution optique au cours du temps.

### 1.5.2 Nanoscopie en champ proche

En 1928, afin de compenser l'effet de diffraction de la lumière, Edward Synge a proposé d'éclairer un échantillon à travers une feuille de métal mince et opaque avec des trous de taille sub-longueur d'onde, placée à moins de 100 nm de la surface de l'objet à étudier. En balayant point par point le spécimen à travers cet éclairage, une image peut être enregistrée avec une résolution optique inférieure à la limite de diffraction. Cependant, la réalisation expérimentale d'un microscope

optique en champ proche (SNOM) n'a été possible qu'à partir des années 1980 à cause des difficultés liées à la fabrication des trous nanoscopiques et de leur positionnement précis. (Weisenburger & Sandoghdar, 2015). La microscopie SNOM contourne la limite de diffraction en utilisant un détecteur, comme une pointe, placé très près de la surface. En effet, les effets de la diffraction ne surviennent lorsque l'on est très proche de la source, là où se trouvent les ondes évanescentes qui sont non propagatives. Ces ondes évanescentes contiennent les informations de hautes fréquences spatiales de la lumière et de l'objet observé mais leurs intensités décroissent de manière exponentielle à mesure que l'on s'éloigne de l'échantillon.

Cette technique est limitée en résolution non plus par la longueur d'onde de la lumière d'éclairage mais par la taille de la sonde utilisée comme détecteur. Sa résolution latérale est de l'ordre de 20 nm et sa résolution axiale est d'environ de 2 à 5 nm (Dürig et al., 1986; Oshikane et al., 2007). Les inconvénients de la microscopie SNOM sont sa très faible distance de travail, sa faible profondeur de champ qui limite son utilisation qu'à l'étude des surfaces, ainsi que la difficulté d'étudier des objets mous.

### 1.5.3 Nanoscopie en champ lointain

La nanoscopie optique en champ lointain est une des nouvelles techniques d'imagerie haute résolution, aujourd'hui largement utilisée en biophysique et en imagerie biomédicale, pour imager et caractériser des nanostructures, tout en conservant tous les avantages de l'imagerie optique en champ lointain comme un vaste champ, la visualisation et l'analyse en temps réel, ainsi que la possibilité d'évolution vers une plus grande précision.

#### 1.5.3.1 Distinction entre les techniques de super-résolution et de nano-détection

Il existe de nombreuses techniques de nanoscopie optique en champ lointain, qui diffèrent néanmoins les unes des autres selon plusieurs critères. Dans (Montgomery et al., 2012a), nous avons proposé un premier schéma de classification des principales techniques de nanoscopie optique disponibles afin d'aider à mieux comprendre les différents concepts à l'origine de ces méthodes et afin de recenser leurs performances. Cette classification a ensuite été améliorée dans (Montgomery & Leong-Hoi, 2015), puis de nouveau dans (Montgomery et al., 2016). Elle est représentée en figure 1-17, dans laquelle se trouvent différentes techniques de nanoscopie dont les abréviations sont expliquées dans le tableau 1-2.

La figure 1-18 présente certaines techniques de nanoscopie en fonction de la résolution latérale réelle et de la taille du plus petit objet pouvant être détecté. Une distinction est présentée entre les différentes techniques de nanoscopie optique en champ lointain : les techniques de super-résolution et les techniques de nano-détection. Les techniques de super-résolution permettent une réelle amélioration de la résolution latérale et peuvent être capables de fournir des détails à plus haute résolution. Concernant les techniques de nano-détection, bien que limitées par la diffraction, elles peuvent dans de nombreux cas faire apparaître des nanostructures pour les rendre observables voire caractérisables, sans nécessairement pouvoir résoudre tous les détails. Puis, nous avons reconsidéré ce schéma de classification en y ajoutant des techniques et des catégories supplémentaires qui peuvent être différenciées selon leur nécessité d'utiliser ou non des nano-marqueurs fluorescents ou en or.

Parmi les techniques de super-résolution sans marquage, la microscopie tomographique numérique (en anglais TDM : *Tomographic Digital Microscopy*) est une technique qui consiste à faire varier l'angle d'éclairage afin d'augmenter la taille de l'ouverture numérique, améliorant

ainsi la résolution d'un facteur 2, sur des images de diatomées (atteignant une résolution latérale de 97 nm). De plus, une technique utilisant une lentille de diffusion (en anglais SL : *Scattering Lens*) permet d'obtenir une amélioration de la résolution d'un facteur 5 et peut être utilisée par exemple en endoscopie pour imagier des cellules.

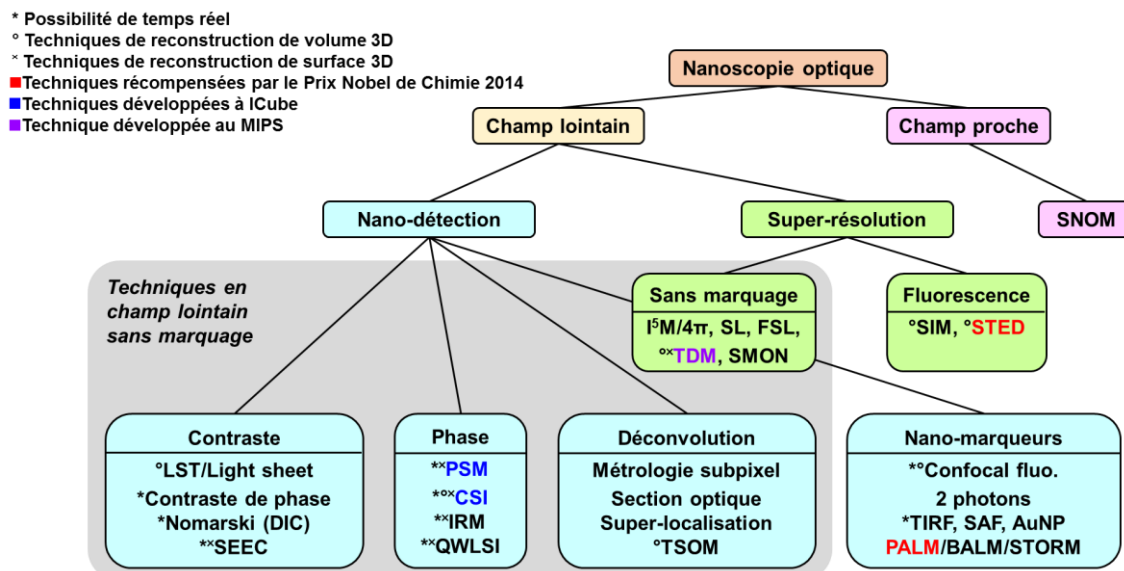


Figure 1-17. Schéma de classification pour les techniques de super-résolution et de nano-détection.

Tableau 1-2. Tableau des abréviations des techniques de nanoscopie optique.

Abréviations	Technique	Abréviations	Technique
<b>4π</b>	4π microscopy	<b>QWLSI</b>	Quadriwave lateral shearing interferometry
<b>AuNP</b>	Gold nanoparticles	<b>SAF</b>	Supercritical angle fluorescence
<b>BALM</b>	Bleaching (or blinking) assisted localization microscopy	<b>SEEC</b>	Surface enhanced ellipsometric contrast microscopy
<b>Confocal fluo</b>	Confocal fluorescence microscopy	<b>SIM</b>	Structured illumination microscopy
<b>CSI</b>	Coherence scanning interferometry	<b>SL</b>	Scattering lens microscopy
<b>FSL</b>	Far field superlens	<b>SMON</b>	Submerged microsphere optical nanoscopy
<b>I°M</b>	Combination of I°M (interference illumination microscopy) and I°M (incoherent interference illumination microscopy)	<b>SNOM</b>	Scanning near-field optical microscopy
<b>IRM</b>	Interference reflection microscopy	<b>STED</b>	Stimulated emission depletion
<b>LST</b>	Laser scanning tomography	<b>STORM</b>	Stochastic optical reconstruction microscopy
<b>Nomarski</b>	Differential interference contrast (DIC) microscopy	<b>TDM</b>	Tomographic diffractive microscopy
<b>PALM</b>	Photo-activated localization microscopy	<b>TIRF</b>	Total internal reflection
<b>PSM</b>	Phase-stepping microscopy	<b>TSOM</b>	Through-focus scanning optical microscopy

La technique permettant d'imager, quant à elle, à travers une microsphère immergée dans de l'eau est la technique SMON (pour *Submerged Microsphere Optical Nanoscopy*) et peut atteindre une résolution latérale de 50 nm. En ce qui concerne les techniques de nano-détection, on distingue quatre catégories. Les techniques de mesures utilisant le contraste, comme la microscopie SEEC (pour *Surface Enhanced Ellipsometric Contrast*), qui consiste à augmenter le contraste en réduisant le signal de fond dans un système de lumière polarisée croisée, peuvent permettre d'observer sans marquage les traces laissées par des bactéries en mouvement (Ausseré & Valignat, 2007).

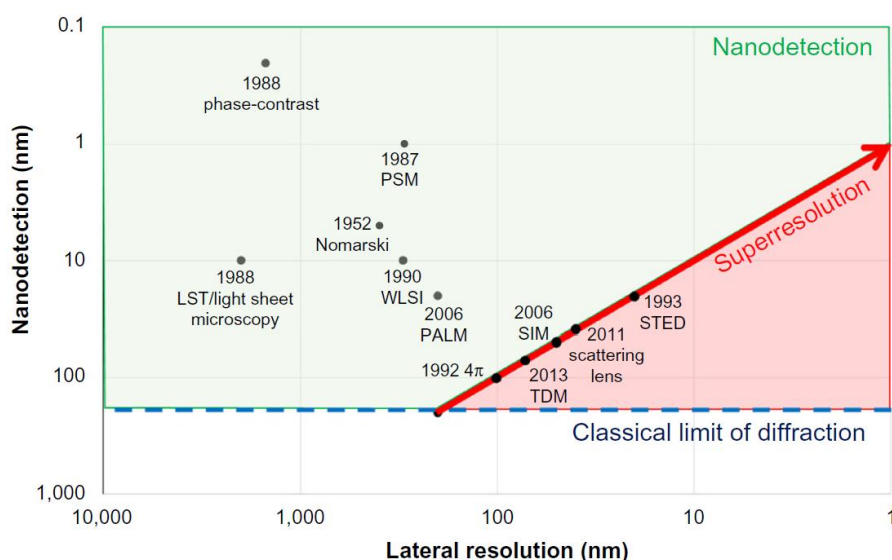


Figure 1-18. Graphique des techniques de super-résolution et de nano-détection en fonction de la résolution latérale réelle et de la taille du plus petit objet pouvant être détecté.

La microscopie interférométrique utilise, quant à elle, la phase en temps réel pour extraire les informations nanométriques 3D de surfaces dans la direction Z. Cette technique peut être utilisée pour l'analyse de surface ou encore en tomographie optique, pour obtenir des tranches et des volumes de couches transparentes ou semi-transparentes sans marquage. Une autre possibilité est de recourir à des méthodes de déconvolution, comme la microscopie TSOM (pour *Through-focus Scanning Optical Microscopy*), basées sur la connaissance de la fonction de transfert du système optique et permettant de mesurer la position de structures simples et régulières (petites particules ou motifs réguliers) à l'aide de la super-localisation. Les applications possibles sont nombreuses. En biologie, il est possible de mesurer les positions de molécules individuelles dans des cellules. En sciences des matériaux ces techniques peuvent être utilisées pour mesurer la distribution 3D des défauts dans des semi-conducteurs. Des techniques utilisant des nano-marqueurs pour effectuer des mesures telles que la microscopie STORM (pour *STochastic Optical Reconstruction Microscopy*) peuvent être utilisées en imagerie médicale afin d'observer les filaments des cellules (Genova et al., 2013). Ainsi, en allumant et éteignant des molécules fluorescentes, des images haute-résolution de structures intra-cellulaires peuvent être générées.

### 1.5.3.2 Nanoscopie en fluorescence

En champ lointain, la nanoscopie en fluorescence a connu plusieurs développements importants dans les années 1980 et fait à présent partie des développements les plus réussis des dernières décennies. Il existe deux principales approches à cette technique. La première consiste à exciter spatialement les molécules fluorescentes (STED, SSIM) et la deuxième consiste à localiser une molécule individuellement (STORM, PALM). Ces techniques de nanoscopie en fluorescence sont

déjà largement utilisées en sciences du vivant, comme la biologie cellulaire, la microbiologie et de la neurobiologie, et ont un grand avenir dans les domaines de la biologie et de la médecine.

### 1.5.3.2.1 Microscopie confocale à balayage

La microscopie confocale à balayage (en anglais LSCM : *Laser scanning confocal microscopy*) est une technique non destructive (cf. [figure 1-19](#)) qui consiste à réaliser des images de faible profondeur de champ, ne dépassant pas environ 400 nm, appelées « sections optiques » à la fois dans les plans XY et XZ (parallèle à l'axe optique) permettant ainsi des reconstructions tridimensionnelles ([Roblin, 1999](#)). Bien que le principe ait été breveté par Marvin Minsky en 1957, il a fallu 20 ans jusqu'à l'invention du laser approprié et les progrès dans les acquisitions de données informatisées pour une utilisation plus répandue.

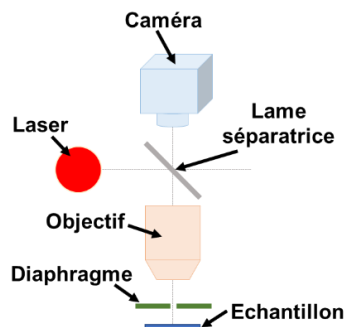


Figure 1-19. Schéma de la microscopie confocale à balayage.

La taille latérale de la PSF peut être améliorée théoriquement par un facteur de  $\sqrt{2}$  en microscopie confocale. La microscopie confocale fluorescente basée sur l'utilisation des produits fluorescents permet d'observer des structures 3D et est généralement utilisée dans les domaines de la biologie cellulaire, neurologie, immunologie, cancérologie, biophysique, génétique, etc... Cette technique présente de nombreux avantages comme une résolution latérale submicronique (améliorée d'un facteur 0,83 par rapport à la microscopie optique classique), une résolution axiale de 0,1  $\mu\text{m}$  (à 10 nm, en théorie) ou encore la possibilité d'imager des structures transparentes complexes. Cependant, un des inconvénients le plus important de cette microscopie est le temps de mesure qui peut prendre jusqu'à quelques dizaines de minutes pour des mesures 3D.

### 1.5.3.2.2 Microscopie sous illumination structurée

La microscopie SIM, comme présentée dans la [figure 1-20](#), consiste à illuminer un échantillon à l'aide d'un champ de lumière à motifs de franges, typiquement sinusoïdales. L'interférence entre le motif d'illumination et le motif (fluorescent) de l'échantillon forme un nouveau réseau, appelé « motif de Moiré ».

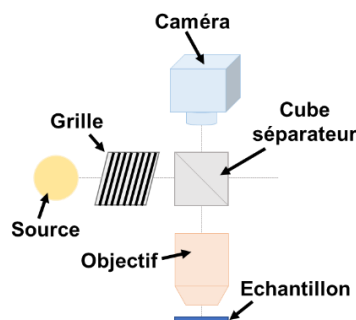


Figure 1-20. Schéma de la microscopie sous illumination structurée.



En enregistrant une série d'images pour différentes orientations et phases des franges, on peut reconstruire l'image complète avec une résolution latérale pouvant atteindre 100 nm (Gustafsson, 2005; Gustafsson et al., 2000). Le motif de Moiré qui en résulte a également une structure tridimensionnelle, qui permet après reconstruction d'obtenir une meilleure résolution axiale. Un des avantages de cette technique est la flexibilité en termes de fluorophores utilisés mais a comme inconvénient d'être relativement lent puisqu'elle nécessite l'acquisition de plusieurs images.

#### 1.5.3.2.3 Microscopie à déplétion par émission stimulée

La microscopie à déplétion par émission stimulée (en anglais STED : *Stimulated-Emission-Depletion*) consiste à exciter les fluorophores introduits dans l'échantillon à observer puis à inhiber la fluorescence dans la zone périphérique du volume d'excitation. Son principe est présenté dans la figure 1-21. Sa résolution latérale est typiquement de 50 nm et sa résolution axiale est environ de 100 à 200 nm. Cependant, cette technique est relativement lente, complexe et coûteuse. Stefan Hell proposa d'exploiter le principe de l'émission stimulée pour diminuer la fluorescence des molécules dans la partie extérieure de l'éclairage, réduisant ainsi la taille efficace de la tache de fluorescence (Hell & Wichmann, 1994). S. Hell reçut le prix Nobel de chimie en 2014 pour ses réalisations dans ce domaine (cf. figure 1-22).

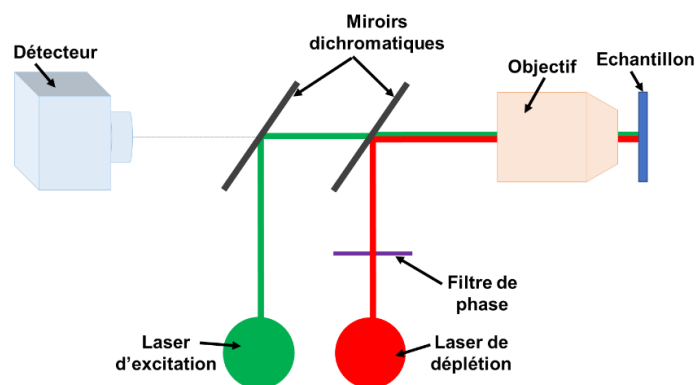


Figure 1-21. Schéma de la microscopie à déplétion par émission stimulée.

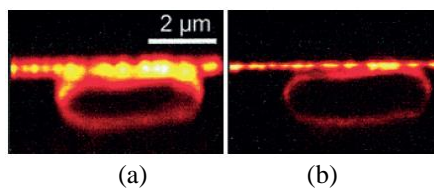


Figure 1-22. Image d'un *E. coli* avec la technique STED. (a) Image avec un microscope classique et (b) un STED (Klar et al., 2000).

#### 1.5.3.2.4 Techniques de fluorescence stochastiques et de super-localisation

Ces techniques reposent sur l'utilisation de marqueurs fluorescents photo-convertibles. Pour pouvoir observer des détails plus fins en utilisant des molécules fluorescentes individuelles, des techniques stochastiques sont nécessaires pour les séparer ainsi que des techniques de super-localisation pour mesurer leurs positions. Les molécules individuelles peuvent être observées en activant et désactivant certaines d'entre elles à un temps donné et en mesurant leurs positions. En les illuminant successivement, une cartographie des molécules peut être établie, une résolution beaucoup plus élevée que celle d'un système d'imagerie classique peut être obtenue avec la microscopie de localisation « par photoactivation » (PALM), dont le principe de fonctionnement est présenté dans la figure 1-23.

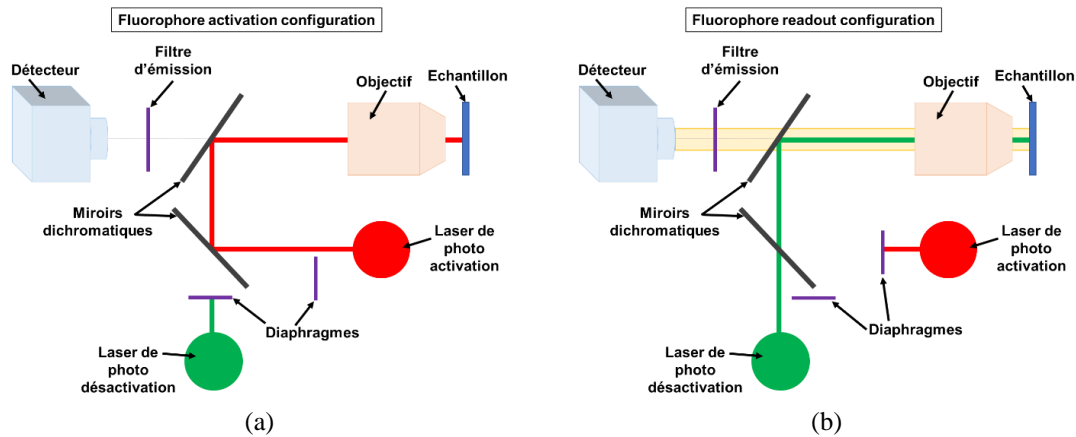


Figure 1-23. Schéma de la microscopie de localisation par photoactivation. (a) Configuration d'activation des fluorophores. (b) Configuration de désactivation des fluorophores.

Un exemple d'images acquises avec un microscope optique classique et la technique PALM est illustré dans la figure 1-24. De nombreux fluorophores pour l'imagerie stochastique ont été mis au point, ce qui a permis l'analyse spatio-temporelle des différents détails structuraux dans les processus cellulaires avec des résolutions latérales de 20 à 40 nm et des résolutions axiales de 10 à 70 nm. D'autres améliorations dans la précision pour la nano-détection des molécules ont été obtenues en utilisant un dispositif à deux objectifs et l'imagerie astigmatique en microscopie STORM 3D à double objectifs. Une dissymétrie est introduite dans la PSF, ce qui permet des mesures avec une plus grande précision des positions des molécules individuelles de 10 nm latéralement et de 20 nm axialement.

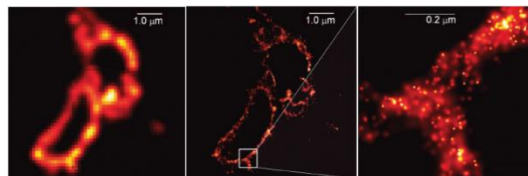


Figure 1-24. Image d'une membrane de lysosome avec la technique PALM. (a) Image avec un microscope classique et (b) un PALM. (c) agrandissement de la zone d'intérêt (Betzig et al., 2006).

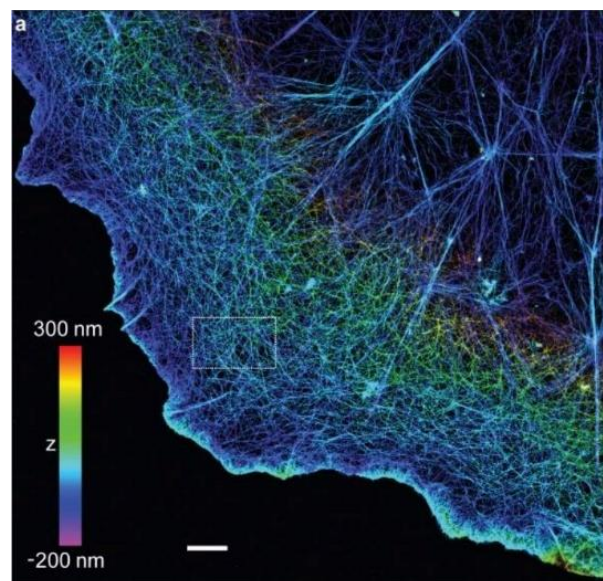


Figure 1-25. Image des filaments d'actine individuels dans une cellule COS-7 (marquée avec des fluorophores Alexa 647-phalloïdine) avec un microscope STORM 3D à double objectif (Xu et al., 2012).

Les résultats de la [figure 1-25](#) montrent la disposition des filaments d'actine individuels dans une cellule COS-7 ([Xu et al., 2012](#)), illustrant bien les détails aidant à la compréhension de la structurelle du cytosquelette d'actine.

### 1.5.3.3 Techniques de nanoscopie optique sans marquage

Bien que les techniques de nanoscopie optique par fluorescence ont pour avantage d'améliorer la résolution et de pouvoir cibler des protéines spécifiques dans les cellules vivantes, elles ont l'inconvénient d'utiliser des marqueurs tels que des molécules fluorescentes, ce qui les rendent intrusives pouvant ainsi causer des modifications sur les bio-objets étudiés et sont limitées dans le temps à quelques dizaines de secondes à cause du photo-blanchiment des fluorophores. Les techniques de nanoscopie **sans marquage** ont la particularité d'être non intrusive et permettent d'imager un grand nombre d'objets dont les échantillons non-fluorescents, comme par exemple des dispositifs électroniques, ou de nombreux virus et des structures sub-cellulaires qui ne peuvent être marqués en utilisant des fluorophores existants. Il existe plusieurs techniques de nanoscopie sans marquage telles que la microscopie I<sup>5</sup>M ([Gustafsson et al., 1999](#)), 4 $\pi$  illumination ([Bewersdorf et al., 2006](#)), la microscopie SL ([van Putten et al., 2011](#)) et la technique FSL (pour *Far field SuperLens*) ([Liu et al., 2007](#)). Dans cette section, les techniques TDM, SL, microscopie à contraste de phase, les techniques utilisant des hyper-lentilles et métamatériaux, TSOM et la microscopie interférométrique en lumière blanche sont décrites.

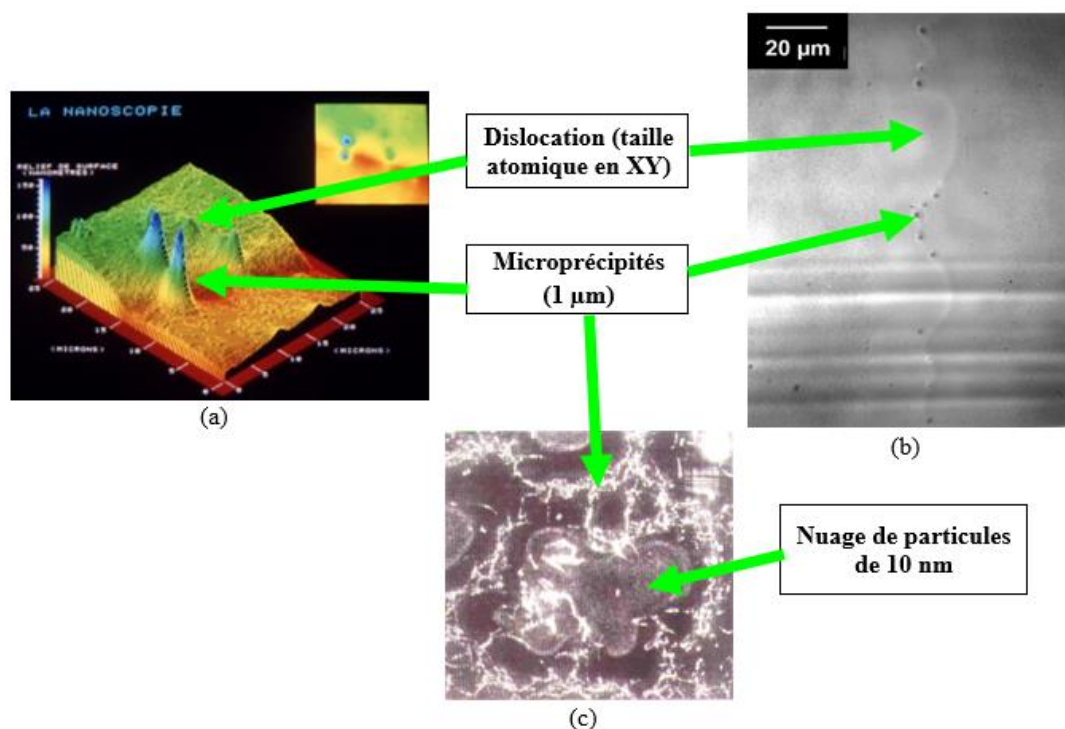


Figure 1-26. Reconstruction 3D avec un microscope interférométrique. Rugosité nanométrique d'un échantillon en phosphure d'indium (InP) dopé à l'étain avec la technique PSM ([Montgomery & Weyher, 2007](#)). (b) Dislocation et microprécipités dans un échantillon d'arséniure de gallium (GaAs) par microscopie à contraste de phase  $\lambda = 800 \text{ nm}$  ([Montgomery, 1990](#)). (c) Microprécipités et nuages de particules de 10 nm dans le GaAs à  $\lambda = 1 \mu\text{m}$  avec la technique LST ([Fillard, 1996](#)).

En effet, plusieurs principes de bases de la nanoscopie en champ lointain sans marqueurs ont été développées au début des années 1990 pour étudier les défauts dans les semi-conducteurs ([Fillard, 1996](#); [Montgomery, 1990](#)). Parmi les techniques de nano-détection sans marquage en utilisant la phase, une rugosité nanométrique a pu être observée après une gravure chimique DSL (*Diluted*

*Sirtl-like etchants used with Light*) d'un échantillon en phosphure d'indium (InP) dopé à l'étain (cf. [figure 1-26\(a\)](#)) en utilisant la technique PSM (*Phase-shifting Microscopy*) ([Weyher & Montgomery, 1990](#)).

En augmentant le contraste, la microscopie à contraste de phase a permis d'observer non seulement des microprécipités de taille de  $1\ \mu\text{m}$  à  $\lambda = 800\ \text{nm}$ , mais aussi une dislocation étendue de taille atomique (en deux des dimensions) dans un échantillon d'arséniure de gallium (GaAs) (cf. [figure 1-26\(b\)](#)) ([Montgomery, 1990](#)). En outre, la technique LST (*Laser Scanning Tomography*) a permis de détecter des microprécipités de  $1\ \mu\text{m}$  et des nuages de particules de  $10\ \text{nm}$  dans le GaAs à  $\lambda = 1\ \mu\text{m}$  (cf. [figure 1-26\(c\)](#)) ([Fillard, 1996](#)). D'autres techniques ont été développées pour déterminer la position sub- $\mu\text{m}$  des microprécipités en étudiant la réponse PSF du système optique ([Fillard, 1996](#); [Fillard et al., 1990](#)).

#### 1.5.3.3.1 Microscopie tomographique numérique

La plupart des informations concernant la forme d'un échantillon micrométrique, telle que sa surface et sa structure 3D peuvent être sauvegardées dans un hologramme numérique en utilisant la technique de la microscopie holographique numérique (en anglais DHM : *Digital Holographic Microscopy*). Cependant, les images reconstruites à partir des hologrammes numériques ont généralement une résolution latérale faible en raison de fréquences spatiales limitées dans le domaine de Fourier qui se dégrade en outre à cause des tavelures (en anglais *speckle*).

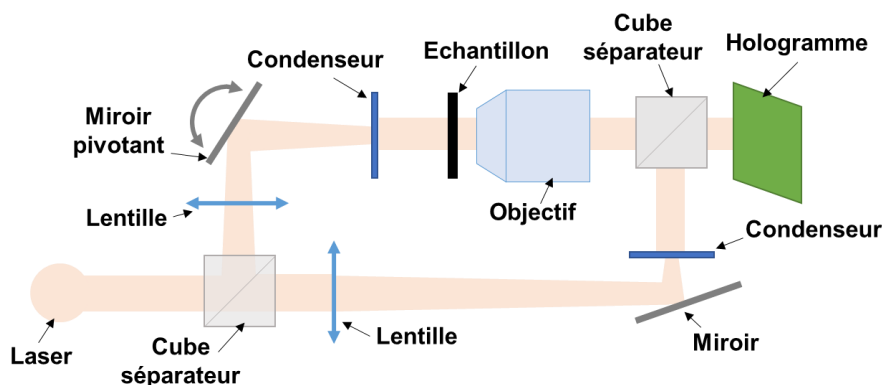
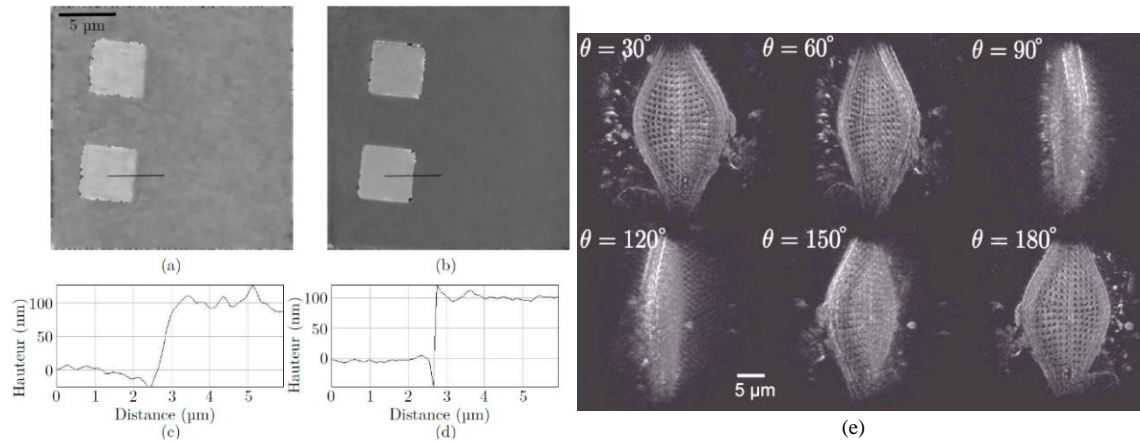


Figure 1-27. Schéma de la microscopie tomographique numérique ([Simon et al., 2008](#)).

La microscopie TDM, donc le principe de fonctionnement est illustré par le schéma de la [figure 1-27](#), est basée sur la DHM. Afin d'améliorer la résolution en TDM, une méthode consiste à faire varier l'angle d'éclairage de manière à augmenter la taille de l'ouverture numérique synthétique et d'augmenter les fréquences spatiales ([Debailleul et al., 2009](#)). En outre, l'utilisation de différents angles d'éclairage permet de moyenniser le bruit dû au « speckle », améliorant ainsi l'observation des détails. En utilisant la méthode de décalage de phase, l'onde incidente diffractée par l'échantillon est mesurée dans le domaine de Fourier à différents angles d'éclairage. Une représentation tridimensionnelle de l'objet est reconstruite en utilisant la série d'images enregistrées à chaque angle dans le domaine des fréquences spatiales. En utilisant la première approximation de Born ([Born & Wolf, 1999](#)) et la transformée de Fourier simple, la distribution de l'indice de réfraction complexe dans l'échantillon est alors obtenu. La technique TDM permet ainsi l'imagerie haute résolution sans marquage des échantillons transparents, améliorant jusqu'à deux fois la résolution comparée à la micro-holographie classique.

La [figure 1-28\(a\)-\(d\)](#) montre la phase d'une mire de calibration VLSI STR10-1000P avec la synthèse d'ouverture 2D, reconstruite avec un seul angle d'illumination ([figure 1-28\(a\)](#)) et plusieurs angles d'illumination en utilisant la synthèse d'ouverture ([figure 1-28\(b\)](#)). Les profils de bord correspondant ([figure 1-28\(c\)-\(d\)](#)) montrent que la résolution latérale et la précision longitudinale sont améliorées avec la technique ([Liu, 2014](#)).



**Figure 1-28. Reconstruction par TDM. (a)-(d) Synthèse d'ouverture sur la mire de calibration VLSI STR10-1000P ([Liu, 2014](#)). (a) Phase reconstruite avec un seul angle d'illumination. (b) avec plusieurs angles d'illumination en utilisant la synthèse d'ouverture. (c) et (d) Profils associés à (a) et (b) respectivement. (e) 6 angles de vue différents d'une diatomée obtenue par TDM en transmission, avec une résolution latérale de 97 nm ([Debailleul et al., 2009](#)).**

La [figure 1-28\(e\)](#) illustre des résultats obtenus en utilisant la technique TDM en transmission. Une série d'images d'une diatomée est ainsi reconstruite à partir de 6 angles de vue différents ([Debailleul et al., 2009](#)). Chaque image est faite à partir de 400 angles d'éclairage différents. En utilisant une longueur d'onde d'illumination de 475 nm et un objectif à immersion dans l'huile à grande ouverture numérique ( $NA = 1,4$ ), une résolution latérale de 97 nm a été obtenue. Une réduction supplémentaire de l'éclairage à la longueur d'onde de 405 nm a permis une amélioration de la résolution à 90 nm ([Cotte et al., 2013](#)). Ces résultats montrent clairement la possibilité d'imager en dessous de 100 nm dans un microscope à transmission non fluorescent. La résolution axiale qui est de 300 nm en transmission peut être améliorée à 200 nm en réflexion ([Liu et al., 2014](#)).

#### 1.5.3.3.2 Microscopie par lentille de diffusion

Une autre façon d'améliorer la résolution en augmentant l'angle d'éclairage est d'utiliser une lentille de diffusion, comme illustré sur le schéma en [figure 1-29](#). Cette technique permet d'imager des cellules dans des tissus vivants. Pendant longtemps, la diffusion de la lumière dans ces milieux a été considérée comme une source de bruit à éliminer, puisque l'effet de la diffusion multiple de la lumière provoque des distorsions sur les ondes se propageant à travers les milieux, dégradant ainsi la qualité de l'image. L'idée de cette technique est de ne pas supprimer les effets de la diffusion de la lumière, mais au contraire de les exploiter ([Choi et al., 2011](#); [van Putten et al., 2011](#)). Cet exemple est très semblable à l'histoire de l'holographie du fait que le *speckle* était d'abord considéré comme du bruit indésirable, avant d'être utilisé pour convertir la phase en intensité : cette technique est appelée *Electronic Speckle Pattern Interferometry* (ESPI), permettant ainsi plus facilement des mesures de déformation et de vibration par vidéo ([Jones & Wykes, 1989](#)).

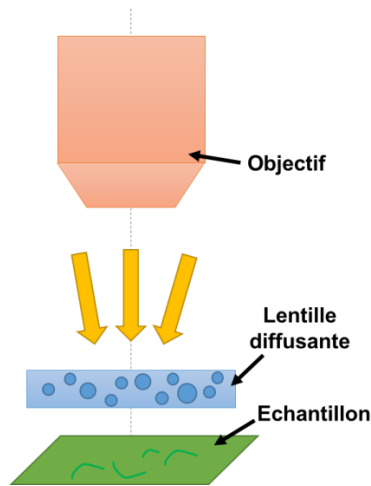


Figure 1-29. Schéma de la microscopie SL.

De la même manière que pour le *speckle*, les milieux diffusants peuvent être utilisés comme un moyen d'imager, avec les avantages supplémentaires d'une meilleure résolution et d'un plus grand champ de vision puisque la lumière est diffusée à des angles plus grands que dans les systèmes d'imagerie classique. Une méthode pour extraire une image déformée par la diffusion de la lumière est de déterminer la matrice, dite « de transmission du système », ce qui revient à considérer le milieu diffusant comme une lentille. Pour se faire, le milieu est d'abord illuminé avec un faisceau laser en balayant tous les angles d'éclairage requis, puis les images en sortie sont enregistrées. L'échantillon est ensuite illuminé par le faisceau le long de l'axe optique pour obtenir l'image déformée obtenue à partir des ondes diffusées. La corrélation entre la matrice de transmission et l'image altérée est ensuite calculée et l'image non déformée de l'objet est ainsi récupérée. Par cette technique, il a été démontré une amélioration de la résolution d'un facteur 5 (Choi et al., 2011).

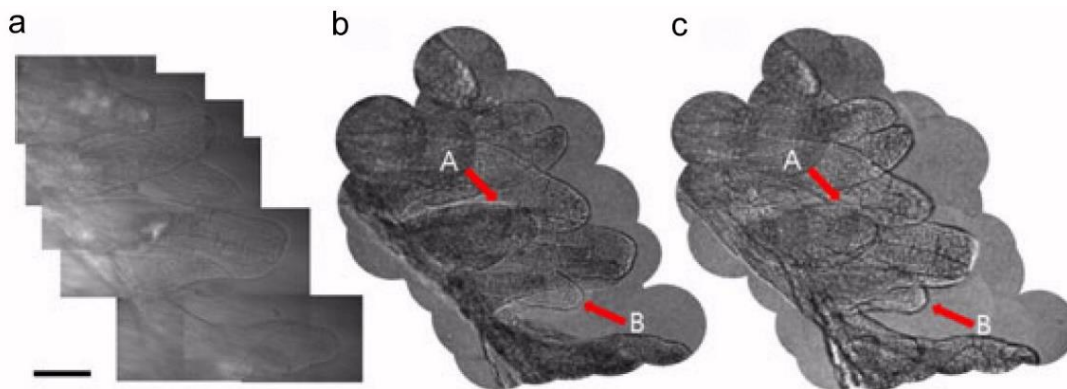


Figure 1-30. Images d'un tissu de l'intestin d'un rat (a) avec un microscope classique en transmission (échelle : 100  $\mu\text{m}$ ), (b) en imagerie endoscopique en réflexion à travers une seule fibre optique multimode, et (c) la même image que pour (b) mais après refocalisation numérique but after numerical refocusing de 40  $\mu\text{m}$  vers l'extrémité de la fibre. Les flèches A montrent les villosités mises au point dans (c) et les flèches B celles mises au point dans (b) (Choi et al., 2014).

La technique de la lentille de diffusion a été appliquée avec succès en endoscopie. Les résultats de la figure 1-30 montrent des images obtenues sur un tissu d'intestin de rat avec un microscope à transmission classique (figure 1-30(a)) présentant un mauvais contraste et une mauvaise résolution. En utilisant l'imagerie endoscopique en réflexion à travers une seule fibre optique multimode (sans lentille ni aucun élément de balayage fixé à la fibre), en appliquant la technique de la lentille de diffusion conduit aux images améliorées sur les figure 1-30(b) et figure 1-30(c).

La résolution spatiale de cette nouvelle technique d'imagerie endoscopique avec une seule fibre optique multimode est équivalente à celui de l'imagerie en lumière incohérente mais est deux fois supérieure à celle de l'imagerie en lumière cohérente à cause du *speckle* (Choi et al., 2014).

#### 1.5.3.3.3 Super-lentilles de Pendry et la technique SMON

Les super-lentilles en métamatériaux ou super-lentilles de Pendry, théoriquement proposées par le scientifique britannique John Pendry en 2000 consistait à utiliser une plaque d'indice de réfraction négatif pour produire et rendre accessibles des ondes évanescentes, offrant ainsi la possibilité de restaurer les informations à l'échelle nanométrique en champ lointain (Pendry, 2000). Le concept de « lentille parfaite » a été largement repris par la communauté et a provoqué un grand intérêt pour la recherche en métamatériaux et en plasmonique. Plusieurs versions de super-lentilles en métamatériaux qui suivent l'idée de base de Pendry, ont été développées et démontrées par un certain nombre de groupes et de chercheurs à travers le monde dans la dernière décennie (Fang et al., 2005; Liu & Zhang, 2011). Les ondes évanescentes sont converties en propageant des ondes en champ lointain formant une image agrandie de l'échantillon. Cependant les défis de nano-fabrication et les résolutions limitées à 70-100 nm à une seule longueur d'onde visible sont les raisons pour lesquelles après dix ans d'efforts de recherche, l'utilisation de ces super-lentilles en métamatériaux est restée limitée.

En 2011, une nouvelle technique de nanoscopie utilisant des microsphères comme super-lentille a été développée (Hao et al., 2011). Cette technique consiste à placer une microsphère de verre de taille micrométrique sur l'échantillon à étudier, pour agrandir son image (formation d'une image virtuelle qui garde la même orientation que les objets en champ lointain) avant la projeter dans l'objectif d'un microscope classique (cf. figure 1-31). La combinaison de la super-lentille de microsphères et de la lentille de focalisation forme une lentille composée. La technique est sans marquage et offre une résolution latérale remarquable de 50 nm en lumière blanche. Ces caractéristiques sont uniques et attrayantes pour des observations à faible intensité et à imagerie de haute résolution de presque tous les objets nanométriques.

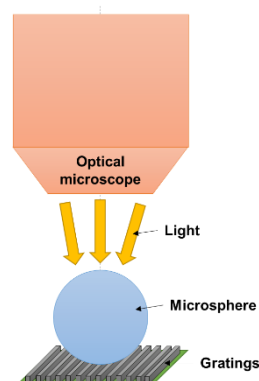


Figure 1-31. Schéma de la technique de microscopie utilisant une microsphère comme lentille.

Contrairement aux super-lentilles en métamatériaux, qui utilisent des métaux pour amplifier les ondes évanescentes pour atteindre la super-résolution, la nanoscopie avec des microsphères utilise une autre stratégie dans la réalisation de la super-résolution : la formation de nano-jets photoniques à haute intensité de taille limitée au-dessous de la microsphère. Ces nano-jets photoniques sont connus pour leurs propriétés intéressantes de taille en dessous de la tache de diffraction pour la focalisation des faisceaux laser. En inversant ce chemin optique, la super-résolution en imagerie peut être obtenue. De plus, bien que cet effet ne soit pas encore complètement compris, il semble qu'une autre conséquence de l'utilisation d'une microsphère

soit la conversion des ondes évanescentes à proximité de l'échantillon en ondes se propageant en champ lointain, qui peuvent alors être collectées par l'objectif de microscope pour former une image. Dans des conditions d'éclairage normal, ces ondes sont très faibles, mais ce sont les propriétés de super-résolution de focalisation du nano-jet de la microsphère qui jouent un rôle important dans l'amélioration du contraste du signal des ondes se propageant à l'extérieur de la microsphère. L'image résultante contient donc bien des détails sub-longueur d'onde de l'échantillon qui ne peut normalement pas être récupérés en imagerie classique.

Suite à cela, de nombreuses variantes de cette technique ont été proposées. Par exemple, il a été démontré que la résolution pouvait être encore améliorée avec des microsphères placées en partie en immersion dans un liquide (Yao et al., 2015; Ye et al., 2014). Un autre développement important, en particulier pour des applications biologiques est la démonstration de l'imagerie super-résolue avec des microsphères à indices plus élevées dans des milieux aqueux (Darafsheh et al., 2014; Pang et al., 2015). Dans l'eau, cette technique peut atteindre une résolution latérale de 50 à 120 nm (Darafsheh et al., 2012; Lee et al., 2013).

Les résultats illustrés dans la figure 1-32(a) montrent une image de nanopores d'oxyde anodique d'aluminium (AAO) d'environ 50 nm. Un objectif x50 à immersion dans l'eau (NA = 0,75) a été utilisé en transmission avec une microsphère de titanate de baryum ( $\text{BaTiO}_3$ ) de diamètre de 100  $\mu\text{m}$ . Une résolution bien inférieure à 100 nm a été démontrée. Les résultats présentés dans les figure 1-32(b)-(c) montrent des adénovirus de 75 nm, observés avec un MEB (figure 1-32(b)) et par la technique SMON (figure 1-32(c)) en utilisant un objectif x80 à immersion dans l'eau (NA = 0,9) (Li et al., 2013).

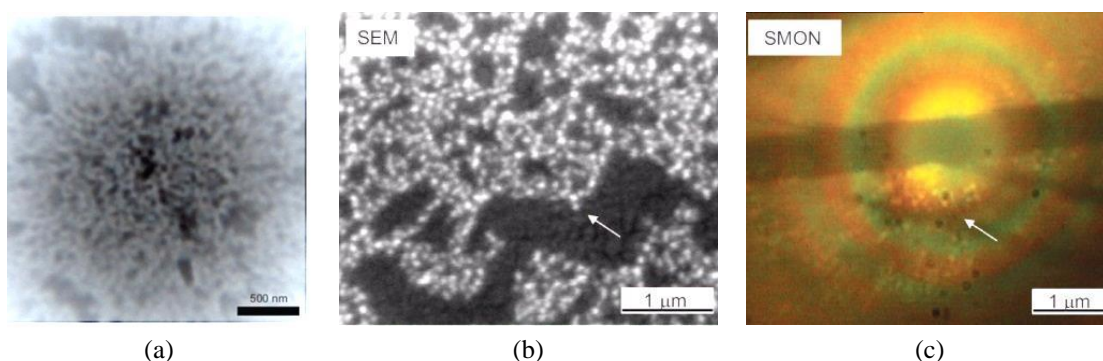


Figure 1-32. Résultats de la technique SMON dans l'eau avec des microsphères de  $\text{BaTiO}_3$  de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre. (a) Image SMON de nanopores AAO de 50 nm. (b) Images d'adénovirus de 75 nm avec un MEB, (c) et avec la technique SMON (Li et al., 2013).

Comparée à d'autres techniques de super-résolution, la nanoscopie utilisant des microsphères comme lentilles présente un certain nombre d'avantages : simple, facile à mettre en œuvre, sans marquage, haute résolution et est compatible avec l'imagerie en lumière blanche. Cette technique sera plus approfondie dans le chapitre 4.

#### 1.5.3.3.4 Technique de déconvolution TSOM

Une autre méthode de nano-détection consiste à utiliser des techniques de déconvolution, plus particulièrement applicables dans le cas des petites structures régulières. Par exemple, la technique TSOM est une nouvelle méthode qui utilise un microscope optique ordinaire à des longueurs d'onde visibles en réflexion pour la mesure sub-nanométrique de nanostructures en micro-électronique (cf. figure 1-33) (Attota et al., 2013). Les images XY sont simplement échantillonnées en fonction de Z par balayage par le foyer du microscope. L'étude du diagramme



de diffraction dans les images XZ proche de la mise au point révèle alors une grande quantité d'informations quantitatives utiles concernant la taille des nanostructures, avec une sensibilité sub-nm. La clé de cette technique est de bien déterminer la fonction de transfert optique du système et de prendre grand soin dans l'optimisation des conditions d'acquisition d'image (calcul de la moyenne, la réduction du bruit, étalonnage...) et à normaliser les images afin qu'elles puissent être comparés entre elles ou avec une bibliothèque d'images à partir des normes calibrées.

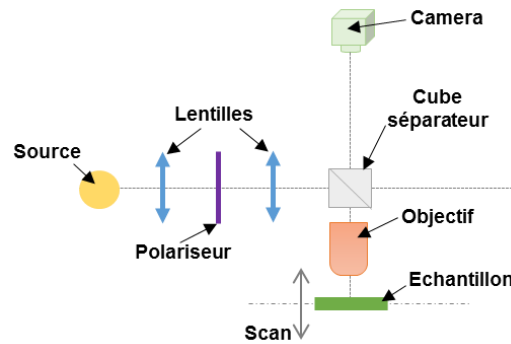


Figure 1-33. Schéma de la technique TSOM.

Un résultat typique d'une image de TSOM différentiel est représenté sur la figure 1-34, dans laquelle une ligne d'un transistor Tri-gate FinFET (Intel) de 40-50 nm de large peut être observée. Sur la droite de l'image dans la figure 1-34(a) on peut voir une comparaison des profils d'intensité qui ont été moyennés sur 8 lignes, prises à partir des positions dans l'image sur la gauche. Ils illustrent la différence (profil vert) entre une ligne large de 44,2 nm (profil bleu) et une grande ligne de 55,3 nm (profil rouge), avec une hauteur uniforme de 71,4 nm. Les images ont été prises avec une lumière à une longueur d'onde de 546 nm et une ouverture numérique de 0,8, donnant une limite de résolution classique de 0,42  $\mu\text{m}$ . La section transversale du motif de diffraction d'une ligne étroite de 40 nm est observable en raison de l'acquisition d'image optimisée et après traitement.

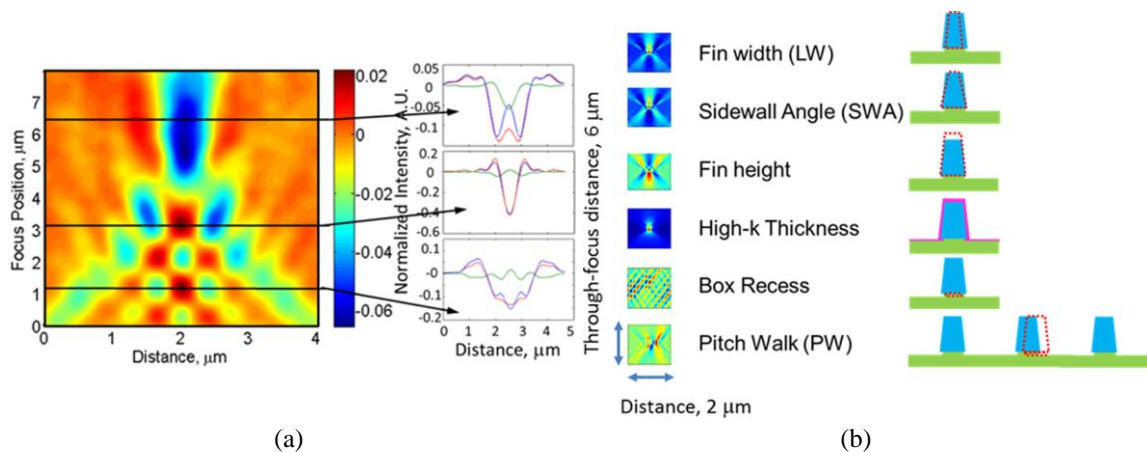


Figure 1-34. Mesure d'un composant microélectronique nanométrique en utilisant la technique TSOM. (a) Différence dans les mesures avec la technique différentiel TSOM (profil vert) entre la ligne de 44,2 nm de large (profil bleu) et la ligne de 55,3 nm de large (profil rouge). (b) Résultats de simulation pour la technique TSOM différentiel (à gauche) pour différentes configurations des lignes en dessous de 22 nm de large (à droite) (Attota et al., 2013).

Pour aller plus loin, des simulations dans le domaine de Fourier (*FDTD : Finite Difference Time Domain*) ont été réalisées pour prédire de fonctionnement de la technique TSOM pour mesurer les perturbations structurales des lignes plus étroites comme pour les ailettes de transistors de

22 nm et 16 nm, comme illustré dans la [figure 1-34\(b\)](#). La technique TSOM peut également être utilisée pour mesurer la taille des nanoparticules aussi petites que 20 nm de diamètre et de déterminer le nombre de particules dans des amas de 1 à 4 nanoparticules de 120 nm.

#### 1.5.3.3.5 Technique SEEC pour augmenter le contraste

L'ellipsométrie consiste à étudier le changement de polarisation d'un faisceau lumineux après que celui-ci ait été réfléchi par la surface de l'objet observé. Il s'agit d'une technique sans contact permettant l'analyse de surface, mais également la caractérisation de propriétés optiques des matériaux. Outre les avantages d'être simple et rapide à mettre en œuvre, l'ellipsométrie présente également des inconvénients comme une résolution latérale limitée par la taille du faisceau lumineux ou encore la contrainte pour l'échantillon d'avoir une surface plane ([Bertrand et al., 1997](#); [Neal & Fane, 1973](#)).

Une méthode pour améliorer la résolution en ellipsométrie est d'augmenter le contraste en réduisant le signal de fond à l'aide d'un substrat revêtu d'un antireflet en lumière polarisée en utilisant la technique SEEC (pour *Surface Enhanced Ellipsometric Contrast microscopy*) ([Auserré & Valignat, 2007](#)), dans laquelle une amélioration du contraste de 10 à 100 fois est obtenue. En effet, lorsqu'une nanostructure a une taille nettement inférieure à la limite de Rayleigh dans un microscope optique classique, l'intensité diffusée est si petite qu'elle est invisible. L'intensité lumineuse diffusée diminue en fonction de  $d^6$  lorsque la taille de l'objet  $d \ll \lambda$ . Puisque la diffusion est uniforme dans toutes les directions, en augmentant le contraste, les nanoparticules peuvent devenir visibles en champ lointain. Comme les nanostructures modifient la polarisation de la lumière réfléchie, elles deviennent visibles dans un système de lumière polarisée croisée.

La [figure 1-35](#) présente le principe de fonctionnement du SEEC. Cette technique est utilisée avec des substrats disponibles dans le commerce connus sous le nom de « Sarfus »® (Nanolane, Le Mans, France) pour étudier des nanotubes de carbone et de stéroïdes, des fibres de chitine, des nanofils, des nanostructures et des plots d'or. Des films minces et des structures géométriquement minces latéralement étendues sont aussi souvent invisibles en microscopie classique en raison de leur très faible contraste, même en utilisant la microscopie à contraste de phase. La visibilité dépend de la différence entre l'indice de réfraction des structures à visualiser et celui de l'arrière-plan, et l'étendue latérale des structures à travers le champ. Une étude a été réalisée avec succès sur la motilité de bactéries par l'observation de seulement une couche mince où l'on peut observer les traces laissées par les bactéries en mouvement ([Ducret et al., 2012](#)).

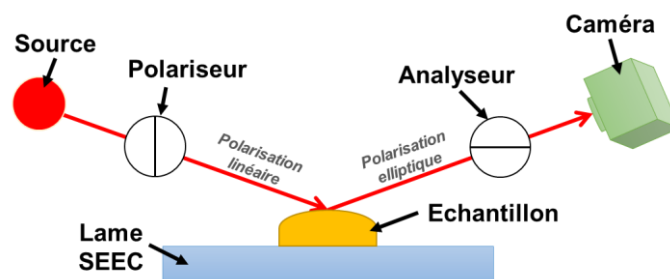


Figure 1-35. Schéma de la technique SEEC.

Deux techniques ont été utilisées. La première, la microscopie à contraste de phase, a été utilisée pour faire apparaître les bactéries elles-mêmes ([figure 1-36\(a\)](#)). Puis la technique SEEC a été utilisée pour montrer les traces ([figure 1-36\(b\)](#)). La combinaison des deux images ([figure 1-36\(c\)](#))

à la cadence vidéo montre le mouvement des bactéries sans l'utilisation de marquage. Une telle technique de haute sensibilité a permis d'élucider, pour la première fois, comment les traces ont été déposées au cours de la mobilité. La technique SEEC a pour avantages d'avoir une sensibilité nanométrique permettant ainsi d'étudier des nanocouches et des nanoparticules en utilisant l'imagerie plein champ sans marquage et en temps réel et de pouvoir mesurer des rugosités de surface et l'épaisseur des couches après calibration de l'axe z.

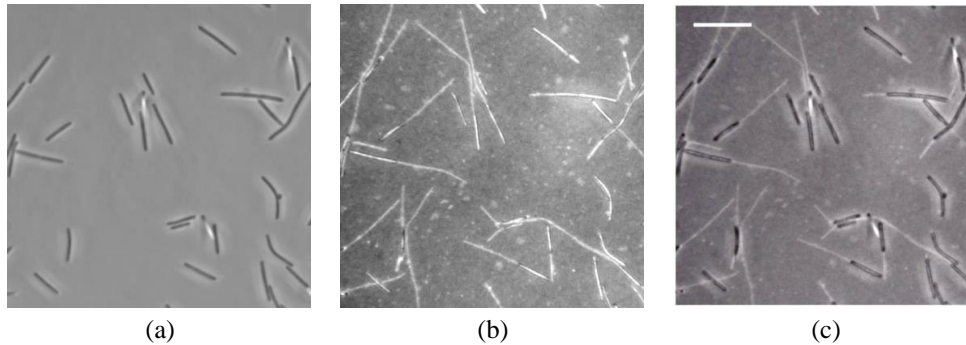


Figure 1-36. Observation de traces laissées par des bactéries en mouvement avec (a) un microscope à contraste de phase pour montrer les bactéries, (b) la technique SEEC pour révéler les traces et (c) la combinaison des deux (microscopie à contraste de phase et technique SEEC) pour montrer les bactéries et leurs traces, échelle : 10  $\mu\text{m}$  (Images de Marie-Pierre Valignat, INSERM, Marseille, France).

#### 1.5.3.3.6 Microscopie interférométrique en lumière blanche

La microscopie interférométrique est basée sur le principe de l'interférence lumineuse et présente les avantages d'être rapide et sans contact donc non-destructive. Il existe différentes configurations pour un microscope interférométrique, basées sur l'utilisation de différents types d'objectifs, comme présenté dans la [figure 1-37](#).

Dans la configuration Michelson, un cube séparateur, placé après l'objectif du système, permet de séparer la lumière en deux chemins, celui de l'objet et celui de référence (miroir), puis de les recombiner après réflexion sur l'objet et sur le miroir, créant par conséquent des interférences. Ce système étant très compact a donc pour avantage d'être robuste mécaniquement. Un inconvénient de cette configuration vient du fait que le cube séparateur se trouvant entre l'objectif et l'échantillon à observer, le point de focalisation du faisceau doit donc se trouver derrière le cube séparateur. Pour avoir une distance de travail suffisamment grande, il est donc nécessaire d'utiliser un objectif à faible ouverture numérique, ce qui a pour effet de limiter la résolution latérale du système.

Le microscope interférométrique de type Mirau utilise une lame séparatrice placée entre le miroir et l'échantillon à étudier, tous les composants se trouvant sur l'axe optique du système. La lame séparatrice étant largement plus fine que le cube séparateur, des objectifs de plus grande ouverture numérique que dans la configuration Michelson, peuvent être placés pour ainsi améliorer la résolution du microscope. Cependant, les inconvénients liés à cette configuration proviennent de la position du miroir de référence qui réduit la quantité de lumière envoyée sur l'échantillon et collectée. De plus, cette configuration ne permet pas l'utilisation d'objectifs à immersion.

Dans la configuration Linnik, deux objectifs identiques sont utilisés. Tous deux sont placés après le cube séparateur. L'un se trouve avant le miroir de référence et l'autre au-dessus de l'échantillon à observer, ce qui est un avantage car leurs positions permettent donc l'utilisation de grandes ouvertures numériques puisque la faible distance de travail n'est plus un obstacle. De plus, la focalisation des faisceaux sur l'échantillon et sur le miroir de référence pouvant être réglées

indépendamment, il est alors possible d'introduire, entre l'objectif et l'objet, un milieu transparent avec un indice différent de celui de l'air et également des objectifs à immersion.

En plus de ces trois types de microscopes interférométriques présentés dans la [figure 1-37](#), il existe des systèmes de mesures optiques basés sur d'autres types d'interféromètre tels que Fizeau, Mach Zehnder ou Nomarski. Ces configurations ne sont pas basés sur le principe de balayage vertical mais sur la détermination de la vitesse de la lumière pour chaque chemin (Fizeau), sur des techniques de modulation en longueur d'onde (Mach Zehnder) ou sur la polarisation de la lumière (Nomarski) ([Bass, 1994](#)).

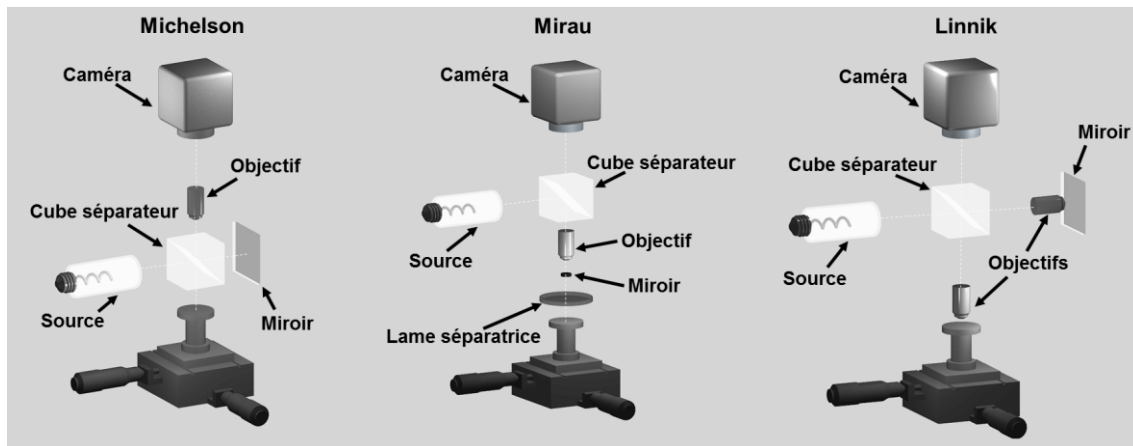


Figure 1-37. Différentes configurations d'un microscope interférométrique.

La microscopie interférométrique en lumière blanche avec un balayage axial est également connue sous différentes appellations : *White light interferometry* (WLI), *Vertical scanning interferometry* (VSI), *Low coherence interferometry* (LCI), *Coherence probe*, *Optical coherence profilometry* (OCP), *Optical coherence microscopy*, *Scanning white light interferometry* (SWLI), *White light scanning interferometry* (WLSI), *Coherence Scanning Interferometry* (CSI), *Coherence probe microscopy* (CPM), *Correlation microscopy*, *Phase correlation microscopy*, *Interference microscope*, *Microscopic interferometry*, *Wide band interferometry*, *Full field OCT*, *Wide field OCT*, *Coherence radar*, *Fringe peak scanning interferometry*... ([Malacara, 2007](#)).

Plusieurs familles de techniques existent afin de permettre la reconstruction en 3D d'objets à partir de l'analyse de franges. Parmi ces techniques, la microscopie à saut de phase (en anglais PSM : *Phase Shifting Microscopy*) est une méthode d'interpolation de franges, développée dans les années 1980. Elle est basée sur l'introduction de décalages de phase (ou sauts de phase) connus entre les deux bras de l'interféromètre en lumière monochromatique. Cette méthode permet, par calcul de la phase, l'analyse de surfaces et de défauts peu profonds avec une résolution axiale de l'ordre du nanomètre ([Creath, 1988](#)). Cependant, la mesure de marches (bords droits) est restreinte à quelques centaines de nanomètres à cause de la périodicité des franges et la résolution latérale est limitée par la diffraction à  $\lambda/2$  (typiquement à  $0,4 \mu\text{m}$  en lumière blanche). Une autre méthode d'analyse des franges d'interférence est la microscopie à sonde de faible cohérence, basée sur le principe de détection de l'enveloppe des franges d'interférence, développé dans les années 1990. Cette technique permet la mesure tri-dimensionnelle de reliefs beaucoup plus profonds (de hauteur allant de quelques micromètres à plusieurs dizaines de micromètres ou plus). Plusieurs algorithmes analysant cette enveloppe permettent de reconstruire les surfaces en 3D : PFSM (*Peak Fringe Scanning Microscopy*), la Transformée de Fourier rapide (FFT : *Fast Fourier Transform*), FSA (*Five-Sample-Adaptive non linear algorithm*) et CPM (*Coherence Probe Microscopy*).

Les résultats présentés en [figure 1-38](#) montrent des mesures effectuées à IPP sur différentes nanostructures. Sur la [figure 1-38\(a\)](#), on peut observer des structures périodiques sur une surface de silicium nano-texturée, réalisées par attaque chimique, pour le photovoltaïque. La [figure 1-38\(b\)](#) montre des structures linéaires ondulées, appelées en anglais *ripples*, réalisées sur une plaque d'acier inoxydable à l'aide d'un laser pulsé femtoseconde en infrarouge ( $\lambda = 1030$  nm et des impulsions de 300 fs), en lumière polarisée linéairement. Les *ripples* ont une période de  $4,3 \mu\text{m}$  et une hauteur de  $2,8 \mu\text{m}$  ([Hairaye et al., 2014](#)). La [figure 1-38\(c\)](#) montre une couche de PPHMDS (*polymerized hexamethyldisiloxane*) plongé dans de la fibronectine. Ces deux éléments sont généralement utilisés dans le développement des biomatériaux. Les fibres visibles sont en forme de cordes de plusieurs fibres individuelles d'une épaisseur de plusieurs nanomètres jusqu'à  $300$  nm ([Pramatarova et al., 2011](#)). Ces mesures ont été obtenues avec deux microscopes interférométriques. Le premier est un microscope Leitz-Linnik modifié et développé à ICube, basé sur la technique WLSI avec deux objectifs de grossissement  $\times 50$  et d'ouverture numérique  $\text{ON} = 0,85$  donnant une résolution latérale de  $0,43 \mu\text{m}$  en lumière visible ([figure 1-38\(a\)](#) et [\(b\)](#)). Le second instrument optique utilisé est un microscope commercial Zygo NewView 7200 composé d'un objectif de Mirau de grossissement  $\times 50$  ( $\text{ON} = 0,55$ ) donnant une résolution latérale de  $0,52 \mu\text{m}$  ([figure 1-38\(c\)](#)).

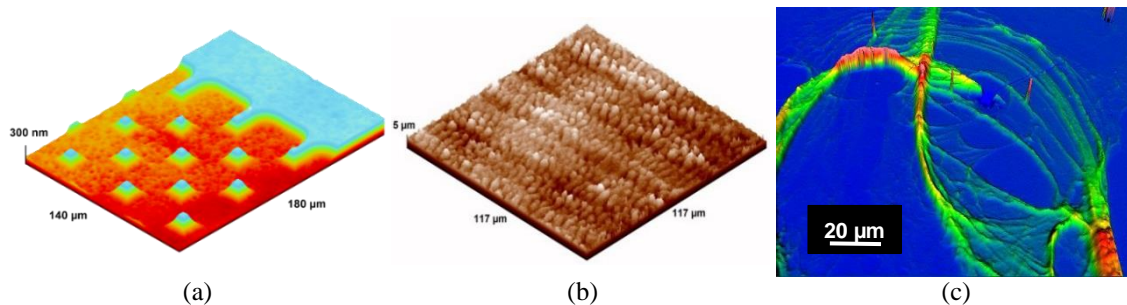


Figure 1-38. Mesures de rugosité de nano surfaces avec la technique CSI. (a) Surface de silicium nano-texturée pour le photovoltaïque (Leitz-Linnik). (b) Structures ondulées (*ripples*) de  $4,3 \mu\text{m}$  de période et  $2,8 \mu\text{m}$  de hauteur auto-organisées grossièrement sur de l'acier inoxydable (Leitz-Linnik). (c) Fibres de fibronectine ( $R_t = 30 - 300$  nm) sur une couche de PPHMDS (Zygo NewView 7200).

Les résultats de la [figure 1-39\(a\)](#) ont été obtenus sur une couche d'hydroxyapatite, qui est un biomatériau semi-transparent et très poreux, sur des carrés gravés dans du silicium ([Guellil et al., 2014](#)). La [figure 1-39\(b\)](#) illustre une image 3D d'une cellule d'oignon révélant des détails internes comme le noyau de la cellule à travers la membrane (comme montré par la flèche) ([Montgomery et al., 2011](#)). Pour des mesures à l'intérieur d'une couche transparente ou semi-transparente, le microscope interférométrique peut être utilisé dans le mode tomographique. Cette technique est appelée FF-OCT (pour *Full-Field Optical Coherence Tomography*) et peut être utilisée pour mesurer l'épaisseur et la structure interne des couches transparentes par la détection de plusieurs signaux d'enveloppe de franges ([Dubois & Boccara, 2006](#); [Halter et al., 2010](#)). Pour réaliser des images tomographiques (coupe XZ), les systèmes FF-OCT utilisent une source de faible cohérence spatiale et temporelle, comme une source de lumière blanche par exemple pour éclairer l'ensemble du champ. Il existe de nombreux algorithmes permettant d'extraire des informations tomographiques par détection des enveloppes de franges interférométriques, tels que la PFSM (pour *Peak Fringe Scanning Microscopy*), la FSA (pour *Five-Sample-Adaptive non linear Algorithm*), la méthode de démodulation etc... En balayant pas à pas et verticalement l'échantillon, une série d'images tomographiques peut être acquise à l'aide d'une caméra. A partir des données enregistrées, des coupes XY et XZ peuvent être observées et une image 3D de l'échantillon peut alors être générée.

Le microscope interférométrique de type Linnik combiné à l'utilisation de deux objectifs à grandes ouvertures numériques peut être utilisé pour obtenir des images tomographiques à haute résolution (Dubois et al., 2002). De plus, les progrès en imagerie numérique, et plus particulièrement les avancées technologiques sur les sources d'éclairage, les systèmes de balayage précis (appareils piezo-électriques) et également les systèmes de traitement de signaux pour automatiser l'analyse des franges d'interférences, la mesure et la caractérisation de surfaces, ont permis une amélioration significative de la résolution des systèmes optiques imageurs. Les résultats de la figure 1-39(c) ont été obtenus avec la technique FF-OCT sur un film transparent de polymère de Mylar de 3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, dans lequel on peut observer des structures sub-micrométriques.

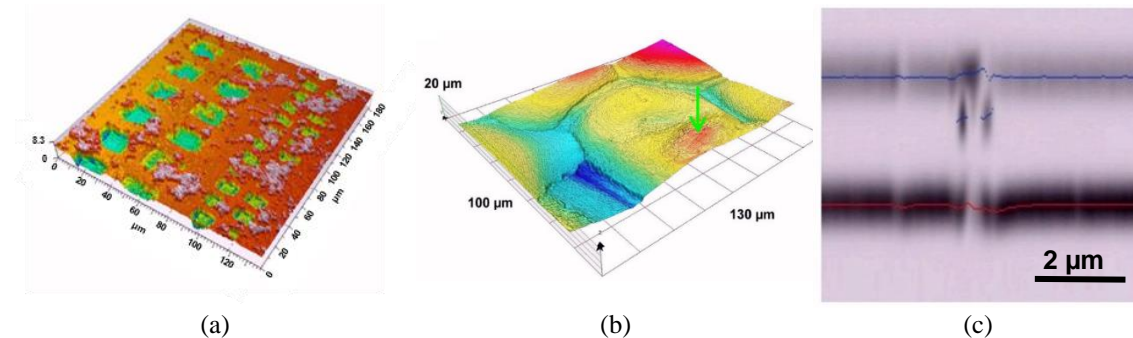


Figure 1-39. Caractérisation de surfaces 3D nanométriques avec la technique FF-OCT. (a) Couche d'hydroxyapatite sur des carrés gravés dans du silicium (Guellil et al., 2014). (b) Cellule d'oignon montrant des détails sur le noyau caché (flèche) (Montgomery et al., 2011). (c) Structures dans une couche de polymère transparent de Mylar de 3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (image XZ).

Cependant, le temps d'acquisition avec un système FF-OCT reste tout de même assez long à cause du balayage vertical de l'échantillon, qui est d'autant plus long si on diminue le pas de balayage dans le but d'avoir une meilleure précision axiale. De plus, dans le cas de couches transparentes, observer des interfaces et des structures enfouies sous ces couches peut s'avérer laborieux puisque le rapport signal à bruit peut être très faible en raison de la faible réflectivité, du bruit et des artefacts (Benatmane & Montgomery, 2004). Une solution à ces deux problèmes serait d'utiliser une caméra rapide et à bas bruit, mais dans certaines situations, cela ne suffit pas pour améliorer la qualité des images. Au chapitre 3, nous verrons les techniques de traitement d'images développées pour améliorer ce rapport SNR afin de pouvoir détecter des structures initialement difficilement observables.

## 1.6 Méthodes de reconstruction 3D en microscopie interférométrique par analyse de franges d'interférence

### 1.6.1 Principe du décalage de phase

Dans une image d'interférence, l'intensité sur un pixel de coordonnées  $(x,y)$  est donnée par :

$$I(x, y) = I_0(x, y)[1 + \gamma_0 * \cos(\varphi(x, y) + \delta_i)] \quad \text{Eq. (1-15)}$$

avec  $\delta_i$  le décalage de phase,  $I_0(x, y)$  l'intensité incidente,  $\gamma_0$  le facteur de visibilité des franges et  $\varphi(x, y)$  la phase recherchée. La méthode de décalage de phase en interférométrie nécessite l'acquisition de trois images minimum. Dans les cas particuliers de 3, 4 et 5 images, avec les sauts de phases respectifs de  $\frac{2\pi}{3}$ ,  $\frac{\pi}{2}$  et  $\frac{\pi}{2}$ , les formules permettant de retrouver la phase relative sont

identiques que pour la méthode appliquée à la projection de franges et sont données dans le [tableau 1-3](#).

Tableau 1-3. Equation de la phase relative correspondant à la technique de décalage à 3, 4 et 5 sauts.

Technique	Saut	Phase relative
3 sauts	$\frac{2\pi}{3}$	$\phi_{relative-3sauts}(x, y) = \text{atan} \left[ \frac{\sqrt{3}(I_3(x, y) - I_2(x, y))}{2I_1(x, y) - I_2(x, y) - I_3(x, y)} \right]$
4 sauts	$\frac{\pi}{2}$	$\phi_{relative-4sauts}(x, y) = \text{atan} \left[ \frac{I_4(x, y) - I_2(x, y)}{I_1(x, y) - I_3(x, y)} \right]$
5 sauts	$\frac{\pi}{2}$	$\phi_{relative-5sauts}(x, y) = \text{atan} \left[ \frac{2(I_2(x, y) - I_4(x, y))}{2I_3(x, y) - I_5(x, y) - I_1(x, y)} \right]$

Les fonctions de visibilité associées à ces trois techniques sont données dans le [tableau 1-4](#). Une fois la phase calculée, la hauteur de l'objet à étudier en chaque point de coordonnées (x,y) peut être déterminée avec l'équation suivante :

$$h(x, y) = \frac{\varphi(x, y) * \lambda}{2\pi * (\cos\theta + \cos\theta')} \quad \text{Eq. (1-16)}$$

où  $\lambda$  est la longueur d'onde de la source d'éclairage, et  $\theta$  et  $\theta'$  sont respectivement l'angle incident et l'angle réfléchi de la lumière par rapport à l'axe optique ([Creath, 1988](#)). Dans le cas particulier où la source de lumière suit l'axe optique, les valeurs de  $\theta$  et  $\theta'$  de l'équation [Eq. \(1-16\)](#) sont nulles et donc la hauteur est donnée par :

$$h(x, y) = \frac{\varphi(x, y)}{2\pi} * \frac{\lambda}{2} = \frac{\lambda_{eff}}{4\pi} * \varphi(x, y) \quad \text{Eq. (1-17)}$$

Pour décaler les franges d'interférences, il faut introduire une différence de chemin optique entre les deux bras de l'interféromètre, par exemple en déplaçant soit l'objectif soit le porte-échantillon avec une platine piézo-électrique dans l'axe vertical (axe Z). Pour cela, on détermine la distance du déplacement vertical à utiliser à l'aide de la formule précédente ([Eq. \(1-17\)](#)). Par exemple, pour un décalage des franges de  $\pi/2$ , on déplace la platine piézo-électrique de  $\lambda_{eff}/8$ . Cependant, pour mesurer des marches supérieures à  $\lambda/2$ , la méthode à décalage de phase ne fonctionne pas. En effet, une différence de hauteur de  $\lambda/2$  correspond à une différence de marche de  $\lambda$  et donc à un déphasage de  $2\pi$  : on n'arriverait donc plus à distinguer les sauts de phases de  $2\pi$  et à reconstruire la topographie de l'échantillon. Sur des surfaces continues, on peut utiliser les techniques de déroulement de la phase (*unwrapping*) mais une autre méthode est nécessaire pour reconstruire la hauteur des structures supérieure à  $\lambda/2$ . La technique la plus réussie consiste à déterminer l'enveloppe des signaux d'interférences.

Tableau 1-4. Facteurs de visibilité associés à la technique de décalage de phase à 3, 4 et sauts.

Technique	Saut	Visibilité
3 sauts	$\frac{2\pi}{3}$	$\gamma_{3sauts}(x, y) = \frac{\sqrt{3(I_3(x, y) - I_2(x, y))^2 + (2I_1(x, y) - I_2(x, y) - I_3(x, y))^2}}{2I_0(x, y)}$
4 sauts	$\frac{\pi}{2}$	$\gamma_{4sauts}(x, y) = \frac{\sqrt{(I_4(x, y) - I_2(x, y))^2 + (I_1(x, y) - I_3(x, y))^2}}{2I_0(x, y)}$
5 sauts	$\frac{\pi}{2}$	$\gamma_{5sauts}(x, y) = \frac{\sqrt{(2I_2(x, y) - I_4(x, y))^2 + (2I_3(x, y) - I_5(x, y) - I_1(x, y))^2}}{2I_0(x, y)}$

## 1.6.2 Principe de détection de l'enveloppe des franges

Dans le cas d'une illumination polychromatique telle que la lumière blanche, seuls les rayons de la même longueur d'onde peuvent interférer les uns avec les autres, et l'intensité totale est la somme des interférences à chaque longueur d'onde. Pour un pixel donné  $(x, y)$  dans une image XY, l'intensité  $I(z)$  au niveau du détecteur en fonction de la position le long de l'axe optique  $z$  peut être écrite de la façon suivante :

$$I(z) = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} I_0(\lambda) \cdot [1 + \gamma(z) \cdot \cos(\phi(\lambda, z))] d\lambda \quad \text{Eq. (1-18)}$$

où  $(\lambda_1, \lambda_2)$  définissent la largeur de bande spectrale de la source d'illumination,  $I_0(\lambda)$  est une fonction qui tient compte de la répartition spectrale et de l'intensité de la source d'illumination ainsi que des réponses spectrales des composants du système optique.  $\gamma(z)$  est la visibilité de franges en fonction de certains paramètres du système optique tel que l'ouverture numérique de l'objectif et  $\phi(\lambda, z)$  est la phase liée à la différence de chemin optique entre les deux ondes qui interfèrent tenant compte de la différence de nature entre le miroir de référence et l'échantillon. Il existe différents moyens de déterminer l'enveloppe des franges.

A l'origine, l'entreprise KLA eut l'idée de cette technique pour la mesure des dimensions critiques (Davidson et al., 1987), puis plusieurs algorithmes basés sur cette méthode s'en suivirent, tels que la démodulation (Caber et al., 1993; Lee & Strand, 1990), le pic d'intensité PFSM (Montgomery & Fillard, 1993, 1994), la transformée de Fourier rapide (FFT) (de Groot & Deck, 1995), la technique FSA (Larkin, 1996), la technique des ondelettes (Sandoz et al., 1997), la corrélation comme développée par la société Taylor Hobson (Bankhead & McDonnell, 2004; Conroy, 2009), etc.

### 1.6.2.1 Technique PFSM

La technique PFSM (pour « Peak Fringe Scanning Microscopy ») (Montgomery & Fillard, 1993) consiste à déterminer, dans la série d'images de franges d'interférence, la frange centrale d'ordre zéro qui est la frange avec le contraste le plus élevé, et cela pour chaque pixel, comme illustré dans la figure 1-40.

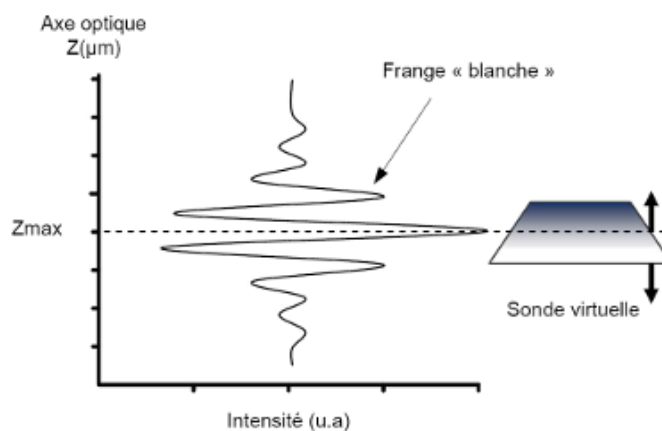


Figure 1-40. Méthode de détection du pic de la frange d'interférence par la PFSM (Benatmane, 2002).

Pour se faire, le maximum d'intensité pour chaque pixel est recherché à chaque position du balayage vertical de l'échantillon. Par conséquent, pour obtenir une meilleure résolution axiale,



un petit pas d'échantillonnage doit être considéré, mais cela implique donc une plus grande quantité d'images à traiter. L'algorithme PFSM est basé sur la comparaison des valeurs de l'intensité d'un même pixel entre deux images prises à une position différente sur l'axe Z. La position pour laquelle la valeur de l'intensité du pixel est supérieure est alors enregistrée. Dans l'espace mémoire, il ne suffit donc de stocker que trois images à la fois.

La technique PFSM est bien adaptée pour mesurer en temps réel des structures de plusieurs micromètres de hauteur (Montgomery et al., 2008), à condition que l'arrière-plan de l'échantillon ne présente pas de variations d'intensités supérieures à l'amplitude maximale des franges. Cependant, cette technique reste efficace seulement pour des échantillons homogènes mais ne pourrait pas fonctionner pour des objets transparents pour lesquels plusieurs pics dans l'enveloppe des franges seraient présents.

#### 1.6.2.2 Algorithme basé sur la transformée de Fourier rapide : Zygo

Le microscope Zygo NewView 7200 disponible au laboratoire est utilisé pour caractériser des surfaces en 3D (rugosité, topographie, etc) et est basé sur la méthode CSI pour des mesures à haute résolution. Après avoir acquis les différents interférogrammes à l'aide d'une caméra CCD, une transformée de Fourier rapide (« Fast Fourier Transform » FFT) est réalisée (de Groot & Deck, 1995), basée sur l'algorithme breveté « Frequency Domain Analysis » (FDA) afin de fournir des informations topographiques de l'échantillon observé (de Groot, 2015a, 2015b). Cet algorithme consiste à calculer l'enveloppe du contraste des franges et travaille dans le domaine fréquentiel en utilisant une FFT du signal obtenu. Il en résulte une série de coefficients de Fourier des phases :

$$\phi_v = hK_v \quad \text{Eq. (1-19)}$$

où  $K_v$  sont les fréquences des franges et  $h$  la hauteur de la surface. Une estimation de cette hauteur est obtenue par la pente de phase :

$$h_c = \frac{dK}{d\phi} \quad \text{Eq. (1-20)}$$

Un ajustement linéaire par la méthode des moindres carrés est ensuite utilisé pour fournir une valeur moyenne de la phase à la fréquence centrale  $K_0$ , notée  $\theta$  avec :

$$\theta = hK_0 \quad \text{Eq. (1-21)}$$

Et la hauteur finale peut être calculée par la relation suivante :

$$h = \frac{\theta}{K_0} + \frac{2\pi}{K_0} \text{round}\left(\frac{A - \langle A \rangle}{2\pi}\right) \quad \text{Eq. (1-22)}$$

où la fonction  $\text{round}(x)$  donne la valeur entière la plus proche de  $x$ ,  $A = \theta - K_0 h_c$  et  $\langle \rangle$  représente la moyenne. La résolution latérale de ce microscope est de 520 nm pour un objectif de Mirau de grossissement 50x et une ouverture numérique de 0,55 pour une longueur d'onde de 550 nm. Le système est équipé d'une platine porte-échantillon motorisée, rendant alors possible l'analyse de grands objets par « recollement » automatique (*stitching*) de ces zones d'observation afin de couvrir à la fois des surfaces importantes tout en conservant une bonne résolution latérale. Le microscope Zygo NewView 7200 est contrôlé par le logiciel MetroPro permettant une maîtrise rapide de la position de l'échantillon ainsi qu'une visualisation facile des mesures et des analyses 3D. Nous avons utilisé ce microscope pour caractériser certains échantillons utilisés dans ce projet.

### 1.6.2.3 Technique FSA

La technique FSA (*Five-Sample-Adaptive non linear algorithm*) (Larkin, 1996), basée sur l'approximation de Hilbert, consiste à appliquer le principe de la technique de mesure de phase à 5 sauts à la technique de détection de l'enveloppe des franges par la mesure de la visibilité (modulation) des franges. Par conséquent, l'enveloppe des franges est mesurée à partir d'une fenêtre glissante de 5 images consécutives et déphasées de  $90^\circ$  suivant la formule pour déterminer la modulation :

$$M = C\sqrt{(I_2 - I_4)^2 - (I_1 - I_3)(I_3 - I_5)} \quad \text{Eq. (1-23)}$$

où  $C$  est une constante de normalisation. Ainsi, l'enveloppe des franges d'interférence est extraite à partir de 5 images successivement le long de l'axe vertical, jusqu'à obtenir l'enveloppe complète finale des franges pour chaque pixel. Enfin, le pic de l'enveloppe est recherché pour chaque pixel (cf. figure 1-41).

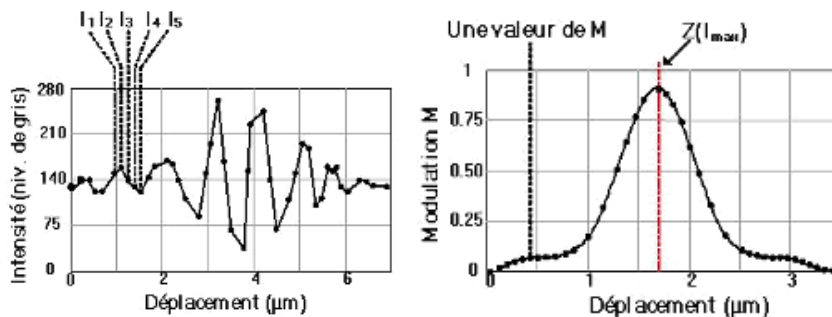


Figure 1-41. Méthode de détection du pic de la frange d'interférence par la FSA (Benatmane, 2002).

Contrairement à la technique PFSM, la résolution axiale de la technique FSA ne peut être améliorée par une réduction du pas de balayage, car pour cette technique, un déphasage de  $90^\circ$  entre deux images consécutives est nécessaire, ce qui représente un pas constant de  $\lambda_{\text{eff}}/8$  (égal à 97,5 nm pour  $\lambda_{\text{eff}} = 780$  nm). Un moyen d'améliorer la résolution axiale pour la technique FSA est d'effectuer une interpolation des points de l'enveloppe de franges par la méthode des moindres carrés. Un avantage de cette technique est qu'elle est moins sensible aux bruits de hautes fréquences car celles-ci sont supprimées lors de la reconstruction de l'enveloppe.

Plusieurs techniques d'interpolation (splines et phase) ont été étudiées, développées et implémentées dans le programme Labview « ModFly », par l'équipe, pour améliorer la résolution axiale du système (Montgomery et al., 2013). En effet, la plupart des méthodes pour la détection d'un pic ou l'extraction de la phase du signal de franges monodimensionnel sont basées sur un modèle de signal AM-FM, qui représente la variation de l'intensité lumineuse mesurée le long de l'axe optique d'un microscope interférométrique. Il a été démontré que les approches 2D peuvent rivaliser avec certaines méthodes classiques utilisées dans le domaine de l'interférométrie, en termes de robustesse et de temps de calcul. En outre, alors que la plupart des méthodes tiennent compte seulement des données 1D, il semblerait avantageux de prendre en compte le voisinage spatial utilisant des approches multidimensionnelles (2D, 3D, 4D), y compris le paramètre de temps afin d'améliorer les mesures. De nouvelles approches n-D plus appropriées pour la caractérisation de surfaces plus complexes sont à l'étude dans l'équipe (thèse en cours de G. Gianto), telles que les méthodes basées sur la Transformée de Fourier (TF), les ondelettes, la FSA et l'opérateur d'énergie de Teager Kaiser (TKEO) 1D et 2D (Gianto et al., 2016; Salzenstein et al., 2014).

## 1.6.2.4 Technique CPM

La technique CPM (*Coherence Probe Microscopy*) consiste à acquérir une série d'images de franges d'interférences et à effectuer un traitement d'images sur les images XZ (Montgomery et al., 2012b). La technique est basée sur la démodulation 2D, qui est version étendue de la technique de Caber et al. (1993). La caméra enregistre donc à chaque déplacement vertical, à l'aide d'une platine piézo-électrique, l'intensité à chaque pixel de la lumière réfléchiée par l'échantillon. Pour obtenir les informations de hauteur de l'objet étudié, l'enveloppe de la visibilité des franges  $\gamma(x, y, z)$  à chaque pixel doit être déterminée.

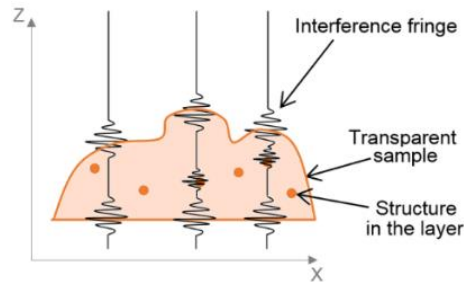


Figure 1-42. Schéma de la construction d'interférogrammes sur une couche transparente à l'aide des signaux de franges avec un système FF-OCT.

Comme illustré dans la figure 1-42, l'enveloppe des franges présente des pics, dont la position permet de situer les endroits où se trouvent certains détails (surfaces, interfaces ou structures) pour reconstruire la surface en 3D ou dans le cas des couches transparentes pour générer des coupes tomographiques de l'échantillon. Pour se faire, l'équipe IPP a développé un algorithme écrit sur LabView qui consiste à enregistrer la série d'images sous la forme d'une matrice XYZ. Puis, un traitement d'images est réalisée sur les images XZ en fonction de Y pour extraire la visibilité des franges. Dans un premier temps, un filtre passe-bas est appliqué sur chaque image XZ, puis on soustrait le résultat obtenu à chaque image XZ initial. Dans un second temps, les valeurs des intensités sont élevées au carré pour n'avoir que des valeurs positives et doubler la fréquence. Puis, on applique à nouveau un filtre passe-bas pour obtenir l'enveloppe des franges d'interférences. Et enfin, on détermine le ou les pics de chaque enveloppe.

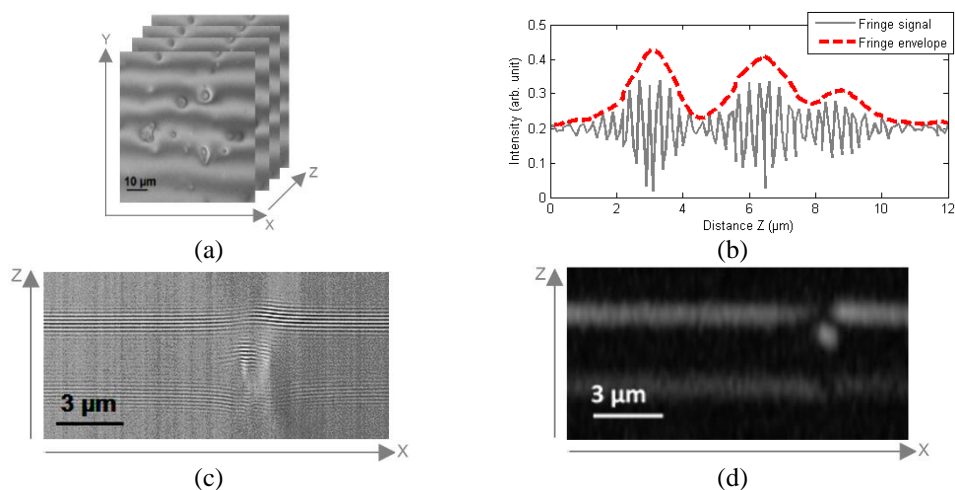


Figure 1-43. Etapes de la technique CPM. Exemple de (a) une pile d'images XYZ, (b) à partir d'un pixel d'une image XY de l'image XYZ pile, (c) des franges premières dans une image de XZ de l'image pile XYZ et (d) des franges traitées de (c) en utilisant le traitement 2D représenté avec une échelle linéaire sur un film de polymère de Mylar d'épaisseur 3 µm.

Quelques résultats typiques d'une série de motifs de franges acquise pour un film transparent de polymère de Mylar de 3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont présentés dans la [figure 1-43\(a\)](#). Les différentes interfaces et structures internes produisent plusieurs paquets de franges le long de l'axe optique. Un redressement et un filtrage passe-bas des signaux de franges à chaque pixel sont effectués pour obtenir l'enveloppe des franges indiquée en rouge sur la [figure 1-43\(b\)](#). Un algorithme de détection de pic permet d'obtenir des positions de la surface avant, les défauts éventuels à l'intérieur de la couche et la surface arrière. Puis, il est possible d'extraire de la matrice XYZ des images XZ pour observer les franges brutes le long de l'axe Z, comme le montre la [figure 1-43\(c\)](#). En utilisant l'algorithme de détection de franges 2D, sur la base du traitement des images XZ, les résultats dans les nouvelles images XZ montrent les enveloppes de franges, comme illustré sur la [figure 1-43\(d\)](#).

Un des avantages de cette technique est la possibilité de mesurer des surfaces d'objets de profondeur allant de plusieurs centaines de nanomètres à plusieurs dizaines de micromètres. De plus, des coupes tomographiques (en XZ) peuvent être obtenues. Cependant, un inconvénient non négligeable de cette technique est l'utilisation de l'espace mémoire d'autant plus importante que la surface analysée est grande.

## 1.7 Conclusion sur l'état de l'art en nanoscopie

Dans ce chapitre, après un petit historique de la microscopie optique pour situer le contexte des travaux, nous avons discuté des différentes définitions de la résolution latérale et axiale 2D et 3D en microscopie optique. Pendant longtemps cette limite de résolution optique a été de 400 nm dans le visible. Cependant, les avancées scientifiques actuelles nous ont prouvés que cette limite de diffraction peut être améliorée, donnant ainsi une nouvelle dimension (la super-résolution) aux microscopes optiques. Ces instruments super-résolus sont appelés nanoscopes. La nanoscopie optique en champ lointain est donc une des nouvelles techniques d'imagerie haute résolution, aujourd'hui largement utilisée en biophysique et en imagerie médicale, pour imager et caractériser des nanostructures, tout en conservant tous les avantages de l'imagerie optique en champ lointain comme un vaste champ, l'imagerie parallèle pour la visualisation et l'analyse en temps réel, et l'évolution vers une plus grande précision. La nanoscopie optique a l'avantage de pouvoir déceler sans marquage des structures nanométriques à l'intérieur des matériaux, des cellules ou encore des tissus.

Dans ce chapitre, nous avons présenté la différence entre les techniques de super-résolution et celles de nano-détection en nanoscopie optique en champ lointain. Parmi les techniques de super-résolution sans marquage, la microscopie TDM, qui consiste à faire varier l'angle d'éclairage afin d'augmenter la taille de l'ouverture numérique, permet une amélioration de la résolution d'un facteur 2. La technique SMON, permettant d'imager à travers une microsphère immergée dans de l'eau, peut atteindre une résolution latérale de 50 nm. En ce qui concerne les techniques de nano-détection, la microscopie TSOM, basée sur la connaissance de la fonction de transfert du système optique, permet de mesurer la position de structures simples et régulières (petites particules ou motifs réguliers) à l'aide de la super-localisation. La microscopie interférométrique utilise, quant à elle, la phase en temps réel pour extraire les informations nanométriques 3D de surfaces dans la direction Z. Cette technique peut être utilisée pour l'analyse de surface ou encore en tomographie optique, pour obtenir des tranches et des volumes de couches transparentes ou semi-transparentes sans marquage. Les applications possibles sont nombreuses. En biologie, il est possible de mesurer les positions de molécules individuelles dans des cellules. En sciences des matériaux ces

techniques peuvent être utilisées pour mesurer la distribution 3D des défauts dans des semi-conducteurs.

En microscopie interférométrique, il existe différents algorithmes de reconstruction 3D, comme par exemple l'algorithme de décalage de phase (PSM) ou les méthodes basées sur le principe de détection de l'enveloppe des franges d'interférence (PFSM, CPM, FSA, etc.).

La suite de mon projet de recherche a consisté à améliorer trois aspects en microscopie. Tout d'abord, pour une amélioration du temps de mesures, j'ai étudié la technique SIM en projection de franges à l'aide d'un système basé sur un projecteur miniature. Puis, avec un protocole développé combinant différentes techniques de traitements d'images, j'ai amélioré le pouvoir de détection en microscopie interférométrique, grâce à une augmentation du SNR et du contraste des images. Enfin, nous nous sommes intéressés à une nouvelle technique de super-résolution qui consiste à combiner la microscopie interférométrique aux effets des jets photoniques en utilisant une microsphère de verre. Cela a permis une amélioration de la résolution latérale du système.

#### **REMERCIEMENTS ET CONTRIBUTIONS**

Je tiens à remercier Robin Pierron pour les images 2D, 3D et les profils des PSF de la [figure 1-6](#), codés sur Matlab.

Je remercie également Camille Hairaye pour ses échantillons de *ripples*, de la [figure 1-38\(b\)](#).



---

## Chapitre 2. Étude des méthodes de reconstruction 3D par analyse de franges projetées et développement d'un profilomètre miniaturisé basé sur un projecteur pico-DLP

---

*The photons which constitute a ray of light behave like intelligent human beings: out of all possible curves they always select the one which will take them most quickly to their goal.*  
- Max Planck.

### RESUME DU CHAPITRE

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à la méthode de reconstruction 3D d'objets par décalage de phase. La technique consiste à déterminer la phase du front d'onde réfléchi en appliquant un décalage de phase (ou saut de phase) connu, une méthode bien rodée dans tous les domaines d'interférométrie pour quantifier les franges. Cette méthode peut être utilisée sur des franges d'interférence (« Phase Shifting Microscopy »), comme présenté dans le chapitre précédent ou sur des franges projetées (« Structured Illumination Microscopy ») à l'aide d'un dispositif de projection tel qu'un pico-DLP.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont fait l'objet des publications et des conférences suivantes :

- A. Leong-Hoi, P. Montgomery, B. Serio, P. Twardowski. High speed implementation of a three-dimensional shape profiler with submillimeter precision using a digital light processing device and a new efficient algorithm for absolute phase retrieval, *Optical Engineering*, Society of Photo-optical Instrumentation Engineers (SPIE), Vol. 54(3):034102-034102, 2015. ( IF : 0.984, SNIP : 0.85, SJR : 0.485 )
- A. Leong-Hoi, B. Serio, P. Twardowski, P. Montgomery. Three-dimensional surface reconstruction by combining a pico-digital projector for structured light illumination and an imaging system with high magnification and high depth of field, dans *SPIE Photonics Europe, Proceedings of the Society of Photo-optical Instrumentation Engineers*, Vol. 9132(913219), C. Gorecki, A.K. Asundi, W. Osten (Eds.), Bruxelles, Belgium, avril 2014.



## PLAN DU CHAPITRE

<b>2.1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>54</b>
<b>2.2</b>	<b>PRINCIPE DU DECALAGE DE PHASE.....</b>	<b>54</b>
2.2.1	Détermination de la phase relative par décalage de phase .....	54
2.2.2	Détermination de la phase absolue : déroulement de la phase .....	55
2.2.2.1	<i>Algorithme de déroulement de la phase : la phase codée</i> .....	56
2.2.2.2	<i>Algorithme plus rapide de déroulement de la phase : « Stair intensity »</i> .....	58
<b>2.3</b>	<b>AMELIORATION DES IMAGES POUR LA RECONSTRUCTION 3D .....</b>	<b>60</b>
2.3.1	Correction gamma .....	60
2.3.2	Traitement d'images pour optimiser le rapport signal à bruit .....	60
<b>2.4</b>	<b>SIMULATIONS : INFLUENCE DU BRUIT SUR LES IMAGES .....</b>	<b>61</b>
<b>2.5</b>	<b>RESULTATS EXPERIMENTAUX.....</b>	<b>65</b>
<b>2.6</b>	<b>COMPARAISONS DES METHODES DE DEROULEMENT DE LA PHASE .....</b>	<b>67</b>
<b>2.7</b>	<b>CONCLUSION DU CHAPITRE.....</b>	<b>68</b>

## 2.1 Introduction

Les techniques de reconstruction 3D sont largement utilisées dans la métrologie optique et dans de nombreux autres domaines tels que la vision par ordinateur, l'ingénierie inverse, ou en imagerie biologique et médicale. Le développement et l'évolution des imprimantes 3D ont conduit à une explosion dans l'utilisation des scanners 3D qui permettent une copie rapide de la forme d'un objet (Borghese et al., 1998). En effet, puisque les logiciels de conception graphique (CAO : *Computer Aided Design*) ne sont pas facilement maîtrisés par tout le monde et puisque les modèles d'objets en 3D librement disponibles sont limités pour le moment, il est nécessaire de développer de nouvelles méthodes, portables, efficaces, rapides et abordables en termes de coût afin de permettre la reconstruction 3D utilisables comme scanners 3D. Il existe de nombreuses méthodes pour la reconstruction 3D telles que la projection de franges, la stéréoscopie, l'interférométrie, le temps de vol des photons, etc. Parmi toutes ces techniques, nous nous sommes intéressés à l'interférométrie pour ses nombreux avantages, tels que la mesure rapide, sans contact, sans marquage, en plein champ, etc.

## 2.2 Principe du décalage de phase

Historiquement, parmi les premières techniques automatiques d'interpolation des franges d'interférences, la méthode du saut de phase, développée pendant les années 1980, a semblé donner les meilleurs résultats. Elle a été appliquée avec succès en Moiré, en interférométrie classique, avec du *speckle*, en holographie et en microscopie. En effet, la phase du front d'onde réfléchi et provenant de la surface d'un objet, par exemple en microscopie, contient des informations sur cette surface telle que le relief. Il est possible de déterminer la phase relative et la phase absolue de l'objet à observer à partir d'acquisitions d'images. Pour cela, il existe plusieurs techniques pour l'extraction de la phase (Stahl, 1991). Nous présentons deux méthodes particulières d'extraction de phase que nous avons implémentées sous Matlab et que nous avons testées pour différents échantillons.

### 2.2.1 Détermination de la phase relative par décalage de phase

Les algorithmes basés sur le principe de décalage de phase consistent à acquérir une série de  $N$  images ( $N$  étant un entier généralement compris entre 3 et 8). Les images obtenues sont déphasées entre elles avec un déphasage connu. A chaque pixel de coordonnées  $(x,y)$  d'une image, l'intensité peut être exprimée par l'équation suivante :

$$I(x, y) = I'(x, y) + I''(x, y) * \cos(\varphi(x, y)) \quad \text{Eq. (2-1)}$$

avec  $I'(x, y)$  l'intensité moyenne,  $I''(x, y)$  la modulation d'intensité et  $\varphi$  la phase du signal. L'acquisition d'au moins trois images avec un déphasage connu  $\alpha_i$  (cf. équation (3-6)) est nécessaire afin de déterminer les trois termes inconnus  $I'(x, y)$ ,  $I''(x, y)$  et  $\varphi(x, y)$ .

$$I_i(x, y) = I'(x, y) + I''(x, y) * \cos(\varphi(x, y) + \alpha_i) \quad \text{Eq. (2-2)}$$

où  $i$  est un entier supérieur à 3. On obtient alors la phase relative de l'objet avec la formule suivante :

$$\phi_{relative}(x, y) = - \operatorname{atan} \left[ \frac{\sum_{i=1}^N I_i(x, y) * \sin\left(\frac{2\pi}{N} i\right)}{\sum_{i=1}^N I_i(x, y) * \cos\left(\frac{2\pi}{N} i\right)} \right] \quad \text{Eq. (2-3)}$$

où  $N$  est le nombre d'images (supérieur à 3) acquises. Dans les cas particuliers de 3, 4 et 5 images, avec les sauts de phases respectifs de  $\frac{2\pi}{3}$ ,  $\frac{\pi}{2}$  et  $\frac{\pi}{2}$ , les formules permettant de retrouver la phase relative sont identiques que pour la méthode appliquée aux franges d'interférence et sont données dans le [tableau 1-3](#) du [chapitre 1](#). Le calcul dans le cas de la technique à 3 sauts est présenté en [annexe 2-1](#).

Cependant, l'utilisation de la fonction « arctangente » dans ces différents algorithmes de reconstruction de la phase a l'inconvénient de fournir des valeurs de la phase comprises entre  $-\frac{\pi}{2}$  et  $\frac{\pi}{2}$ , donc modulo  $\pi$  ([Creath, 1988](#)). Il est possible d'étendre la valeur de la phase entre 0 et  $2\pi$  en observant les signes des fonctions  $\sin\varphi$  et  $\cos\varphi$  (cf. [annexe 2-2](#)). Cependant, dans certains cas où la phase est supérieure à  $2\pi$ , elle présentera des discontinuités correspondant à des sauts de  $2\pi$ . Il suffit alors d'ajouter ou de soustraire  $2\pi$  lorsqu'une telle discontinuité est détectée pour ainsi obtenir la phase finale, nommée phase absolue. Cette technique est appelée déroulement de la phase. La hauteur de l'objet est ensuite obtenue à partir de la phase absolue suivant l'équation [Eq. \(1-16\)](#). Un inconvénient de la technique à 3 sauts de phase est le problème de linéarité entre 2 sauts. En effet, les surfaces présentent une forme en « S » au lieu d'avoir une pente droite. La technique à cinq sauts de phase permet de résoudre ce problème même si le temps de calcul est plus élevé par rapport à la technique à trois sauts (cf. [annexe 2-2](#)). La technique de décalage de phase peut être utilisée dans plusieurs types de configurations : soit par projection de franges sur un objet avec un décalage latéral des franges à chaque image, soit par interférence entre une image de l'objet et une image d'une référence provoquant ainsi des franges d'interférences.

Dans ces travaux de recherche sur les techniques pour améliorer la résolution latérale, on s'est d'abord intéressé à la technique SIM ([Gustafsson, 2000](#)). Pour cela, nous avons développé un système de projection de franges de taille réduite pour mieux comprendre les principes.

### 2.2.2 Détermination de la phase absolue : déroulement de la phase

Pour la reconstruction 3D macroscopique, les scanners de référence existants utilisent l'imagerie stéréoscopique, le balayage laser étant basé sur la technique de triangulation ou des méthodes de lumière structurée. La méthode basée sur la lumière structurée consiste à projeter un motif sur l'objet. L'utilisation de la projection d'une lumière codée ou de franges sinusoïdales permet d'obtenir des informations sur la profondeur de l'objet à partir de l'analyse de la déformation sur l'objet du motif des franges projetées et enregistrées par un capteur. Bien que cette méthode semble similaire à celle des franges de Moiré ([Patorski, 1993](#); [Pirodda, 1982](#)), la technique de la lumière structurée a l'avantage, par rapport à celle de Moiré, de n'utiliser qu'un motif de franges. Les autres avantages sont une facilité d'implémentation, une mesure rapide sans contact en plein champ et d'avoir un faible coût.

A l'échelle microscopique, un instrument de mesure de surfaces 3D utilisant la lumière structurée est le microscope sous illumination structurée (SIM). Dans un des modes de mesure du SIM, le principe de triangulation est employé et consiste à projeter un motif de franges sur l'échantillon à observer et à extraire les informations de hauteur à partir des déformations des franges. Cette méthode a pour avantages d'avoir une grande profondeur de champ. Dans un deuxième mode du SIM, la résolution spatiale peut être améliorée d'un facteur 2 ([Gustafsson et al., 2000](#)) par projection de franges non résolues et avec la formation de franges de moiré.

De nombreuses méthodes de reconstruction 3D à partir de projections d'un motif de franges existent, telles que la méthode de décalage de phase ([Huang, 2006](#); [Quan et al., 2010](#)), celles

basées sur les algorithmes de transformées de Fourier (Zhong et al., 2010) ou des ondelettes (Watkins, 2010). La méthode par décalage de phase à N images combinée à la technique de reconstitution de la phase absolue, où N est un entier supérieur à 3 est une technique bien adaptée à la reconstruction d'objets de forme complexe et nécessitent beaucoup moins de temps de calcul par rapport aux techniques utilisant la transformée de Fourier.

Nous avons choisi d'exploiter la technique de la microscopie SIM dans son 1<sup>er</sup> mode en utilisant un mini projecteur pico-DLP (Digital Light Projector), comme illustré dans le schéma de la figure 2-1. Cependant, il serait tout à fait possible de remplacer ce projecteur par une grille illuminée par une source incohérente par exemple. Cette grille serait alors placée directement dans le microscope, ou alors il serait aussi envisageable d'utiliser un modulateur spatial de lumière afin de projeter le motif souhaité.

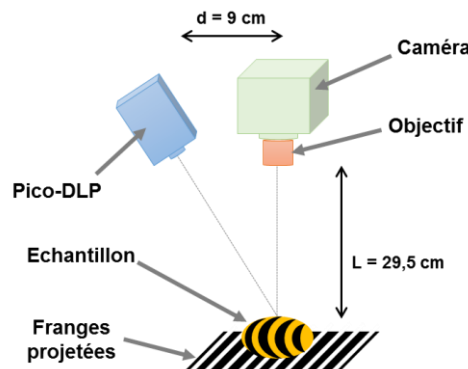


Figure 2-1. Schéma de la technique SIM dans son premier mode.

### 2.2.2.1 Algorithme de déroulement de la phase : la phase codée

Dans un premier temps, le motif de franges sinusoïdales est créé et enregistré, à l'aide du logiciel Matlab. Pour un contraste maximal (égal à 1), les franges ont la forme illustrée par la figure 2-2 et leurs intensités vérifient l'équation suivante :

$$I_i^{generated}(x, y) = \frac{1}{2} \left[ 1 + \cos \left( \frac{2\pi}{P} x + \frac{2\pi}{N} i \right) \right] \quad \text{Eq. (2-4)}$$

avec  $P$  la période des franges en pixels et  $N$  le nombre de sauts. Les motifs de franges sont alors projetés sur l'objet puis enregistrés à l'aide d'une caméra pour chaque décalage et ont la forme donnée par l'équation Eq. (2-2) Eq. (1-15) avec  $\alpha_i = \frac{2\pi}{N} i$ , où  $i$  varie entre 1 et N. La reconstruction de la phase relative est alors donnée par l'équation Eq. (2-3).

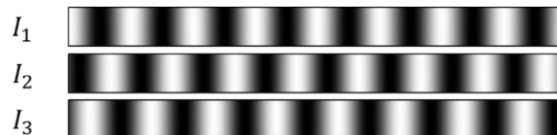


Figure 2-2. Motifs de franges sinusoïdales pour la technique à 3 sauts avec un décalage de  $2\pi/3$ .

Pour dérouler la phase relative dans la technique de projection de franges, il existe plusieurs méthodes et algorithmes (Guo & Huang, 2009; Huntley, 1989; Kemaio et al., 2008; Leong-Hoi et al., 2014; Meneses et al., 2005; Zhao et al., 1994). La technique utilisant le code Gray peut être utilisée pour dérouler la phase en créant un motif codé unique pour chaque saut de phase de  $2\pi$  selon les règles du code Gray (Zheng & Da, 2012a). Bien que cette technique fonctionne correctement dans de nombreuses applications, elle n'est pas assez robuste pour les surfaces

d'objets ayant un contraste élevé, puisque cette méthode est basée sur la mesure de l'intensité et non de la phase. Par ailleurs, le nombre de motifs en code Gray à projeter sur l'échantillon (en plus des  $N$  motifs de franges sinusoïdales utilisés pour obtenir la phase relative) est égal à  $\log_2(F)$  où  $F$  correspond au nombre total de franges présentes sur les premiers motifs projetés pour la phase relative. Par exemple, pour une projection d'un motif de 32 franges, il est nécessaire d'utiliser 5 motifs codés supplémentaires.

Une autre méthode pour la récupération de phase absolue est le codage de phase proposée par Zheng et al. qui consiste à utiliser 6 motifs supplémentaires quel que soit le nombre de franges (Zheng & Da, 2012b). Une autre méthode a été proposée par Wang et al. et consiste à projeter une série d'images avec un motif en escalier, avec un décalage de  $2\pi/3$  rad les uns par rapport aux autres pour le calcul de la phase absolue (Wang & Zhang, 2012). Cette technique présente les avantages de projeter seulement trois motifs supplémentaires pour le déroulement de la phase et d'être robuste. Dans un premier temps, les motifs en escalier sont créés et enregistrés, à l'aide du logiciel Matlab. Ces motifs ont la forme illustrée par la figure 2-3 et décrite par l'équation suivante :

$$I_i(x, y) = \frac{1}{2} \left[ 1 + \cos \left( \phi^S(x, y) + \frac{2\pi}{3} i \right) \right] \quad \text{Eq. (2-5)}$$

avec la phase codée  $\phi^S(x, y) = -\pi + \text{ceil} \left[ \frac{x}{P} - \frac{1}{2} \right] * \frac{2\pi}{F}$ ,  $\text{ceil}[x]$  l'entier le plus proche de  $x$  arrondi au supérieur,  $F$  le nombre total de franges égal à  $\text{Round} \left( \frac{\text{width of image}}{P} \right)$ , où  $\text{Round}(x)$  est l'entier le plus proche de  $x$  et  $i = \{1, 2, 3\}$ .

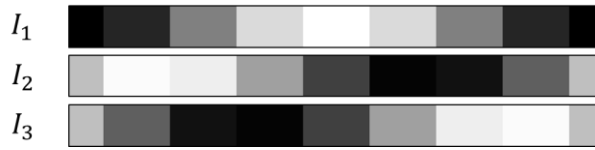


Figure 2-3. Motifs en escalier pour la technique de déroulement de phase à 3 sauts (décalage de  $2\pi/3$ ).

Les motifs sont alors projetés sur l'objet à étudier puis enregistrés à l'aide d'une caméra. De la même façon que pour la phase relative, les images acquises avec la caméra ont la forme suivante :

$$I_i(x, y) = I'(x, y) + I''(x, y) \cdot \cos \left( \phi^{S'}(x, y) + \frac{2\pi}{3} i \right) \quad \text{Eq. (2-6)}$$

La phase codée est donc obtenue avec l'équation suivante :

$$\phi^{S'}(x, y) = \text{atan} \left( \frac{\sqrt{3}(I_3(x, y) - I_2(x, y))}{2 * I_1(x, y) - I_2(x, y) - I_3(x, y)} \right) \quad \text{Eq. (2-7)}$$

Enfin, pour reconstruire la phase absolue de l'objet, il est nécessaire de déterminer l'ordre des franges  $K(x, y)$ , à savoir la position des sauts de phase de  $2\pi$ , avec la relation suivante :

$$K(x, y) = \text{Round} \left( \frac{F(\phi^{S'}(x, y) + \pi)}{2\pi} \right) \quad \text{Eq. (2-8)}$$

La phase absolue est donc obtenue en ajoutant  $2\pi$  à chaque saut de phase, comme suit :

$$\phi_{\text{absolute}}(x, y) = \phi_{\text{relative}}(x, y) + K(x, y) * 2\pi \quad \text{Eq. (2-9)}$$

Afin d'obtenir la hauteur de l'objet, une calibration au préalable est nécessaire, puis il suffit de soustraire la phase absolue de l'objet à observer par la phase absolue d'un plan de référence :

$$h(x, y) = c * [\phi_{absolute} - \phi_{absolute}^{ref}] \quad \text{Eq. (2-10)}$$

avec  $\phi_{absolute}^{ref}$  : phase absolue d'un plan de référence et  $c$  : constante déterminée après calibration. La figure 2-4 montre les profils des différentes phases (relative, codée et absolue) pour la méthode de Wang et al. à trois sauts.

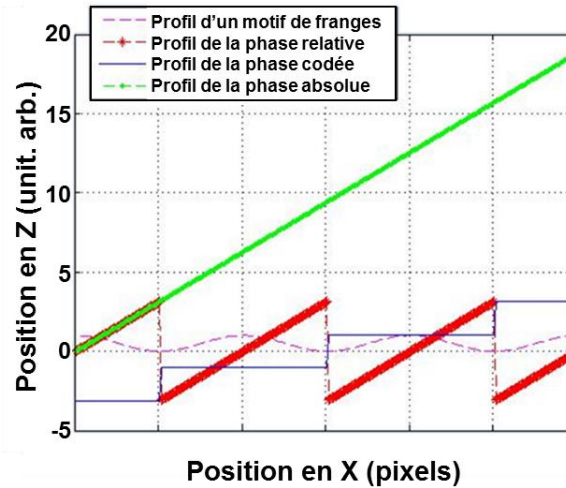


Figure 2-4. Profils des différentes phases pour la méthode de Wang et al.

### 2.2.2.2 Algorithme plus rapide de déroulement de la phase : « Stair intensity »

Nous avons proposé une nouvelle méthode générale pour reconstruire la phase absolue qui peut tout aussi bien être utilisée en macroscopique qu'en microscopique (Leong-Hoi et al., 2015a). Cette méthode a été mise en œuvre dans une configuration basée sur un projecteur miniature DLP. La méthode proposée, appelée « Stair Intensity » (S.I.) utilise un seul motif d'intensité en escalier supplémentaire pour déterminer les positions des discontinuités de  $2\pi$  permettant ainsi de dérouler la phase relative. Nous avons comparé le temps d'acquisition et de traitement, l'erreur quadratique moyenne (RMS : *Root Mean Square*) de la hauteur de la surface en fonction du bruit et les résultats expérimentaux pour notre méthode et celle proposée par Wang et al.

Le dispositif expérimental développé a une grande profondeur de champ d'environ 170 mm en utilisant une lentille de longueur focale de 8 mm et d'une ouverture numérique de 0,05. Le système dispose d'une distance de travail d'environ 295 mm et est basé sur un pico-projecteur DLP compact contrôlable à faible coût avec une résolution adaptée de 854x480 pixels utilisés pour reconstruire des objets avec une échelle millimétrique et un champ de vision d'environ 14,5 cm<sup>2</sup>. Ce système, combiné avec un algorithme efficace pour projeter un motif de franges d'intensité supplémentaire est plus rapide que les algorithmes classiques pour la récupération de phase absolue. De plus, dans cet algorithme, une méthode de traitement d'image a été introduite. Il s'agit de l'amélioration de l'image par un filtre médian de 5x5 pixels permettant de diminuer le bruit présent.

L'unique motif supplémentaire à projeter pour le déroulement de la phase est illustré par la figure 2-5 et est donné par l'équation suivante :

$$J^{generated} = \frac{1}{F} * \text{round} \left( \frac{x}{P} \right) \quad \in [0 ; 1] \quad \text{Eq. (2-11)}$$

où  $Round(x)$  correspond à l'entier le plus proche de  $x$  (avec  $Round(0,5) = 1$ ) et  $F$  est le nombre total de franges obtenu en calculant le nombre entier du rapport entre la taille de l'image projetée et la période des franges  $P$ .



Figure 2-5. Stair intensity pour  $P=50$  px et largeur d'image = 300 px.

Après projection sur l'objet, l'image du motif enregistrée par la caméra est donnée par :

$$J^{acq}(x, y) = I'(x, y) + I''(x, y) * (2 * J^{generated}(x, y) - 1) \quad \text{Eq. (2-12)}$$

où l'intensité moyenne est déterminée avec la relation suivante :

$$I'(x, y) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N I_i(x, y) \quad \text{Eq. (2-13)}$$

et la modulation d'intensité avec :

$$I''(x, y) = \frac{2}{N} \sqrt{\left( \sum_{i=1}^N I_i(x, y) \sin\left(\frac{2\pi}{N} i\right) \right)^2 + \left( \sum_{i=1}^N I_i(x, y) \cos\left(\frac{2\pi}{N} i\right) \right)^2} \quad \text{Eq. (2-14)}$$

Les niveaux de franges (« staircase ») sont ensuite déterminés avec la relation suivante :

$$S(x, y) = \frac{J^{acq}(x, y) - I'(x, y) + I''(x, y)}{2 * I''(x, y)} \quad \text{Eq. (2-15)}$$

L'ordre des franges  $K_s(x, y)$  puis la phase absolue et enfin la hauteur de l'objet sont déterminés respectivement par les équations Eq. (2-16), Eq. (2-17) et Eq. (2-18).

$$K_s(x, y) = Round(S(x, y) * F). \quad \text{Eq. (2-16)}$$

$$\Phi_{absolute}(x, y) = \phi_{relative}(x, y) + 2\pi * K_s(x, y) \quad \text{Eq. (2-17)}$$

$$h(x, y) = c' * \left[ \phi_{absolute}^{object}(x, y) - \phi_{absolute}^{referenceplane}(x, y) \right] \quad \text{Eq. (2-18)}$$

La figure 2-6 montre les profils des différentes phases (relative, codée et absolue) pour la nouvelle méthode à trois sauts proposée.

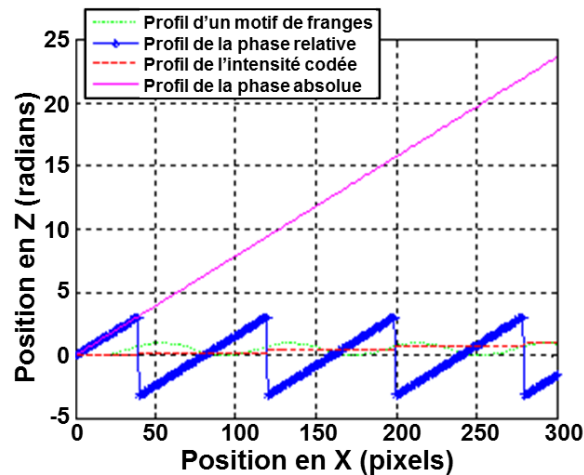


Figure 2-6. Profils des phases pour la méthode *Stair Intensity*.

## 2.3 Amélioration des images pour la reconstruction 3D

### 2.3.1 Correction gamma

Pour reconstruire les surfaces 3D à partir de motifs projetés sur l'objet à étudier, une technique habituelle est d'utiliser des motifs de franges sinusoïdales. La hauteur de la surface est obtenue en analysant les déformations de ces franges après l'acquisition de ces images avec une caméra. Cependant, les intensités des motifs générés,  $I_0$ , et celles des motifs projetés par un DLP,  $I_{out}$ , sont légèrement différentes. En effet, pour une meilleure visualisation les DLP modernes appliquent en général une correction gamma sur les images (Wang et al., 2010), donnée par l'équation suivante :

$$I_{out} = I_0^\gamma \quad \text{Eq. (2-19)}$$

où  $\gamma > 1$  est la correction gamma. La valeur de la correction gamma des projecteurs modernes est typiquement comprise entre 2,2 et 2,6. Pour obtenir un motif de franges sinusoïdales avec une caméra, une méthode simple et robuste est de modifier le motif initial avant la projection avec le DLP.

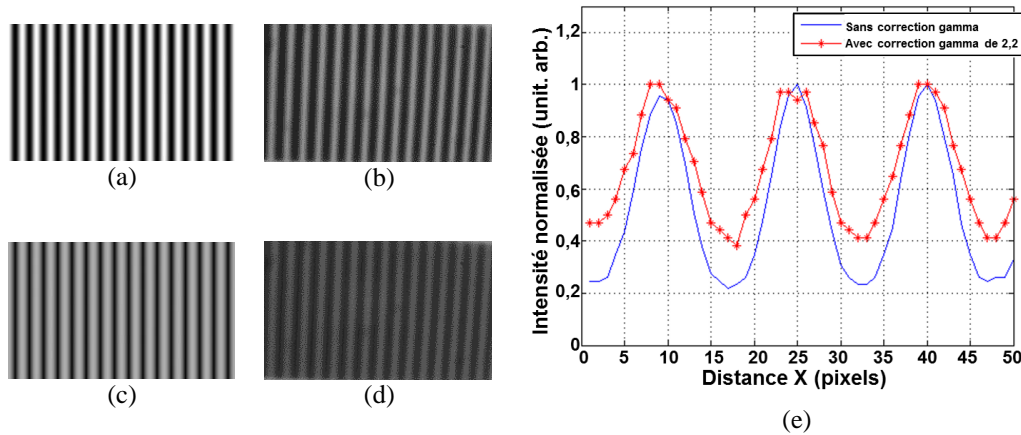


Figure 2-7. Comparaison des franges sans et avec correction gamma. Motifs de franges sans correction gamma (a) avant projection, (b) après projection ; avec correction gamma  $\gamma = 2,2$  (c) avant projection, (d) après projection. (e) Profils des motifs après projection.

Par conséquent, le motif de franges avant projection peut être généré à l'aide de l'équation suivante :

$$I_{corrected} = I_f^{1/\gamma} \quad \text{Eq. (2-20)}$$

où  $I_f$  est l'intensité du motif souhaité et  $I_{corrected}$  est l'intensité du motif à projeter après correction. Pour projeter le motif de franges sur l'objet à observer, nous avons utilisé un projecteur miniature PicoPix PPX2055. Les images sont ensuite acquises avec une caméra Prosilica EC1380. Avant la projection, une correction gamma avec  $\gamma = 2,2$  a été appliquée, donnant ainsi des franges sinusoïdales après acquisition avec la caméra (cf. figure 2-7). Une étude sur l'influence de la correction gamma sur les méthodes de décalage de phase pour reconstruire une surface 3D est présentée en annexe 2-3.

### 2.3.2 Traitement d'images pour optimiser le rapport signal à bruit

Une étape fondamentale et nécessaire dans toute technique de reconstruction 3D est le traitement d'images (cf. chapitre 3) pour améliorer la qualité des images acquises et augmenter le rapport



signal à bruit (SNR) (Petrou & Petrou, 2010; Russ, 2002). Deux méthodes sont utilisées dans ce chapitre pour réduire le bruit sur les images. La première méthode consiste à effectuer un moyennage des images. Une autre méthode est de réduire les erreurs de données en utilisant un filtre médian. Cette opération de filtrage sur 9 pixels consiste à remplacer chaque valeur d'un pixel par la valeur médiane de ses 8 pixels voisins.

Par exemple, pour la matrice de pixel  $\begin{bmatrix} b & c & d \\ e & a & f \\ g & h & i \end{bmatrix}$ , on remplace  $a$  par :

$$a = \text{median}[a \ b \ c \ d \ e \ f \ g \ h \ i] \quad \text{Eq. (2-21)}$$

où  $\text{median}[\ ]$  est la fonction qui détermine la valeur médiane. Lorsque cette opération est effectuée pour chaque pixel, une partie du bruit de l'image peut être supprimée. En effet, chaque image se compose de fluctuations aléatoires du bruit, qui peuvent être réduits par un simple filtrage. Afin d'éliminer davantage le bruit, un filtrage avec beaucoup plus de valeurs autour de chaque pixel peut être utilisé. Cette méthode est bien adaptée pour réduire le bruit en éliminant les valeurs extrêmes et présente moins de flou qu'en faisant la moyenne des pixels. Toutefois, un inconvénient est que cette méthode peut supprimer certaines informations de l'image dans le cas de grands filtrages de la matrice, ce qui réduit donc la résolution latérale.

Pour le nouvel algorithme proposé, une simulation a été effectuée, ainsi qu'une étude du bruit et une comparaison avec la méthode de Wang et al. (2012).

## 2.4 Simulations : influence du bruit sur les images

Pour illustrer le principe de méthode, des simulations de la reconstruction en 3D par projection de franges ont été réalisées à l'aide du logiciel Matlab. Des images, de taille 300 x 300 pixels, de franges sinusoïdales avec une période de 50 pixels, ont été créées et projetées sur un bloc rectangulaire ayant une taille de base de 200 x 100 pixels. Pour le système qui a été mis au point, le champ de vision correspondrait à 1,8 x 1,8 mm et la base de l'échantillon correspondrait à une taille de 1,2 x 0,6 mm. La figure 2-8 montre les résultats de la reconstruction 3D obtenus avec la technique de décalage de phase à 3 sauts combinée avec notre méthode de déroulement de la phase pour reconstruite la phase absolue.

Afin de tester la robustesse de l'algorithme et d'évaluer sa sensibilité au bruit, une étude de comparaison entre notre méthode S.I. et celle proposée par Wang et al. a été réalisée, en utilisant le même bruit pour les techniques 3, 4 et 5 sauts. Le bruit introduit est de forme gaussienne, avec une moyenne nulle et un écart-type variant de 0,0005 à 0,1. Tout d'abord, une série d'images de franges bruitées sur un plan de référence a été simulée, suivie de la reconstruction de la phase absolue. A partir des données calculées, la phase bruitée résultante a ensuite été comparée à la phase absolue idéale. Enfin, l'erreur quadratique moyenne (RMS) d'un profil a été calculée, après avoir appliqué un filtre médian de 5x5 pixels, comme indiqué dans le tableau 2-1. La valeur RMS est donnée par :

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2} \quad \text{Eq. (2-22)}$$

avec  $n$  le nombre de points et  $y_i$  les valeurs de hauteurs des pixels.

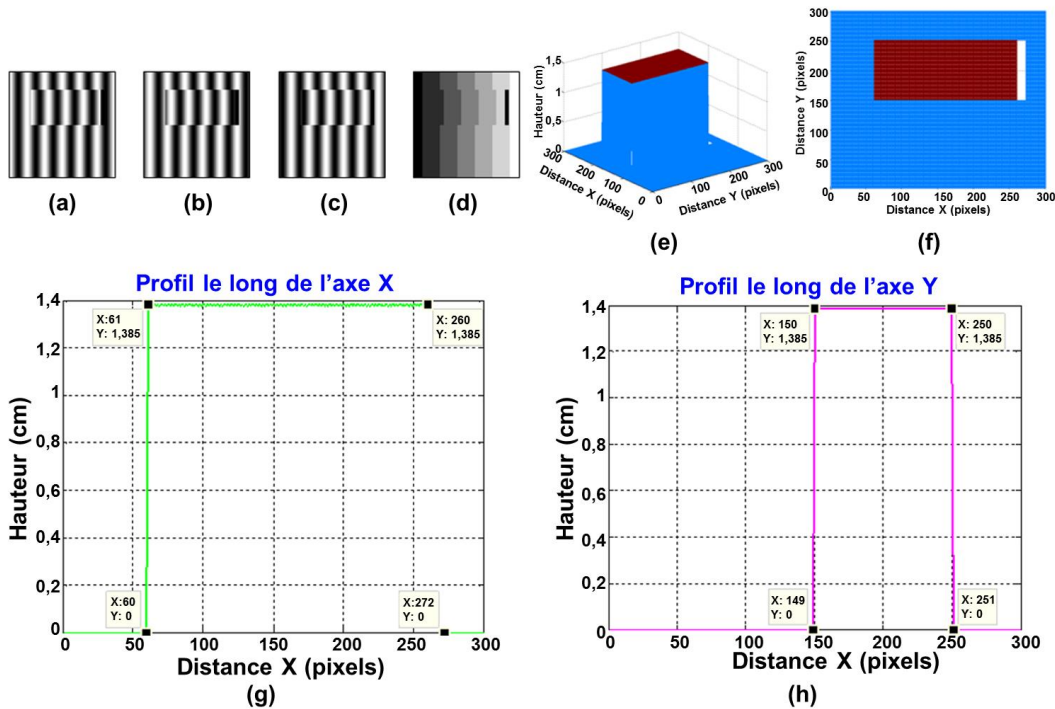


Figure 2-8. Simulation de la reconstruction 3D d'un bloc. (a)-(d) Simulation des motifs de franges projetées sur le bloc; (e) vue de côté du bloc 3D reconstruit, (f) vue du haut du bloc reconstruit; (g) profil du bloc reconstruit le long de l'axe X (h) le long de l'axe Y.

Tableau 2-1. Valeur RMS des mesures de surface selon l'écart-type du bruit pour les deux méthodes.

Ecart-type du bruit	3-sauts		4-sauts		5-sauts	
	S.I.	Wang et al.	S.I.	Wang et al.	S.I.	Wang et al.
0,001	0,08	0,03	0,08	0,03	0,07	0,02
0,005	0,80	0,06	0,73	0,06	0,79	0,05
0,01	1,71	0,08	1,75	0,07	1,75	0,06

En règle générale, un système composé d'une caméra CCD présente un bruit dont l'écart-type est compris entre un et deux niveaux de gris (pour une dynamique de couleurs de 8 bits). Ce bruit peut être modélisé, après normalisation, par un bruit blanc gaussien avec une moyenne de 0 et une variance comprise entre 0,39% et 0,78%. La figure 2-9 montre un exemple d'histogramme de la transmission du bruit de notre système, obtenu par la soustraction des deux images acquises à des moments différents. Selon la distribution de probabilité normale, l'histogramme présente la forme d'une gaussienne avec une moyenne de 0 et une variance de 2 niveaux de gris. Les résultats présentés dans le tableau 2-1 montrent que la méthode de Wang et al. est moins sensible au bruit.

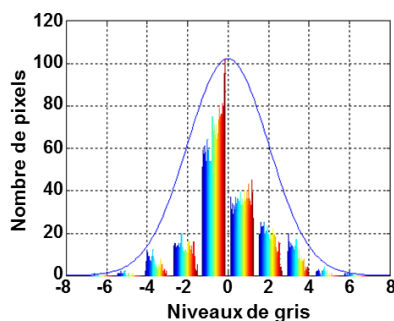


Figure 2-9. Histogramme du bruit de notre système.

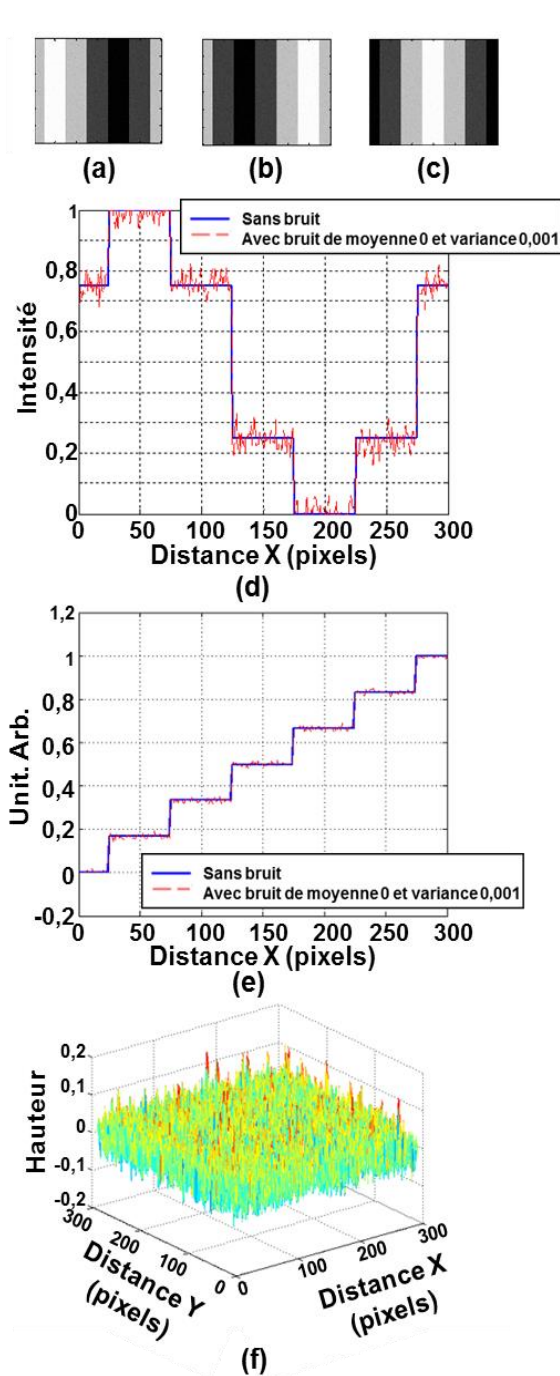


Figure 2-10. Sensibilité au bruit (de moyenne 0 et de variance 0,001) pour la méthode de Wang et al. (a)-(c) Motifs de franges pour la reconstruction de la phase codée avec un bruit de moyenne 0 et de variance 0,001; (d) Profil de (a) avec et sans bruit; (e) profil de la phase codée avec et sans bruit; (f) reconstruction 3D du plan de référence avec du bruit.

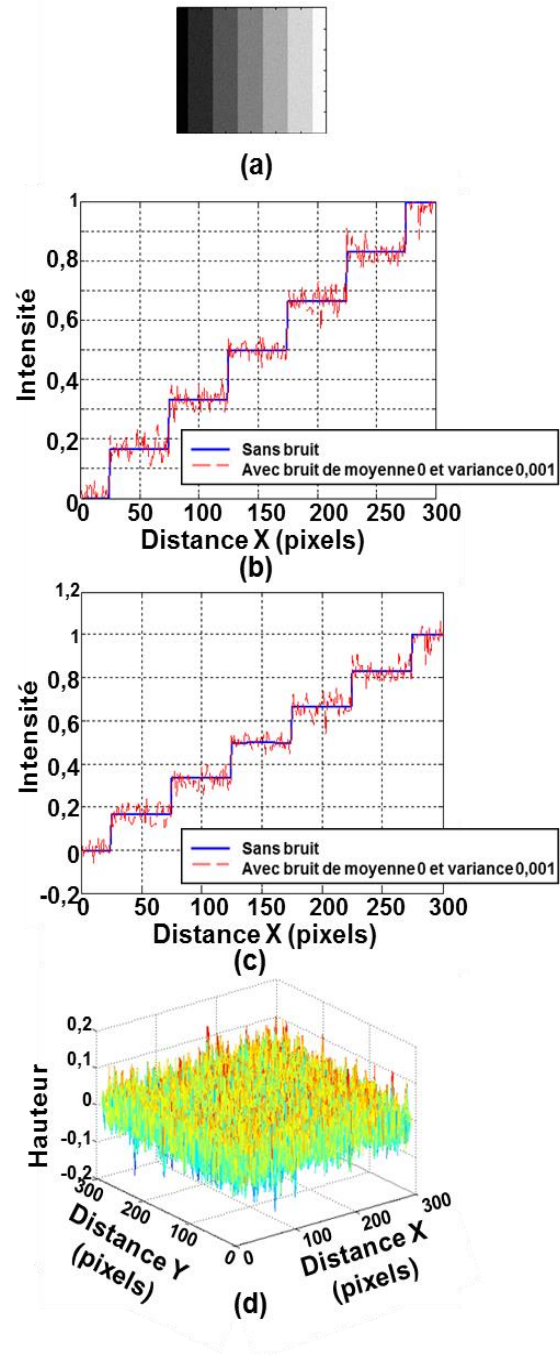


Figure 2-11. Sensibilité au bruit de moyenne 0 et de variance 0,001) pour la méthode « Stair intensity ». (a) Motif de franges pour la reconstruction avec un bruit de moyenne 0 et de variance 0,001; (b) profils de (a) avec et sans bruit; (c) profil des niveaux de franges avec et sans bruit; (d) reconstruction 3D du plan de référence avec du bruit.

Mais la différence entre les erreurs RMS entre les deux méthodes est comprise entre 0,40% (pour un écart type du bruit de 0,001) et 7% (pour un écart type du bruit de 0,01), sachant que le bruit de notre système est inférieur à 0,01. Cette erreur est acceptable compte tenu du gain de temps de notre méthode.

La [figure 2-10](#) et la [figure 2-11](#) montrent les résultats de la simulation des motifs de franges sans et avec un bruit gaussien de moyenne nulle et de variance 0,001 pour la méthode de Wang et al. et notre méthode S.I. respectivement. L'influence d'un bruit blanc gaussien sur la phase codée et sur l'intensité en escalier de notre méthode est étudiée. La phase codée proposée par Wang et al. est obtenue en utilisant une fonction arctangente comme dans l'équation [Eq. \(2-7\)](#) et est illustrée dans la [figure 2-10](#) [figure 2-12\(e\)](#). L'intensité en escalier est obtenue avec l'équation [Eq. \(2-15\)](#) et est présentée sur la [figure 2-11\(c\)](#). En observant et en comparant la phase codée et l'intensité en escalier après normalisation, on peut constater que le bruit est 2% plus faible pour la phase codée que pour l'intensité en escalier.

Les deux méthodes sont ensuite comparées entre elles en observant les courbes de l'ordre des franges  $K$  et les phases absolues avec et sans bruit, comme présenté dans la [figure 2-12\(a\)](#) et la [figure 2-12 \(b\)](#) respectivement. Les fonctions donnant l'ordre des franges,  $K$  et  $K_s$ , exprimées par les équations [Eq. \(2-8\)](#) et [Eq. \(2-16\)](#) respectivement sont calculées pour les deux méthodes, et une comparaison de cette fonction est illustrée sur la [figure 2-12\(a\)](#). Les résultats obtenus en calculant les phases absolues, comme illustrés dans la [figure 2-12 \(b\)](#), montrent que la méthode avec l'intensité en escalier est seulement 5% plus sensible au bruit que la méthode proposée par Wang et al. La différence entre les deux méthodes après application d'un filtre médian est seulement de 0,40%, ce qui est une concession acceptable puisque le temps d'acquisition est plus rapide de 25% à 33% pour notre méthode.

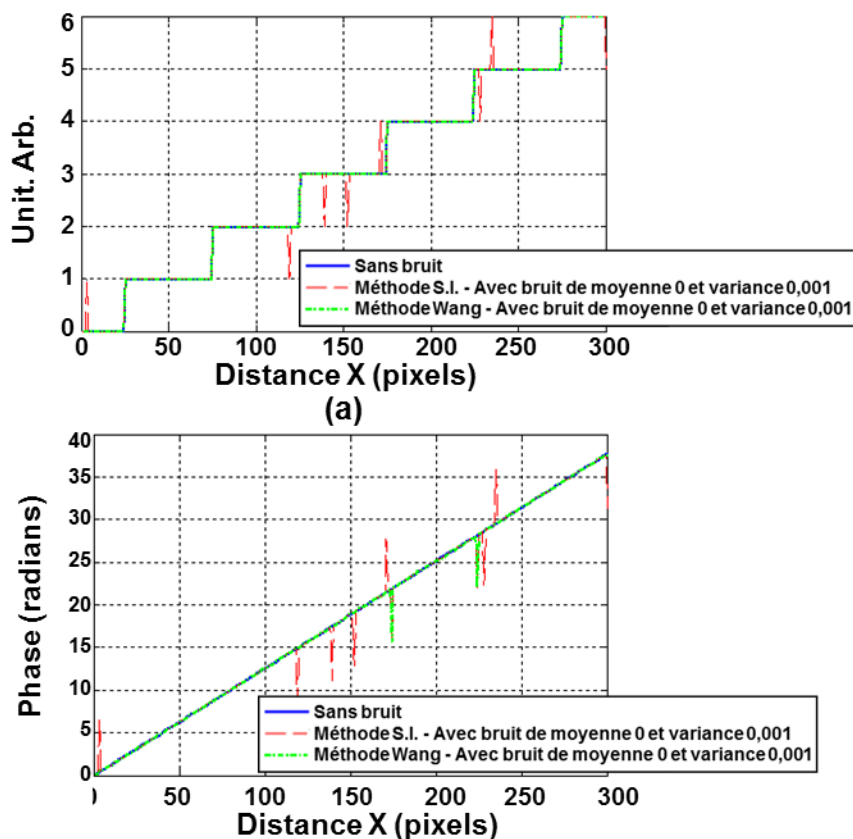


Figure 2-12. Comparaison de la sensibilité au bruit (de moyenne 0 et de variance 0,001) pour les deux méthodes. (a) Profils de la fonction donnant l'ordre des franges  $K$ ; (b) profils des phases absolues.

## 2.5 Résultats expérimentaux

Le système SIM, présenté dans la [figure 2-13](#), que nous avons développé est composé d'un projecteur miniature PicoPix PPX2055 et d'une caméra monochrome Prosilica EC1380 (dont les fiches techniques sont données en [annexe 2-4](#)). Avant la projection, une correction gamma avec  $\gamma = 2,5$  a été réalisée sur les motifs de franges. L'objet étudié est un bouchon de bouteille ([Leong-Hoï et al., 2014](#)). Une étude sur la profondeur de champ de la camera Prosilica EC1380 est présentée en [annexe 2-5](#). La [figure 2-14](#) montre les résultats obtenus avec la technique de Wang et al. à trois sauts puis à cinq sauts. On remarque que la technique à cinq sauts donne une surface plus lisse que la méthode à trois sauts.

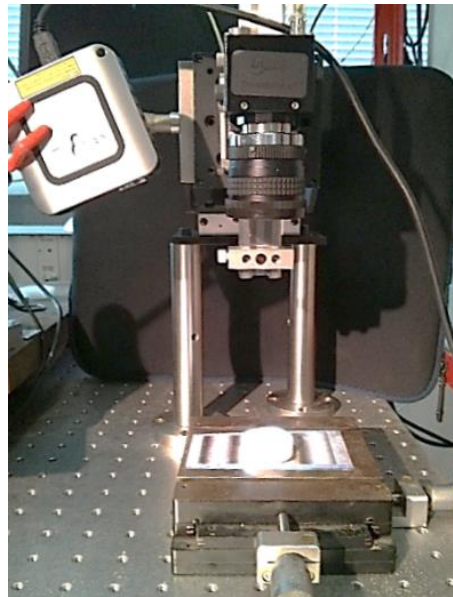


Figure 2-13. Photo du système SIM développé.

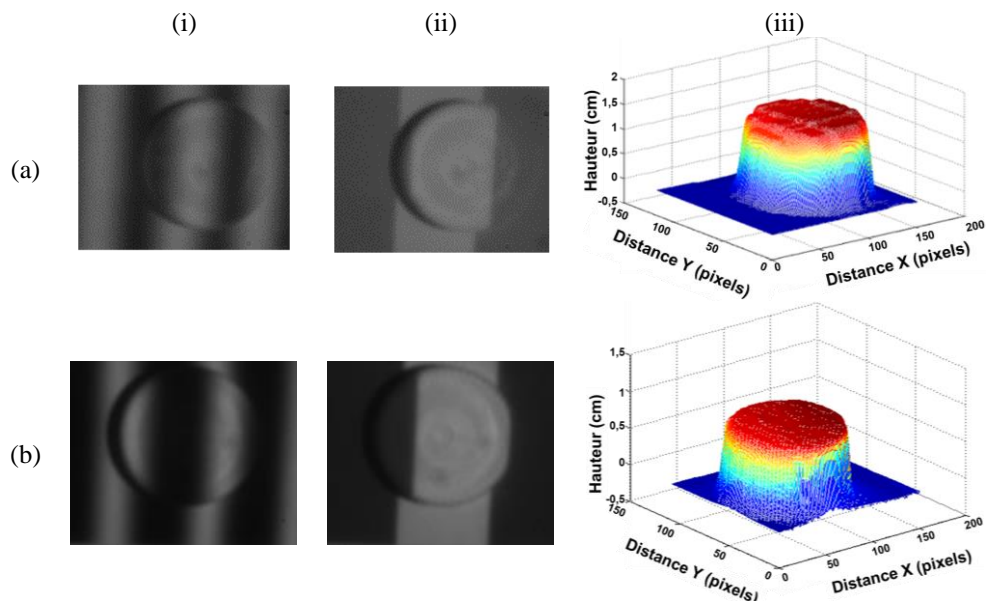


Figure 2-14 : Reconstruction macroscopique avec la méthode à 3 et 5 sauts avec la correction gamma 2,2. (a) Méthode à 3 sauts (décalage  $2\pi/3$ ) et (b) méthode à 5 sauts (décalage  $2\pi/5$ ) avec : (i) image des franges projetées sur l'objet pour la phase relative, (ii) pour la phase codée et (iii) reconstruction 3D.

L'algorithme proposé, comme illustré sur l'organigramme de la [figure 2-15](#), consiste d'abord à créer les motifs de franges corrigés avec une correction gamma de  $\gamma = 2,5$  avant de les projeter.

La phase absolue d'un plan de référence est, dans un premier, enregistré avant de reconstruire la phase absolue de l'objet à étudier. Ensuite, pour obtenir la topographie de l'objet, la phase du plan de référence est soustraite à celle de l'objet. Enfin, la dernière étape consiste à utiliser un filtre médian avec une fenêtre de 5x5 pixels pour éliminer certaines erreurs dues au bruit sur les images.

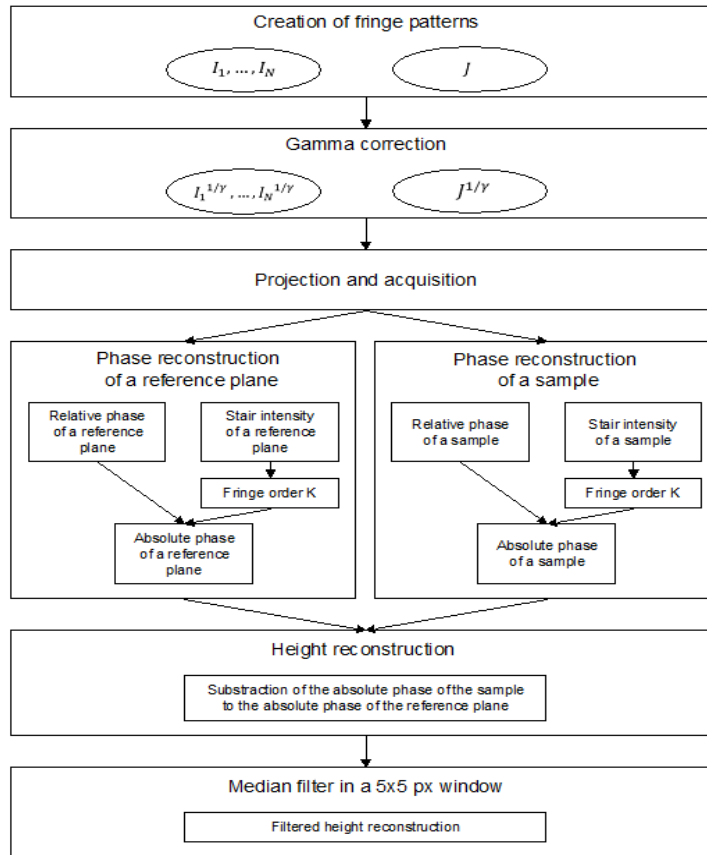


Figure 2-15. Schéma de l'implémentation de la technique (Leong-Hoi et al., 2015a).

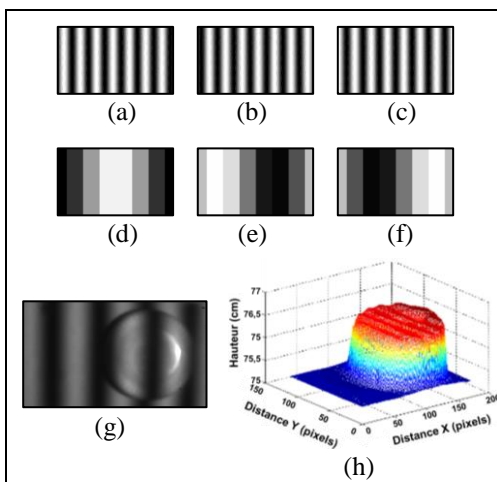


Figure 2-16. Reconstruction 3D par projection de franges par la méthode de Wang et al. (a)-(f) Motifs de franges avant projection et (g) après projection sur l'échantillon; (h) Reconstruction 3D de l'échantillon avec vue de côté.

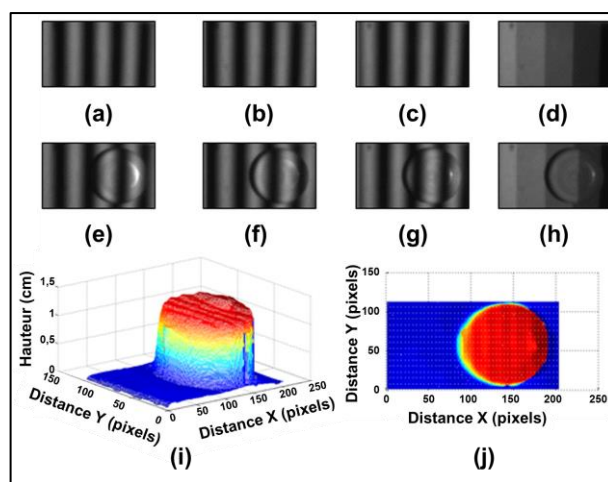


Figure 2-17. Reconstruction 3D par projection de franges par la méthode *Stair intensity*. (a)-(d) Motifs de franges projetés sur le plan de référence et (e)-(h) sur l'échantillon; (i) Reconstruction 3D de l'échantillon avec vue de côté et (j) vue du haut.

La [figure 2-16](#) montre les résultats obtenus après l'application de l'algorithme précédent sur un bouchon de bouteille avec la technique de décalage de phase à 3 sauts pour la méthode de Wang et al. La [figure 2-17](#) montre les résultats obtenus sur le même échantillon avec la méthode S.I. La taille des images acquises est de 211 x 121 pixels et la période des franges est de 52 pixels (quatre période de franges sur les images).

## 2.6 Comparaisons des méthodes de déroulement de la phase

Une comparaison de la méthode proposée avec celle de Wang et al. a été ensuite réalisée sur le même échantillon en utilisant la technique de décalage de phase à 5 sauts, avec une taille d'image de 211 x 121 pixels et une période de franges de 52 pixels. Puis, un profil de chaque reconstruction 3D a été observé, comme montré sur la [figure 2-18](#), pour une position de la ligne à  $Y = 120$  pixels. Le nouvel algorithme est en accord avec celui de la méthode de Wang et al. En effet, sur la [figure 2-18\(b\)](#), la différence de hauteur absolue entre les deux méthodes est d'environ  $210 \mu\text{m}$ . La hauteur de l'échantillon mesurée avec une jauge de hauteur donne une valeur de  $1,0 \pm 0,01 \text{ cm}$ .

Une mesure plus précise au bord de notre échantillon a été effectuée avec un profilomètre à stylet (Dektak® 150 Profiler de surface), comme le montre le zoom sur la [figure 2-18\(c\)](#). La présence d'une bosse au niveau du bord, mesurée avec le Dektak® d'environ  $60 \mu\text{m}$  de hauteur, montre que la nouvelle technique peut atteindre une résolution axiale de quelques dizaines de  $\mu\text{m}$ . Ainsi, en utilisant le nouvel algorithme, l'enregistrement de la forme d'un objet peut être réalisé rapidement et avec une bonne précision axiale. En [annexe 2-6](#), une étude plus approfondie des comparaisons entre les deux méthodes est présentée.

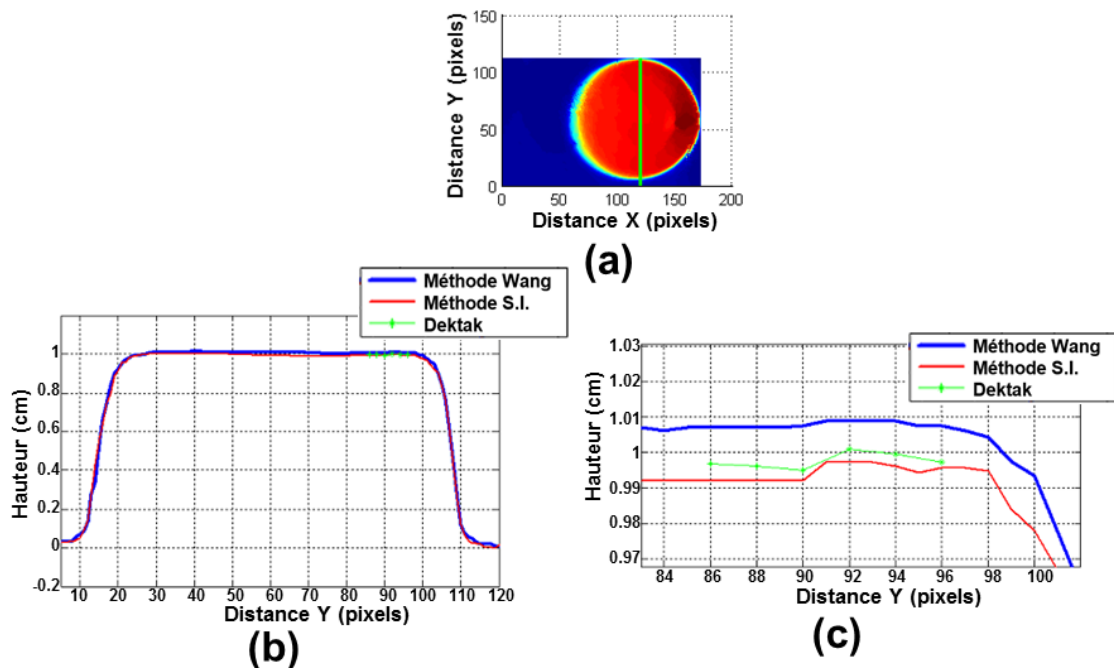


Figure 2-18. Comparaison des profils avec les différentes méthodes. (a) Position du profil sur l'objet 3D; (b) Profil avec les deux méthodes (Wang et al. et « Stair Intensity ») suivant  $Y=120$  pixel et mesures avec le profilomètre Dektak®; (c) Grandissement de (b).

Nous avons donc proposé une nouvelle technique générale pour récupérer la phase absolue en utilisant un seul motif d'intensité en escalier supplémentaire pour la méthode de décalage de phase (3, 4 ou 5 sauts) utilisée dans les techniques de projection de franges. La technique proposée réduit

le temps total (temps de projection, d'acquisition et de traitement de l'algorithme) jusqu'à 33% par rapport à la méthode de déroulement de phase de Wang et al., mais avec une légère augmentation du bruit allant jusqu'à 7%. En raison de l'avantage d'un nombre réduit d'images à projeter et à acquérir, il est donc plus rapide que les techniques nécessitant d'autres motifs supplémentaires. Nous avons en outre présenté des résultats de simulation 3D et des résultats expérimentaux qui illustrent les performances de la méthode proposée. Bien que la nouvelle méthode n'ait pas la même robustesse en termes de sensibilité au bruit, elle utilise néanmoins des fonctions moins complexes dans l'algorithme et est donc plus rapide en termes d'acquisition et de temps de traitement. Cet avantage pourrait permettre une reconstruction 3D en temps réel par l'intégration du système et de l'algorithme dans un réseau de portes programmables (FPGA : *field-programmable gate array*) ou dans un système embarqué.

## 2.7 Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons vu la méthode de décalage de phase permettant la reconstruction en 3D d'objets à partir de l'analyse de franges, utilisée en microscopie SIM sur des franges projetées à l'aide d'un dispositif de projection. Nous avons développé un prototype basé sur un projecteur DLP miniature afin de projeter les motifs de franges et nous avons mis au point un nouvel algorithme plus rapide pour reconstruire la phase absolue d'un objet. Bien que les résultats macroscopiques soient encourageants, nous avons compris que l'application de la technique SIM à la CSI était possible mais nécessiterait le développement de toute une instrumentation spécifique comme le montre Lehmann et al. dans (Lehmann et al., 2014). Par conséquent, nous avons préféré explorer d'autres pistes. Toutefois, ce travail pourra être repris par la suite et une des perspectives possibles serait d'effectuer des simulations plus poussées sur le bruit introduit sur les images acquises en tenant compte du bruit de photons.

### REMERCIEMENTS ET CONTRIBUTIONS

Je remercie très sincèrement Monsieur Dalibor Vukicevic et Monsieur Yoshitate Takakura pour leurs conseils, leur aide et leur soutien lors de mes manipulations expérimentales et en particulier pour le montage du système à projection de franges à l'aide d'un projecteur pico-DLP.

Je tiens également à remercier Stéphane Roques pour sa disponibilité et son aide pour la mesure au profilomètre à stylet (Dektak® 150 Profiler de surface) dans la [figure 2-18](#).



---

# Chapitre 3. Méthodes et algorithmes de traitement d'images pour améliorer le pouvoir de détection et la résolution latérale en microscopie interférométrique

---

*Science knows no country because knowledge belongs to humanity  
and is the torch which illuminates the world.  
- Louis Pasteur.*

## RESUME DU CHAPITRE

L'analyse d'images interférométriques acquises avec une caméra à travers un système FF-OCT permet d'obtenir des images tomographiques. Cependant, le bruit dans les images peut masquer certaines structures importantes ou induire des erreurs dans la taille de ces détails. En astronomie, des procédures complexes de traitement d'images ont déjà été mises au point dans la chaîne d'acquisition d'images, de post-traitement et de réduction des données afin d'améliorer la résolution et la puissance de détection des télescopes. Certaines de ces procédures pourraient également être appliquées à la microscopie, ce qui permettrait d'améliorer la qualité des images en microscopie en augmentant le SNR. De la même façon, la plage dynamique des images peut être améliorée en augmentant le contraste en combinant les images acquises avec des temps d'exposition différents ou avec des intensités d'éclairage différentes. Il en résulte une amélioration de la résolution latérale permettant de se rapprocher de la limite de diffraction du microscope et d'accroître la puissance de détection, ce qui permet l'observation de nouvelles structures de taille sub-micrométrique. Dans ce chapitre, nous présenterons une nouvelle procédure rigoureuse « IMPROVE-Protocol », basée sur une combinaison de techniques de traitement d'images, en nanoscopie optique sans marquage, appliquée au système FF-OCT utilisant un éclairage incohérent, avec pour objectif de pouvoir observer des détails microscopiques non résolus dans des matériaux.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont fait l'objet des publications et des conférences suivantes :

- A. Leong-Hoï, P. Montgomery, B. Serio, P. Twardowski, W. Uhring. High-dynamic-range microscope imaging based on exposure bracketing in full-field optical coherence tomography, *Optics Letters*, Optical Society of America, Vol. 41(7):1313, 2016. ( IF : 3.04, SNIP : 1.532, SJR : 2.397 )
- A. Leong-Hoï, P. Montgomery, B. Serio, W. Uhring, E. Pecheva. Improvement in measurements of hydroxyapatite layers by hybrid high dynamic range image processing in white-light interferometry, dans *EMR-S - Nanomaterials, Light interaction with nanomaterials*, Lille, France, mai 2016.
- A. Leong-Hoï, R. Claveau, P. Montgomery, B. Serio, W. Uhring, F. Anstotz, M. Flury. High resolution full-field optical coherence tomography using high dynamic range image processing, dans *Optical Micro- and Nanometrology, SPIE Photonics Europe*, SPIE (Eds.), Bruxelles, Belgium, avril 2016.
- A. Leong-Hoï, R. Claveau, M. Flury, W. Uhring, B. Serio, F. Anstotz, P. Montgomery. Detection of defects in a transparent polymer with high resolution tomography using white light scanning interferometry and noise reduction, dans *SPIE Optical Metrology 2015*, Vol. Proc. SPIE 9528:952807, Munich, Germany, juin 2015.
- P. Montgomery, A. Leong-Hoï, R. Claveau, F. Salzenstein. Amélioration des performances en Full-Field OCT par traitement d'images pour la caractérisation d'un film de polymère, dans *Journées Imagerie Optique Non Conventionnelle (JIONC), GDR ISIS & GDR ONDES*, Paris, France, mars 2016.
- R. Claveau, A. Leong-Hoï, W. Uhring, M. Flury, B. Serio, P. Montgomery. Algorithmes de réduction de bruit en tomographie interférométrique à haute résolution pour la détection de pores dans un polymère transparent, dans *Mesures et techniques optiques pour l'industrie (CMOI)*, Lannion, France, novembre 2015.

## PLAN DU CHAPITRE

<b>3.1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>72</b>
<b>3.2</b>	<b>TYPES DE CAPTEURS PHOTOGRAPHIQUES .....</b>	<b>75</b>
3.2.1	Capteurs CCD .....	75
3.2.2	Capteurs CMOS .....	75
<b>3.3</b>	<b>PRINCIPES DU TRAITEMENT D'IMAGES .....</b>	<b>78</b>
3.3.1	Transformations LUT.....	78
3.3.2	Moyennage d'images .....	79
3.3.3	Corrections du FPN.....	81
	3.3.3.1 Correction « Dark ».....	81
	3.3.3.2 Correction « Flat ».....	81
3.3.4	Technique HDR.....	83
3.3.5	Combinaison des techniques : IMPROVE-Protocol .....	87
<b>3.4</b>	<b>MONTAGE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>88</b>
3.4.1	Le système.....	88
3.4.2	Implémentation du logiciel.....	89
3.4.3	Temps de traitement.....	90
<b>3.5</b>	<b>RESULTATS SUR DES MICROBILLES DE 4 µM DE DIAMETRES DANS DU SU-8.....</b>	<b>90</b>
<b>3.6</b>	<b>RESULTATS SUR DES ECHANTILLONS D'HYDROXYAPATITE .....</b>	<b>93</b>
<b>3.7</b>	<b>CONCLUSION DU CHAPITRE.....</b>	<b>97</b>

### 3.1 Introduction

A l'origine, la microscopie permettait une étude qualitative des échantillons observés. L'utilisation et l'avancée des capteurs ont rendu possible l'extraction automatique de données pour une approche quantitative. Cependant, ces capteurs numériques sont souvent eux-mêmes la source de plusieurs erreurs dans les mesures car ils introduisent du bruit dans les images. Le développement des méthodes d'analyse et de traitement d'images afin de réduire le bruit présent sur les images après l'acquisition est alors devenu de plus en plus important.

Les couches transparentes telles que les polymères peuvent contenir des défauts qui ne sont pas détectables avec les techniques de mesures optiques classiques. En microscopie interférométrique une analyse tomographique peut être utilisée afin d'obtenir des informations sur la composition de l'échantillon en profondeur. Par balayage de franges le long de l'axe Z avec le traitement de signal approprié, nous avons montré qu'il était possible de révéler à partir de l'enveloppe des franges la présence de certaines structures (Montgomery et al., 2012b). L'observation des images en coupe XZ ne permet pas toujours de visualiser les structures de faibles contrastes et de tailles micrométriques qui peuvent être noyées dans le bruit d'acquisition vidéo de la caméra. Différentes techniques de traitement d'images existent et permettent de réduire le bruit présent sur les images. L'analyse d'images interférométriques acquises par FF-OCT avec une caméra permet d'obtenir des images tomographiques, dans lesquelles des surfaces et autres structures à l'intérieur de l'échantillon transparent sont alors perceptibles. La technique FF-OCT peut également être utilisée pour observer des interfaces et des structures enfouies sous des couches transparentes, mais dans ce cas d'imagerie, le rapport signal sur bruit peut être très faible en raison de la faible réflectivité, du bruit et des artefacts. Les images dans l'analyse tomographique en profondeur peuvent également être dégradées, et par conséquent les structures de tailles proches de la limite de Rayleigh sont perdues dans le bruit.

Parmi les nombreuses techniques qui existent pour améliorer la résolution, le traitement d'image est une méthode qui n'induit aucune modification ni dans la configuration du système ni dans l'échantillon. En effet, la résolution latérale (comme axiale) peut être dégradée à cause de plusieurs sources de détérioration de la qualité de l'image dues au capteur (Healey & Kondepudy, 1994; Mullikin et al., 1994). Une des causes de dégradation est le bruit aléatoire, appelé aussi le bruit de lecture de la caméra qui varie avec le temps et peut être réduit en faisant un simple moyennage d'images. Une autre source de dégradation est le bruit *Fixed Pattern Noise* (FPN) (Lukas et al., 2006; Michel et al., 1997). La valeur par défaut de chaque pixel sans éclairage n'est pas uniforme sur l'ensemble du réseau de capteurs. Ces effets peuvent être corrigés par la soustraction d'une image noire obtenue en obstruant le chemin d'éclairage. En outre, l'intensité de l'éclairage en arrière-plan peut également être elle-même une source de bruit dans les images en raison de l'éclairage non homogène sur la zone de l'échantillon. De plus, la caméra peut également avoir un décalage dans le gain du pixel appelé *photo response non uniformity* (PRNU), qui décrit le rapport entre la puissance optique sur un pixel en fonction du signal électrique. La réponse non uniforme des différents pixels de la caméra, ainsi qu'un éclairage non homogène qui peut provenir des projections de particules de poussières ou de saletés présentes sur les optiques du système, sont des sources de dégradations des images. Une façon de compenser cela est de diviser chaque image acquise par l'image *flat*, qui consiste en une image uniforme obtenue, par exemple, en plaçant une feuille de papier blanche sous le microscope et en défocalisant légèrement (Seibert et al., 1998). Cette opération permet de surmonter le problème de vignettage

et d'éliminer les éventuels défauts dus aux particules de poussière sur les lentilles ou sur les composants du système (Russ, 2002).

Ces techniques de traitement d'images sont déjà largement utilisées en astronomie pour l'étude des étoiles, des galaxies et des exo-planètes. Ces dernières, comme les étoiles, sont des sources ponctuelles non résolues qui sont initialement perdues dans le bruit de l'image, car elles sont trop près de l'étoile autour de laquelle elles orbitent (Galicher et al., 2011). Néanmoins, leurs orbites peuvent être résolues, ce qui rend les exo-planètes individuelles observables. Avant d'être en mesure d'analyser les images dans le but de mesurer l'intensité des planètes, leur position et leurs mouvements, des procédures complexes ont été mises au point dans la chaîne d'acquisition d'images, de post-traitement (moyennage, corrections *Dark* et *Flat*, correction gamma, correction de distorsion...) et la réduction des données afin de réduire sensiblement le bruit de façon à améliorer la résolution et la puissance de détection de télescopes. De la même façon, nous avons commencé à mettre en œuvre une méthodologie plus rigoureuse similaire en nanoscopie optique sans marquage, avec le même objectif, à savoir être en mesure d'observer les structures microscopiques non résolues dans les matériaux.

Outre les problèmes dus au bruit, le contraste est également un facteur important en interférométrie puisque l'information de phase apparaît sous la forme de motifs de franges d'interférence comprenant des franges claires et foncées. Pour un appareil photo ou une caméra, le temps d'exposition pour lequel les détails dans les franges sombres sont bien visibles, l'information est perdue dans les franges lumineuses qui sont surexposées. Inversement, pour un temps d'exposition faible pendant lequel les franges brillantes ne sont pas saturées, les franges sombres peuvent être sous-exposées et les informations peuvent également être perdues dans le bruit. De nombreuses méthodes de traitement de signaux existent pour réduire le bruit de l'image (Jain, 1989; Petrou & Petrou, 2010; Russ, 2002). Une méthode consiste à améliorer le contraste en augmentant la plage dynamique des images, qui dans les caméras modernes est généralement limitée à 256 niveaux de gris. La technique *High Dynamic Range* (HDR), bien connue dans le domaine de la photographie, est basée sur la technique *bracketing* consistant à acquérir plusieurs images de la même scène en utilisant différents réglages de l'appareil et de les combiner en post-traitement. Cette technique est un moyen efficace et utile pour obtenir une image résultante adéquate quand il est laborieux de définir les paramètres de la caméra pour acquérir l'image d'un seul coup. Le principe de cette méthode réside dans une série d'acquisitions et est donc couramment utilisé dans des cas statiques. La technique *bracketing* peut être réalisée de différentes manières en modifiant les différents paramètres de la caméra, tels que le gain ou encore le temps d'exposition qui est le plus généralement utilisé (Hirakawa, 2010).

En photographie, l'exposition définit la quantité de lumière par unité de surface atteignant le capteur et est mesurée en lux secondes. Elle peut être contrôlée en réglant la vitesse d'obturation, l'ouverture de l'objectif ou l'éclairage de la scène. Comme les capteurs de la caméra ont une plage dynamique limitée (8, 10 ou 12 bits de profondeur), si l'exposition est en dehors de cette plage, l'image acquise ne peut pas être enregistrée avec précision. En effet, un détail dans une image sous-exposée peut être perdu dans certaines régions et, inversement, une image surexposée peut contenir des zones saturées. Il est parfois difficile de trouver le réglage de l'exposition adéquate pour les objets lumineux tels que des objets métalliques. La vitesse d'obturation ou le temps d'exposition d'une caméra est définie comme la durée de temps pendant laquelle l'obturateur est ouvert pour chaque acquisition et est exprimée en secondes. La quantité de lumière qui atteint le capteur de la caméra dépend proportionnellement de ce temps d'exposition. La modification de la vitesse d'obturation modifie l'effet du mouvement d'un objet dans l'image. Les

temps d'exposition courts sont nécessaires pour geler le mouvement des objets en mouvement, afin d'éviter le flou. La technique *bracketing* est utilisée pour obtenir un contraste élevé avec des capteurs de dynamique limitée tels que les CCD. Les images acquises pour un ensemble de conditions données (même gain, même éclairage ...) avec différents temps d'exposition peuvent alors être combinées dans le post-traitement pour obtenir une image à plus grande dynamique (image HDR).

En microscopie, la technique HDR a été utilisée dans l'imagerie infrarouge pour améliorer les détails sur les échantillons (Liu et al., 2012; Mookherjea & Grant, 2012). L'une des techniques HDR consiste à acquérir des images de 8 bits d'une scène statique avec un appareil photo en utilisant différents temps d'exposition, puis de les combiner pour obtenir une image en profondeur de 10 bits ou 12 bits. Une technique HDR a été proposée pour l'interférométrie en utilisant un éclairage cohérent dans une configuration de Mach-Zehnder (Vargas et al., 2011) et a ensuite été appliquée dans un algorithme de décalage de phase afin d'augmenter la qualité de la phase récupérée (Restrepo et al., 2012). Dans le domaine de la microscopie, le contraste est généralement plus élevé en utilisant un éclairage cohérent (Goodman, 1996). Lorsqu'il est appliqué à un éclairage incohérent, la technique HDR permet d'améliorer le contraste en augmentant la dynamique de l'image. L'amélioration du SNR peut permettre la détection de structures de faible contraste qui sont initialement inobservables. De plus, cette technique est utile pour l'observation d'échantillons tels que des structures métalliques en raison de leur forte réflectivité ou d'échantillons transparents où le contraste est particulièrement bas (Zhang et al., 2009).

Nous avons proposé une technique hybride HDR pour la FF-OCT basée sur le *bracketing* (Leong-Hoi et al., 2016a), illustrée par les résultats obtenus sur des films de polymère transparent de Mylar d'épaisseur de 3  $\mu\text{m}$ , qui en raison de leur transparence, donne des motifs de franges à faible contraste en microscopie interférométrique en lumière blanche. Ce matériau est actuellement utilisé comme isolant en électronique et en microélectronique, ou en tant que matériau pour les prothèses cardio-vasculaires et en chirurgie plastique. Dans toutes ces applications, il est important de pouvoir caractériser les défauts dans le film étant donné qu'ils ont une grande influence sur les propriétés structurales du matériau. En utilisant une combinaison de plusieurs images acquises à différents temps d'exposition, la plage dynamique de l'image peut être augmentée, améliorant ainsi de façon significative le SNR et le contraste de l'image, ce qui conduit à la détection de détails sub-micrométriques.

Dans ce chapitre, nous proposons un protocole de traitement d'image, qui a été appelé « IMAGE PRocessing Optimization for fringe Visibility Enhancement (IMPROVE)-Protocol » utilisant une série de méthodes de traitement appliquées successivement, en utilisant un système Leitz-Linnik modifié utilisant des objectifs à grande ouverture numérique ( $NA = 0,85$ ). Les principes du protocole développé seront d'abord présentés individuellement et mis en évidence en imageant des films transparents de polymère de Mylar d'épaisseur de 3  $\mu\text{m}$  et 6  $\mu\text{m}$  contenant des structures de vide à l'intérieur. Ces films proviennent de l'équipe MaCEPV d'ICube, et faisaient partie d'une étude sur les effets du rayonnement par des particules alpha (Abdesselam et al., 2011). Les résultats issus de l'application de la technique « IMPROVE-Protocol » seront ensuite donnés pour une couche de résine de SU-8 contenant des microbilles de diamètre de 4  $\mu\text{m}$  puis pour des couches synthétiques d'hydroxyapatite, qui est une composante minérale des os et des dents et l'un des biomatériaux naturels les plus courants sont largement utilisés dans des applications médicales.

## 3.2 Types de capteurs photographiques

Un des éléments le plus important des appareils photographiques et des caméras numériques est un composant électronique photosensible appelé capteur photographique permettant de convertir les rayons électromagnétiques (IR, UV ou visible) en signaux électriques analogiques. Après avoir été amplifiés, ces signaux analogiques sont ensuite convertis en signaux numériques, puis traités pour donner une image numérique. Il existe deux principaux types de capteurs photographiques couramment utilisés : les dispositifs à transfert de charge (en anglais *CCD* : *charge-coupled device*) et les capteurs CMOS (*complementary metal-oxide-semiconductor*). Ces deux types de capteurs sont des semi-conducteurs d'oxyde de métal pixellisés. Chaque pixel accumule une charge de signal proportionnelle à l'intensité locale de l'éclairage. La différence entre les capteurs CCD et CMOS est leur technique de lecture, influençant ainsi leurs performances (réponse, plage dynamique, rapidité, coûts, fiabilité...) et leurs limites (Litwiller, 2001).

### 3.2.1 Capteurs CCD

En 1969, George E. Smith et Willard Boyle inventèrent les capteurs CCD. Simple à fabriquer, ces capteurs ont été rapidement utilisés pour des applications d'imagerie en astronomie puis dans les caméras et appareils photo. Leurs travaux furent récompensés au Prix Nobel de Physique en 2009. Chaque pixel d'un capteur CCD transfère la charge de signal qu'il reçoit de manière séquentielle à une sortie commune pour ensuite convertir la charge en une tension, comme illustré dans la figure 3-1. Les capteurs CCD sont en général sensibles à l'ensemble du spectre de la lumière visible. Les caméras CCD couleurs sont le plus souvent constituées d'un filtre (par exemple filtre de Bayer), composé de cellules colorées en rouge, vert ou bleu. Le plus souvent, on retrouve des séries de 4 pixels (1 bleu, 1 rouge et 2 verts) pour d'être plus proche de la sensibilité de notre vision.

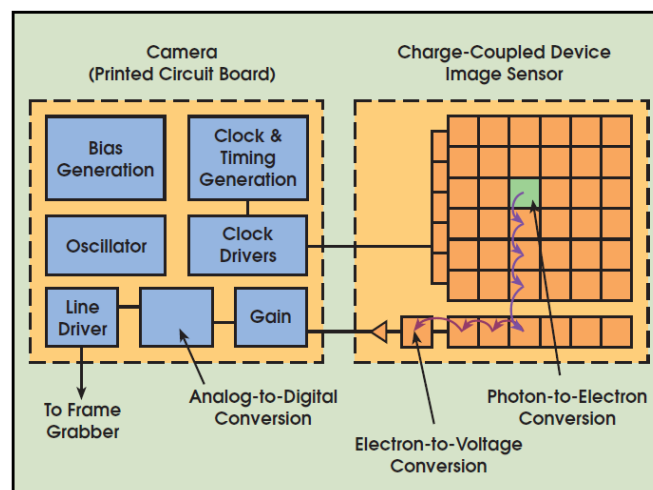


Figure 3-1. Schéma de fonctionnement d'une caméra CCD (Litwiller, 2001).

### 3.2.2 Capteurs CMOS

Contrairement aux CCD qui possèdent une sortie convertisseur commune, les imageurs CMOS sont composés de photodiodes où chaque pixel a son propre convertisseur charge / tension, comme illustré dans la figure 3-2. Les avantages des capteurs CMOS par rapport aux CCD sont leur basse consommation en électricité, leur vitesse de lecture plus élevée et leur faible coût de fabrication.

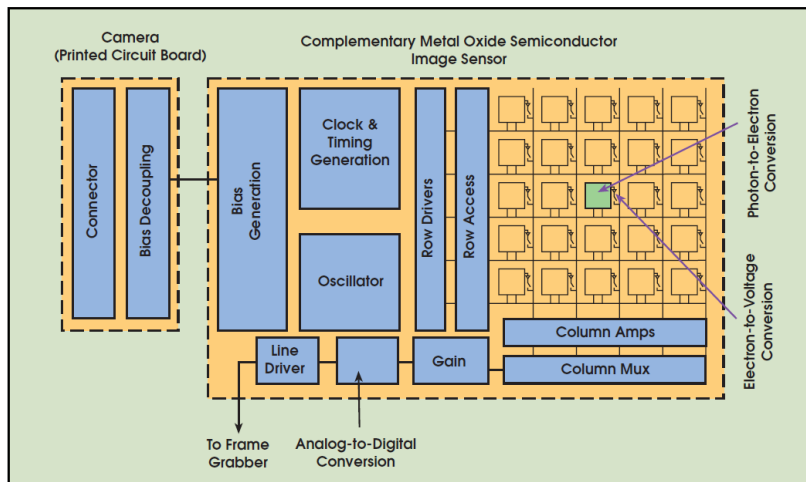


Figure 3-2. Schéma de fonctionnement d'une caméra CMOS (Litwiller, 2001).

Dans la suite de ce chapitre, les deux caméras utilisées sont une caméra CCD Basler avA1000-100gc et une caméra CMOS Photonfocus MV1-D2048-96-G2, présentées dans la figure 3-3(a) et la figure 3-3(b) respectivement), toutes les deux ayant une connexion Giga Ethernet. Les principales caractéristiques de ces caméras sont résumées dans le tableau 3-1. Leurs fiches techniques sont présentées en annexe 3-1 pour la CCD Basler et en annexe 3-2 pour la CMOS Photonfocus.



Figure 3-3. Images des deux caméras utilisées dans ce chapitre. (a) CCD Basler avA1000-100gc et (b) CMOS Photonfocus MV1-D2048-96-G2.

Tableau 3-1. Résumé des principales caractéristiques des deux caméras.

	Basler avA1000-100gc	Photonfocus MV1-D2048-96-G2
<b>Type</b>	CCD	CMOS
<b>Monochrome / Couleur</b>	Couleur	Monochrome
<b>Résolution en pixels</b>	1024 × 1024	2048 × 2048
<b>Taille d'un pixel (horizontal / vertical)</b>	5,5 μm × 5,5 μm	5,5 μm × 5,5 μm
<b>Profondeur de numérisation du pixel</b>	8 bit / 12 bit	8 bit / 10 bit
<b>Fréquence d'images à résolution maximale</b>	101 im/s	22 im/s

L'histogramme d'une image correspond à la fonction qui associe à une valeur d'intensité le nombre de pixels dans l'image ayant cette valeur. Les histogrammes suivent une loi normale d'équation :

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2}, \quad \text{Eq. (3-1)}$$



avec  $\mu$  la moyenne et  $\sigma$  l'écart-type. La largeur à mi-hauteur des histogrammes est donnée par :

$$\text{FWHM} = 2\sqrt{2 * \ln(2)} * \sigma. \quad \text{Eq. (3-2)}$$

Sur l'histogramme d'une image uniforme *flat*, acquise en plaçant une feuille de papier blanche sous la caméra et en défocalisant légèrement, on peut mesurer le bruit spatial de l'image qui est généralement assimilé à du bruit blanc gaussien. La figure 3-4 montre les histogrammes d'une image *flat* acquise avec la CCD Basler au temps d'exposition 1600  $\mu\text{s}$  et avec la CMOS Photonfocus au temps d'exposition 1610  $\mu\text{s}$ . En faisant la différence entre deux images *flat*, prises consécutivement avec le même temps d'exposition, on peut obtenir le bruit temporel des caméras, comme le montre les résultats donnés dans la figure 3-5. Le tableau 3-2 résume les caractéristiques utilisées et obtenues des figure 3-4 et figure 3-5.

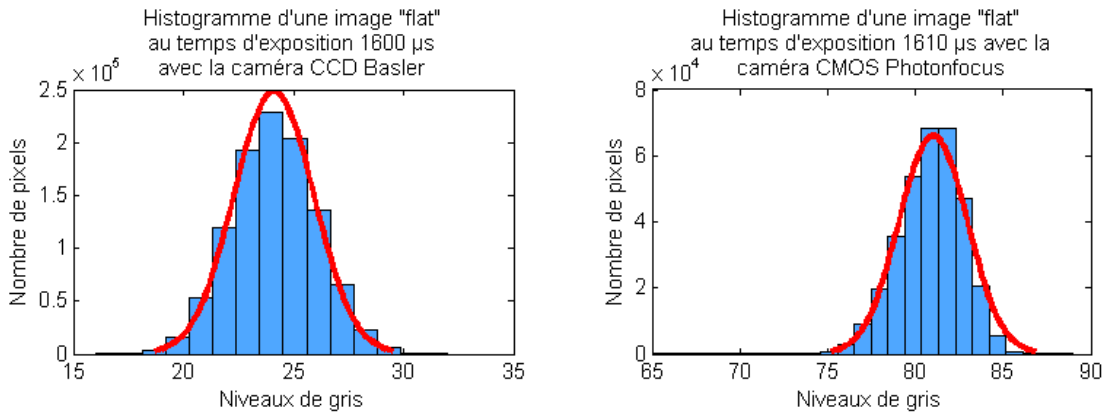


Figure 3-4. Histogrammes d'une image *flat* prise avec chaque caméra.

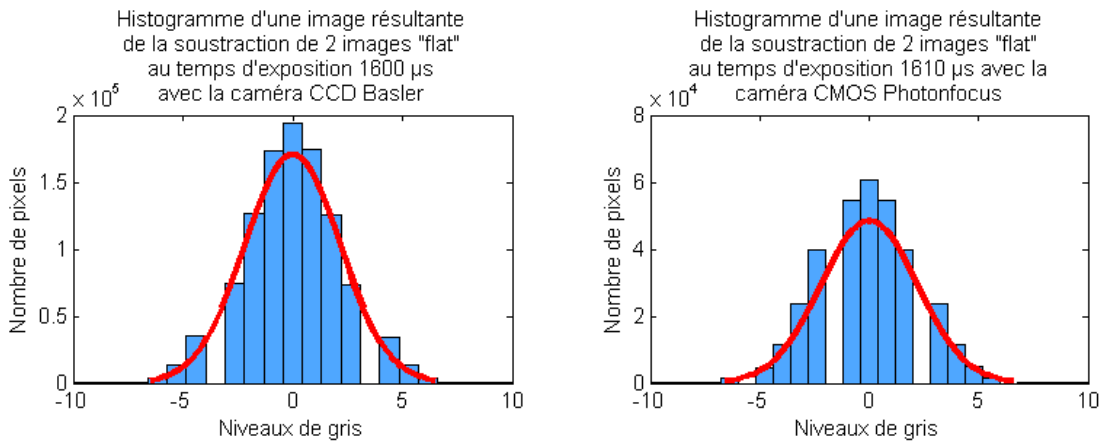


Figure 3-5. Histogrammes d'une image résultante de la différence entre deux images *flat*, prises consécutivement, avec le même temps d'exposition avec les deux caméras.

Tableau 3-2. Caractéristiques de l'image *flat* et des histogrammes de la figure 2.





	Basler ava1000-100gc	Photonfocus MV1-D2048-96-G2
Taille de l'image	1024 x 1024 pixels	520 x 640 pixels
Temps d'exposition	1600 $\mu\text{s}$	1610 $\mu\text{s}$
Centre de l'histogramme (niv. de gris)	24	81
Largeur à mi-hauteur (niv. de gris)	5	5,5
SNR (dB)	51,92	74,73
<b>APRÈS SOUSTRACTION DE 2 IMAGES CONSÉCUTIVES</b>		
Largeur à mi-hauteur (niv. de gris)	6,10	6,22

### 3.3 Principes du traitement d'images

#### 3.3.1 Transformations LUT

Dans les images tomographiques, les surfaces et les structures internes au sein d'un échantillon transparent sont alors perceptibles (Dubois & Boccara, 2006; Dubois et al., 2004). Bien que l'approche 2D soit satisfaisante, cela ne suffit pas pour la détection de structures de faibles contrastes ou pour des détails plus petits qui sont, dans ce cas, perdus dans le bruit présent sur les images. Il est néanmoins possible de modifier les niveaux de luminosité des pixels afin d'élargir le contraste des images. Ceci peut être réalisé en utilisant une table de conversion appelé « Look-Up Table » (LUT), afin de redéfinir les valeurs des pixels d'une image en les remplaçant par d'autres valeurs de luminosité dans le but d'améliorer les détails, et ce, sans modifier les valeurs initialement mises en mémoire. Un LUT est une table en niveaux de gris contenant au maximum 256 éléments pour une image de 8 bits. Une transformation linéaire consiste à attribuer la valeur de pixel la plus sombre à une valeur noire et la plus brillante au blanc. Ainsi, des valeurs comprises entre les valeurs extrêmes sont des nuances de gris issues d'une interpolation linéaire. La transformation inverse consiste à inverser la plage de contraste des images, conduisant ainsi à des images ressemblant à des photographies négatives, ce qui peut entraîner une amélioration dans l'observation de certains détails. Les transformations en racines carrés et logarithmiques permettent une compression de la haute luminosité, tout en élargissant les faibles intensités (Russ, 2002). Les détails dans le [tableau 3-3](#) indiquent les équations associées à chaque transformation, ainsi que les échelles de couleurs correspondantes après les transformations, avec  $T_i$  étant la valeur du  $i^{\text{ème}}$  coefficient du tableau,  $i$  étant compris entre 0 et 256 pour une image en 8 bits et  $I_{max} \leq 256$ . Le graphique de la [figure 3-6](#) montre les fonctions de transfert après les transformations LUT.

Tableau 3-3. Équations et échelles de couleurs associés aux transformations LUT.

Transformation	Equation associée	Echelle de couleur
Linéaire	$T_i^{linear} = i$	
Inverse	$T_i^{inverse} = I_{max} - i$	
Racine carrée	$T_i^{sq.root} = \frac{\sqrt{i} * I_{max}}{\sqrt{I_{max}}}$	
Logarithme	$T_i^{log} = \frac{Log(i + 1) * (I_{max} - 1)}{Log(I_{max} - 1)}$	

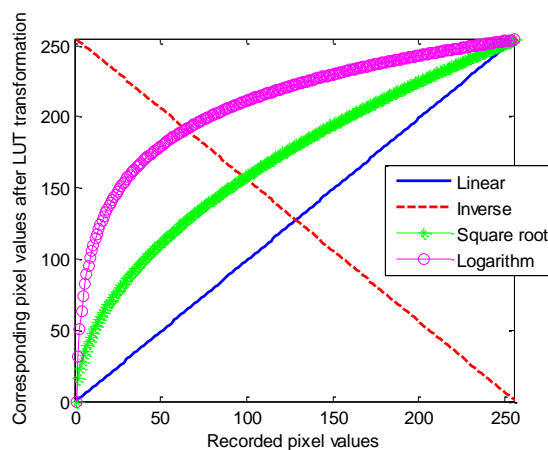


Figure 3-6. Les fonctions de transfert après transformations LUT.

La figure 3-7 montre des images XZ d'un film de polymère de Mylar après avoir appliqué les transformations LUT. Avec une transformation linéaire, l'interface supérieure de la couche transparente est observable et une petite structure apparaît (carré rouge). Avec la transformation inverse, une autre structure commence à être visible (cercle vert). La transformation en racine carrée améliore la détection des défauts, mais présente l'inconvénient d'augmenter le bruit. Avec une transformation logarithmique de petites structures peuvent être mieux observées, mais le bruit augmente également. Pour les résultats qui suivent, les images XZ sont présentées avec une transformation logarithmique afin de souligner l'amélioration du SNR des images après les corrections proposées.

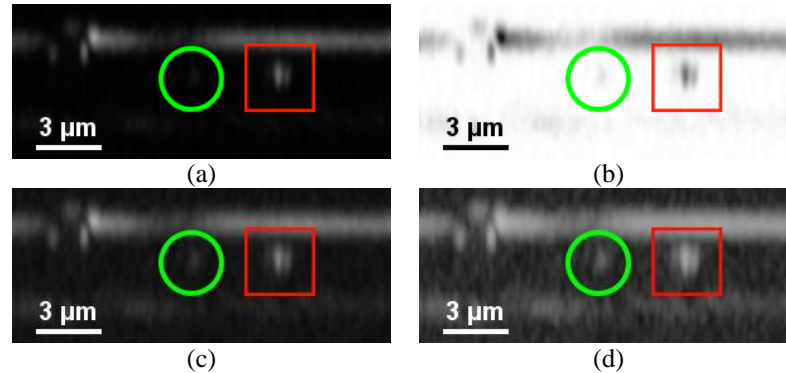


Figure 3-7. Images XZ d'un film de polymère de Mylar après une transformation LUT (a) linéaire, (b) inverse, (c) en racine carrée et (d) logarithmique.

### 3.3.2 Moyennage d'images

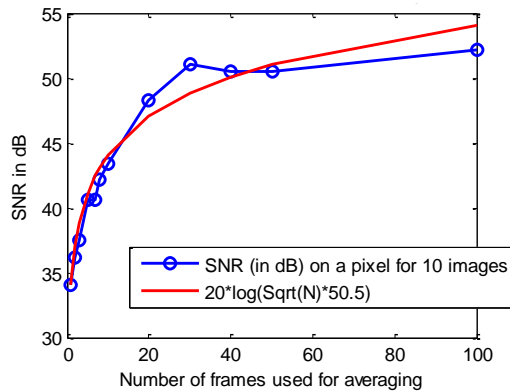
Les caméras, comme tout appareil photographique numérique, sont souvent source de plusieurs erreurs dans les images acquises mais celles-ci peuvent être traitées à l'aide de logiciels afin de réduire ces erreurs. Par exemple, les valeurs de pixels dans les images peuvent varier même dans les régions qui sont idéalement uniformes par exemple en raison du bruit électronique provenant des connexions des câbles. Par conséquent, les niveaux de gris des mêmes pixels de deux acquisitions prises à des moments différents peuvent avoir de petites variations. Ces variations sont des fluctuations aléatoires qui varient au fil du temps, appelées bruit temporel ou bruit de lecture. Lorsque le SNR est faible, certains détails sont invisibles et ne peuvent pas être mesurés. Pour les échantillons statiques, ce bruit temporel peut être réduit en faisant une moyenne de plusieurs images vidéo consécutives, comme donnée par l'équation Eq. (3-3), ce qui améliore la qualité de l'image d'un facteur égal à la racine carrée du nombre d'images moyennées (Russ, 2002).

$$I_{moy} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N I_i \quad \text{Eq. (3-3)}$$

$N$  est le nombre d'images et  $I_i$  est l'image d'intensité de la  $i^{\text{ème}}$  image avec  $i = \{1, \dots, N\}$ . En général et pour la plupart des applications, le nombre d'images n'a pas besoin d'être très élevé : 20 images suffisent. Le SNR temporel en décibels (dB) sur le même pixel  $x$  est comparé pour plusieurs images, comme indiqué dans l'équation suivante :

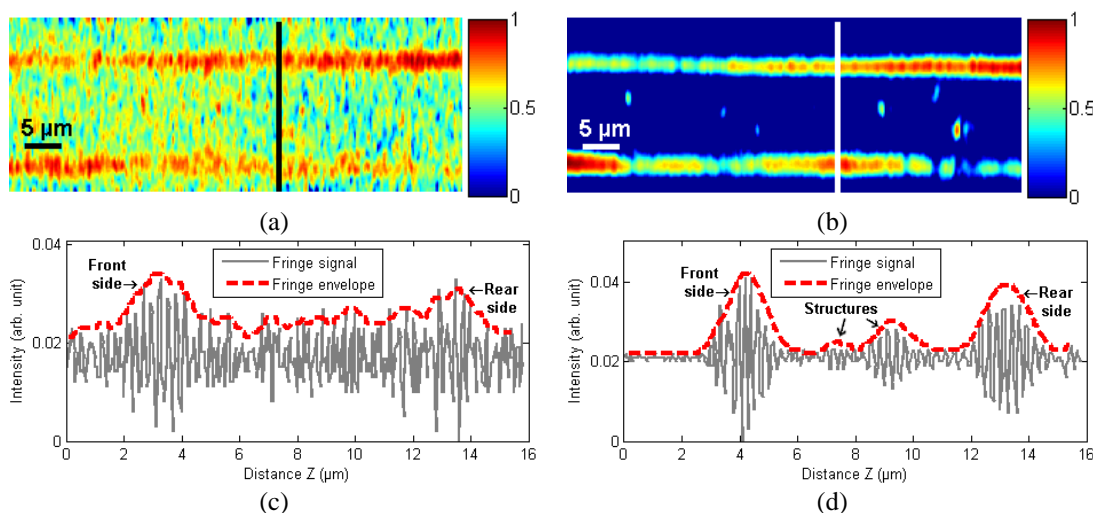
$$SNR_{dB} = 20 * \log_{10} \left( \frac{\bar{x}}{\sigma} \right) \quad \text{Eq. (3-4)}$$

où  $\bar{x} = \sum_{i=1}^M x_i$  est l'intensité moyenne sur un même pixel, M le nombre d'images acquises à des temps différents et l'écart-type est donné par  $\sigma = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^M (x_i - \bar{x})^2}$ . Les résultats de la [figure 3-8](#) montrent le SNR, comme calculé par l'équation [Eq. \(3-4\)](#) sur un pixel donné pour 10 images moyennées N fois, avec N variant entre 1 et 100. Cela montre que le SNR est augmentée d'un facteur  $\sqrt{N}$ , avec le N étant le nombre d'images. Ces résultats montrent également que la moyenne entre 20 et 50 images est suffisante pour un SNR adéquat. Le moyennage permet donc une amélioration pertinente dans le SNR pour les images XY et XZ et augmente par conséquent la capacité de détection du système permettant l'observation de structures de taille micrométrique initialement noyées dans le bruit et donc invisibles.



**Figure 3-8. SNR à un pixel donné pour 10 images moyennées N fois avec une caméra CCD.**

Une des conséquences du moyennage d'images appliqué à la technique FF-OCT est l'amélioration de la capacité de détection du microscope, comme le montre la [figure 3-9](#), dans laquelle un profil vertical sur la coupe XZ d'un film de polymère de Mylar de 6  $\mu\text{m}$  d'épaisseur est observé, sans traitement d'image ([figure 3-9\(a\)](#) et [figure 3-9\(c\)](#)) et après un moyennage de 100 images pour chaque position verticale de la table piézoélectrique ([figure 3-9\(b\)](#) et [figure 3-9\(d\)](#)). On peut observer qu'après un moyennage de 100 images, le bruit est clairement réduit à la fois sur les images XZ et sur les signaux de franges.



**Figure 3-9. Amélioration de la capacité de détection du système avec d'image XZ en fausse couleur d'un film de polymère de Mylar de 6  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (a) sans traitement d'image et (b) après un moyennage de 100 images; (c) un signal de frange sur le profil de (a); (d) un signal de frange sur le profil de (b).**

### 3.3.3 Corrections du FPN

Tout photodétecteur possède un bruit fixe appelé *Fixed pattern noise* (FPN), caractérisé par des pixels ayant des intensités différentes qui apparaissent dans les images à des positions données lorsqu'elles sont acquises dans les mêmes circonstances. Le FPN correspond à deux propriétés différentes des caméras. En effet, il existe dans toute caméra un courant résiduel non uniforme présent en l'absence d'éclairage et unique pour chaque appareil, appelé courant d'obscurité. De plus, la caméra peut également avoir un décalage dans le gain du pixel appelé *photo response non uniformity* (PRNU), qui décrit le rapport entre la puissance optique sur un pixel en fonction du signal électrique. Le FPN dépend de paramètres internes à la caméra comme le temps d'exposition, le gain etc. mais aussi de paramètres externes tels que la température, l'éclairage, etc.

#### 3.3.3.1 Correction « Dark »

Un moyen de corriger le courant d'obscurité est de soustraire les images par une image noire (*Dark frame*), comme représenté par l'équation Eq. (3-5). C'est ce qu'on appelle correction *Dark*.

$$I_{corrDark} = I - I_{Dark} \quad \text{Eq. (3-5)}$$

$I_{Dark}$  est l'image noire (en termes d'intensité) obtenue en obstruant le chemin d'illumination. Néanmoins, un inconvénient de cette correction *Dark* est une réduction de la gamme dynamique de l'image (Russ, 2002). L'amélioration due à la correction *Dark*, n'est pas directement visible dans l'image, mais pour la quantifier, la moyenne quadratique (RMS)  $R_q$  de l'image noire peut être calculée comme suit:

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{p} \sum_{i=1}^p x_i^2} \quad \text{Eq. (3-6)}$$

$p$  étant le nombre total de pixels et  $x_i$  le  $i^{\text{ème}}$  pixel de l'image.

#### 3.3.3.2 Correction « Flat »

Une autre source de bruit peut provenir de la source lumineuse utilisée pour éclairer l'échantillon sous le microscope. L'éclairage peut provoquer des variations non-uniformes, d'autant plus perceptible lorsque les surfaces ne sont pas planes. En outre, les lentilles ou les capteurs peuvent provoquer du vignelage, qui se traduit par le fait que les coins de l'image sont plus sombres que le centre en raison de l'absorption partielle de la lumière. De plus, les images enregistrées peuvent contenir des taches dues à la présence de particules de poussière ou de la saleté sur les composants optiques du système. Ces défauts ainsi que le bruit dû au PRNU de la caméra, qui est supposé être constant à une période donnée, peuvent être minimisés par la correction *Flat*. Pour cela, l'acquisition d'une image *flat-field* est nécessaire. La plupart du temps et dans de nombreux cas, il est possible d'acquérir cette image en plaçant un échantillon de Spectralon® ou tout simplement une feuille de papier blanche sous le microscope et en défocalisant légèrement. Il existe deux façons de corriger les images à partir de cette image *flat* de référence. Si la caméra est logarithmique, une soustraction des images acquises par l'image *flat* est effectuée. Si la caméra est linéaire, la division des images acquises par l'image *flat* est préférée. Toutefois, cette correction *flat* présente également l'inconvénient de réduire une partie de la plage dynamique des

données d'origine (Russ, 2002). La plupart des capteurs utilisés étant linéaire, la correction *flat* consiste à diviser les images par l'image *flat*, comme donnée par l'équation suivante :

$$I_{corrFlat} = \frac{I}{I_{Flat}} * C \quad \text{Eq. (3-7)}$$

où  $C$  est une constante comprise entre 0 et 255, dans le cas d'une caméra 8 bits, et peut être égale à la valeur moyenne de l'image *flat-field*. Pour quantifier l'amélioration due à la correction *Flat*, les histogrammes d'une image uniforme peuvent être observés. Si l'histogramme est plus étroit et ressemble à une fonction de Dirac, alors l'image est améliorée. Une combinaison des trois techniques de traitement d'images présentées (moyennage, correction *Dark* et correction *Flat*) peut être réalisée, comme représentée par l'équation Eq. (3-8) pour obtenir une image de haute qualité.

$$I_{corrected} = \frac{I_{moy} - I_{Dark}}{I_{Flat} - I_{Dark}} * C \quad \text{Eq. (3-8)}$$

Les résultats obtenus en mesurant les largeurs à mi-hauteur (FWHM) des histogrammes illustrés dans la figure 3-10, sont présentés dans le tableau 3-4 et mettent en évidence que l'histogramme obtenu après les corrections données par l'équation Eq. (3-8) est presque 10 fois plus étroit que celui obtenu après l'acquisition d'une image brute (Leong-Hoi et al., 2015b).

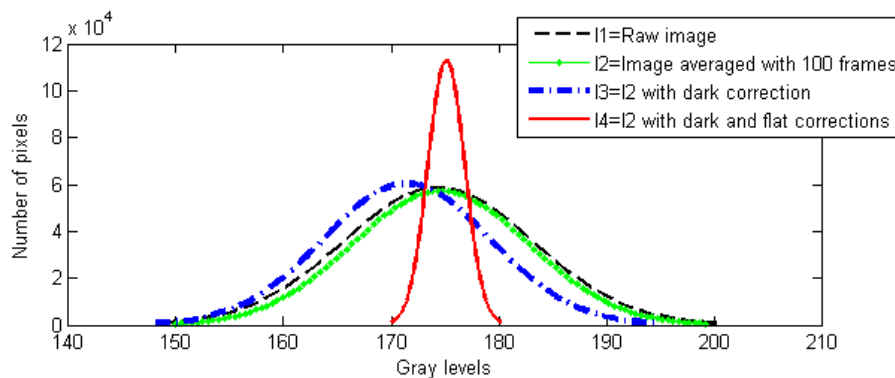


Figure 3-10. Histogrammes d'une image uniforme pour les 4 méthodes.

Tableau 3-4. Largeurs à mi-hauteur pour les histogrammes obtenus avec les 4 méthodes.

	I1	I2	I3	I4
FWHM (en niveaux de gris)	28	26	24	3

En pratique, les éléments optiques d'un système (lentilles, miroirs, cube séparateur etc.) ne sont pas toujours parfaitement propres et certains défauts, tels que des particules de poussière ou de la graisse peuvent être présents. Souvent, ils ne sont pas facilement visibles et parfois il n'est pas forcément pratique de retirer les composants optiques afin de les nettoyer. La correction *Flat* a l'avantage de réduire ou même éliminer ces défauts indésirables des images, comme le montre les images XY (cercle dans la figure 3-11(a)-(c)) et les images XZ (flèche dans la figure 3-11(d)-(e)). En comparant les images de la figure 3-11(b) et la figure 3-11(c), on remarque que l'éclairage non homogène de l'échantillon a été corrigé impliquant ainsi une augmentation du contraste des détails. L'image *flat* sur la figure 3-11(a) est obtenue en retirant l'échantillon de l'objectif et en plaçant une feuille de papier blanche. On peut y observer des défauts (indiqués par des cercles verts). Par conséquent, on peut en déduire qu'il s'agit de particules de poussière sur un des composants optiques du système.

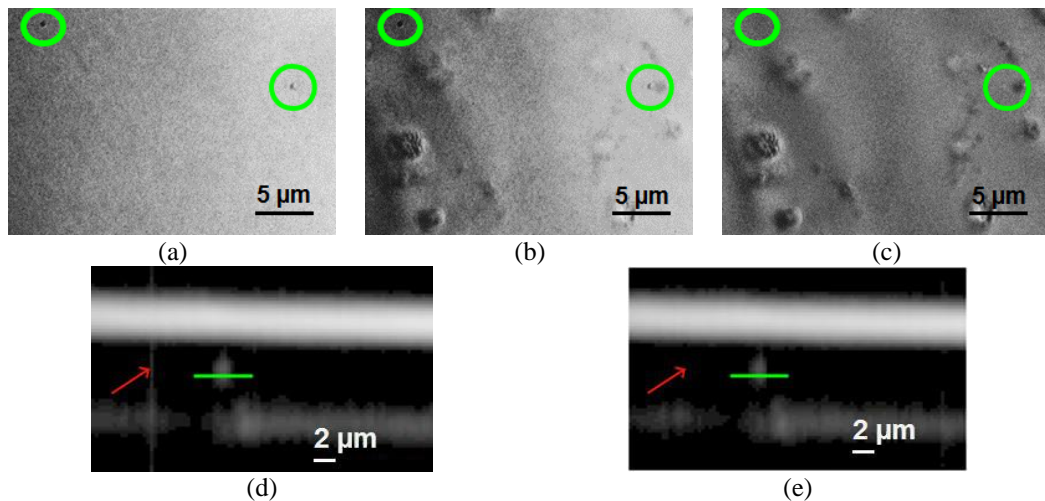


Figure 3-11. Réduction d'un artefact due à une particule de poussière après corrections *Dark* et *Flat* sur un échantillon de Mylar de 3 µm d'épaisseur. (a) Une image *flat*; (b) une image XY après un moyennage de 100 images; (c) l'image (b) après corrections *Dark* et *Flat*; (d) une image XZ après un moyennage de 100 images; (e) l'image (d) après corrections *Dark* et *Flat*.

En outre, en mesurant le profil latéral d'une structure contenue dans le film de polymère de Mylar, on peut observer que la résolution latérale du système peut être améliorée après avoir appliqué la correction donnée par l'équation Eq. (3-8). Cet effet est illustré dans la figure 3-12, en mesurant la distance latérale au niveau des bords de la structure entre les points de l'intensité à 90% et à 10% de l'intensité maximale.

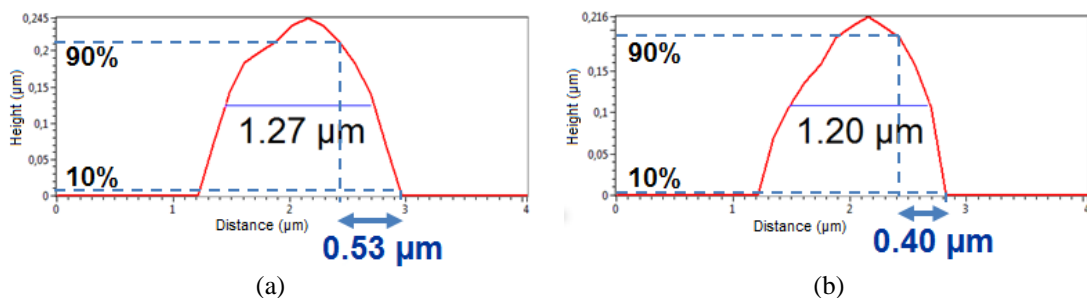


Figure 3-12. Amélioration de la résolution latérale. (a) Profil de la structure de la figure 4-11(d); (b) Profil de la structure de la figure 4-11(e).

### 3.3.4 Technique HDR

En photographie, la miniaturisation des capteurs (dans les smartphones, appareils photo compacts etc.) a causé une perte de qualité au niveau des images (plus de bruit, faible dynamique...). Il a donc fallu trouver une solution pour améliorer les images prises par ces capteurs. Puisque les caméras ont une gamme dynamique limitée (8, 10 ou 12 bits de profondeur), si la quantité de lumière atteignant les capteurs est en dehors de cette plage, alors l'image acquise ne peut pas être enregistrée avec précision. Pour des échantillons très réfléchissants comme des objets métalliques, il est parfois difficile de trouver l'éclairage adéquat sans perdre certains détails. Une sous-exposition peut cacher des détails dans certaines zones et inversement surexposition peut provoquer des zones saturées. En effet, la quantité de lumière qui atteint le capteur dépend proportionnellement de la durée d'exposition de la caméra. Plus le temps d'exposition est long, plus la quantité de lumière recueillie par le capteur est grande. Les images acquises pour un ensemble donné de conditions (même gain, même éclairage, même température...) avec différents temps d'exposition peuvent alors être combinés pour obtenir une image à plus grande gamme dynamique (en anglais *HDR* : *high dynamic range*).

La technique HDR est basée sur la technique *bracketing* consistant à acquérir plusieurs images de la même scène en utilisant différents réglages de l'appareil et de les combiner en post-traitement. Cette technique est un moyen efficace et utile pour obtenir une image résultante adéquate quand il est laborieux de définir les paramètres de la caméra pour acquérir l'image d'un seul coup. Le principe de cette méthode réside dans une série d'acquisitions et est donc couramment utilisé dans des cas statiques. La technique *bracketing* peut être réalisée de différentes manières en modifiant les différents paramètres de la caméra, tels que le gain ou encore le temps d'exposition qui est le plus généralement utilisé (*exposure bracketing*). Cette technique a été utilisée pour la première fois en 1995 (Mann & Picard, 1995). Mais rapidement, il est apparu plusieurs algorithmes s'inspirant de cette technique afin d'obtenir des images HDR : *Gradient-based* (Mann & Picard, 1995), fonction chapeau (Debevec & Malik, 2008), *SNR-based* (Nayar & Mitsunaga, 2000), *SNR-Hat* (Akyüz & Reinhard, 2007; Reinhard et al., 2010), *Variance-based* (Aguerrebere et al., 2014; Granados et al., 2010; Kirk, 2006; Robertson et al., 1999)...

En photographie, la technique HDR est de plus en plus utilisée (cf. figure 3-13) mais les images sont souvent améliorées seulement de manière qualitative. En revanche, dans nos travaux de métrologie à partir des intensités des franges en microscopie, il est important de pouvoir quantifier l'intensité des images du type HDR. Nous avons donc proposé une nouvelle technique hybride HDR permettant une amélioration quantitative des images. En effet, dans le cas des coupes tomographiques de couches transparentes acquises par FF-OCT, la transparence des échantillons implique une diminution du contraste des motifs de franges donnant ainsi des images avec un faible SNR.



Figure 3-13. Illustration de la technique HDR en photographie (Reinhard et al., 2010).

Des exemples d'images d'un film de polymère de Mylar sous-exposées, normalement exposées, sur-exposées, et l'image HDR résultante d'une combinaison de 10 temps d'exposition sont illustrés dans la figure 3-14(a)-(d). Sur les trois premières images, les franges d'interférences sont présentes mais peu contrastées. En observant les histogrammes sur la figure 3-14(e), on peut remarquer que l'image HDR correspondante n'est pas saturée grâce à la compensation des pixels des temps d'exposition intermédiaires. En effet, après avoir acquis plusieurs images avec une plage dynamique standard (en anglais *SDR* : *standard dynamic range*) de profondeur de 8 bits avec différents temps d'exposition, une image avec une plage dynamique améliorée peut ainsi être obtenue avec l'équation suivante :

$$I_{HDR} = \sum_i I_i * w_i \quad \text{Eq. (3-9)}$$



où  $I_i$  est l'image avec un temps d'exposition donné et  $w_i$  est un coefficient de pondération pour chaque temps d'exposition donné. En effet, les pixels les plus brillants dans les images acquises avec des temps d'exposition élevés sont saturés et leurs valeurs sont automatiquement ramenées à 255. Toutefois, ces pixels ont également une valeur pertinente pour les images avec des temps d'exposition plus faibles.

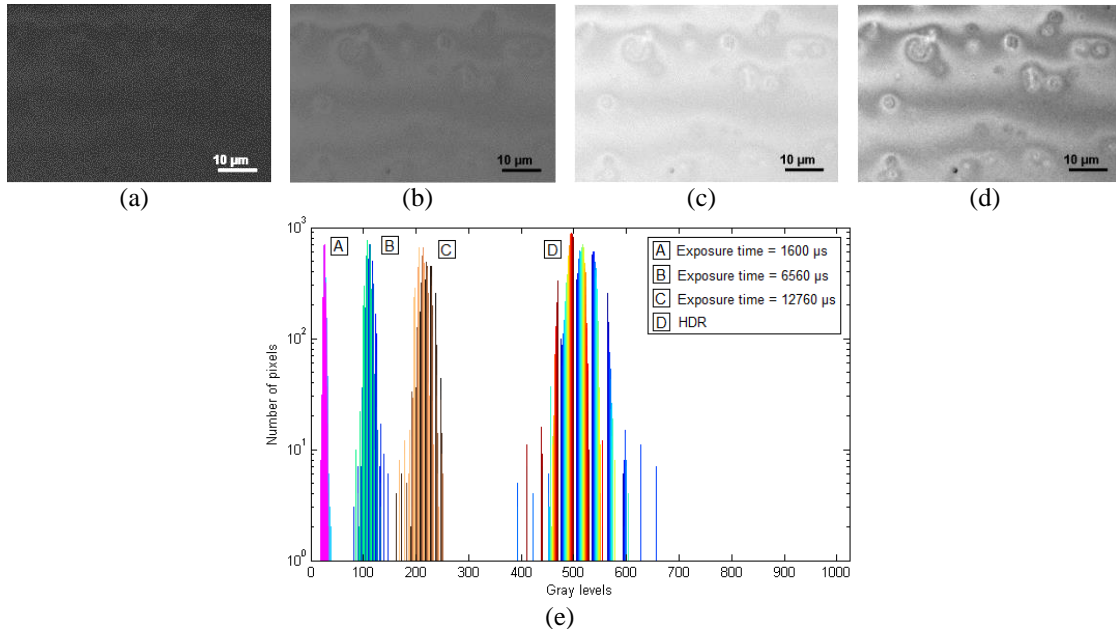


Figure 3-14. Principe de la technique HDR. Exemple d'une image (a) sous-exposée à 1600  $\mu\text{s}$ , (b) à exposition normale à 6560  $\mu\text{s}$ , (c) surexposée à 12760  $\mu\text{s}$  et (d) l'image HDR résultante de la combinaison de 10 temps d'exposition de 1600  $\mu\text{s}$  à 12760  $\mu\text{s}$ ; (e) Histogrammes correspondants aux images (a)-(d).

Ainsi, en appliquant la formule donnée par l'équation Eq. (3-9), la valeur des pixels saturés peut être approchée par compensation. Les coefficients de pondération  $w_i$  sont obtenus après calibration du système, en faisant varier le temps d'exposition de la caméra et en mesurant la valeur moyenne des intensités des pixels sur une image *flat* acquise à travers l'instrument optique. La réponse peut être approchée par une équation linéaire, comme illustré par la figure 3-15(a). La courbe est ensuite inversée latéralement et suit une équation affine permettant d'obtenir les coefficients  $w_i$  correspondant à un temps d'exposition donné (cf. figure 3-15(b)), afin d'améliorer les valeurs des pixels des zones sous-exposées et surexposées.

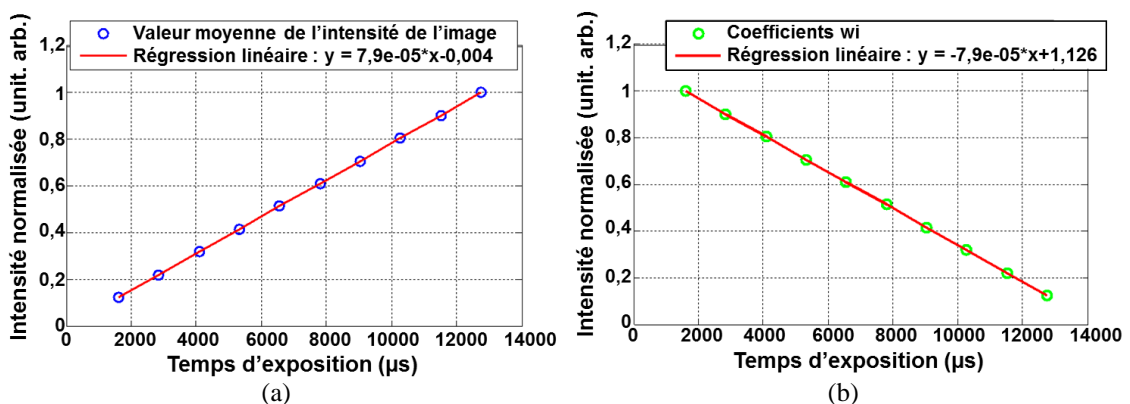


Figure 3-15. Réponse du système [Basler-Mylar] et calibration des coefficients de pondération pour la technique HDR. (a) Réponse du système avant et (b) après inversement de la courbe.

Dans le cas d'un film de polymère de Mylar, en utilisant une caméra CCD (Basler avA1000-100gc), l'équation affine obtenue est donnée par l'équation Eq. (3-10). Le tableau 3-5 montre les coefficients  $w_i$  obtenus dans ce cas particulier.

$$w_i = -7,87 \cdot 10^{-5} * i + 1,13 \quad \text{Eq. (3-10)}$$

$i$  est le temps d'exposition allant de 1600  $\mu\text{s}$  à 12760  $\mu\text{s}$ .

Tableau 3-5. Coefficients  $w_i$  correspondant à chaque temps d'exposition.

Temps d'exposition ( $\mu\text{s}$ )	1600	2840	4080	5320	6560	7800	9040	10280	11520	12760
$w_i$	1,00	0,90	0,81	0,71	0,62	0,51	0,42	0,32	0,22	0,13

Par conséquent, les structures initialement perdues dans le bruit dans le film transparent de Mylar peuvent être détectées après l'application de la technique HDR proposée, comme l'illustre la figure 3-16. En observant le profil sur la figure 3-16(c), à la position des cercles (cf. figure 3-16(a)-(b)), la structure devient clairement visible avec la méthode HDR.

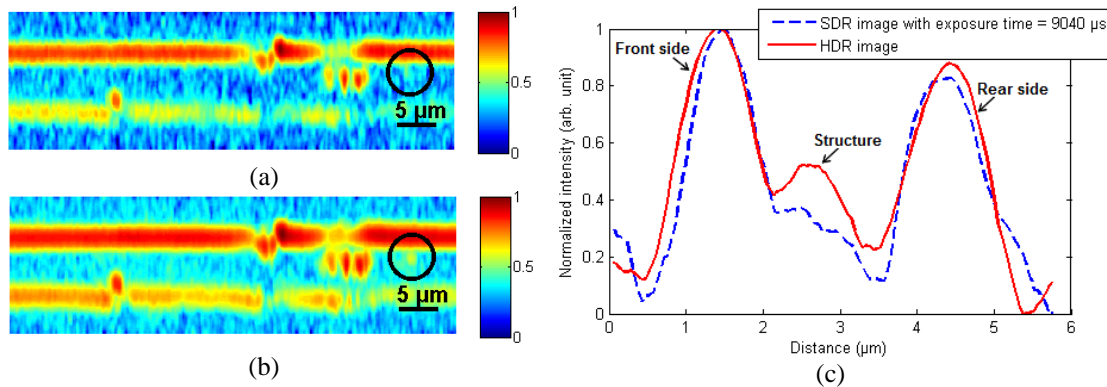


Figure 3-16. Détection d'une structure dans une image XZ HDR. (a) L'image XZ SDR en fausses couleurs; (b) L'image XZ HDR en fausses couleurs; (c) Les profils des images SDR et HDR.

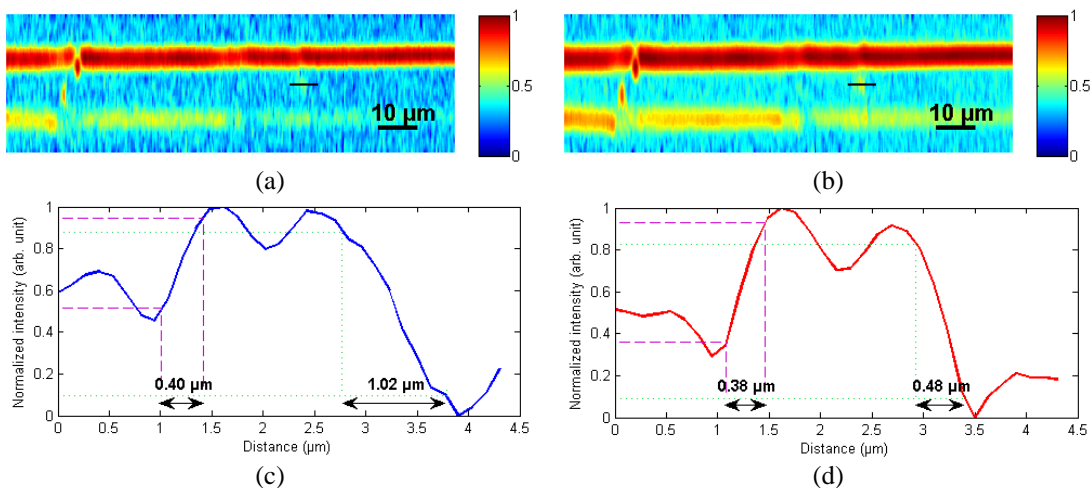


Figure 3-17. Amélioration de la résolution latérale. (a) Image XZ SDR en fausses couleurs; (b) Image XZ HDR en fausses couleurs; (c) Profil de la structure sur l'image SDR; (d) Profil de la structure sur l'image HDR (Leong-Hoi et al., 2016a).

On remarque également une amélioration de la résolution latérale du système, comme représenté sur la figure 3-17. Dans cet exemple, la résolution latérale, correspondant à la distance latérale au niveau des bords de la structure entre les points d'intensité à 90% et à 10% de l'intensité maximale,

a été améliorée de 540 nm pour le côté droit et de 20 nm pour le côté gauche, atteignant ainsi une résolution latérale qui s'approche de la valeur limitée par la diffraction de 0,45  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.5 Combinaison des techniques : IMPROVE-Protocol

En astronomie, les techniques de traitement d'image sont déjà couramment appliquées pour l'étude des étoiles, des galaxies ainsi que pour la détection d'exo-planètes. Ces dernières, comme les étoiles, sont des sources ponctuelles non résolues. Cependant, puisqu'elles sont trop près de l'étoile autour de laquelle elles orbitent, lors de leur observation, elles se retrouvent perdues dans le bruit de l'image (Galicher et al., 2011). Néanmoins, leurs orbites peuvent être résolues. Par conséquent, les exo-planètes individuelles peuvent devenir observables. Mais avant d'être en mesure d'analyser les images afin de pouvoir mesurer l'intensité des planètes, leur position et leurs mouvements, des procédures importantes et complexes ont été mises en place au moment de l'acquisition des images, de leur traitement et lors des réductions de données afin d'augmenter le SNR dans le but d'améliorer la résolution et la puissance de détection des télescopes. La figure 3-18 illustre la procédure suivie dans (Galicher et al., 2011) pour la détection des exo-planètes b, c, d et e orbitant autour de l'étoile Pegasus HR 8799 après l'application de plus de 20 étapes de traitement d'images.

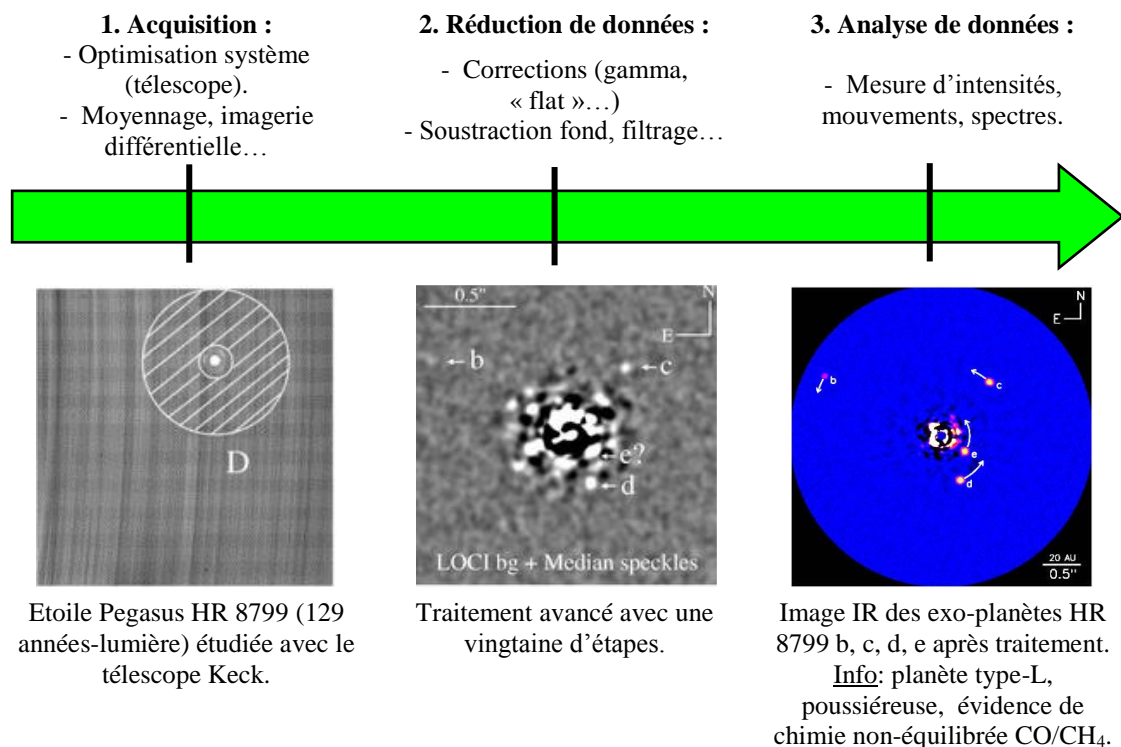


Figure 3-18. Détection d'exo-planètes après application de la technique LOCI (*locally optimized combination of images*) (Galicher et al., 2011).

Nous avons démontré que toutes les techniques de traitement d'image mentionnées dans les sections 3.3.2, 3.3.3 et 3.4.4, utilisées individuellement peuvent améliorer la qualité des images acquises et donc la reconstruction 3D. De la même façon qu'en astronomie, nous avons commencé à développer une nouvelle procédure rigoureuse, en nanoscopie optique sans marquage, appliquée au système FF-OCT, avec le même objectif, à savoir être capable d'observer des objets non-résolus. Dans ce cas, ce ne sont pas des exo-planètes mais des structures microscopiques non résolues dans les matériaux. Cette procédure, appelée « IMPROVE-Protocol » (pour « IMage PRocessing Optimization for fringe Visibility Enhancement ») consiste

en une combinaison des techniques de traitement d'image appliquées successivement. Plusieurs combinaisons de ces techniques ont été testées et les mesures du SNR sur les images finales ont montré que la combinaison donnée par l'équation Eq. (3-11) permettait d'obtenir les meilleures résultats (Leong-Hoi et al., 2016b).

$$I_{HDR, DF}^{av20} = \sum_{i=1}^{14} \frac{I_i^{av20} - D_i^{av20}}{F^{av20} - D_i^{av20}} * C \quad \text{Eq. (3-11)}$$

où  $I_i^{av20}$  est l'image moyennée 20 fois pour le temps d'exposition  $i$ ,  $D_i^{av20}$  l'image *dark* moyennée 20 fois pour le temps d'exposition  $i$ ,  $F^{av20}$  image *flat* moyennée 20 fois et  $C$  est une constante égale à l'intensité valeur de la moyenne image plate.

Pour l'acquisition :

- La technique HDR est utilisée avec une combinaison de 10 temps d'exposition différents.
- Le moyennage est effectué avec 20 images pour chaque temps d'exposition.

Pour la réduction des données:

- La correction *Dark* est effectuée en soustrayant chaque image par une image *dark* moyennée 20 fois.
- La correction *Flat* est effectuée en divisant chaque image par une image *flat* moyennée 20 fois.

Pour chaque temps d'exposition une image *flat* et une image *dark* peuvent être enregistrées. En effet, le bruit sur les images dépend du temps d'exposition de la caméra. Plus le temps d'exposition est grand, plus le bruit (temporel et spatial) augmente mais l'intensité moyenne étant plus élevée, cela améliore par conséquent le SNR des images. Une étude sur la lampe incandescente utilisée dans le système ainsi qu'une étude quantitative du bruit en fonction du temps d'exposition des caméras CCD Basler et CMOS Photonfocus ont été faites et sont présentées respectivement en [annexe 3-3](#) et [annexe 3-4](#).

Pour l'analyse des données, on peut observer les signaux de franges le long de l'axe vertical, les franges brutes 2D (image XZ), les images tomographiques et les hauteurs dans les images 3D. Bien que cette procédure soit inspirée de l'astronomie, nous n'avons pas encore atteint le même niveau d'amélioration des images. Une optimisation de microscope et de cette technique « IMPROVE-Protocol » sera donc nécessaire dans l'avenir.

## 3.4 Montage expérimental

### 3.4.1 Le système

Le système FF-OCT utilisé est un microscope interférométrique Leitz-Linnik modifié composé d'objectifs x50 (NA = 0,85), d'un cube diviseur de faisceau et d'une lampe à incandescence comme source lumineuse. L'échantillon est monté sur une table piézo-électrique (PIFOC P-721.CLQ) de la société PI (Physik Instrumente) équipée d'un système d'asservissement (boucle fermée) et contrôlée avec un capteur capacitif de position avec une sensibilité de 1 nm pour le balayage en Z des franges sur toute la profondeur de l'échantillon. La platine piézo-électrique a une dynamique de 100  $\mu\text{m}$  et est commandée par l'ordinateur par un port série RS-232-C. Le schéma de la [figure 3-19](#) montre la disposition schématique du système FF-OCT utilisé. L'acquisition et le traitement d'images sont effectués sur un PC équipé d'un processeur CPU Intel® Xeon® (2,40 GHz, 8 Go RAM) et du système d'exploitation Windows 7 (64 bits).

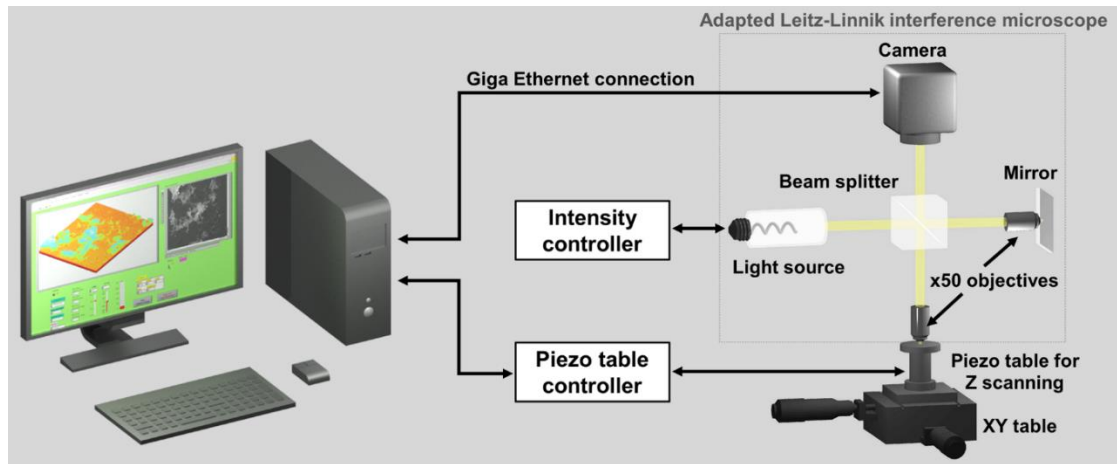


Figure 3-19. Représentation schématique du système FF-OCT utilisé.

### 3.4.2 Implémentation du logiciel

Le système est contrôlé par un programme développé par l'équipe et écrit en LabVIEW (version 2014, 64 bits, National Instruments) combiné avec le module IMAQ Vision pour l'acquisition et le traitement des images. Les étapes d'acquisition, de traitement et d'analyse disponibles dans le programme sont données dans la figure 3-20 (Montgomery et al., 2012b). Après avoir enregistré les images XY par balayage rapide sur la profondeur de l'échantillon, le traitement d'image peut être effectué sur la pile d'images XYZ. Les images qui en résultent sont ensuite stockées sur le disque dur et chargées dans la mémoire RAM pour l'analyse.

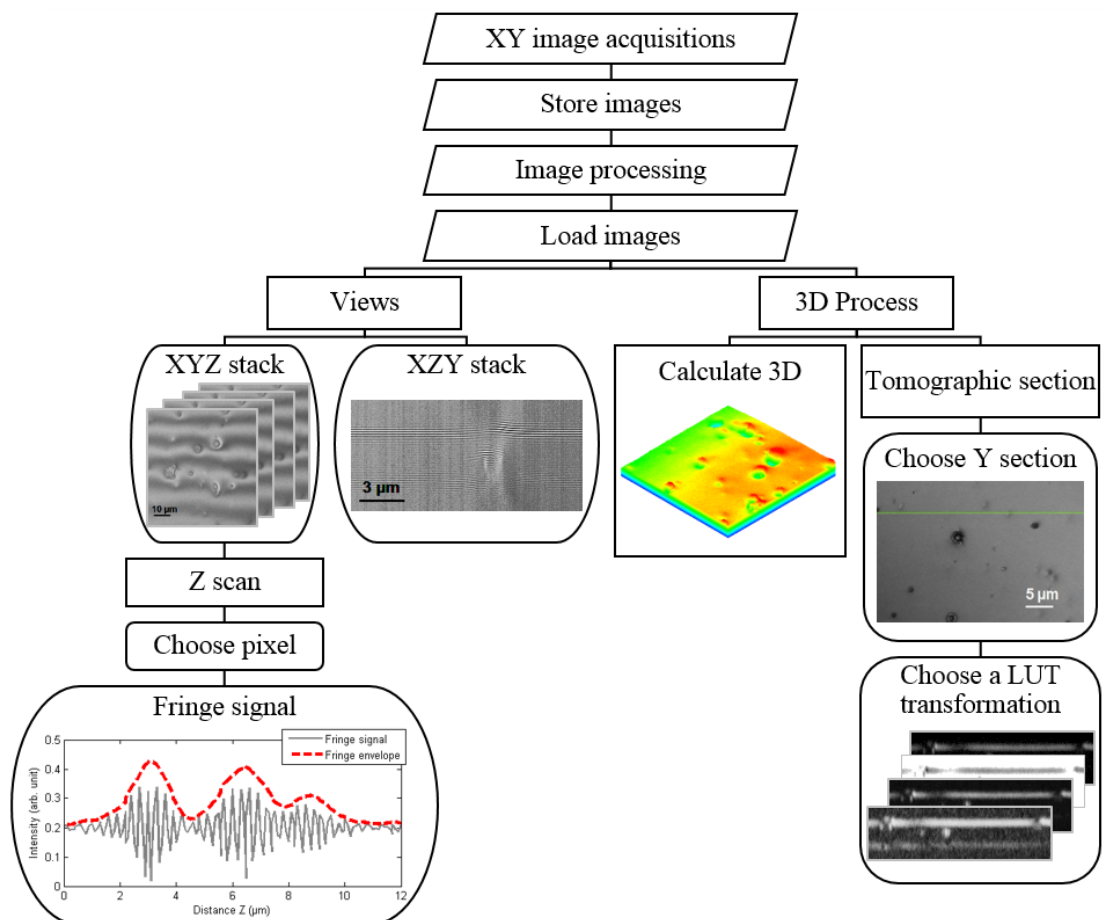


Figure 3-20. Etapes pour l'acquisition, le traitement et l'analyse des signaux de franges.

Différents outils ont été développés pour traiter et étudier cette matrice d'images. Par exemple, le signal de franges à un point donné peut être obtenu en choisissant un pixel dans la pile XYZ, permettant ainsi d'analyser la nature du signal de franges et de tester différents types d'algorithmes de détection d'enveloppe. Puis, il est possible d'extraire de la matrice XYZ des images XZ pour observer les franges brutes. De plus, la forme en 3D de la surface de l'échantillon peut être générée après un traitement 3D. Enfin, des coupes tomographiques peuvent être observées après avoir choisi une section Y, et une transformation LUT (linéaire, inverse, racine carrée ou logarithmique) peut être utilisée pour améliorer l'observation des images. Dans la partie « traitement d'images », j'ai développé le sous-programme en LabVIEW, comme illustré dans la [figure 3-21](#), pour permettre de générer les images HDR, avec les corrections *Dark* et *Flat*, après la calibration du système permettant d'obtenir les coefficients  $w_i$ .



Figure 3-21. Programme Labview pour générer des images HDR.

### 3.4.3 Temps de traitement

Avec la caméra CMOS Photonfocus, la fréquence d'acquisition est de 6,5 images par seconde. Concrètement, pour un balayage sur 16  $\mu\text{m}$  de profondeur avec un pas de 90 nm (178 images) pour 10 temps d'exposition différents chacun moyenné 20 fois, l'acquisition a une durée de 1h30. Pour un balayage sur 35  $\mu\text{m}$  de profondeur avec un pas de 90 nm (390 images) pour 5 temps d'exposition différents chacun moyenné 10 fois, le temps d'acquisition est de 50 min.

## 3.5 Résultats sur des microbilles de 4 $\mu\text{m}$ de diamètres dans du SU-8

Pour illustrer la technique « IMPROVE-Protocol », nous avons préparé un échantillon composé d'une couche de résine contenant des microsphères de verre. L'échantillon utilisé consiste en un film épais de 25  $\mu\text{m}$  de résine de « SU-8 2025 permanent epoxy negative photoresist » sur une plaque de silicium ([Leong-Hoï et al., 2016b](#)). La résine SU-8 2025 est largement utilisée pour des applications microélectroniques, en particulier dans la fabrication de MEMS. Cette résine photosensible est optiquement transparente à une longueur d'onde de 633 nm, avec un indice de réfraction de 1,596. Dans ce film, des microsphères de silice de 4  $\mu\text{m}$  de diamètre (ayant un indice de réfraction de 1,43) ont été ajoutés avant le procédé de revêtement par centrifugation. La [figure 3-22](#) montre la disposition schématique des échantillons qu'on appellera « SU8-Microsphères ».

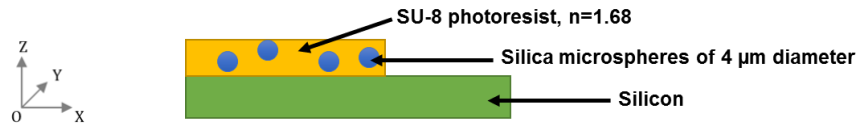


Figure 3-22. Représentation schématique de l'échantillon SU8-Microsphères.

L'acquisition d'image est effectuée avec une caméra CCD Basler avA1000-100gc avec une connexion Giga Ethernet. La calibration du système pour l'échantillon SU8-Microsphères, avec une intensité de courant de la source lumineuse de 2,6 A et une tension de 6,5 V, permet le calcul des coefficients  $w_i$  et l'équation affine obtenue est donnée par l'équation suivante :

$$w_i = -6,81 \cdot 10^{-5} * i + 1,42 \quad \text{Eq. (3-12)}$$

avec  $i$  le temps d'exposition en µs. Les résultats du [tableau 3-6](#) montrent les valeurs de  $w_i$  obtenues pour des temps d'exposition de 2000 µs à 13574 µs par période de 1286 µs. Les valeurs saturées ont été délibérément exclues pour éviter les erreurs de compensation (cf. [figure 3-23](#)).

Tableau 3-6. Coefficients correspondant à chaque temps d'exposition pour le système Basler-SU8-Microsphères.

Temps d'exposition (µs)	2000	3286	4572	5858	7144	8430	9716	11002	12288	13574
$w_i$	1,28	1,19	1,11	1,02	0,93	0,84	0,76	0,67	0,58	0,49

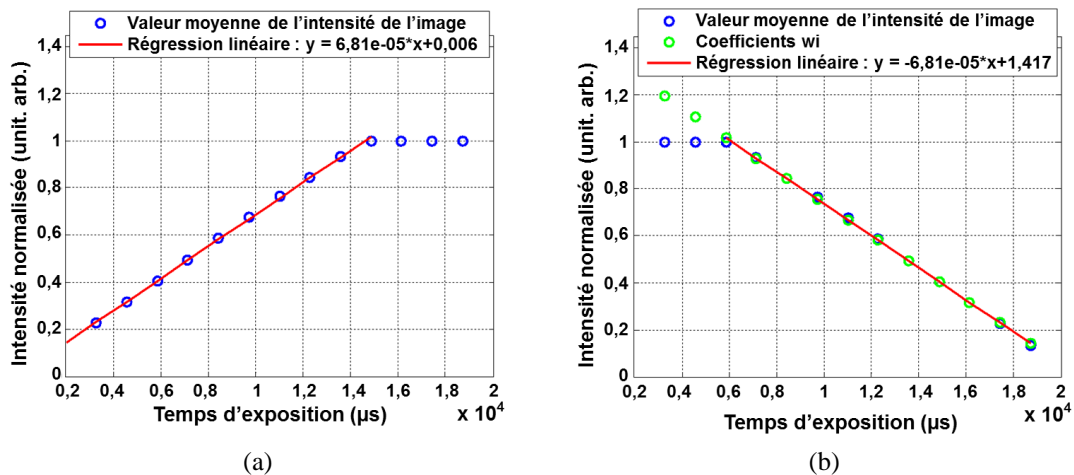


Figure 3-23. Calibration du système: la réponse de l'intensité de la caméra CCD (Basler) en fonction du temps d'exposition. (a) Réponse du système avant et (b) après inversion de la courbe.

La [figure 3-24](#) montre l'évolution des améliorations sur les images après les différentes corrections successives de la technique « IMPROVE-Protocol ». Les images SDR utilisées pour les comparaisons dans cette section sont ceux obtenus avec un temps d'exposition de 11002 µs dans lesquelles aucun pixel n'est saturé. Les images XY sont illustrées en fausses couleurs dans la première colonne. On peut observer une amélioration du contraste des images et une augmentation du SNR sur les images HDR. En observant un profil le long d'une zone uniforme sur les images, le SNR peut être calculé, comme indiqué par l'équation [Eq. \(3-4\)](#). Une amélioration significative jusqu'à 9 dB peut être observée, ce qui correspond à une amélioration d'un facteur 3, après avoir appliqué la technique HDR combinée à une moyenne de 20 images et des corrections *Dark* et *Flat* sur les images XY, comme le montre le [tableau 3-7](#). Puisque la technique proposée permet d'améliorer le SNR des images, il en résulte une amélioration de la résolution latérale du système ainsi que de sa capacité de détection.

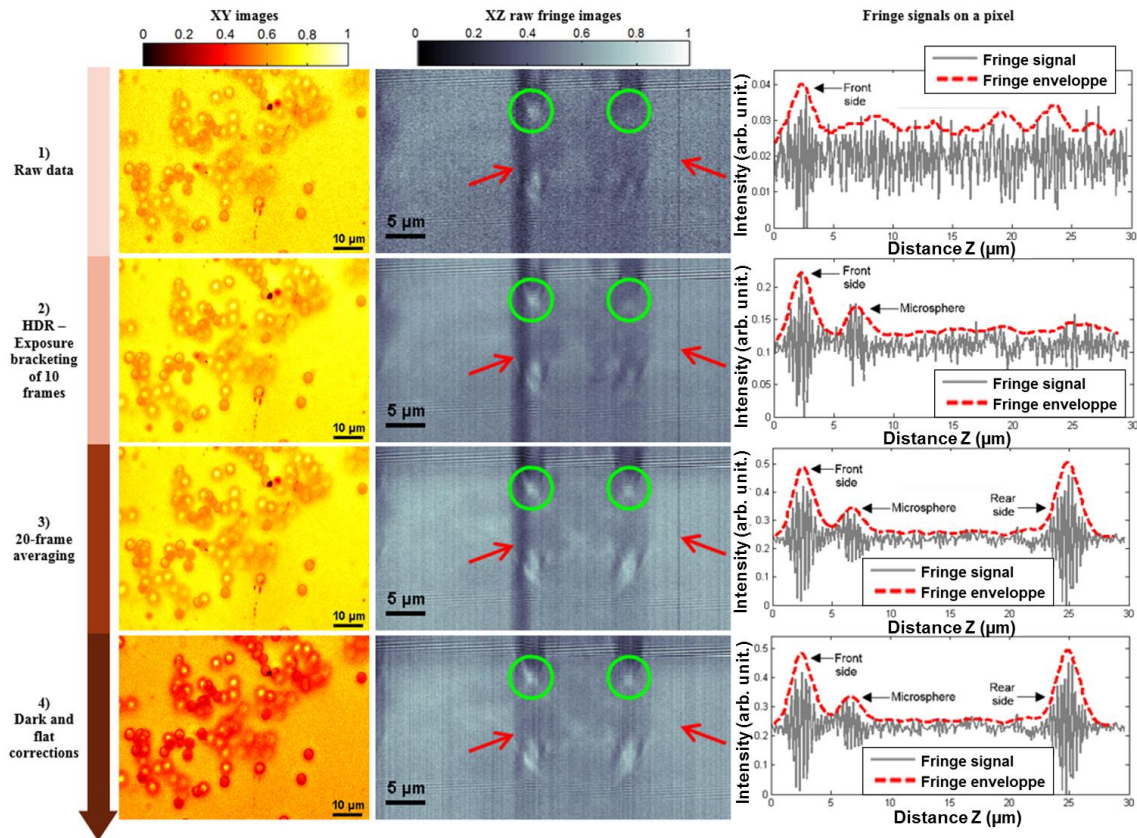


Figure 3-24. Evolution des améliorations après corrections par IMPROVE-Protocol. La première colonne illustre les images XY en fausses couleurs. La deuxième colonne montre des images XZ avec les cercles verts révélant la position des franges brutes et les flèches rouges la position des défauts dus à des particules de poussière sur les optiques. La troisième colonne présente des signaux de franges sur un pixel de la pile d'images XYZ.

Tableau 3-7. Valeurs SNR d'un profil sur des image XY SDR et HDR avec des corrections *Dark* et *Flat*.

	Données brutes	Moyennage de 10 im.	Moyennage de 20 im.
Image SDR (temps d'exposition : 11002 $\mu$ s)	30.54 dB	30.47 dB	29.66 dB
Image HDR (10 temps d'exposition)	38.91 dB	39.03 dB	39.12 dB

En effet, après une extraction des images XZ à partir de la pile d'images XYZ, les franges brutes peuvent être observées, comme illustré dans la deuxième colonne de la figure 3-24. Initialement, les données brutes obtenues sans traitement d'images ne permettent pas l'observation des franges brutes au fond de microsphères, comme indiqué par les cercles verts. Après utilisation de la technique HDR avec 10 temps d'exposition, les franges brutes dans le cercle vert gauche peuvent être détectées. La combinaison de la technique HDR avec la moyenne des 20 images permet une meilleure observation de ces franges. En outre, en appliquant les corrections *Dark* et *Flat* avec des images *dark* et *flat* moyennées 20 fois, certains défauts dus aux imperfections indésirables de poussière sur les composants optiques du système, comme indiqué par les flèches rouges, peuvent être supprimés. En observant dans la troisième colonne les signaux de franges sur un pixel de la pile d'images XYZ, on remarque une amélioration des signaux dans les images HDR moyennées 20 fois combinées aux corrections *Dark* et *Flat*. La courbe en pointillée rouge correspond à l'enveloppe de franges obtenue après le retrait de la moyenne locale des franges en gris le long de l'axe z et après un filtrage passe-bas du signal de frange. Sur les deux derniers signaux de franges, trois pics d'enveloppe peuvent être clairement détectés. Le premier pic à partir de la gauche



correspond très probablement au sommet d'une microsphère ou à la surface de la couche de SU-8. Le deuxième pic semble être le bas de la microsphère contenue dans la résine et le dernier pic correspond à l'interface entre la résine SU-8 et la plaque de silicium. Cette interface entre la résine photosensible et le silicium est bien visible après un moyennage de 20 images, et le bas de la microsphère ne peut être détecté seulement après avoir appliqué la technique HDR.

### 3.6 Résultats sur des échantillons d'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite (HA) est la principale composante minérale des os et des dents. Les couches synthétiques de HA (entre 1  $\mu\text{m}$  et 20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) sont des nouveaux biomatériaux qui suscitent beaucoup d'intérêts en particulier dans les implants médicaux ou dans les biocapteurs. Nous travaillons, depuis 2003, en collaboration (échange coopération, PICS) avec une équipe du Laboratoire ISSP du BAS (Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgarie), qui est spécialiste dans l'élaboration de nouveaux biomatériaux synthétiques. Ces couches peuvent être caractérisées par des techniques classiques, telles que la microscopie électronique à balayage et à transmission (MEB et MET), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), la spectroscopie Raman, la microscopie à force atomique (AFM), la microscopie à rayons X (en anglais *XRD : X-Ray Diffraction*) (Montgomery et al., 2009, 2010), etc.

Cependant les techniques classiques telles que le profilomètre à stylet, l'AFM et le MEB ne sont pas bien adaptées pour les mesures de topographie, d'épaisseur et de profil des couches d'HA hétérogènes, épaisses et rugueuses synthétiquement fabriquées. En effet, ces techniques peuvent être difficiles à prendre en main, invasives ou peuvent nécessiter un temps de mesure élevé, un contact physique avec l'échantillon, ou ont tout simplement une résolution latérale limitée. Par exemple, des informations qualitatives et de haute résolution peuvent être obtenues par le MEB, comme représenté sur la [figure 3-25](#), mais avec un coût élevé, et avec la contrainte d'une préparation spéciale des échantillons ainsi qu'un temps élevé de mesures.

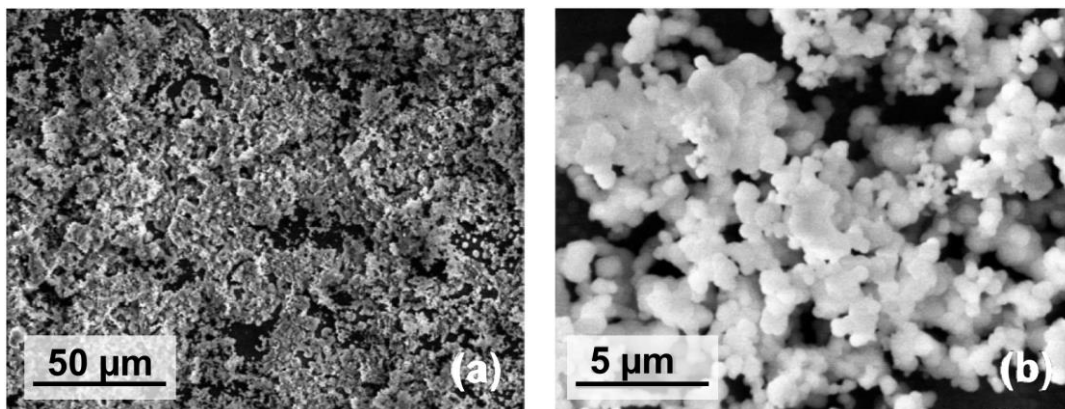


Figure 3-25. Images d'une couche d'HA par MEB confirmant la présence d'une couche hétérogène sur la surface : (a) grossissement x500 et (b) grossissement x5000 montrant des amas de particules sphériques de diamètre moyen de 0,75  $\mu\text{m}$  (Pecheva et al., 2007).

En outre, l'AFM permet une analyse nanométrique des surfaces d'HA, comme illustré sur la [figure 3-26](#), mais l'inconvénient est qu'elle ne peut être réalisée que sur des petites surfaces et les mesures peuvent causer des dommages soit sur la pointe, soit sur la couche de l'échantillon en raison de sa portée verticale limitée.

D'un autre côté, la FF-OCT permet des mesures sans contact, rapides et n'a besoin d'aucune préparation de l'échantillon. La topographie obtenue, comme présenté sur la [figure 3-27](#), est très

similaire à celle observée par le MEB et l'AFM. Les couches d'HA sont donc constituées de structures de taille micrométrique ressemblant à des nodules de sphère.

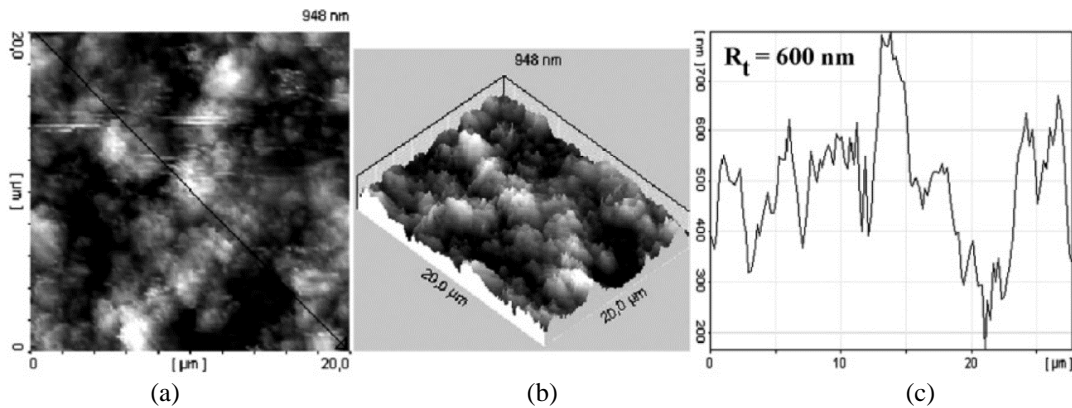


Figure 3-26. Mesure d'une surface d'HA par AFM : les images (a) 2D et (b) 3D ainsi qu'un (c) profil de la surface montrent la rugosité de la couche.

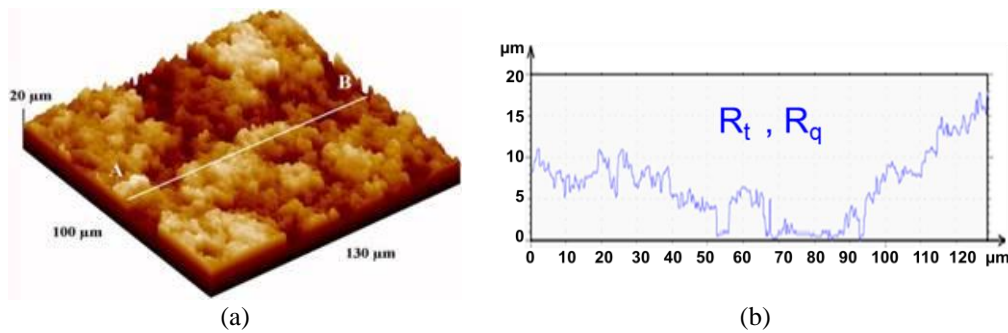


Figure 3-27. Mesure d'une surface d'HA par FF-OCT. (a) Image 3D et (b) profil de la surface montrent la rugosité de la couche (Pecheva et al., 2007).

Les informations obtenues avec la FF-OCT après l'analyse des signaux de franges ont permis de proposer un modèle des couches d'HA, comme illustré sur la figure 3-28 (Pecheva et al., 2007). On peut identifier trois différentes zones (A, B et C) sur les échantillons. La zone A, seulement visible sous le microscope interférométrique, correspond à l'interface entre une couche transparente et le substrat. Sur cette couche transparente, une mince couche formée d'amas de particules d'HA ressemblant à des sphères, de taille inférieure à  $10\ \mu\text{m}$ , a été formée et correspond à la zone B. Dans la zone C, l'adhérence des amas augmente l'épaisseur totale de la couche jusqu'à  $20\ \mu\text{m}$ .

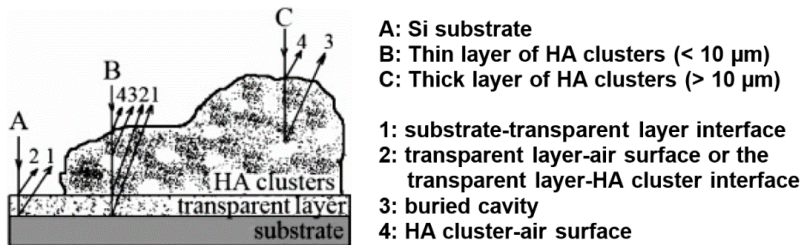


Figure 3-28. Modèle d'une couche d'HA. Du bas vers le haut : substrat, couche transparente d'HA, amas de particules d'HA (Pecheva et al., 2007).

Bien que la FF-OCT peut être utilisée pour mesurer l'épaisseur et la rugosité des matériaux d'HA, ces couches restent néanmoins un défi pour cette technique à cause de la semi-translucidité des couches d'HA, la haute rugosité des surfaces, et la présence de cavités formées à l'intérieur des couches, qui influent sur la qualité des motifs de franges et donc sur la précision axiale et latérale

des mesures. De plus, la FF-OCT a une résolution latérale égale à  $0,45 \mu\text{m}$ , qui reste donc faible par rapport à l'AFM, le SEM et le TEM, en raison des effets de diffraction.

Afin de réduire les erreurs de mesures et d'améliorer le pouvoir de détection des structures de la couche d'HA, nous avons appliqué la technique « IMPROVE-Protocol » sur les images acquises avant la reconstruction (Leong-Hoi et al., 2016c). L'acquisition d'image est effectuée avec une caméra CMOS Photonfocus MV1-D2048-96-G2 avec une connexion Giga Ethernet et une fréquence d'acquisition allant jusqu'à 22 images par seconde. La calibration du système pour les couches d'HA, avec une intensité de courant de la source lumineuse de 2,5 A permet le calcul des coefficients  $w_i$  et l'équation affine obtenue est donnée par :

$$w_i = -3,8 \cdot 10^{-4} * i + 1,23 \quad \text{Eq. (3-13)}$$

avec  $i$  le temps d'exposition en  $\mu\text{s}$ . Les résultats du tableau 3-8 montrent les valeurs de  $w_i$  obtenues pour 10 temps d'exposition allant de  $500 \mu\text{s}$  à  $2570 \mu\text{s}$  par pas de  $230 \mu\text{s}$ . La figure 3-29 montre les courbes obtenues lors de la calibration.

Tableau 3-8. Coefficients correspondant à chaque temps d'exposition pour le système Photonfocus-couches d'HA.

Temps d'exposition ( $\mu\text{s}$ )	500	730	960	1190	1420	1650	1880	2110	2340	2570
$w_i$	1,04	0,95	0,87	0,78	0,69	0,60	0,52	0,43	0,34	0,26

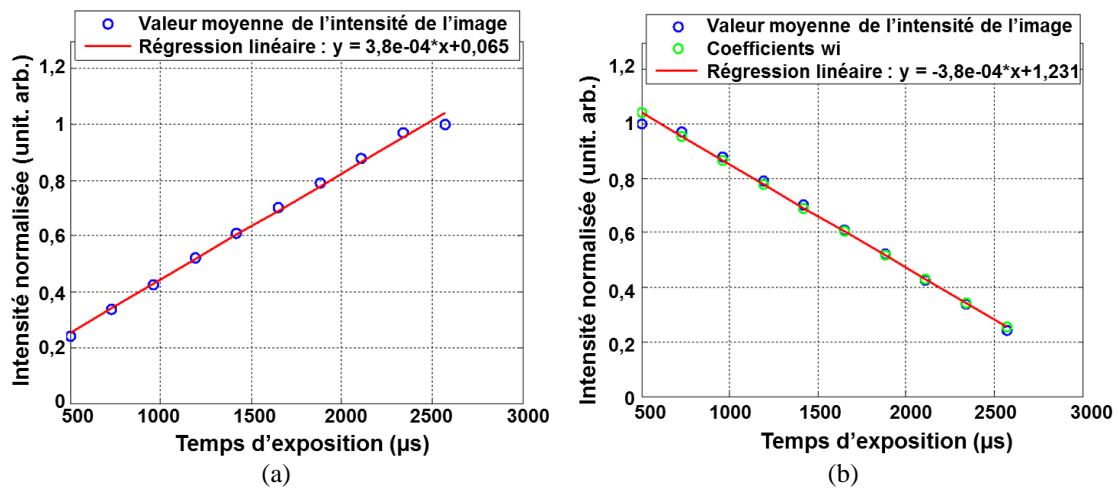


Figure 3-29. Calibration du système: la réponse de l'intensité de la caméra CMOS (Photonfocus) en fonction du temps d'exposition. (a) Réponse du système avant et (b) après inversion de la courbe.

La technique « IMPROVE-Protocol » permet d'améliorer de façon significative le SNR et le contraste de l'image, et par conséquent le pouvoir de détection de détails sub- $\mu\text{m}$  (Leong-Hoi et al., 2016c). La figure 3-30 montre des images 3D en fausses couleurs d'un échantillon d'HA fabriqué dans l'équipe IPP, sans traitement d'image (figure 3-30(a)) et après l'application de la technique « IMPROVE-Protocol » (figure 3-30(b)). L'image 3D corrigée contient des détails plus contrastés (cercles bleus). Dans les deux images, on distingue les trois types de zones (A, B et C) sur les échantillons. En observant les signaux de franges sur un pixel de la pile d'image XYZ, on remarque une amélioration des signaux sur les images HDR combinée avec la méthode de moyennage, et les corrections *Dark* et *Flat*, comme le montre la figure 3-31. Cette figure illustre les signaux de franges suivant les différentes corrections successives du protocole de traitement d'image. La courbe rouge correspond à l'enveloppe des franges.

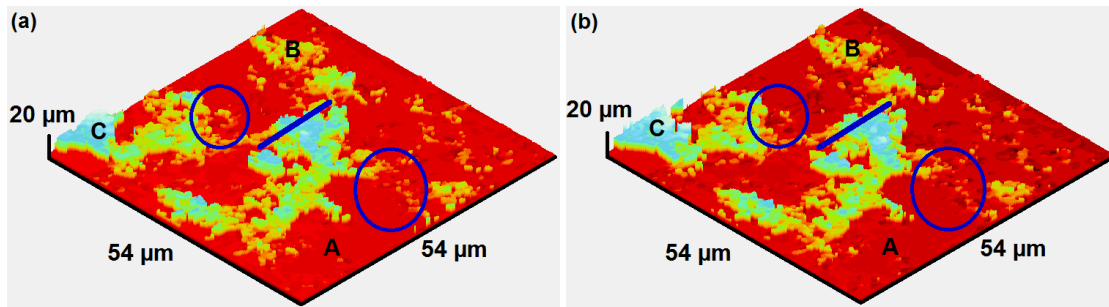


Figure 3-30. Image 3D image d'une couche d'HA : (a) sans correction et (b) après l'application de la technique « IMPROVE-Protocol ».

Différents pics peuvent ainsi être observés. Le pic 1 correspond à l'interface entre le substrat et la couche de transparente d'HA. Le pic 2 montre la position de l'interface entre la couche transparente et les amas de particules d'HA. Le pic 3 correspond à des cavités enfouies à l'intérieur des amas d'HA et le pic 4 est l'interface entre l'air et la surface d'HA. Avec les techniques de traitement d'image, le contraste de franges d'interférence est amélioré et les pics deviennent donc détectables. Les profils sur la surface des couches HA ont été comparés comme le montre la deuxième colonne (à droite) de la figure 3-31. On peut noter que la technique « IMPROVE-Protocol » a permis l'observation des détails sur la surface qui n'étaient pas mesurés initialement.

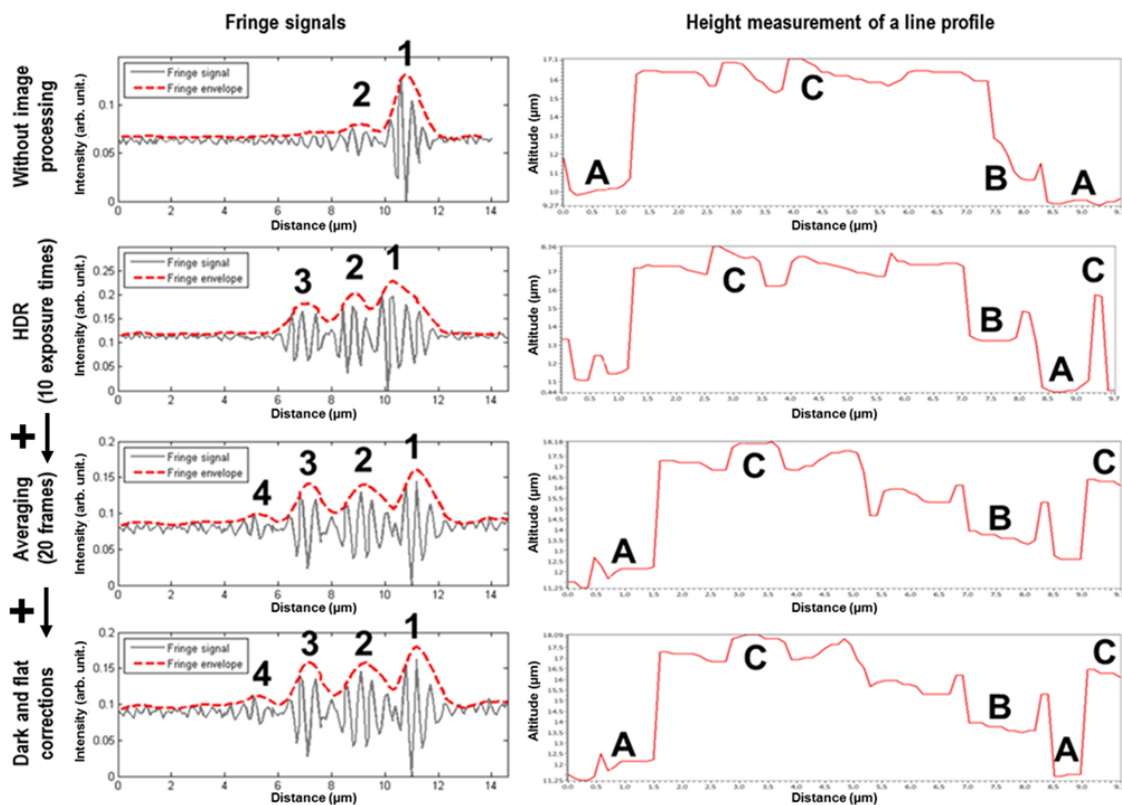


Figure 3-31. Evolution des signaux de franges et des mesures de hauteur sur un profil après l'application de la technique « IMPROVE-Protocol ».

Après avoir extrait des images XZ à partir de la matrice d'images XYZ, les franges brutes, comme illustré sur la figure 3-32 (à gauche) et les valeurs des enveloppes de franges en fausses couleurs, comme présenté sur la figure 3-32 (à droite), peuvent être observées. Les résultats obtenus montrent que l'utilisation de la technique HDR avec 10 temps d'exposition ne suffit pas pour la détection de certaines particules d'HA à l'intérieur des couches, tandis que l'ajout d'un moyennage

de 20 fois sur les images HDR permet leur détection. En conclusion, la combinaison de la technique HDR avec un moyennage de 20 images et les corrections *Dark* et *Flat* permet d'améliorer le contraste et donc l'observation des franges brutes. En outre, la correction *Flat* a permis une réduction des artefacts sur les images tels que l'inhomogénéité de l'éclairage ou les défauts dus aux poussières sur les composants optiques du système, comme illustré avec le cercle rose sur la [figure 3-32](#). Enfin, en analysant le SNR sur le long d'un profil sur une zone uniforme de l'échantillon, une amélioration de 4 à 6 dB peut être observée après l'application de la technique « IMPROVE-Protocol » sur les images.

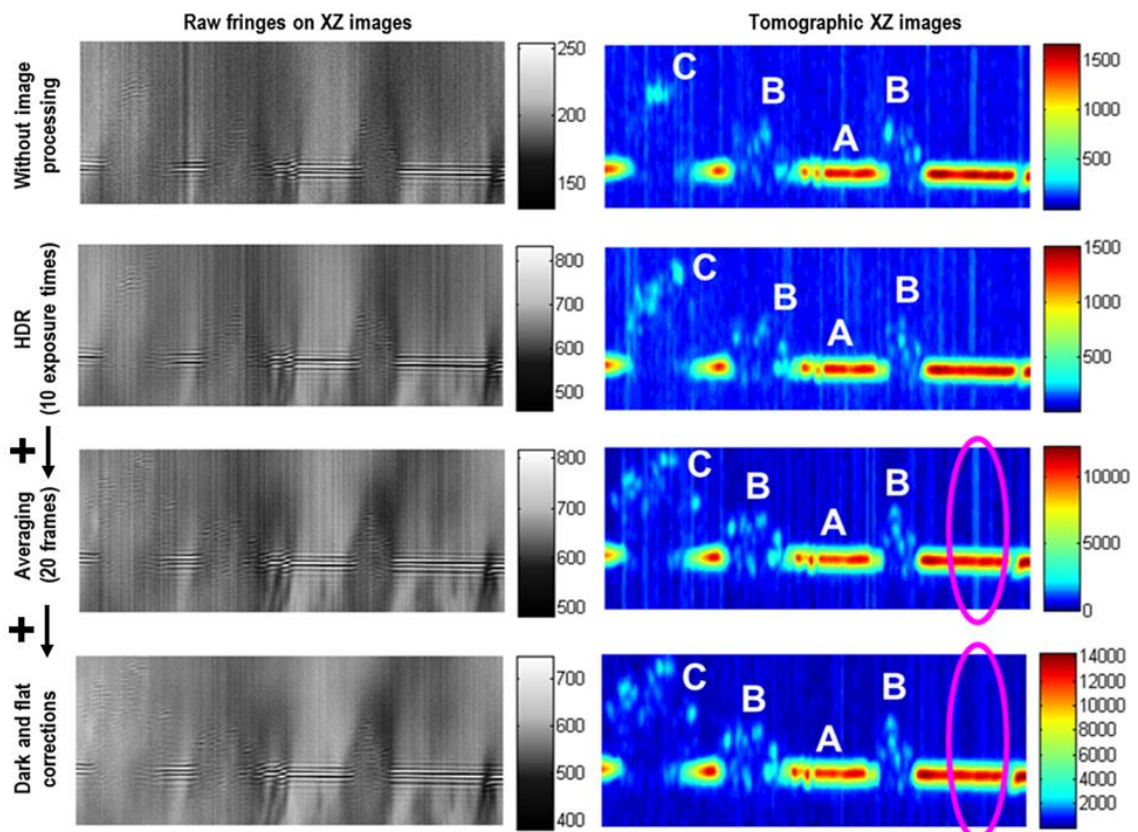


Figure 3-32. Evolution et amélioration des franges brutes sur les images XZ et des images tomographiques après l'application de la technique « IMPROVE-Protocol ».

### 3.7 Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons présenté le début d'une nouvelle procédure rigoureuse « IMPROVE-Protocol », en nanoscopie optique sans marquage, appliquée au système FF-OCT utilisant un éclairage incohérent, avec pour objectif de pouvoir observer des détails microscopiques non résolus dans des matériaux. Cette procédure est basée sur l'utilisation de techniques de traitement d'images soigneusement choisies pour améliorer la sensibilité de détection des structures et des détails à l'intérieur de couches transparentes. La combinaison des méthodes de traitement d'image proposée permet d'imager des structures de taille micrométriques et sub-micrométriques contenues dans la couche, initialement perdues dans le bruit et donc à peine observables.

La technique est basée sur l'acquisition d'une pile d'images XYZ suivie par l'utilisation de différentes corrections d'images pour améliorer le contraste et pour augmenter de façon significative le SNR. Une extraction d'images XZ à partir de la matrice d'images XYZ est alors effectuée. Un traitement 2D des franges dans le plan XZ est ensuite réalisé afin d'améliorer encore

la robustesse au bruit. Parmi les méthodes de traitement d'images utilisées, le moyennage d'images permet une augmentation de la stabilité des acquisitions en réduisant le bruit temporel. Ensuite, l'utilisation de l'image *dark* obtenue par en bloquant du chemin d'illumination du système optique, et la correction *Flat* sont appliquées afin de réduire le bruit spatial des images permettant ainsi une compensation des erreurs dues aux défauts sur les optiques tels que des particules de poussière. Les résultats de la technique hybride HDR permet une amélioration du contraste, rendant ainsi les détails sombres d'une zone sous-exposée de l'échantillon observables et inversement permettant aux zones surexposées de ne plus être saturées.

Les résultats sont obtenus tout d'abord sur des films de polymère de Mylar d'épaisseur 3  $\mu\text{m}$  et 6  $\mu\text{m}$  contenant des structures de vide de taille  $\mu\text{m}$  ou sub- $\mu\text{m}$ . Puis la technique « IMPROVE-Protocol » a été appliquée à des films de 25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de résine photosensible SU-8 dans lequel des microsphères de silice de 4  $\mu\text{m}$  de diamètre ont été insérées. Enfin, cette même technique a été utilisée sur des échantillons d'HA rugueux et poreux, difficilement mesurables. Les résultats ont montré une amélioration du SNR allant de 4 à 9 dB, donc d'un facteur 2 à 3. De plus, cela a permis une réduction des artefacts sur les images, ainsi qu'une amélioration de la résolution latérale permettant ainsi au système de se rapprocher de la limite théorique de diffraction d'un microscope optique en lumière blanche, à savoir 0,45  $\mu\text{m}$ .

On pourrait envisager par la suite d'employer la procédure sur un microscope amélioré et avec une caméra d'une grande profondeur (de 12 bits ou 16 bits) pour améliorer encore plus le SNR et de pouvoir détecter des structures non-résolues comme les nanoparticules. Cependant, l'application de ce protocole de traitement d'images requiert l'acquisition d'un grand nombre d'images (pour le moyennage et pour la technique HDR), ce qui nécessite des temps d'acquisition et de traitement allant de quelques minutes à 2 heures selon le nombre de moyennage, le nombre de temps d'exposition, la dynamique et le pas de balayage utilisés. Par conséquent, une caméra rapide combinée à une carte FPGA ou GPU pourrait être utilisée pour diminuer les temps d'acquisition à des durées plus pratiques.

De plus, des tests sur d'autres échantillons plus rugueux nous ont amené à la conclusion que la combinaison des techniques de traitement d'images doit être ré-étudiée et optimisée en fonction de l'échantillon à observer afin d'obtenir un bon compromis entre qualité et temps de mesure.

## REMERCIEMENTS ET CONTRIBUTIONS

Je tiens à exprimer ma gratitude à M. Freddy Anstotz, M. Manuel Flury et M. Wilfried Uhring pour leur aide, leurs conseils et leurs explications sur les caméras et les différentes techniques de traitement d'images.

Mes remerciements vont également à Rémy Claveau pour son aide pour les mesures sur les films de polymère de Mylar ([section 3.3.2](#) et [section 3.3.3](#)) et à Mme Emilia Pecheva pour ses échantillons d'hydroxyapatite, utilisés dans la [section 3.6](#).

Je remercie Hongyu Li (stagiaire en fin de 1<sup>ère</sup> année à Télécom Physique Strasbourg) pour son travail sur les images 3D du microscope Leitz-Linnik ([figure 3-19](#)) réalisées sur AutoCAD.

---

## Chapitre 4. Nanoscopie interférométrique par jet photonique

---

*By the help of Microscopes, there is nothing so small, as to escape our inquiry; hence there is a new visible World discovered to the understanding.  
- Robert Hooke, in Micrographia, 1665.*

### RESUME DU CHAPITRE

Dans ce chapitre, nous présenterons les résultats du premier nano-3D en configuration Linnik utilisant des microsphères de verre (« Photonic nano-jet lens » PNL) développé à IPP dans un premier temps en Janvier 2016. Nous démontrerons que la résolution latérale élevée du nano-jet photonique produite par la microsphère joue un rôle important dans l'amélioration de la résolution latérale du système optique. Des résultats 3D sur un étalon de réseaux avec différentes périodes ont été obtenus dans l'air et à travers des microsphères de diamètre de 24  $\mu\text{m}$  placées sous l'objectif et sur l'échantillon à étudier en lumière blanche. D'autres résultats ont été obtenus sur un réseau métal-diélectrique de 580 nm de période avec des microsphères de 24  $\mu\text{m}$  et 35  $\mu\text{m}$  de diamètre en lumière blanche. De plus, quelques premiers résultats de simulations de l'interaction entre le jet photonique et le réseau vont être présentés avec une certaine compréhension de base sur la formation d'image. Cependant, étant donné que certains résultats feront potentiellement l'objet d'un dépôt de brevet, certaines explications ont été volontairement omises dans ce chapitre.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont fait l'objet des publications et des conférences suivantes :

- P.C. Montgomery, S. Lecler, A. Leong-Hoi & P Pfeiffer, 3D nano surface profilometry by combing the photonic nanojet with interferometry, 19th INTERNATIONAL SCHOOL ON CONDENSED MATTER PHYSICS, Advances in Nanostructured Condensed Matter: Research and Innovations, Varna, Bulgaria, 2016.
- I. Kassamakov, P. Montgomery, A. Nolvi, S. Lecler, A. Leong-Hoi and E. Hægström, 3D Superresolution Label-free Imaging, en préparation.
- P.C. Montgomery, A. Leong-Hoi, S. Lecler, & P Pfeiffer, Profilométrie nanoscopique par la combinaison du jet photonique avec l'interférométrie, *Mesures et techniques optiques pour l'industrie (CMOI)*, Le Mans, France, 2017.



## PLAN DU CHAPITRE

<b>4.1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>102</b>
<b>4.2</b>	<b>DE LA NANOSCOPIE 2D A LA NANOSCOPIE INTERFEROMETRIQUE 3D PAR JET PHOTONIQUE .....</b>	<b>102</b>
4.2.1	Nanoscopie 2D à travers des microsphères .....	102
4.2.2	Nanoscopie holographique à travers des microsphères.....	106
4.2.3	Nanoscopie interférométrique 3D avec des objectifs Linnik .....	107
4.2.4	Nanoscopie interférométrique 3D à objectif Mirau par jet photonique .....	108
	4.2.4.1 <i>Principe du système et disque de Blu-Ray utilisé.....</i>	<i>108</i>
	4.2.4.2 <i>Simulations.....</i>	<i>108</i>
	4.2.4.3 <i>Résultats expérimentaux sur le disque de Blu-Ray .....</i>	<i>109</i>
<b>4.3</b>	<b>MICROSCOPE NANO-3D INTERFEROMETRIQUE DEVELOPPE A IPP.....</b>	<b>110</b>
<b>4.4</b>	<b>PREMIERS RESULTATS NANO-3D .....</b>	<b>111</b>
4.4.1	L'échantillon utilisé : un prototype d'étalon de résolution .....	111
4.4.2	Résultats en lumière blanche.....	113
	4.4.2.1 <i>Réseau de période 1,2 <math>\mu\text{m}</math>.....</i>	<i>114</i>
	4.4.2.2 <i>Réseau de période 0,6 <math>\mu\text{m}</math>.....</i>	<i>115</i>
	4.4.2.3 <i>Résumés des résultats obtenus sur les réseaux .....</i>	<i>115</i>
	4.4.2.4 <i>Simulations.....</i>	<i>116</i>
<b>4.5</b>	<b>MESURES SUR UN RESEAU DE HFO<sub>2</sub> DE 580 NM .....</b>	<b>117</b>
4.5.1	L'échantillon utilisé : réseau métal-diélectrique .....	117
4.5.2	Mesures directes (sans microsphères) par microscopies interférométriques.....	117
4.5.3	Mesure par interférométrie nano-3D.....	118
<b>4.6</b>	<b>MESURES SUR L'ETALON CALIBRE .....</b>	<b>119</b>
4.6.1	Etalon calibré par le PTB .....	119
4.6.2	Mesures directes par microscopies interférométriques et par AFM.....	119
4.6.3	Mesure par interférométrie nano-3D.....	120
<b>4.7</b>	<b>CONCLUSION DU CHAPITRE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>122</b>

## 4.1 Introduction

Une technique de microscopie d'interférence est basée sur le principe de décalage de phase (PSM) et l'interférométrie CSI, comme présenté dans le [chapitre 1 \(section 1.6.1\)](#). Cette technique fait partie des techniques robustes et sans contact pour mesurer la rugosité des surfaces et la topographie des surfaces 3D à l'échelle microscopique. Des informations quantitatives sur de grandes surfaces sont fournies avec une résolution axiale sub-nanométrique ([de Groot, 2015b](#)) en utilisant la mesure de haute sensibilité de la phase du front d'onde et en la comparant à celle de la lumière réfléchiée par un miroir de référence à travers un objectif d'interférence. Cependant, la résolution latérale reste limitée par la diffraction à  $\lambda/2$  (cf. [chapitre 1](#)), à une valeur d'environ 400 nm dans le visible ([Montgomery & Montaner, 1999](#)). Récemment, la technique de super-résolution à travers des microsphères avec un microscope optique classique ([chapitre 1, section 1.5.3.3.3](#)) a été un succès pour observer des structures en 2D en dessous de la limite de résolution, dans l'air et en immersion ([Wang et al., 2011](#); [Yao et al., 2015](#)), permettant ainsi une amélioration de la résolution latérale jusqu'à un facteur 4.

L'idée que nous avons eu a été de combiner cette technique de super-résolution latérale 2D par nano-jet photonique avec la haute résolution axiale de la microscopie interférométrique, en utilisant une configuration de type Linnik. Cette idée est le fruit du savoir-faire de l'équipe IPP sur la microscopie interférométrique et les jets photoniques. Au même moment, cette idée a été développée avec une configuration de type Mirau ([Kassamakov et al., 2016](#)) mais également avec un Linnik ([Wang et al., 2016a](#)) en éclairage Köhler avec la technique basée sur la détection de l'enveloppe des franges. Des résultats des mesures 3D de réseaux de petites périodes à travers des microsphères de verre sont présentés. Les petites périodes des réseaux ne sont pas observables avec le même objectif dans l'air, car elles sont en dessous de la limite de résolution du microscope utilisé. De plus, des simulations sur l'interaction entre le jet photonique et les réseaux sont présentées. Cette nouvelle technique ouvre de nouvelles possibilités pour la caractérisation à haute résolution des nanomatériaux et des sciences biologiques.

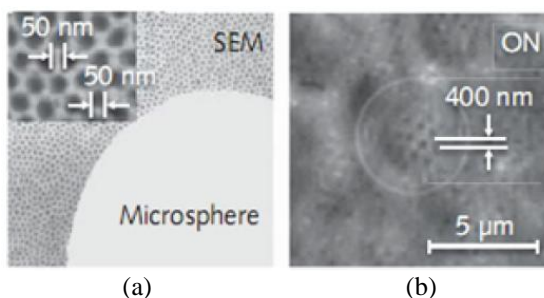
Des premiers tests de notre système interférométrique nano-3D ont été effectués en décembre 2015, mais les résultats n'étaient pas convaincants puisque la mire USAF utilisée était trop grande. Au début, nous étions un peu sceptiques quant au fait de trouver les franges d'interférence à travers la microsphère mais nous avons tout de même décidé d'essayer. Au final, de bons résultats ont été obtenus et nous n'avons pas seulement eu un effet de grossissement mais également une super-résolution latérale !

## 4.2 De la nanoscopie 2D à la nanoscopie interférométrique 3D par jet photonique

### 4.2.1 Nanoscopie 2D à travers des microsphères

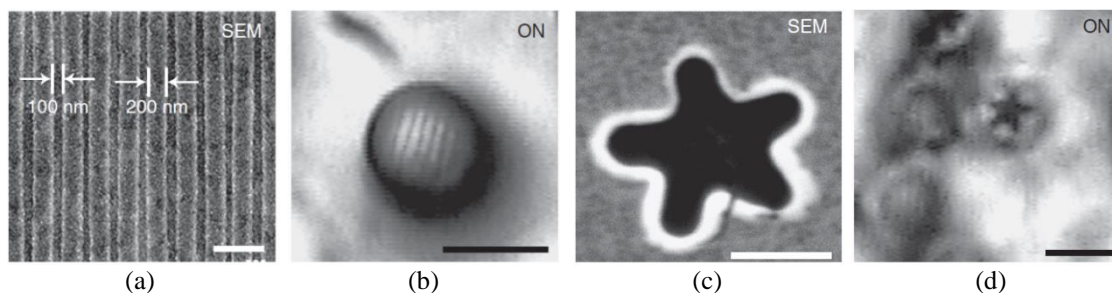
En 2011, il a été démontré qu'en plaçant simplement une microsphère au-dessus d'un échantillon, et en observant à travers un microscope optique classique, des nano-structures de 50 nm ont pu être observées en lumière blanche, et cela sans aucun processus de marquage complexe ([Wang et al., 2011](#)). La technique est basée sur l'utilisation de microsphères ordinaires fabriquées à partir de matériaux tels que le verre (dioxyde de silicium, SiO<sub>2</sub>) et le polystyrène. Les microsphères sont placées au-dessus de la surface de l'objet. Une lampe halogène avec une longueur d'onde centrée à 600 nm est utilisée en tant que source d'éclairage en lumière blanche. Bien que le principe de fonctionnement ne soit pas encore complètement compris, il semble que les microsphères

fonctionnent comme des super-lentilles qui collectent l'information sous l'objet en champ proche et la grossissent, formant ainsi des images virtuelles qui gardent la même orientation que les objets en champ lointain, avant d'être projeté à travers un microscope. La combinaison de la microsphère en tant que super-lentille et de l'objectif de microscope forme une lentille composée. Des résultats imageant des objets à l'échelle nanométrique ont été obtenus en transmission et en réflexion. Par exemple, en transmission, une membrane d'oxydes anodiques d'aluminium (AAO) a été imagée à travers des microsphères de  $4,7\ \mu\text{m}$  de diamètre, comme présenté sur la [figure 4-1](#). Les pores de la membrane sont de  $50\ \text{nm}$  de diamètre et sont espacés de  $50\ \text{nm}$ . Avec cette technique, il est donc possible d'atteindre une résolution de  $50\ \text{nm}$ , soit  $\lambda/8$  (pour  $\lambda = 400\ \text{nm}$ ) ou  $\lambda/14$  (pour  $\lambda = 750\ \text{nm}$ ) dans le domaine du visible. Le grossissement obtenu pour cet échantillon est de  $8\times$ .



**Figure 4-1.** Membrane d'oxydes anodiques d'aluminium (AAO) imagée (a) par MEB et (b) en transmission à travers des microsphères de  $4,7\ \mu\text{m}$  de diamètre ([Wang et al., 2011](#)).

En réflexion, des lignes de  $200\ \text{nm}$  d'épaisseur et séparées de  $100\ \text{nm}$  dans un disque Blu-Ray peuvent être imagées à travers des microsphères de  $4,7\ \mu\text{m}$  de diamètre en lumière blanche, par exemple en utilisant une lampe halogène comme source d'éclairage (cf. [figure 4-2\(a\)-\(b\)](#)). La [figure 4-2\(c\)-\(d\)](#) montre une structure en forme d'étoile gravée sur un disque DVD. La forme complexe de l'étoile, y compris ses coins de  $90\ \text{nm}$  de diamètre, a été clairement résolue par cette technique.



**Figure 4-2.** Imagerie à travers une microsphère en réflexion. (a) Image par MEB d'un DVD Blu-ray et (b) à travers une microsphère de  $4,7\ \mu\text{m}$  de diamètre en lumière blanche en réflexion. (c) Image par MEB d'une structure en étoile faite sur le film du disque et (d) à travers une microsphère de  $4,7\ \mu\text{m}$  de diamètre en lumière blanche en réflexion. Echelles: MEB ( $500\ \text{nm}$ ), ON ( $5\ \mu\text{m}$ ) ([Wang et al., 2011](#)).

Dans la pratique, une difficulté de cette technique est le contrôle du positionnement de la microsphère pour l'observation à travers le microscope. Deux approches ont été proposées. Une approche, récemment brevetée ([Du et al., 2016](#)), consiste à utiliser des microsphères à haut indice, comme le dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) ou le titanate de baryum ( $\text{BaTiO}_3$ ) embarquées dans un matériau transparent, tel que le PMMA ou le PDMS ([Allen et al., 2014, 2015](#)).

De nombreux développements ont montré que la résolution en imagerie optique peut également être améliorée lorsque les microsphères sont placées en partie en immersion dans un liquide ou encore si elles sont totalement immergées avec l'utilisation d'objectifs à immersion (Guo et

al., 2015; Lee et al., 2013), donnant ainsi une meilleure résolution, un grossissement élevé, et une grande distance de travail. D'autre part, Vlad et al. ont étudié la performance de l'imagerie avec des microsphères de polymère thermiquement remodelées et se sont intéressés à la question du choix du plan de l'image virtuelle, comme présenté dans la figure 4-3 (Vlad et al., 2012). Selon la forme de la microsphère, le point focal se trouve plus ou moins profondément dans le substrat. La grille hexagonale avec des trous de 180 nm de diamètre et de période de 330 nm ne peuvent être résolue avec le système optique classique. Les facteurs d'agrandissement ( $M$ ), ainsi que la distance du plan de l'image virtuelle par rapport à la surface ( $Z$ ) au cours de laquelle les images ont été capturées sont indiqués sur la figure 4-3(c).

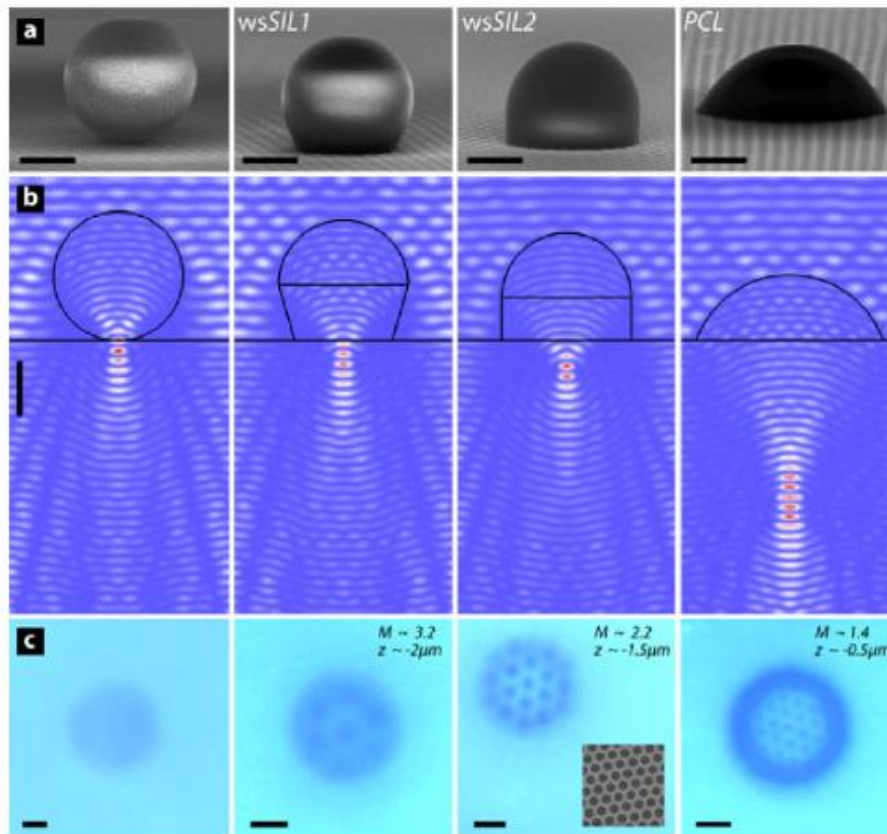
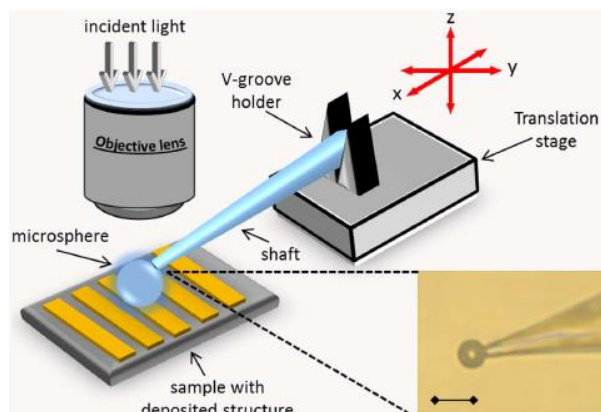


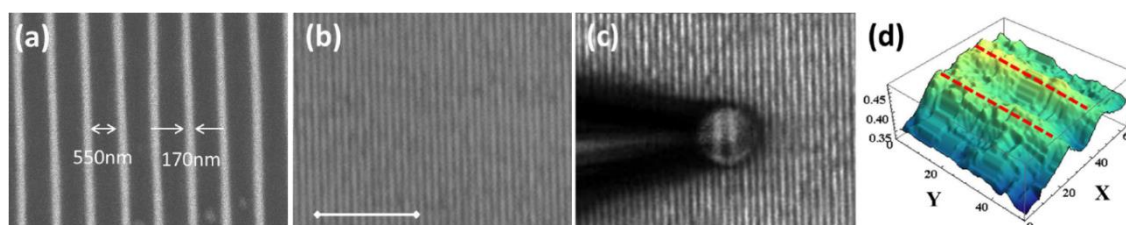
Figure 4-3. Étude des lentilles thermiquement remodelées. (a) Images MEB des lentilles thermiquement remodelées. (b) Résultats des simulations sur la distribution de l'intensité lumineuse pour chaque forme de microsphères. (c) Images correspondantes avec un microscope optique (objectif ON = 0,9). Echelle : 1  $\mu$ m (Vlad et al., 2012).

Une autre approche pour contrôler le mouvement d'une microsphère est d'utiliser une fine micropipette de verre attachée à celle-ci (Krivitsky et al., 2013), comme illustrée dans la figure 4-4. Des simulations ont été réalisées pour étudier l'influence de la micropipette sur les ondes électromagnétiques à travers la microsphère. Il a été démontré que la micropipette a un effet quasiment négligeable pour  $\lambda = 600$  nm en champ proche. Cette méthode a été testée sur deux échantillons. Le premier est un réseau en polymère fabriqué par lithographie par interférence laser sur un substrat de silicium. L'observation à travers un microscope électronique MEB, comme présenté dans la figure 4-5(a), montre des lignes de 170 nm d'épaisseur et de 500 nm de hauteur séparées de 550 nm. La figure 4-5(b) montre l'échantillon observé directement à travers un microscope optique classique avec un objectif de grossissement 50x dans l'air. La figure 4-5(c) montre l'échantillon observé à travers une microsphère d'environ 5  $\mu$ m de diamètre avec le même microscope optique que pour la figure 4-5(b). A travers la microbille, l'image virtuelle de

l'échantillon a subi un grossissement d'environ 6x. Puis, cette image virtuelle est convertie en niveaux de gris et les valeurs des pixels sont récupérées en utilisant Mathematica. Le profil d'intensité en 3D correspondant est représenté sur la [figure 4-5\(d\)](#).

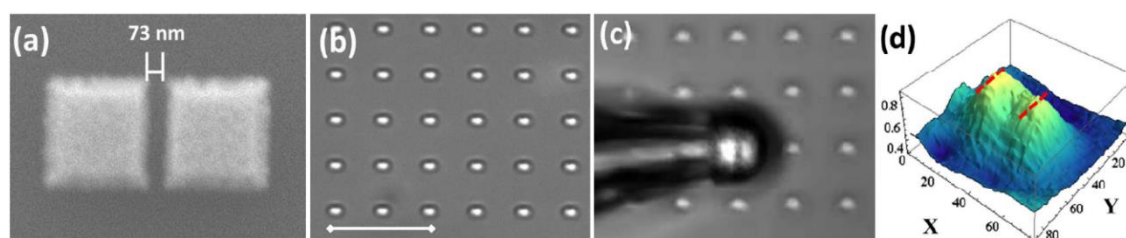


**Figure 4-4.** Schéma du système de contrôle de la microsphère par une micropipette de verre. Une image, vue au microscope (objectif 40x), de la microsphère fixée à la micropipette par une colle optique est présentée ([Krivitsky et al., 2013](#)). Echelle : 10  $\mu\text{m}$  (schéma non à l'échelle).



**Figure 4-5.** Image d'un réseau en polymère à travers une microbille. (a) Image du réseau en polymère par MEB et (b) par microscopie optique dans l'air sous un objectif 50x. Echelle : 10  $\mu\text{m}$ . (c) Image virtuelle de la structure dans l'air à travers une microsphère de 5  $\mu\text{m}$  de diamètre. (d) Profil de l'intensité 3D de l'image virtuelle. Les unités des axes X et Y correspondent au nombre de pixels ([Krivitsky et al., 2013](#)).

Le second échantillon est composé de carrés d'or, déposés les uns à côté des autres sur un substrat de silicium. Il est fabriqué en utilisant la lithographie par faisceau d'électrons. Les carrés de 500 x 500 nm<sup>2</sup> sont séparés de 73 nm, et ont une hauteur de 50 nm. L'échantillon est d'abord observé à travers un microscope électronique MEB, comme présenté sur la [figure 4-6\(a\)](#), puis directement à travers un microscope optique classique avec un objectif de grossissement 50x dans l'air, comme présenté sur la [figure 4-6\(b\)](#).



**Figure 4-6.** Image de carrés d'or à travers une microbille. (a) Image des carrés d'or par MEB et (b) par microscopie optique dans l'air sous un objectif 50x. Echelle : 10  $\mu\text{m}$ . (c) Image virtuelle des structures dans l'air à travers une microsphère d'environ 5  $\mu\text{m}$  de diamètre. (d) Profil de l'intensité 3D de l'image virtuelle. Les unités des axes X et Y correspondent au nombre de pixels ([Krivitsky et al., 2013](#)).

La séparation entre les deux carrés d'or n'est pas résolue avec le microscope classique. La [figure 4-6\(c\)](#) montre l'échantillon observé à travers une microsphère d'environ 5  $\mu\text{m}$  de diamètre avec le même microscope optique que pour la [figure 4-6\(b\)](#). A travers la microbille, la séparation entre les deux carrés devient visible sur l'image virtuelle. Le profil d'intensité en 3D correspondant,

obtenu par le même algorithme que celui de la [figure 4-5\(d\)](#), est représenté sur la [figure 4-6\(d\)](#), où l'on peut clairement observer l'écart entre les carrés.

#### 4.2.2 Nanoscopie holographique à travers des microsphères

La technique utilisant des microsphères a également été appliquée en holographie numérique ([Wang et al., 2016b](#)). Un schéma de la technique permettant d'améliorer la résolution latérale en microscopie holographiques est donné dans la [figure 4-7](#). L'objet est d'abord imagé par la microsphère et l'image virtuelle et grossie de cet objet peut être observée sur le plan image de la microsphère. Puis le grossissement de l'image est doublé à l'aide de l'objectif microscopique (MO). La distance  $L$  entre MO et le plan image de la microsphère correspond à la distance de travail de l'objectif MO.

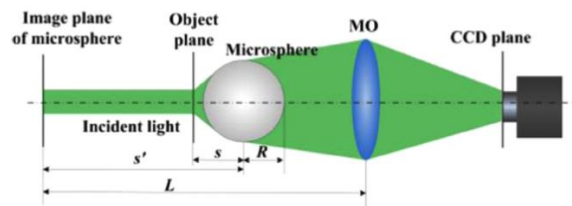


Figure 4-7. Schéma de la technique de microscopie holographique basée sur l'utilisation d'une microsphère ([Wang et al., 2016b](#)).

Pour vérifier la technique expérimentalement, un réseau sinusoïdal avec une période de  $1,2\ \mu\text{m}$  a été observé à travers une microsphère de polystyrène de  $90\ \mu\text{m}$  de diamètre. L'hologramme est donné par la [figure 4-8\(a\)](#) et l'amplitude complexe reconstruite par la [figure 4-8\(b\)](#). Un grandissement de la région d'intérêt est montré sur la [figure 4-8\(c\)](#).

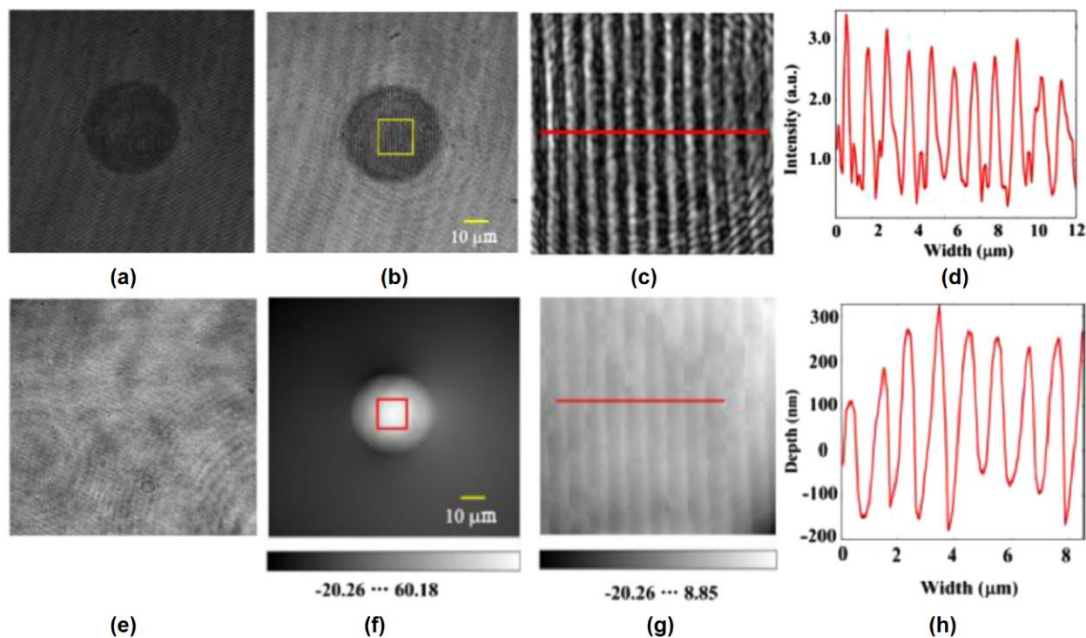
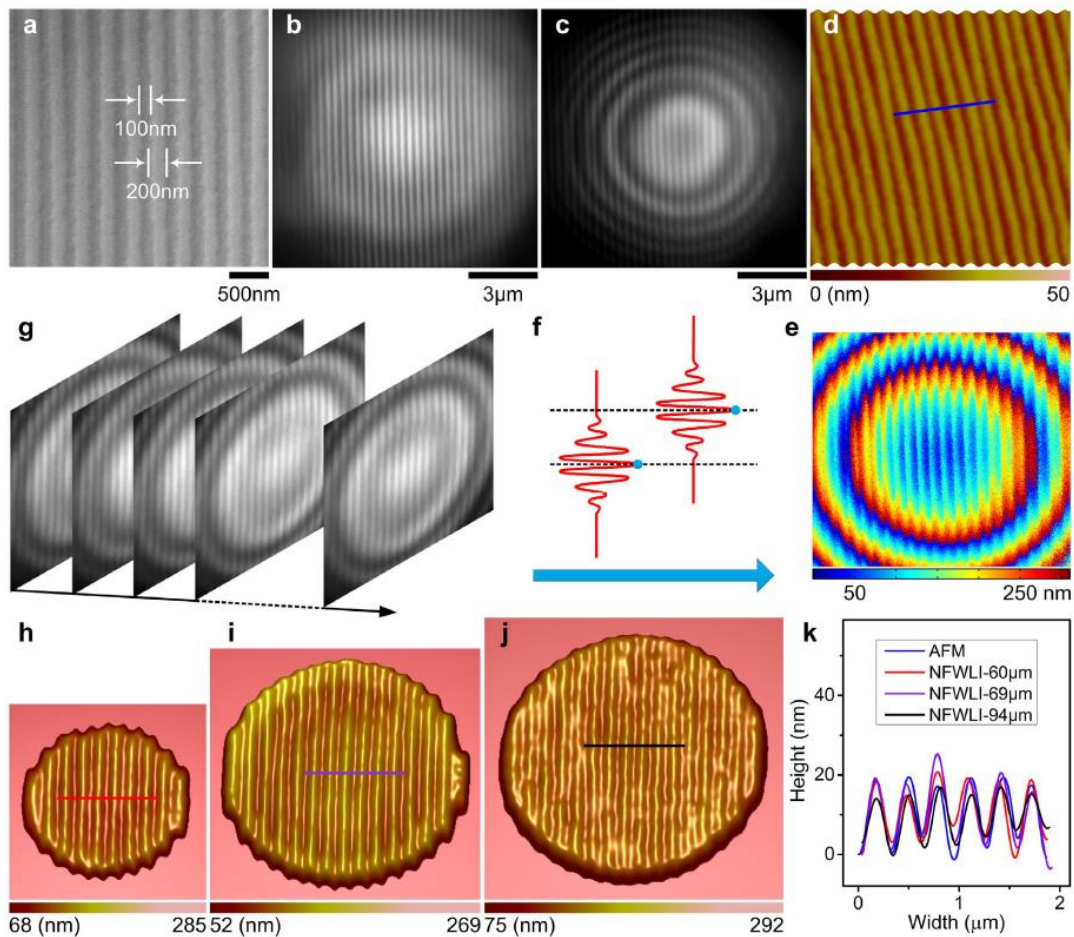


Figure 4-8. Résultats expérimentaux sur le réseau de  $1,2\ \mu\text{m}$  de période. (a) Hologramme du réseau à travers la microsphère. (b) Image de l'amplitude reconstruite. (c) Grandissement de la zone d'intérêt de (b). (d) Profil d'intensité de la ligne indiquée dans (c). (e) Image de l'amplitude reconstruite par le système holographique numérique sans microsphère. (f) Image de la phase déroulée à travers la microsphère. (g) Grandissement de la région d'intérêt de (f) après une correction des aberrations de la phase. (h) Profil de hauteur du réseau à travers la microsphère ([Wang et al., 2016b](#)).

Le grossissement obtenu avec cette technique est de 2,28. On peut observer le réseau à travers la microsphère alors que sans la microsphère, ce réseau n'est pas résoluble (cf. [figure 4-8\(e\)](#)). Un profil d'intensité de l'image du réseau obtenu ([figure 4-8\(c\)](#)) est donné dans la [figure 4-8\(d\)](#). La [figure 4-8\(f\)](#) montre l'image de la phase déroulée, avec en [figure 4-8\(g\)](#) un grandissement de la région d'intérêt après une correction des aberrations de la phase et sur la [figure 4-8\(h\)](#), le profil de hauteur du réseau à travers la microsphère, donnant une hauteur moyenne de 365 nm.

### 4.2.3 Nanoscopie interférométrique 3D avec des objectifs Linnik

Pour démontrer la super-résolution 3D avec la technique, appelée « Near-Field Assisted White-Light Interferometry » (NFWLI) proposée par Wang et al., la surface d'un disque Blu-Ray a été utilisée avec des microsphères de différents diamètres (60  $\mu\text{m}$ , 69  $\mu\text{m}$  et 94  $\mu\text{m}$ ) ([Wang et al., 2016a](#)), comme illustré dans la [figure 4-9](#). Après avoir retiré le film de protection transparent sur la surface du Blu-Ray, les structures sur le disque sont dans un premier temps mesurées par MEB (cf. [figure 4-9\(a\)](#)) puis par AFM (cf. [figure 4-9\(d\)](#)). Elles sont constituées de rainures de 100 nm de large, de 14 à 22 nm de profondeur et espacées entre elles de 200 nm.



**Figure 4-9.** Super-résolution 3D par NFWLI. (a) Image MEB des structures sur une surface de disque Blu-ray après avoir retiré le film de protection transparent. (b) Image virtuelle à travers une microsphère. (c) Image avec les franges d'interférence par NFWLI à travers la même microsphère que dans (b). (d) Image 3D par AFM. (e) Contour coloré de la surface du disque Blu-ray construit en recherchant les images correspondantes à l'intensité maximale pour chaque pixel (f) Schéma des franges d'interférence à partir (g) d'une série d'images. Reconstruction 3D par NFWLI par des microsphères en  $\text{BaTiO}_3$  de (h) 60  $\mu\text{m}$ , (i) de 69  $\mu\text{m}$  et (j) 94  $\mu\text{m}$  de diamètre. (k) Comparaison des profils marqués par les lignes indiquées dans (d, h-j). Ces lignes représentent les barres d'échelle dans chaque figure ([Wang et al., 2016a](#)).

La [figure 4-9\(b\)](#) montre l'image virtuelle de la surface du Blu-Ray à travers une microsphère en  $\text{BaTiO}_3$  de  $69 \mu\text{m}$  de diamètre immergée dans de l'eau. La [figure 4-9\(c\)](#) montre la même image virtuelle mais avec les franges d'interférence. Après une série d'acquisition en balayant l'axe vertical (cf. [figure 4-9\(g\)](#)), la reconstruction 3D de la surface est réalisée en retrouvant la position du maximum d'intensité des franges d'interférence pour chaque pixel (cf. [figure 4-9\(f\)](#)). Le contour 3D est donné dans la [figure 4-9\(e\)](#). Puis, à partir de ces données la surface en 3D est reconstruite après l'application d'un filtre passe-bas et d'une correction de la planéité (cf. [figure 4-9\(h\)-\(j\)](#)). Les profils mesurés par AFM et avec la technique NFWLI pour les trois tailles de microsphères sont comparés dans la [figure 4-9\(k\)](#) et sont en accord entre eux.

#### 4.2.4 Nanoscopie interférométrique 3D à objectif Mirau par jet photonique

Juste avant la sortie de la publication de Wang et al. (en avril 2016), nous avons pris connaissance des travaux semblables d'Ivan Kassamakov ([Kassamakov et al., 2016](#)) de l'Université d'Helsinki en Finlande, utilisant un objectif Mirau. Nous avons commencé une collaboration suite à sa demande d'effectuer des simulations de son système qui est décrit par la suite.

##### 4.2.4.1 Principe du système et disque de Blu-Ray utilisé

Le système de microscopie interférométrique utilisé par l'équipe finlandaise, construit sur mesure, a une configuration de type Mirau (Nikon x50,  $\text{NA} = 0.55$ ) en lumière blanche (lampe halogène), centrée à  $\lambda = 600 \text{ nm}$ , qui dans des conditions normales donne une résolution latérale théorique classique limitée à  $0,51 \mu\text{m}$ , selon le critère de Sparrow. Des microsphères de polymère ( $n = 1,68$ ) de diamètre de  $11 \mu\text{m}$  sont placées sur la surface d'un disque Blu-ray® (Lin et al., 2006) afin d'améliorer la résolution latérale du système initial. Les images ont été acquises à l'aide d'une caméra monochrome haute sensibilité CMOS avec des pixels de petite taille. La topologie de la surface du disque Blu-Ray® enregistrable utilisé, dont la couche protectrice de polymère a été au préalable enlevée, a d'abord été mesurée par MEB et par un AFM. Pour les mesures au MEB, la surface du disque a été recouverte d'une couche d'or de  $4 \text{ nm}$  d'épaisseur. La puissance du faisceau d'électrons a été limitée pour éviter d'altérer la surface du disque.

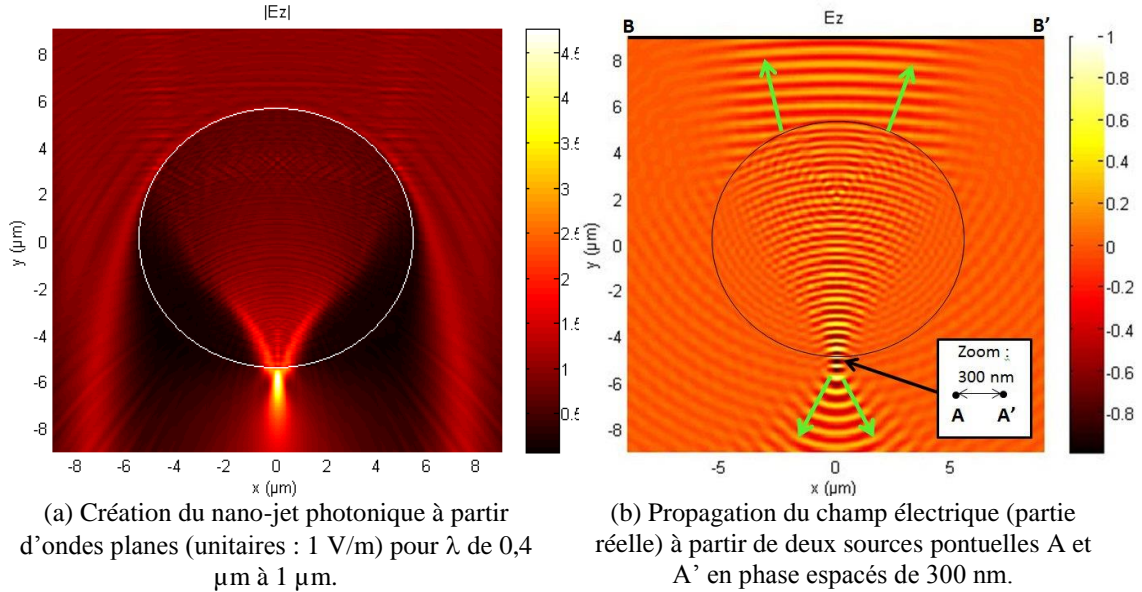
##### 4.2.4.2 Simulations

Des simulations ont été effectuées à IPP, s'appuyant sur le savoir-faire de Sylvain Lecler. Un nano-jet photonique est un faisceau de lumière de très petite taille située près de la surface d'une microsphère diélectrique éclairée, dont le diamètre est comparable à une ou quelques longueurs d'onde de la source de lumière ([Chen et al., 2004](#); [Lecler et al., 2005](#)). Le jet photonique, créé par une microsphère de polymère ( $n = 1,68$ ) de  $11 \mu\text{m}$  de diamètre et éclairée par une onde plane incidente (lumière blanche de TE unitaire), est calculé en utilisant la méthode 2D par éléments finis (FEM) avec comme conditions aux bords une couche absorbante parfaitement adaptée (PML : *Perfectly Matched Layer*) (cf. [figure 4-10\(a\)](#)). La largeur spectrale de la source a été prise en compte dans les simulations en sommant les longueurs d'onde de  $400 \text{ nm}$  à  $1000 \text{ nm}$  (avec un pas de  $50 \text{ nm}$ ). L'intensité maximale du nano-jet photonique est se trouve à  $0,5 \mu\text{m}$  en-dessous de la bille (selon l'axe  $y$ ), avec une longueur d'environ  $2 \mu\text{m}$  (largeur à mi-hauteur le long de l'axe  $y$ ), et a une largeur à mi-hauteur de  $0,5 \mu\text{m}$  (le long de l'axe  $x$ ).

Récemment, des images super-résolues acquises avec un microscope optique classique et des microsphères de silice ( $n = 1,46$ ) de diamètre entre  $2 \mu\text{m}$  et  $9 \mu\text{m}$  ont été obtenus prouvant ainsi que la résolution latérale du système pouvait atteindre  $50 \text{ nm}$ . On ignore encore exactement comment cette approche fonctionne ([Li et al., 2013](#)). Une explication possible est que la super-



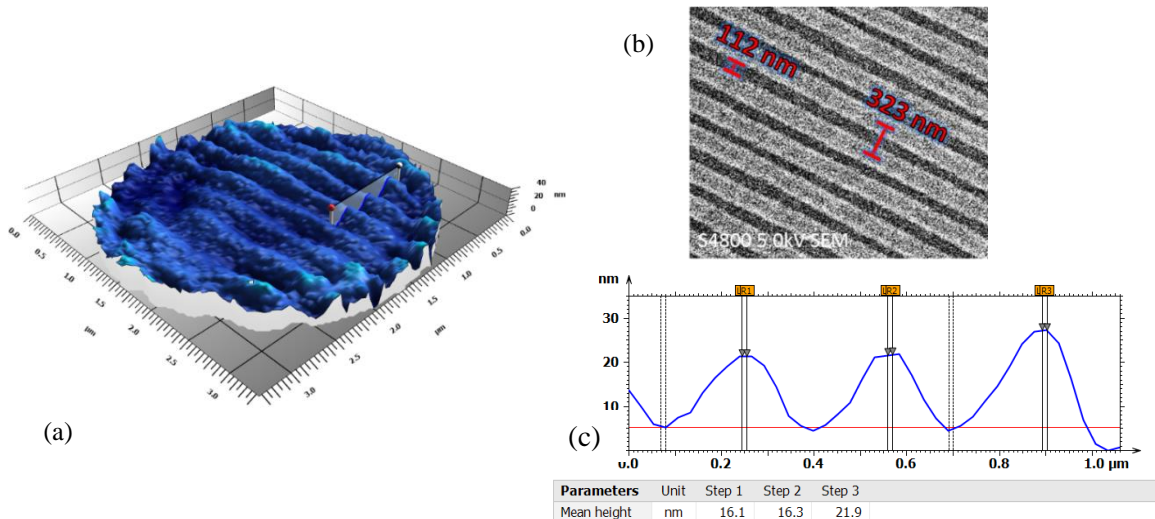
résolution peut être atteinte simplement en observant « à travers la microsphère » au niveau du plan de l'image virtuelle produite par la microsphère. L'existence de ce plan virtuel peut être justifiée par la simulation du nano-jet comme présenté dans la [figure 4-10\(b\)](#), en faisant l'analogie avec une lentille : puisque le nano-jet est en dehors de la microsphère, un objet se trouvant entre la microsphère et le jet photonique sera grossi dans le plan virtuel.



**Figure 4-10.** Détermination de la position du plan de l'image virtuelle (ligne en pointillée) par simulations 2D par éléments finis (FEM) (valeurs absolues  $|E_z|$ ) pour une microsphère de 11  $\mu\text{m}$  de diamètre ( $n = 1.68$ ) et  $\lambda = 600 \text{ nm}$ . La flèche indique le sens de la propagation.

#### 4.2.4.3 Résultats expérimentaux sur le disque de Blu-Ray

La [figure 4-11\(a\)](#) montre les résultats, de l'équipe finlandaise, de la surface d'un disque Blu-Ray® obtenus à travers la microsphère de 11  $\mu\text{m}$  de diamètre. L'image MEB de la [figure 4-11\(b\)](#) donne une indication de l'espacement des lignes, mais ne fournit aucune information 3D.



**Figure 4-11.** Reconstruction 3D de structures d'un disque Blu-Ray à travers une microsphère de 11  $\mu\text{m}$  et un microscope interférométrique de type Mirau. (a) Image 3D du disque Blu-Ray® par PNI. (b) Image MEB sur une zone du disque. (c) Profil de la ligne indiquée dans (a), montrant des structures entre 16 nm et 22 nm de profondeur ([Kassamakov et al., 2016](#)).

Ainsi, sur la reconstruction 3D de la [figure 4-11\(a\)](#), les rainures de 112 nm séparées de 323 nm peuvent être résolues. Cela montre une amélioration de la résolution latérale d'un facteur 6 par rapport à la résolution latérale du système sans la microsphère ([Kassamakov et al., 2016](#)). La profondeur des rainures mesurées est de 16  $\mu\text{m}$  à 22  $\mu\text{m}$  (cf. [figure 4-11\(c\)](#)). Les valeurs obtenues sont très proche des valeurs de profondeur de 20  $\mu\text{m}$  à 25  $\mu\text{m}$  mesurées par AFM. Une des difficultés dans l'utilisation de l'AFM pour mesurer le profil 3D est l'interaction inconnue entre la pointe et le polymère à proximité des bords des rainures qui peut introduire des erreurs de mesure.

Un inconvénient de l'utilisation de cette technique avec une configuration de type Mirau est le choix limité de taille de la microsphère. En effet, en interférométrie, les franges d'interférences apparaissent lorsque les chemins optiques des deux bras de l'interféromètre sont égaux. Or, en utilisant un objectif de Mirau, le déplacement du miroir de référence est limité. Pour surmonter ce problème, une solution est d'utiliser cette technique avec une configuration de type Linnik, qui permet un déplacement plus grand du miroir de référence.

### 4.3 Microscope nano-3D interférométrique développé à IPP

Le système utilisé pour les mesures à IPP est le même qu'utilisé dans le [chapitre 3](#). Il est basé sur un microscope interférométrique Leitz-Linnik modifié avec des objectifs identiques de grossissement x50 (NA = 0,85) et une platine piézoélectrique PIFOE contrôlée avec un capteur de position capacitif pour un balayage en Z des franges sur la profondeur de l'échantillon. Entre l'objectif et la table piézoélectrique, une microsphère de verre est placée sur l'échantillon à observer, comme illustré dans la [figure 4-12](#).

Les images sont acquises avec une caméra CMOS monochrome (Photonfocus MV1-D2048-96-G2) avec une connexion Giga Ethernet. Le système de mesure est contrôlé par un PC équipé d'un processeur CPU Intel® Xeon® (2,40 GHz, 8 Go de RAM) avec le système d'exploitation Windows 7 (64 bits). Le logiciel de contrôle et d'analyse a été développé en interne sous LabVIEW (version 2014, 64 bits, National Instruments) combiné avec le module IMAQ Vision.

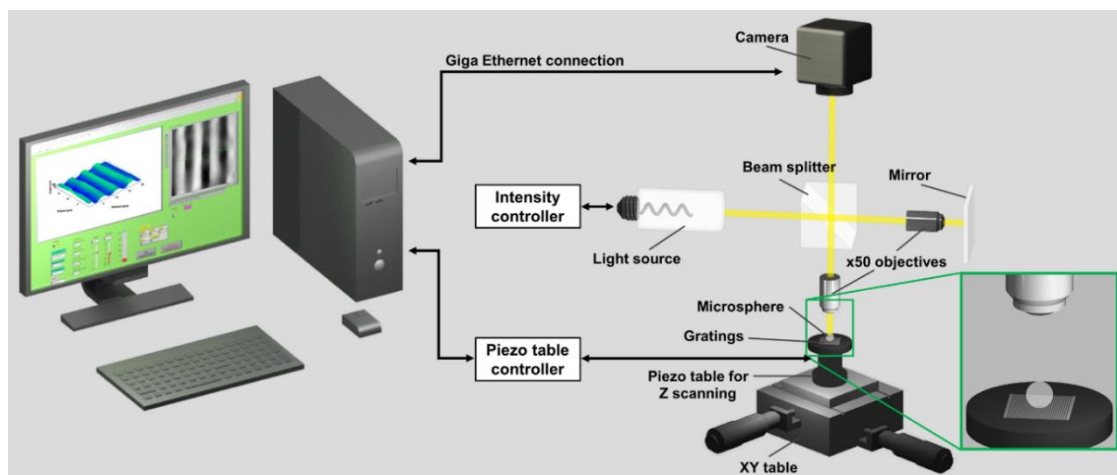


Figure 4-12. Schéma du microscope interférométrique nano-3D.

Les microsphères sont placées sur l'échantillon, comme illustré dans la [figure 4-13](#). L'interféromètre de type Linnik est réglé dans un premier temps pour produire des franges à contraste élevé directement sur la surface de l'échantillon. Ensuite, le miroir du bras de référence est déplacé, modifiant ainsi la différence de marche entre les deux bras pour faire correspondre les plans de cohérence et de focalisation, afin de pouvoir produire les franges d'interférence à travers la microsphère sur la surface de l'image virtuelle.

L'algorithme utilisé est celui de la PSM à cinq sauts de  $\pi/2$  combiné à un moyennage de 20 images (cf. [chapitre 1, section 1.6.1](#) et [chapitre 3, section 3.3.2](#)) et un algorithme de déroulement de la phase que j'ai modifié afin de corriger certaines aberrations dues à la courbure de la bille. Puis, un filtrage médian puis passe-bas d'une fenêtre de 3x3 pixels ont été appliqués pour réduire le bruit des images dû à la caméra.



Figure 4-13. Placement grossier des microsphères sous l'objectif du microscope optique classique Zeiss.

## 4.4 Premiers résultats nano-3D

### 4.4.1 L'échantillon utilisé : un prototype d'étalon de résolution

Les premiers résultats du système nano-3D ont été obtenus le 14 janvier 2016. Le choix de l'échantillon pour illustrer la super-résolution en 3D n'est pas simple. Les difficultés sont généralement liées à l'absence d'informations précises sur la hauteur, la largeur et l'aspect vertical 3D (bords droits) ainsi qu'à la position spécifique des mesures. Pour ces raisons et afin de pallier ces difficultés, nous avons décidé d'utiliser un standard de résolution de type RS-N (de SiMETRICS GmbH), qui a été spécialement conçu en tant qu'étalon de résolution pour la détermination de la longueur d'onde de coupure des microscopes interférométriques et confocales. Cet étalon est composé d'une série de 9 réseaux de périodes différentes allant de  $0,3 \mu\text{m}$  à  $6 \mu\text{m}$  (cf. [figure 4-14](#)) et avec des valeurs de hauteurs nominales différentes (cf. [annexe 4](#)) allant de  $140 \text{ nm}$  à  $192 \text{ nm}$ . Ceux-ci ont été gravées dans une plaque de silicium de taille  $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ . Le procédé utilisé est cité comme produisant des parois latérales presque verticales. Dans un premier temps, nous avons reçu un prototype de cet étalon, qui n'a donc pas été calibré, avant de recevoir l'étalon de résolution calibré (cf. [section 4.7](#) de ce chapitre).

La forme de la surface a également été mesurée en utilisant un microscope AFM Park XE70 travaillant en mode sans contact et placé dans une enceinte isolant des vibrations extérieures. La pointe utilisée est de type PPP-NCHR-10M avec un rayon de  $2 \text{ nm}$  et une largeur de  $10 \text{ nm}$  à une distance de  $100 \text{ nm}$  de la pointe. La taille maximale du champ de mesure est de  $50 \times 50 \mu\text{m}$  pour  $256 \times 256$  pixels avec une résolution latérale allant de  $0,012 \mu\text{m}$  à  $0,195 \mu\text{m}$  en fonction de la taille du champ. Un profilomètre optique Zygo NewView 7200 a également été utilisé avec un objectif de type Mirau de grossissement x50 ( $\text{ON} = 0,55$ ), une caméra monochrome (de résolution de  $640 \times 480$  pixels) et le logiciel d'analyse d'image conçu par Zygo. Le champ de mesure du système est de  $140 \times 110 \mu\text{m}$  et le système a une résolution axiale théorique inférieure à  $0,1 \text{ nm}$  avec une précision inférieure à  $0,75\%$  et une dynamique de balayage axiale de  $150 \mu\text{m}$ . Sa résolution latérale est de  $0,52 \mu\text{m}$ . Enfin, l'étalon de résolution a été mesuré avec le microscope Leitz-Linnik sans microsphères.

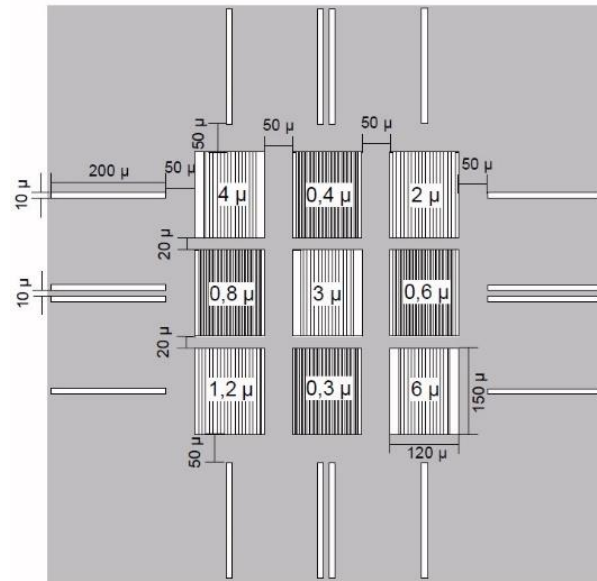


Figure 4-14. Standard de résolution de type RS-N (de SiMETRICS GmbH).

Des microsphères de  $\text{SiO}_2$  (de la société Cospheric, avec une dispersion dans le diamètre de 5%,  $n = 1,5$ ) de  $24 \mu\text{m}$  de diamètre ont été utilisées en lumière blanche (lampe incandescente, de longueur d'onde centrale  $\lambda = 1100 \text{ nm}$ , cf. annexe 3-3). Ces microsphères de  $24 \mu\text{m}$  de diamètre placées sur les réseaux de périodes  $0,4 \mu\text{m}$ ,  $0,6 \mu\text{m}$ ,  $0,3 \mu\text{m}$  et  $1,2 \mu\text{m}$  peuvent être observés avec un microscope optique classique en utilisant un objectif  $\times 10$  ( $\text{ON} = 0,2$ ), comme illustré dans la figure 4-15(a) où la focalisation a été faite sur l'échantillon. La figure 4-15(b) a été obtenue en rapprochant l'échantillon de l'objectif. On peut ainsi observer l'image virtuelle des réseaux à travers les microsphères.

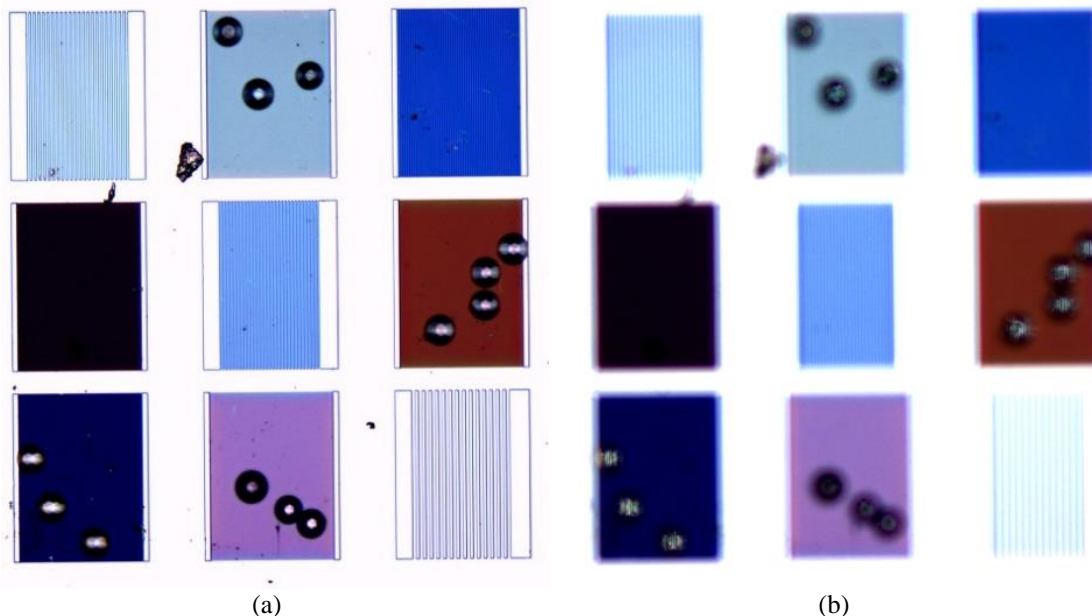


Figure 4-15. Disposition des microsphères de  $24 \mu\text{m}$  de diamètre sur les différents réseaux vue sous le microscope optique Zeiss avec un objectif  $\times 10$  ( $\text{ON} = 0,2$ ), (a) focalisé sur l'objet et (b) focalisé sur le plan image.

La figure 4-16 montre les microsphères de  $24 \mu\text{m}$  de diamètre sur les réseaux de  $1,2 \mu\text{m}$ ,  $0,6 \mu\text{m}$ ,  $0,4 \mu\text{m}$  et  $0,3 \mu\text{m}$  dans l'air en lumière blanche avec la même microscope optique classique Zeiss avec un objectif  $\times 50$  ( $\text{ON} = 0,55$ ). La colonne (i) montre les images lorsque l'on est focalisé sur

le réseau. Puis de (ii) à (iii) les images ont été acquises lorsque l'on rapproche de plus en plus l'objectif de l'échantillon. Enfin la colonne (iv) montre les grossissements des zones d'intérêt montrées dans (iii).

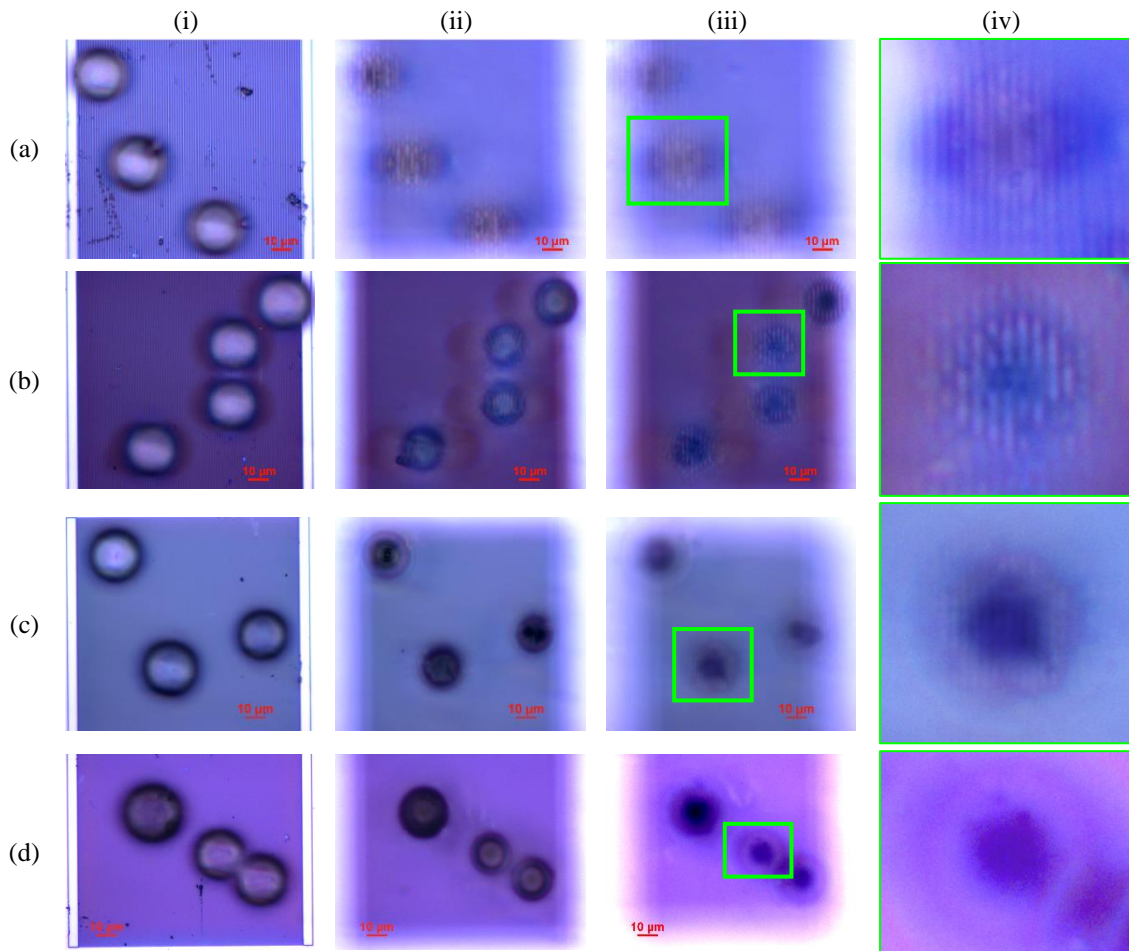


Figure 4-16. Réseaux observés avec le microscope optique classique Zeiss avec un objectif x50 (ON = 0,55) sans et avec des microsphères de 24 µm de diamètre, en changeant la focalisation de (i) à (iii) avec un grossissement en (iv) de la zone d'intérêt de (iii): (a) période de 1,2 µm, (b) période de 0,6 µm, (c) période de 0,4 µm et (d) période de 0,3 µm.

#### 4.4.2 Résultats en lumière blanche

Les résultats des figure 4-17(a)-(b) et des figure 4-17(c)-(d) montrent une sphère d'un diamètre de 24 µm, sur les réseaux de périodes de 1,2 µm et 0,6 µm, respectivement, sous un microscope interférométrique de type Linnik dans l'air en lumière blanche.

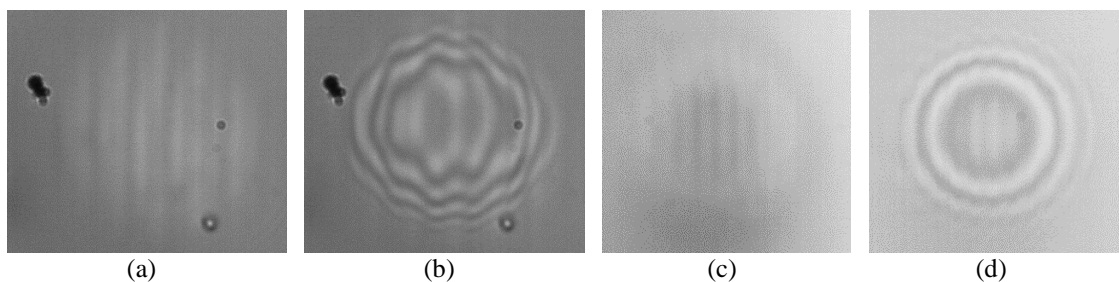


Figure 4-17. Réseaux de périodes (a-b) 1,2 µm et (c-d) 0,6 µm observés à travers une microsphère de 24 µm de diamètre dans l'air en lumière blanche avec le Leitz-Linnik (objectifs x50, ON = 0,85) : (a-c) sans franges d'interférence, montrant ainsi une image super-résolue et (b-d) avec les franges d'interférence superposées à l'image à travers la microsphère.

Une image super-résolue des réseaux peut être observée à travers la sphère dans la [figure 4-17\(a\)](#) et la [figure 4-17\(c\)](#) et les images des franges superposées sur le réseau sur la [figure 4-17\(b\)](#) et la [figure 4-17\(d\)](#). Ces dernières images montrent des déformations des franges dues à la forme 3D des réseaux, ce qui montre que la phase de la lumière est influencée par la surface des réseaux à travers la microsphère.

Les résultats suivants montrent les mesures effectuées sur différents réseaux avec le microscope Leitz-Linnik avec et sans les microsphères. Quelques résultats des mesures effectuées directement en utilisant le profilomètre optique Zygo et l'AFM sont donnés à titre de comparaison. Étant donné que les périodes des réseaux sont connues, le grossissement obtenu à travers les microsphères est déterminé en calculant le rapport entre la période mesurée sur la reconstruction 3D à travers les microsphères et la valeur théorique de la période.

#### 4.4.2.1 Réseau de période 1,2 $\mu\text{m}$

Les mesures effectuées sur le réseau de période 1,2  $\mu\text{m}$  avec le microscope Leitz-Linnik sont possibles directement, c'est-à-dire sans microsphère, en lumière blanche ( $\lambda_{\text{eff}} = 760 \text{ nm}$ ) comme le montre la [figure 4-18\(a\)](#), mais donne seulement une profondeur de 30 nm, au lieu de la profondeur nominale de 192 nm. À travers la microsphère de 24  $\mu\text{m}$  de diamètre en lumière blanche, le réseau de diffraction, grossi d'un facteur 4,5, a une forme beaucoup plus carrée et présente une profondeur de 150 nm (cf. [figure 4-18 \(b\)](#)). Ces derniers résultats sont en accords avec les mesures observées avec l'AFM (cf. [figure 4-18\(c\)](#)), où l'on trouve une période de 1,21  $\mu\text{m}$  et une hauteur de 153 nm. La taille de l'image 3D prise à l'AFM (cf. [figure 4-18\(c,i\)](#)) est de 10  $\mu\text{m}$  x 1,5  $\mu\text{m}$ . L'observation de ce réseau de période 1,2  $\mu\text{m}$  avec le profilomètre optique Zygo est également possible directement, mais les mesures de profondeur contiennent des erreurs. En effet, on peut voir des « *batwings effects* » ([Harasaki et al., 2000](#)) en haut des bords du réseau, dus au mélange des signaux provenant de la partie supérieure et inférieure du bord en raison de l'éclairage Köhler.

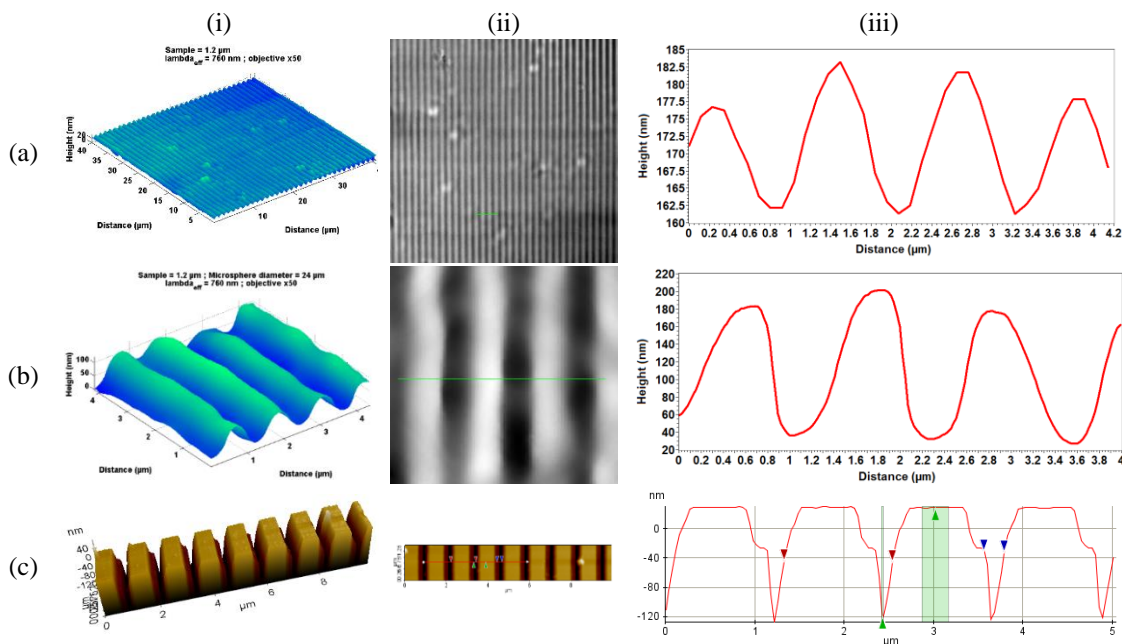


Figure 4-18. Réseau de période 1,2  $\mu\text{m}$  mesuré avec le microscope Leitz-Linnik en lumière blanche avec un objectif x50 (ON = 0,85) (a) sans et (b) avec une microsphère de 24  $\mu\text{m}$  de diamètre, et (c) avec un AFM : (i) images en 3D, (ii) images 2D montrant la position du profil de hauteur étudié en (iii).

4.4.2.2 Réseau de période 0,6  $\mu\text{m}$ 

Les mesures effectuées sur le réseau de période 0,6  $\mu\text{m}$  avec le microscope Leitz-Linnik ne sont pas possibles directement en lumière blanche ( $\lambda_{\text{eff}} = 760 \text{ nm}$ ), étant en-dessous de la résolution du système. A travers une microsphère de 24  $\mu\text{m}$  de diamètre, le réseau, grossi d'un facteur 3,65, devient visible et mesurable, avec une profondeur de 46 nm (figure 4-19(a)), au lieu de la profondeur nominale de 160 nm. Les mesures effectuées sur le réseau de période 0,6  $\mu\text{m}$  avec le profilomètre optique Zygo sont possibles directement (cf. figure 4-19(b)) mais donne une profondeur de 19 nm. La taille de l'image 3D au Zygo (cf. figure 4-19(b,i)) est de 110  $\mu\text{m}$  x 140  $\mu\text{m}$ . Les résultats des mesures avec l'AFM sont présentés dans la figure 4-19(c), révélant un période de 0,633  $\mu\text{m}$  et une profondeur totale d'environ 58 nm. La taille de l'image 3D prise à l'AFM (cf. figure 4-19(c,i)) est de 2,3  $\mu\text{m}$  x 0,34  $\mu\text{m}$ .

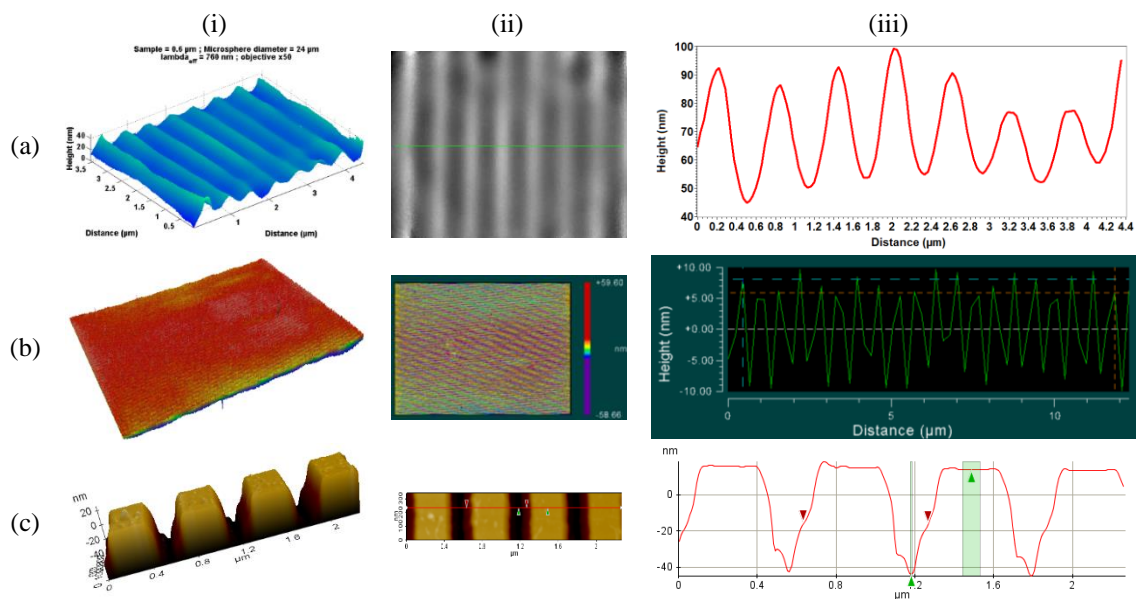


Figure 4-19. Réseau de période 0,6  $\mu\text{m}$  mesuré avec différentes techniques : (a) le microscope Leitz-Linnik en lumière blanche avec un objectif x50 (ON = 0,85) et à travers une microsphère de 24  $\mu\text{m}$  de diamètre, (b) le profilomètre Zygo avec un objectif x50 (ON = 0,55) et (c) un AFM : (i) images en 3D, (ii) images 2D montrant la position du profil de hauteur étudié en (iii).

## 4.4.2.3 Résumés des résultats obtenus sur les réseaux

Tous les résultats de mesures à l'AFM, au Zygo et au Leitz-Linnik sans et avec des microsphères de 24  $\mu\text{m}$  en lumière blanche sont résumés dans le tableau 4-1 et comparés aux valeurs données dans la fiche technique de l'étalon.

Tableau 4-1. Hauteurs nominales et mesurées par l'AFM, le Zygo et le Leitz-Linnik en lumière blanche.

Période ( $\mu\text{m}$ )	Hauteur nominale de la fiche technique (nm)	Hauteur à l'AFM (nm)	Hauteur au Zygo (nm)	Hauteur au Leitz-Linnik, en lumière blanche $\lambda_{\text{eff}} = 800 \text{ nm}$ (nm)
6	192	210	195,8	187,8
4	192	199	193,1	179,45
3		/	190,9	177,67
2	192	/	188,24	56,67
1,2	192	147,76	/	30,34
0,8		80	/	17,92
0,6	160	58,5	18,92	xx
0,4		45,66	xx	xx
0,3	140	35	xx	xx

/ : non mesuré ; xx : non mesurable

## 4.4.2.4 Simulations

Pour mieux comprendre les phénomènes en jeu, des simulations 2D FEM sur Comsol ont été effectuées dans l'air avec une microsphère de verre (silice,  $n = 1,5$ ) éclairée avec un front d'onde plan ayant une longueur d'onde de 500 nm arrivant sur le haut de la microsphère, comme présenté sur la figure 4-20. Pour les conditions aux bords à droite, à gauche et en bas de la figure, nous avons considéré que les couches sont parfaitement absorbantes (Lecler et al., 2005). La formation d'un nano-jet photonique à  $3,5 \mu\text{m}$  en-dessous de la microsphère peut être clairement observée sur la figure 4-20(a). Au point où l'intensité est maximale, la largeur à mi-hauteur, suivant l'axe  $x$ , est d'environ une longueur d'onde. Par analogie avec un objectif classique cela pourrait être considéré comme étant le point focal image.

Dans le cas où la microsphère est placée au-dessus d'un réseau en silicium de période  $1,2 \mu\text{m}$ , comme représenté dans la figure 4-20(b) (avec un grandissement de la zone d'intérêt dans la figure 4-20(c)), puisque l'objet se trouve entre la lentille et le foyer image, la sphère peut donc créer une image virtuelle avec un grossissement supérieur à 1. Les paramètres utilisés pour Si étaient  $n = 3,42$  et  $\sigma = 10^{-12} \text{ Sm}^{-1}$ , avec un rapport réfléchi (puissance air / silicium) de 30%.

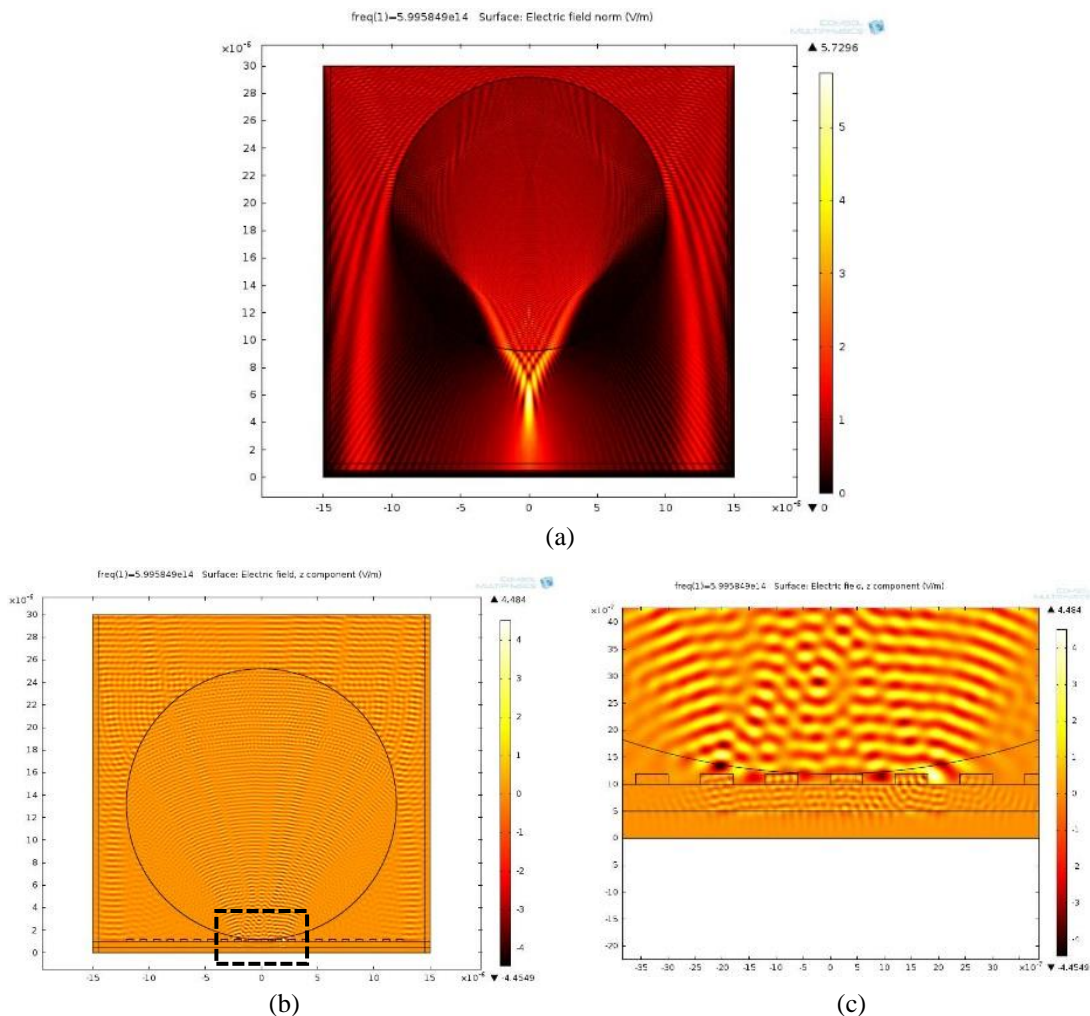


Figure 4-20. Détermination des propriétés de l'image à travers une microsphère de  $24 \mu\text{m}$  de diamètre éclairée par une onde plane à  $\lambda = 500 \text{ nm}$  (du haut vers le bas de la figure) en utilisant une simulation 2D FEM : (a) formation d'un nano-jet photonique en-dessous de la microsphère, (b) intensité du front d'onde émergent de la microsphère après l'interaction avec un réseau en Si de  $1,2 \mu\text{m}$  de période (champ électrique absolu  $|E_0|$ ), (c) grandissement de la région d'intérêt en pointillée dans (b).



Les simulations réalisées sont en accord avec les observations expérimentales, mais avec une position d'image et un grossissement différent de ceux prévus par l'optique classique et peut être facilement compris en raison de l'échelle de l'objet par rapport à la longueur d'onde. Les résultats de ces simulations montrent l'interaction du nano-jet photonique avec le réseau de silicium au-dessous de la microsphère (figure 4-20(b)-(c)). Quatre à cinq périodes du réseau de 1,2  $\mu\text{m}$  sont éclairées, ce qui est en accord avec le nombre de périodes observées expérimentalement. De plus, les simulations de la figure 4-20(b) et la figure 4-20(c) montrent que l'ouverture numérique de la lumière collectée semble être proche de 1, puisque la microsphère et l'objet sont en contact.

## 4.5 Mesures sur un réseau de HfO<sub>2</sub> de 580 nm

### 4.5.1 L'échantillon utilisé : réseau métal-diélectrique

Le réseau métal-diélectrique utilisé est composé d'une couche d'oxyde d'hafnium (HfO<sub>2</sub>) structurée avec un réseau de 580 nm de période, déposée sur de l'Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et un miroir d'argent, comme illustré par le schéma de la figure 4-21. Toutefois, les couches d'Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sont très poreuses avec beaucoup de craquelures visibles sous un microscope optique. L'épaisseur de l'Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> est d'environ 30 nm. L'argent est déposé sur un substrat en silice : le matériau est d'épaisseur suffisante pour réaliser un miroir. Le réseau de HfO<sub>2</sub> a été mesuré par un AFM et a une profondeur d'environ 150 nm.



Figure 4-21. Schéma en vue de face du réseau multi-couches.

### 4.5.2 Mesures directes (sans microsphères) par microscopies interférométriques

Les mesures effectuées sur le réseau de période 580 nm avec le microscope Leitz-Linnik sont possibles directement avec une LED bleue ( $\lambda_{\text{eff}} = 460 \text{ nm}$ ), comme présenté sur la figure 4-22(a). La profondeur obtenue avec le microscope Leitz-Linnik sans microsphère est de 33 nm, comparée à la valeur mesurée par AFM qui est de 150 nm. Les mesures obtenues avec le profilomètre optique Zygo sont possibles également directement (cf. figure 4-22(b)) mais donne une profondeur d'environ 8 nm.

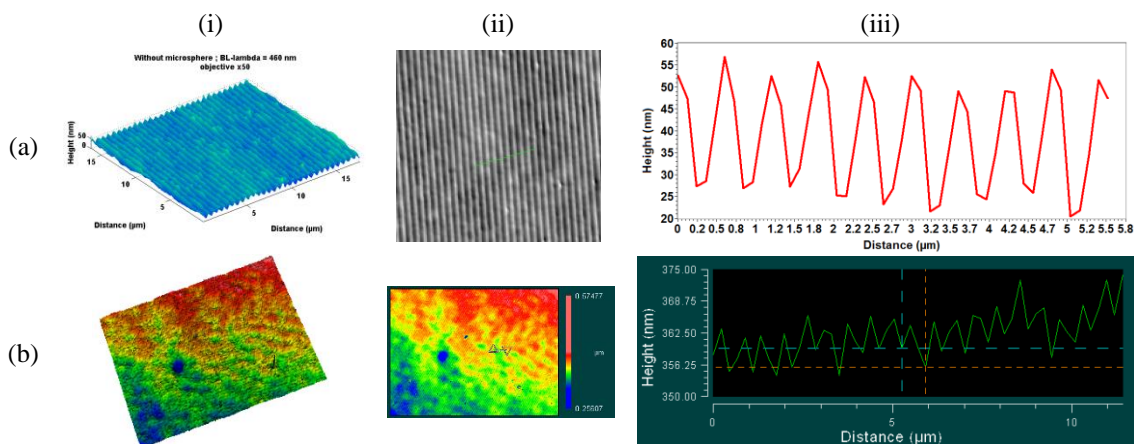
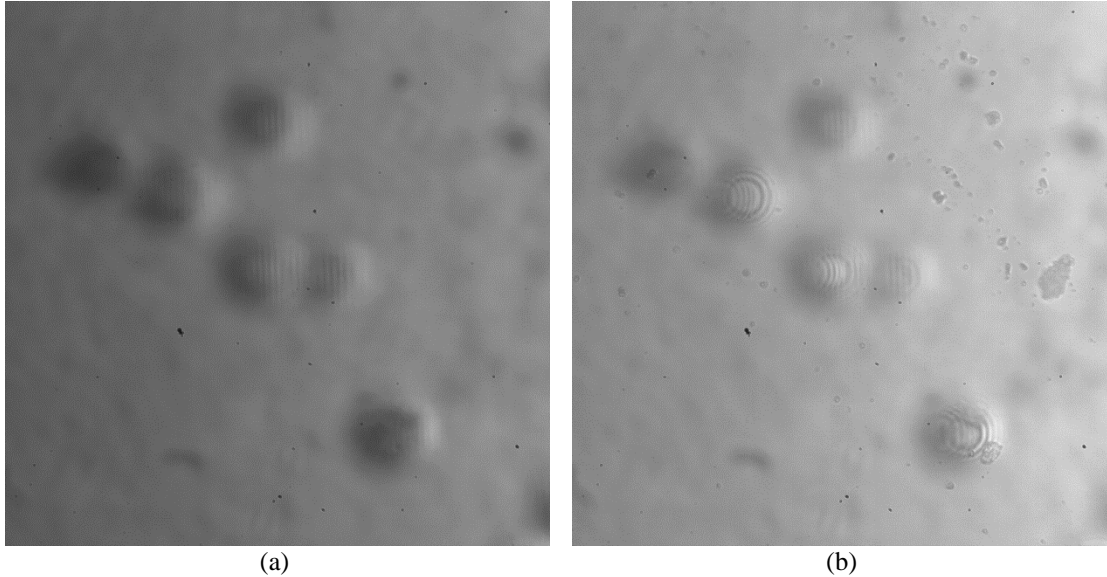


Figure 4-22. Réseau métal-diélectrique de période 580 nm mesuré avec (a) le microscope Leitz-Linnik en LED bleue avec un objectif x50 (ON = 0,85) et avec (b) le profilomètre Zygo avec un objectif x50 (ON = 0,55) : (i) images en 3D, (ii) images 2D montrant la position du profil de hauteur étudié en (iii).

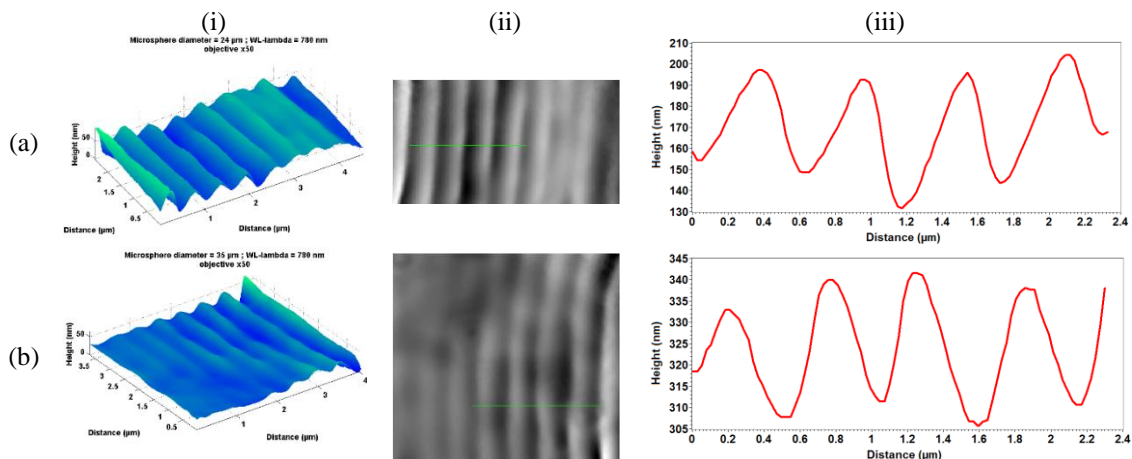
### 4.5.3 Mesure par interférométrie nano-3D

Les résultats de la [figure 4-23](#) montrent des microsphères de  $24\ \mu\text{m}$  de diamètre, sur le réseau métal-diélectrique de  $580\ \text{nm}$  de période, sous un microscope interférométrique de type Linnik dans l'air en lumière blanche. Une image super-résolue des réseaux peut être observée à travers les microsphères dans la [figure 4-23\(a\)](#) et les images des franges superposées sur le réseau sur la [figure 4-23\(b\)](#).



**Figure 4-23.** Réseau métal-diélectrique de  $580\ \text{nm}$  de période observé à travers une microsphère de  $24\ \mu\text{m}$  de diamètre dans l'air en lumière blanche avec le Leitz-Linnik (objectif  $\times 50$ ,  $\text{ON} = 0,85$ ) (a) sans franges d'interférence, montrant ainsi une image super-résolue et (b) avec les franges d'interférence superposées à l'image à travers la microsphère.

Les mesures effectuées sur ce réseau avec le microscope Leitz-Linnik ne sont pas possibles directement, c'est-à-dire sans microsphère, en lumière blanche ( $\lambda_{\text{eff}} = 760\ \text{nm}$ ). Le grossissement obtenu à travers une microsphère de  $24\ \mu\text{m}$  de diamètre et de  $4,4$  et la profondeur du réseau est de  $56\ \text{nm}$  (cf. [figure 4-24\(a\)](#)). Cependant, avec une microsphère de  $35\ \mu\text{m}$  de diamètre, le grossissement est de  $4,4$  et la profondeur mesurée est de  $30\ \text{nm}$  (cf. [figure 4-24\(b\)](#)).



**Figure 4-24.** Réseau métal-diélectrique de  $580\ \text{nm}$  de période mesuré avec le microscope Leitz-Linnik en lumière blanche avec un objectif  $\times 50$  ( $\text{ON} = 0,85$ ) avec une microsphère de (a)  $24\ \mu\text{m}$  et (b)  $35\ \mu\text{m}$  de diamètre : (i) images en 3D, (ii) images 2D montrant la position du profil de hauteur étudié en (iii).

## 4.6 Mesures sur l'étalon calibré

### 4.6.1 Etalon calibré par le PTB

L'étalon de résolution calibré par le « Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB) Braunschweig und Berlin Nationales Metrologieinstitut » suivant les paramètres donnés dans la [figure 4-25](#) ont les caractéristiques (périodes et hauteurs) données par le [tableau 4-2](#). Les champs calibrés de taille  $130\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$  sont ceux de 600 nm, 400 nm et 300 nm de périodes nominales. Leurs positions sont montrées dans la [figure 4-25\(a\)](#). La [figure 4-25\(b\)](#) montre un exemple de trois positions à prendre en compte afin de déterminer la hauteur d'un réseau.

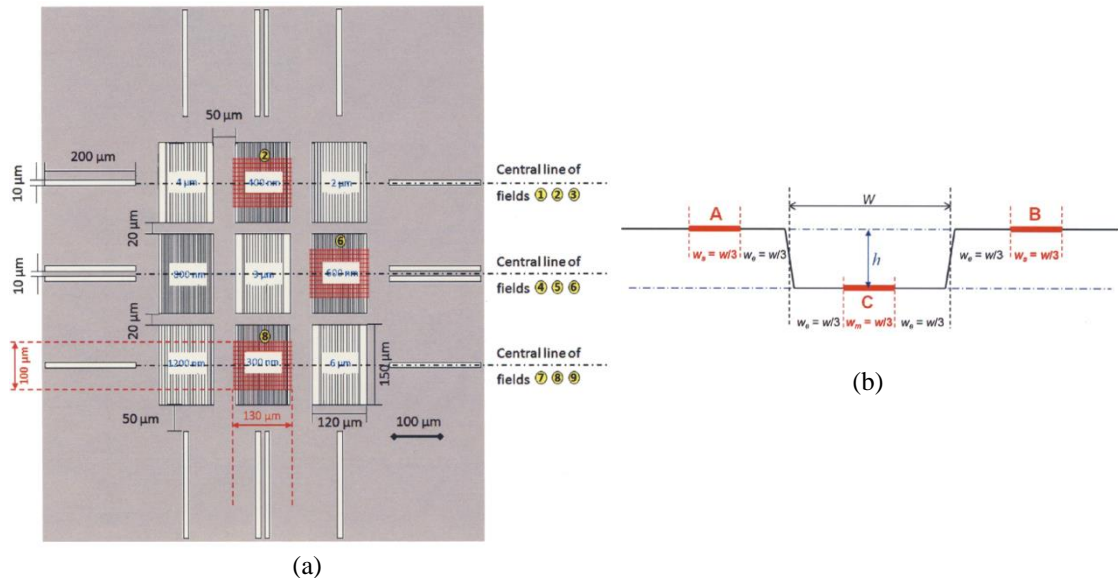


Figure 4-25. Schéma de l'étalon calibré. (a) Positions des trois champs calibrés, de haut en bas dans le sens horaire : 400 nm, 600 nm, 300 nm. (b) Exemple de trois positions A, B et C pris en compte pour la détermination de la hauteur d'une rainure.

Tableau 4-2. Caractéristiques des champs de l'étalon de résolution calibré par le PTB.

Nom du réseau	600 nm	400 nm	300 nm
$w_m$ (en % par rapport à $w$ )	20..25	25	25
$w_s$ (en % par rapport à $w$ )	35..40	40	35
$w_e$ (en % par rapport à $w$ )	45..55	55	55
Période mesurée (nm)	$599,99 \pm 0,08$	$399,98 \pm 0,05$	$299,99 \pm 0,04$
Hauteur mesurée (nm)	$159,8 \pm 1,2$	$148,0 \pm 1,3$	$139,0 \pm 1,7$

### 4.6.2 Mesures directes par microscopies interférométriques et par AFM

La [figure 4-26](#) présente les mesures obtenues directement (sans microsphère) avec l'AFM sur les champs de 600 nm, 400 nm et 300 nm de périodes nominales. Les [figure 4-26\(ii\)](#) montrent les profils obtenus. Les flèches en rouge permettent la mesure de la période du réseau (624 nm, 406 nm et 309 nm respectivement). Les flèches vertes donnent une moyenne de la hauteur (170,55 nm, 94,98 nm et 59,04 nm respectivement) et les flèches bleues permettent d'obtenir la taille d'une rainure (492 nm, 344 nm et 248 nm respectivement).

Les mesures obtenues avec le profilomètre optique Zygo et le Leitz-Linnik sont possibles également directement sur le réseau de 600 nm de période (cf. [figure 4-27\(a\)](#) et [figure 4-27\(b\)](#)).

respectivement) mais donnent une profondeur d'environ 10 nm et 3 nm respectivement, par rapport à la hauteur du PTB de 159,8 nm ( $\pm 1,2$  nm). Les mesures des champs de 400 nm et 300 nm de périodes ne sont pas possible ni avec le Zygo, ni avec le Leitz-Linnik.

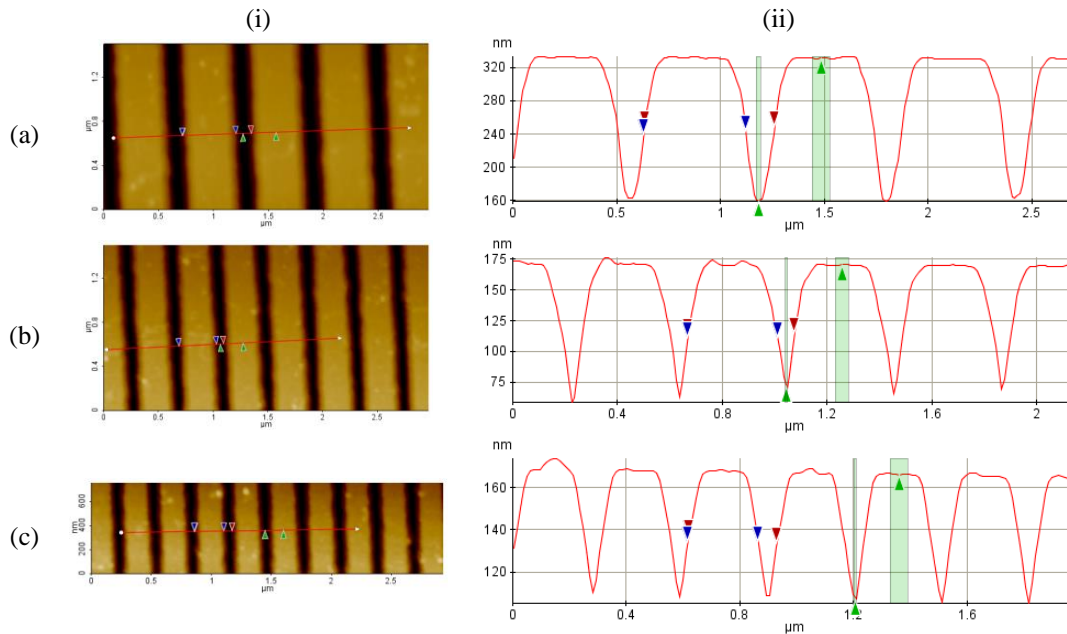


Figure 4-26. Etalon de résolution calibré par le PTB mesuré avec un AFM : champs de (a) 600 nm, (b) 400 nm et (c) 300 nm de périodes nominales. (i) Images 2D montrant la position du profil de hauteur étudié en (ii).

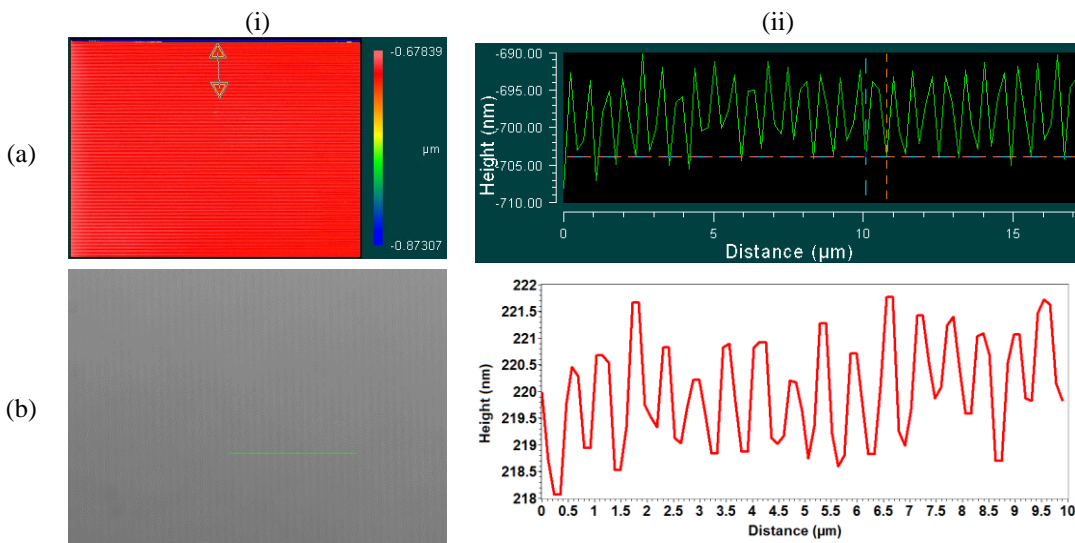


Figure 4-27. Champ de 600 nm de période nominale de l'étalon de résolution calibré par le PTB mesuré avec (a) le profilomètre Zygo avec un objectif x50 ( $ON = 0,55$ ) et (b) le Leitz-Linnik d'objectif x50 ( $ON = 0,85$ ) : (i) Images 2D montrant la position du profil de hauteur étudié en (ii).

#### 4.6.3 Mesure par interférométrie nano-3D

Les résultats de la figure 4-28 montrent des microsphères d'un diamètre de 24 µm, sur le réseau de période de 3 µm, sous le microscope Leitz-Linnik dans l'air en lumière blanche. Une image super-résolue des réseaux peut être observée à travers la microsphère dans la figure 4-28(a) et la et l'image des franges superposées sur le réseau sur la figure 4-28(b), où l'on peut observer les déformations des franges dues à la forme 3D du réseau.

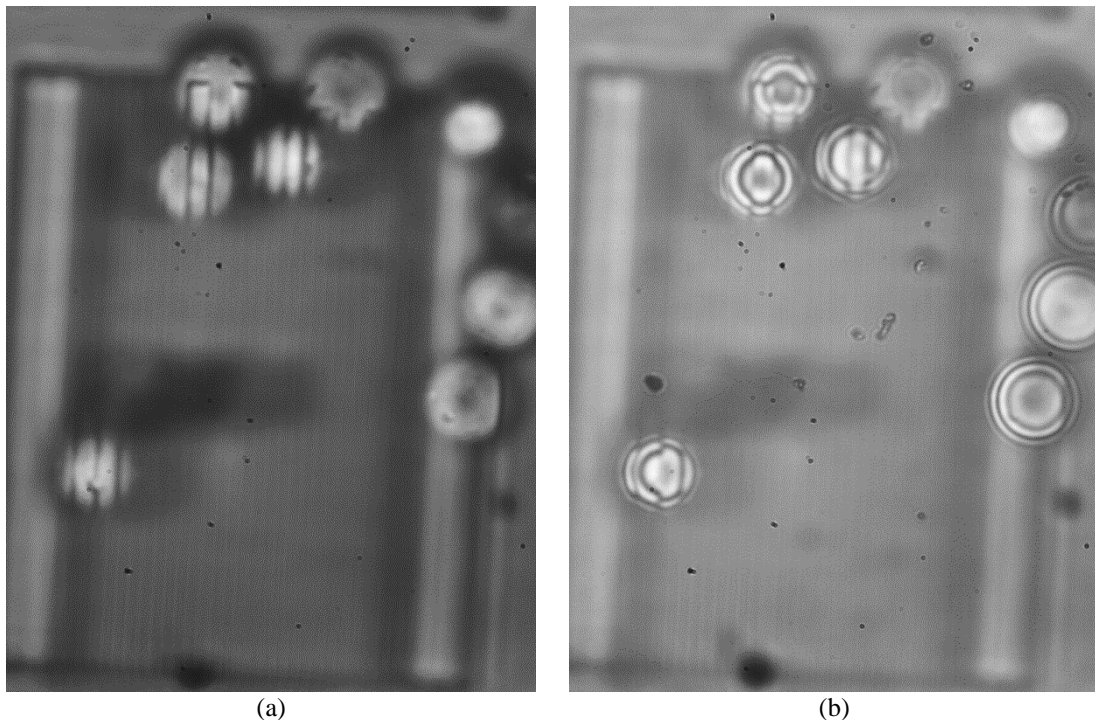


Figure 4-28. Réseau de périodes 3  $\mu\text{m}$  observé à travers une microsphère de 24  $\mu\text{m}$  de diamètre dans l'air en lumière blanche avec le Leitz-Linnik (objectifs x50, ON = 0,85) : (a) sans franges d'interférence, montrant ainsi une image super-résolue et (b) avec les franges d'interférence superposées à l'image à travers la microsphère.

Les mesures effectuées sur le réseau de période 0,8  $\mu\text{m}$  avec le microscope Leitz-Linnik sont possibles directement, c'est-à-dire sans microsphère, en lumière blanche ( $\lambda_{\text{eff}} = 800 \text{ nm}$ ) comme le montre la figure 4-29(a), mais donne seulement une profondeur de 20 nm. À travers une microsphère de 35  $\mu\text{m}$  de diamètre, le réseau de diffraction a subi un grossissement de 4 et présente une profondeur de 78 nm (cf. figure 4-29(b)).

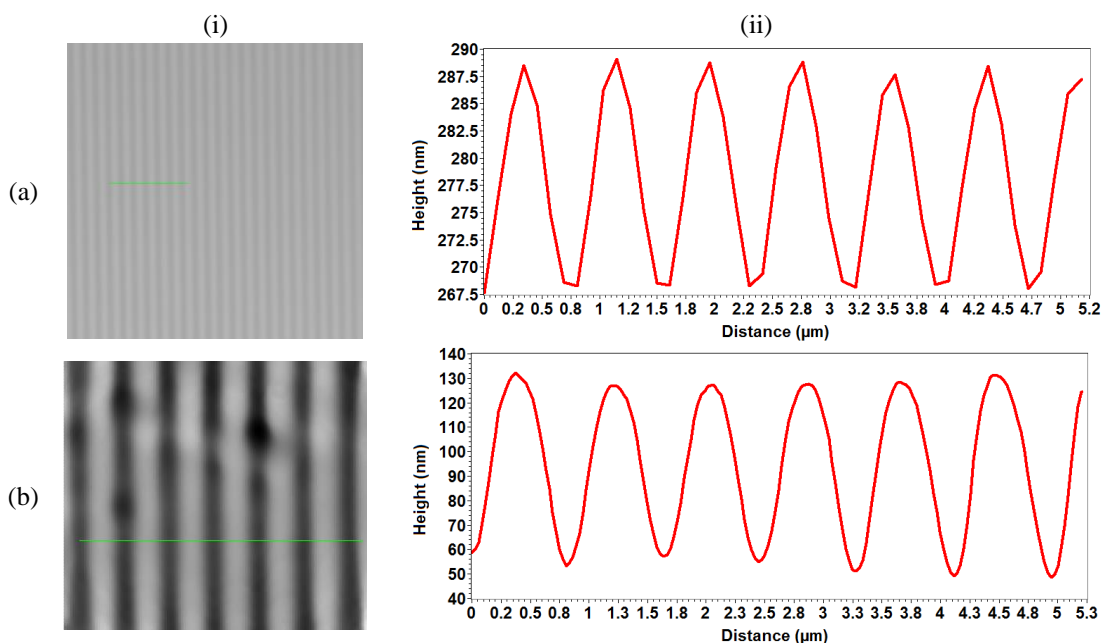


Figure 4-29. Réseau de période 0,8  $\mu\text{m}$  mesuré avec le Leitz-Linnik en lumière blanche avec des objectifs x50 (ON = 0,85) : (a) directement sans microsphère et (b) avec une microsphère de 35  $\mu\text{m}$ . (i) Images 2D montrant la position du profil de hauteur étudié en (ii).

Les mesures effectuées sur le réseau de période  $0,6 \mu\text{m}$  avec le microscope Leitz-Linnik sont également possibles directement en lumière blanche ( $\lambda_{\text{eff}} = 800 \text{ nm}$ ), mais donne seulement une profondeur de  $3 \text{ nm}$  (cf. [figure 4-27\(b\)](#)). A travers une microsphère de  $23 \mu\text{m}$  de diamètre, le réseau, grossi d'un facteur  $4,5$ , présente une profondeur de  $30 \text{ nm}$ , comme illustré dans la [figure 4-30](#).

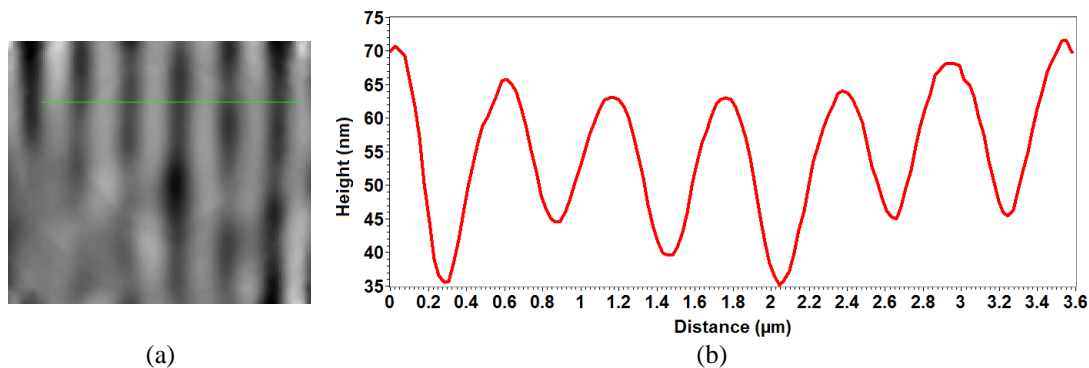


Figure 4-30. Réseau de période  $0,6 \mu\text{m}$  mesuré avec le Leitz-Linnik en lumière blanche avec des objectifs  $\times 50$  ( $\text{ON} = 0,85$ ) avec une microsphère de  $23 \mu\text{m}$ . (a) Images 2D montrant la position du profil de hauteur étudié en (b).

#### 4.7 Conclusion du chapitre et perspectives

Le but de ce chapitre et de ces premières séries de mesures était de faire une première investigation des propriétés 3D de la technique de super-résolution avec des microsphères de verre placées entre l'objectif et l'échantillon d'un microscope interférométrique de type Linnik. Les premiers résultats en lumière blanche obtenus avec des microsphères de verre de diamètre  $24 \mu\text{m}$  placés sur des réseaux en Si de différentes périodes et de hauteur carrée montrent que la super-résolution latérale peut être atteinte tout en gardant une résolution axiale nanométrique à l'aide de la technique de décalage de phase (PSM) pour mesurer la forme 3D des surfaces.

On peut cependant remarquer certains artefacts sur les images 3D super-résolues à travers les microsphères. En effet, il y a notamment des zones floues, qui peuvent être dues à des conditions non optimisées de l'éclairage ou à cause de la non-uniformité de la microsphère. Avec le profilomètre optique Zygo, des effets partiels de *batwings effects* peuvent être visibles sur les bords des marches en raison de la forme conique de l'illumination de Köhler. Avec l'AFM, il y a de possibles artefacts sur les mesures des rainures en raison de l'interaction entre la forme de la pointe et les bords du réseau. Les résultats confirment néanmoins que l'imagerie super-résolue nano-3D est possible dans un système d'imagerie optique en champ lointain en utilisant des microsphères placées entre l'objectif et l'échantillon.

Des études de simulations sur Comsol et Code V sont actuellement en cours pour déterminer les influences entre le diamètre des microsphères et la longueur d'onde de la source sur la position du plan virtuel image, le grossissement et la résolution latérale. Les résultats de simulations obtenus pour le moment sur le grossissement à travers une microsphère de  $24 \mu\text{m}$  de diamètre en lumière blanche sont en accord avec les résultats expérimentaux et donnent un grossissement d'environ  $4,5$ .

Cette nouvelle technique ouvre de nouvelles possibilités pour la caractérisation en haute-résolution des nanomatériaux et dans les sciences biologiques, et peut s'adapter à l'holographie, aux mesures en immersion etc.

**REMERCIEMENTS ET CONTRIBUTIONS**

Ce très excitant projet a pu voir le jour grâce à la collaboration entre Paul Montgomery, Sylvain Lecler, spécialiste en jets photoniques et en leurs simulations, et moi-même. En effet, cette idée est le fruit du savoir-faire de l'équipe IPP sur la microscopie interférométrique et les jets photoniques.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Julien Zelgowski pour sa patience et son aide précieuse pour le positionnement des microsphères sur les étalons ([section 4.4](#) et [section 4.5](#)).

Je souhaiterais évidemment remercier M. Pierre Pfeiffer pour le temps qu'il a pris pour les mesures au profilomètre Zygo et à l'AFM ([section 4.5.2](#) et [section 4.7.2](#)) ainsi que Stéphane Perrin pour son travail de simulations sur Comsol et les manipulations réalisées ensemble ([section 4.7](#)).

Je remercie également M. Manuel Flury pour son réseau de  $\text{HfO}_2$ , utilisé dans la [section 4.6](#), ainsi que pour ses idées et ses conseils pour déterminer la période des réseaux mesurés.





---

# Conclusion générale et perspectives

---

*It is by the sun that there is light and sight, and it is by the Good  
that there is science and truth.  
- Plato, Metaphor of the Sun.*

Durant ces trois années de thèse, j'ai étudié différentes techniques de super-résolution en microscopie pour améliorer la résolution latérale de ces systèmes optiques limités par la diffraction de la lumière. Parmi toutes les techniques de microscopies super-résolues, les microscopies STED et PALM ont remporté le Prix Nobel de Chimie de 2014 et ont donné une nouvelle dimension à ce domaine. Nous nous sommes donc intéressés à une classification des techniques de nanoscopies optiques en champ lointain. On peut distinguer les techniques de super-résolution, qui permettent une réelle amélioration de la résolution latérale et les techniques de nano-détection, capables de faire apparaître des nanostructures pour les rendre observables voire caractérisables, sans nécessairement pouvoir résoudre tous les détails.

Parmi les techniques de super-résolution sans marquage, la microscopie TDM consiste à faire varier l'angle d'éclairage afin d'augmenter la taille de l'ouverture numérique, pouvant ainsi améliorer la résolution d'un facteur 2. La microscopie SIM, basée sur le principe de Moiré, consiste, quant à elle, à illuminer un échantillon à l'aide d'un motif d'illumination, typiquement des franges sinusoïdales, qui va interférer avec l'échantillon. Ainsi, le système peut atteindre une résolution latérale de 100 nm. Parmi les techniques de nano-détection utilisant le contraste, la microscopie SEEC, consiste à augmenter le contraste en réduisant le signal de fond dans un système de lumière polarisée croisée, pour permettre d'observer sans marquage les traces laissées par des bactéries en mouvement. La microscopie interférométrique fait partie des techniques de nano-détection utilisant la phase pour extraire les informations nanométriques 3D de surfaces. Cette technique peut être utilisée pour l'analyse de surface ou encore en tomographie optique, pour obtenir des tranches et des volumes de couches transparentes ou semi-transparentes sans marquage. La technique SMON est une nouvelle technique qui permet d'imager à travers une microsphère immergée dans de l'eau et peut atteindre une résolution latérale de 50 nm.

Mon projet de thèse s'est ensuite déroulé en trois grandes étapes.

Tout d'abord, je me suis intéressée à la technique SIM par projection de franges pour la reconstruction en 3D d'objets en utilisant le principe de décalage de phase. Nous avons développé un prototype basé sur un projecteur miniature afin de projeter les motifs de franges. Puis, nous

nous sommes intéressés à l'amélioration du temps de mesures et nous avons ainsi mis au point un nouvel algorithme plus rapide pour reconstruire la phase absolue d'un objet. Bien que les résultats macroscopiques soient encourageants, nous avons compris que l'application de la technique SIM à la microscopie interférométrique était possible mais nécessiterait le développement de toute une instrumentation spécifique, ce qui aurait pris le temps de toute une thèse. Etant donné que ce projet de recherche consiste à explorer différentes techniques de super-résolution en microscopie afin de permettre l'implémentation de ces techniques dans un microscope interférométrique, nous avons par conséquent préféré étudier d'autres pistes.

Puis, je me suis intéressée de plus près aux techniques de traitement d'images afin d'améliorer le SNR des images. En effet, nous nous sommes rendu compte des conséquences importantes qui résultaient du bruit présent sur les images avant la reconstruction 3D. Plusieurs méthodes de traitement d'images ont été étudiées. Le moyennage d'images est un traitement de base permettant d'augmenter la stabilité des acquisitions en réduisant le bruit temporel des images. Les corrections *Dark* et *Flat* permettent de réduire le bruit spatiale des images en compensant ainsi les erreurs dues aux défauts sur les optiques tels que des particules de poussière ou une non uniformité de l'éclairage du système. Ensuite, je me suis intéressée à la technique HDR maintenant très couramment utilisée en photographie pour améliorer les photos de manière qualitative. En conséquence, une nouvelle technique hybride HDR a été développée et implémentée afin de permettre une augmentation du contraste, améliorant ainsi de manière quantitative les images de franges d'interférence et donc les reconstructions 3D et les images tomographiques. Ces techniques de traitement d'images ont été testées individuellement sur plusieurs échantillons avec un microscope interférométrique en lumière blanche.

Les bons résultats de détection des structures et des détails à l'intérieur de couches transparentes nous ont amenés à réfléchir à protocole combinant toutes ces méthodes de traitement d'images afin d'améliorer significativement le SNR et donc le pouvoir de détection ainsi que la résolution latérale du système utilisé. S'inspirant donc des protocoles de traitement d'images utilisés en astronomie, nous avons proposé et implémenté une nouvelle procédure rigoureuse « IMPROVE-Protocol », en nanoscopie optique sans marquage, afin de pouvoir observer des détails microscopiques non résolus dans des matériaux. Les résultats ont été obtenus sur des films de polymère de Mylar d'épaisseur 3  $\mu\text{m}$  et 6  $\mu\text{m}$  contenant des structures de vide de taille  $\mu\text{m}$  ou sub- $\mu\text{m}$ . Puis le protocole « IMPROVE-Protocol » a été appliqué à des films de 25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de résine photosensible SU-8 dans lequel des microsphères de silice de 4  $\mu\text{m}$  de diamètre ont été insérées. Enfin, cette même technique a été utilisée sur des échantillons d'hydroxyapatite rugueux et poreux, difficilement mesurables. Les résultats ont montré une amélioration du SNR allant de 4 à 9 dB, donc d'un facteur 2 à 3. De plus, cela a permis une réduction des artéfacts sur les images, ainsi qu'une amélioration de la résolution latérale permettant ainsi au système de se rapprocher de la limite théorique de diffraction d'un microscope optique en lumière blanche, à savoir 0,4  $\mu\text{m}$ .

Cependant, l'application de ce protocole de traitement d'images requiert l'acquisition d'un grand nombre d'images (pour le moyennage et pour la technique HDR), ce qui nécessite des temps d'acquisition et de traitement allant de quelques minutes à 2 heures selon le nombre de moyennage, le nombre de temps d'exposition, la dynamique et le pas de balayage utilisés. Par conséquent, une caméra rapide combinée à une carte FPGA ou GPU pourrait être utilisée pour diminuer les temps d'acquisition à des durées plus pratiques. De plus, des tests sur d'autres échantillons plus rugueux nous ont amenés à la conclusion que la combinaison des techniques de traitement d'images doit être ré-étudiée et optimisée en fonction de l'échantillon à observer afin d'obtenir un bon compromis entre qualité et temps de mesure.

Enfin, nous nous sommes intéressés à une nouvelle technique de super-résolution qui consiste à imager des objets en 2D à travers une microsphère dans l'air ou en immersion permettant ainsi d'atteindre une résolution latérale de 50 nm. L'idée que nous avons eu a été de combiner cette technique de super-résolution latérale 2D par nano-jet photonique avec la haute résolution axiale de la microscopie interférométrique, en utilisant une configuration de type Linnik. Cette idée est le fruit du savoir-faire de l'équipe IPP sur la microscopie interférométrique et les jets photoniques. Cette technique permet par conséquent d'atteindre une résolution latérale bien inférieure à la limite de résolution de 400 nm en lumière visible tout en gardant la résolution axiale nanométrique avec la technique PSM. Au même moment, cette idée a été développée avec une configuration de type Mirau mais également avec un Linnik en éclairage Köhler avec la technique basée sur la détection de l'enveloppe des franges. Convaincus par nos premiers résultats obtenus en Janvier 2016 nous avons décidé de rester sur cette étude et d'approfondir cette technique. Pour cela, nous avons commencé la mise en œuvre de l'optimisation du microscope Leitz-Linnik ainsi que des algorithmes de reconstruction 3D à travers les microsphères. Cette technique « nano-3D » est pressentie pour devenir un nouveau mode de mesures 3D à haute résolution et pouvant avoir des retombées importantes dans d'autres domaines.

Ainsi, du microscope par microbille de Van Leeuwenhoek en 1675 au système « nano-3D » par lentille de jet photonique avec des microsphères, la boucle est bouclée.



---

# Références bibliographiques

---

- Abbe, E. (1873). Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. Für Mikrosk. Anat.* 9, 413–418.
- Abdesselam, M., Stoquert, J.P., Djebara, M., Cerruti, C., Chami, A.C., & Montgomery, P. (2011). Stoichiometry evolution of polyethylene terephthalate under 3.7 MeV He<sup>+</sup> irradiation. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 269, 140–144.
- Aguerrebere, C., Delon, J., Gousseau, Y., & Musé, P. (2014). Best algorithms for HDR image generation. a study of performance bounds. *SIAM J. Imaging Sci.* 7, 1–34.
- Akyüz, A.O., & Reinhard, E. (2007). Noise reduction in high dynamic range imaging. *J. Vis. Commun. Image Represent.* 18, 366–376.
- Allen, K.W., Farahi, N., Li, Y., Limberopoulos, N.I., Walker, D.E., Urbas, A.M., & Astratov, V.N. (2014). Super-resolution imaging by arrays of high-index spheres embedded in transparent matrices. In *NAECON 2014-IEEE National Aerospace and Electronics Conference, (IEEE)*, pp. 50–52.
- Allen, K.W., Farahi, N., Li, Y., Limberopoulos, N.I., Walker, D.E., Urbas, A.M., Liberman, V., & Astratov, V.N. (2015). Super-resolution microscopy by movable thin-films with embedded microspheres: Resolution analysis: Super-resolution microscopy by movable thin-films. *Ann. Phys.* 527, 513–522.
- Attota, R., Bunday, B., & Vartanian, V. (2013). Critical dimension metrology by through-focus scanning optical microscopy beyond the 22 nm node. *Appl. Phys. Lett.* 102, 222107.
- Ausserré, D., & Valignat, M.-P. (2007). Surface enhanced ellipsometric contrast (SEEC) basic theory and lambda/4 multilayered solutions. *Opt. Express* 15, 8329–8339.
- Baddeley, D., Weiland, Y., Batram, C., Birk, U., & Cremer, C. (2010). Model based precision structural measurements on barely resolved objects. *J. Microsc.* 237, 70–78.
- Bankhead, A., & McDonnell, I. (2004). Interferometric surface profiling.
- Bass, M. (1994). *Handbook of optics* (McGraw-Hill).
- Benatmane, A. (2002). Développement de la microscopie interférométrique pour une meilleure analyse morphologique des couches minces et épaisses des matériaux semiconducteurs et optiques. Université Louis Pasteur-Strasbourg I.

- Benatmane, A., & Montgomery, P.C. (2004). 3D analysis of buried interfaces using interference microscopy. *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* 27, 411–414.
- Bertrand, N., Bulkin, P., Drévilion, B., Lucas, S., & Benayoun, S. (1997). In situ infrared ellipsometry study of plasma processing of metallic surfaces. *Surf. Coat. Technol.* 94, 362–367.
- Betzig, E., Lewis, A., Harootunian, A., Isaacson, M., & Kratschmer, E. (1986). Near Field Scanning Optical Microscopy (NSOM). *Biophys. J.* 49, 269–279.
- Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacino, J.S., Davidson, M.W., Lippincott-Schwartz, J., & Hess, H.F. (2006). Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science* 313, 1642–1645.
- Bewersdorf, J., Schmidt, R., & Hell, S.W. (2006). Comparison of I5M and 4Pi-microscopy. *J. Microsc.* 222, 105–117.
- Binnig, G., Quate, C.F., & Gerber, C. (1986). Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56, 930–933.
- Boedecker, S., Bauer, W., Krüger-Sehm, R., Lehmann, P.H., & Rembe, C. (2010). Comparability and uncertainty of shape measurements with white-light interferometers. p. 77180J–77180J–12.
- Borghese, N.A., Ferrigno, G., Baroni, G., Pedotti, A., Ferrari, S., & Savare, R. (1998). Autoscan: a flexible and portable 3D scanner. *IEEE Comput. Graph. Appl.* 18, 38–41.
- Born, M., & Wolf, E. (1999). *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light* (Cambridge University Press).
- Caber, P.J., Martinek, S.J., & Niemann, R.J. (1993). New interferometric profiler for smooth and rough surfaces. pp. 195–203.
- Chang, F.C., & Kino, G.S. (1998). 325-nm Interference Microscope. *Appl. Opt.* 37, 3471–3479.
- Chao, W., Harteneck, B.D., Liddle, J.A., Anderson, E.H., & Attwood, D.T. (2005). Soft X-ray microscopy at a spatial resolution better than 15 nm. *Nature* 435, 1210–1213.
- Chen, Z., Taflove, A., & Backman, V. (2004). Photonic nanojet enhancement of backscattering of light by nanoparticles: a potential novel visible-light ultramicroscopy technique. *Opt. Express* 12, 1214.
- Choi, Y., Kim, M., Yoon, C., Yang, T.D., Lee, K.J., & Choi, W. (2011). Synthetic aperture microscopy for high resolution imaging through a turbid medium. *Opt. Lett.* 36, 4263.
- Choi, Y., Yoon, C., Kim, M., Choi, W., & Choi, W. (2014). Optical Imaging With the Use of a Scattering Lens. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* 20, 61–73.
- Colonna De Lega, X., & de Groot, P. (2012). Lateral resolution and instrument transfer function as criteria for selecting surface metrology instruments. In *Optical Fabrication and Testing*, (Optical Society of America), p. OTu1D–4.
- Conroy, M. (2009). Advances in thick and thin film analysis using interferometry. *Wear* 266, 502–506.

- Cotte, Y., Toy, F., Jourdain, P., Pavillon, N., Boss, D., Magistretti, P., Marquet, P., & Depeursinge, C. (2013). Marker-free phase nanoscopy. *Nat. Photonics* 7, 113–117.
- Creath, K. (1988). Phase-measurement interferometry techniques. In *Progress in Optics*, (Amsterdam: Wolf E.), pp. 349–393.
- Cremer, C., & Masters, B.R. (2013). Resolution enhancement techniques in microscopy. *Eur. Phys. J. H* 38, 281–344.
- Darafsheh, A., Walsh, G.F., Dal Negro, L., & Astratov, V.N. (2012). Optical super-resolution by high-index liquid-immersed microspheres. *Appl. Phys. Lett.* 101, 141128.
- Darafsheh, A., Limberopoulos, N.I., Derov, J.S., Jr, D.E.W., & Astratov, V.N. (2014). Advantages of microsphere-assisted super-resolution imaging technique over solid immersion lens and confocal microscopies. *Appl. Phys. Lett.* 104, 61117.
- Davidson, M., Kaufman, K., Mazor, I., & Cohen, F. (1987). An Application Of Interference Microscopy To Integrated Circuit Inspection And Metrology. pp. 233–249.
- Debailleul, M., Georges, V., Simon, B., Morin, R., & Haeberlé, O. (2009). High-resolution three-dimensional tomographic diffractive microscopy of transparent inorganic and biological samples. *Opt. Lett.* 34, 79.
- Debevec, P.E., & Malik, J. (2008). Recovering High Dynamic Range Radiance Maps from Photographs. In *ACM SIGGRAPH 2008 Classes*, (New York, NY, USA: ACM), p. 31:1–31:10.
- Den Dekker, A.J., & Van den Bos, A. (1997). Resolution: a survey. *JOSA A* 14, 547–557.
- Du, B., Ye, Y.-H., Hou, J., Guo, M., & Wang, T. (2016). Sub-wavelength image stitching with removable microsphere-embedded thin film. *Appl. Phys. A* 122, 15.
- Dubois, A., & Boccara, A. (2006). Full-field OCT. *Med. Sci.* 22, 859–864.
- Dubois, A., Vabre, L., Boccara, A.-C., & Beaurepaire, E. (2002). High-Resolution Full-Field Optical Coherence Tomography with a Linnik Microscope. *Appl. Opt.* 41, 805–812.
- Dubois, A., Grieve, K., Moneron, G., Lecaque, R., Vabre, L., & Boccara, C. (2004). Ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography. *Appl. Opt.* 43, 2874–2883.
- Ducret, A., Valignat, M.-P., Mouhamar, F., Mignot, T., & Theodoly, O. (2012). Wet-surface-enhanced ellipsometric contrast microscopy identifies slime as a major adhesion factor during bacterial surface motility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 10036–10041.
- Dürig, U., Pohl, D.W., & Rohner, F. (1986). Near-field optical-scanning microscopy. *J. Appl. Phys.* 59, 3318–3327.
- Ehrenberg, M. (2014). *Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2014: Super-resolved fluorescence microscopy* (Stockholm, Sweden: The Royal Swedish Academy of Sciences).
- Fang, N., Lee, H., Sun, C., & Zhang, X. (2005). Sub-diffraction-limited Optical Imaging with a Silver Superlens. *Science* 308, 534–537.

- Fauver, M., Seibel, E.J., Rahn, J.R., Meyer, M.G., Patten, F.W., Neumann, T., & Nelson, A.C. (2005). Three-dimensional imaging of single isolated cell nuclei using optical projection tomography. *Opt. Express* *13*, 4210.
- Fillard, J.P. (1996). *Near field optics and nanoscopy* (Singapore: World Scientific).
- Fillard, J.P., Montgomery, P.C., Gall, P., Bonnafé, J., & Castagné, M. (1990). Submicron optical sectioning microscopy: A particular inverse problem solution adapted to epilayer defect analysis. *J. Cryst. Growth* *103*, 120–125.
- Friskén Gibson, S., & Lanni, F. (1992). Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A* *9*, 154–166.
- Galbraith, C.G., & Galbraith, J.A. (2011). Super-resolution microscopy at a glance. *J Cell Sci* *124*, 1607–1611.
- Galicher, R., Marois, C., Macintosh, B., Barman, T., & Konopacky, Q. (2011). M-band imaging of the HR 8799 planetary system using an innovative loci-based background subtraction technique. *Astrophys. J.* *739*, L41.
- Genova, J., Vitkova, V., & Bivas, I. (2013). Registration and analysis of the shape fluctuations of nearly spherical lipid vesicles. *Phys. Rev. E* *88*, 22707.
- Gianto, G., Salzenstein, F., & Montgomery, P. (2016). Comparison of envelope detection techniques in coherence scanning interferometry. *Appl. Opt.* *55*, 6763.
- Goodman, J.W. (1996). *Introduction to Fourier Optics* (McGraw-Hill).
- Granados, M., Ajdin, B., Wand, M., Theobalt, C., Seidel, H.P., & Lensch, H.P.A. (2010). Optimal HDR reconstruction with linear digital cameras. In *2010 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*, pp. 215–222.
- de Groot, P. (2015a). Principles of interference microscopy for the measurement of surface topography. *Adv. Opt. Photonics* *7*, 1.
- de Groot, P. (2015b). Interference Microscopy for Surface Structure Analysis. In *Handbook of Optical Metrology*, T. Yoshizawa, ed. (CRC Press), pp. 791–828.
- de Groot, P., & Deck, L. (1995). Surface Profiling by Analysis of White-light Interferograms in the Spatial Frequency Domain. *J. Mod. Opt.* *42*, 389–401.
- de Groot, P., & Lega, X.C. de (2006). Interpreting interferometric height measurements using the instrument transfer function. In *Fringe 2005*, P.D.W. Osten, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 30–37.
- de Groot, P., de Lega, X.C., Sykora, D., & Deck, L. (2012). The meaning and measure of lateral resolution for surface profiling interferometers. *Opt. Photonics News* *23*, 10–13.
- Guellil, M., Montgomery, P.C., Pfeiffer, P., & Serio, B. (2014). Comparison of areal measurements of the same zone of etched Si and hydroxyapatite layers on etched Si using different profiling techniques. In *Proceedings of SPIE Photonics Europe: Optical Micro- and Nanometrology*, (Brussels, Belgium: Gorecki C, Asundi AK, Osten W), pp. 913204-913204–913209.



- Guo, H., & Huang, P.S. (2009). Absolute phase technique for the Fourier transform method. *Opt. Eng.* 48, 43609-043609-7.
- Guo, M., Ye, Y.-H., Hou, J., & Du, B. (2015). Experimental far-field imaging properties of high refractive index microsphere lens. *Photonics Res.* 3, 339.
- Gustafsson, M.G. (2000). Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.* 198, 82-87.
- Gustafsson, M.G.L. (2005). Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 13081-13086.
- Gustafsson, Agard, & Sedat (1999). I5M: 3D widefield light microscopy with better than 100 nm axial resolution. *J. Microsc.* 195, 10-16.
- Gustafsson, M.G., Agard, D.A., & Sedat, J.W. (2000). Doubling the lateral resolution of wide-field fluorescence microscopy using structured illumination. In *BiOS 2000 The International Symposium on Biomedical Optics*, pp. 141-150.
- Hairaye, C., Mermet, F., Engel, T., Montgomery, P.C., & Fontaine, J. (2014). Functionalization of surfaces by ultrafast laser micro/nano structuring. *J. Phys. Conf. Ser.* 558, 12063.
- Halter, E., Montgomery, P., Montaner, D., Barillon, R., Del Nero, M., Galindo, C., & Georg, S. (2010). Characterization of inhomogeneous colloidal layers using adapted coherence probe microscopy. *Appl. Surf. Sci.* 256, 6144-6152.
- Hao, X., Kuang, C., Liu, X., Zhang, H., & Li, Y. (2011). Microsphere based microscope with optical super-resolution capability. *Appl. Phys. Lett.* 99, 203102.
- Harasaki, A., Schmit, J., & Wyant, J.C. (2000). Improved vertical-scanning interferometry. *Appl. Opt.* 39, 2107-2115.
- Healey, G.E., & Kondepudy, R. (1994). Radiometric CCD camera calibration and noise estimation. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 16, 267-276.
- Heintzmann, R., & Ficz, G. (2006). Breaking the resolution limit in light microscopy. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 5, 289-301.
- Hell, S., & Stelzer, E.H.K. (1992). Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope. *J. Opt. Soc. Am. A* 9, 2159.
- Hell, S.W., & Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* 19, 780.
- Hirakawa, K. (2010). *Iterative Exposure Bracketing*. (Optical Society of America), p. DMC4.
- Hooke, R. (2003). *Micrographia: Or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses, with Observations and Inquiries Thereupon* (Courier Corporation).
- Huang, P.S. (2006). Color phase-shifting technique for three-dimensional shape measurement. *Opt. Eng.* 45, 13602.
- Huebner, U., Morgenroth, W., Boucher, R., Mirandé, W., Buhr, E., Fries, T., Schwarz, N., Kunath-Fandrei, G., & Hild, R. (2005). Development of a nanoscale linewidth-standard for high-resolution optical microscopy. In *Proceedings SPIE*, p. 59651W-59651W-9.

- Huntley, J.M. (1989). Noise-immune phase unwrapping algorithm. *Appl. Opt.* 28, 3268.
- ISO 25178-604 (2013). Geometrical product specification (GPS) – Surface texture: Areal – Part 604: Nominal characteristics of non-contact (coherence scanning interferometric microscopy) instruments.
- Izatt, J.A., Swanson, E.A., Fujimoto, J.G., Hee, M.R., & Owen, G.M. (1994). Optical coherence microscopy in scattering media. *Opt. Lett.* 19, 590.
- Jain, A.K. (1989). *Fundamentals of Digital Image Processing* (Upper Saddle River, NJ, USA: Prentice-Hall, Inc.).
- Johnson, J.B. (1928). Thermal Agitation of Electricity in Conductors. *Phys. Rev.* 32, 97–109.
- Jones, R., & Wykes, C. (1989). *Holographic and speckle interferometry* (Cambridge: Cambridge University Press).
- Juette, M.F., Gould, T.J., Lessard, M.D., Mlodzianoski, M.J., Nagpure, B.S., Bennett, B.T., Hess, S.T., & Bewersdorf, J. (2008). Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples. *Nat. Methods* 5, 527–529.
- Kassamakov, I., Nolvi, A., & Hægström, E. (2016). 3D Super-resolution Label-free Imaging. (OSA), p. AM4O.2.
- Kemao, Q., Gao, W., & Wang, H. (2008). Windowed Fourier-filtered and quality-guided phase-unwrapping algorithm. *Appl. Opt.* 47, 5420–5428.
- Kirk, K. (2006). Noise characterization of weighting schemes for combination of multiple exposures. *Br. Mach. Vis. Conf.* 2006 1129–1138.
- Klar, T.A., Jakobs, S., Dyba, M., Egnér, A., & Hell, S.W. (2000). Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8206–8210.
- Krivitsky, L.A., Wang, J.J., Wang, Z., & Luk'yanchuk, B. (2013). Locomotion of microspheres for super-resolution imaging. *Sci. Rep.* 3.
- Larkin, K.G. (1996). Efficient nonlinear algorithm for envelope detection in white light interferometry. *J. Opt. Soc. Am. A* 13, 832.
- Leach, R. (2011). *Optical Measurement of Surface Topography* (Springer Science & Business Media).
- Lecler, S., Takakura, Y., & Meyrueis, P. (2005). Properties of a three-dimensional photonic jet. *Opt. Lett.* 30, 2641.
- Lee, B.S., & Strand, T.C. (1990). Profilometry with a coherence scanning microscope. *Appl. Opt.* 29, 3784.
- Lee, S., Li, L., Wang, Z., Guo, W., Yan, Y., & Wang, T. (2013). Immersed transparent microsphere magnifying sub-diffraction-limited objects. *Appl. Opt.* 52, 7265–7270.
- Lehmann, P., Niehues, J., & Tereschenko, S. (2014). 3-D Optical Interference Microscopy at the Lateral Resolution. *Int. J. Optomechatronics* 8, 231–241.

- Lehmann, P., Tereschenko, S., & Xie, W. (2016). Fundamental aspects of resolution and precision in vertical scanning white-light interferometry. *Surf. Topogr. Metrol. Prop.* *4*, 24004.
- Leong-Hoï, A., Serio, B., Twardowski, P., & Montgomery, P. (2014). Three-dimensional surface reconstruction by combining a pico-digital projector for structured light illumination and an imaging system with high magnification and high depth of field. In *Proceedings SPIE*, pp. 913219-913219-11.
- Leong-Hoï, A., Montgomery, P.C., Serio, B., & Twardowski, P. (2015a). High speed implementation of a three-dimensional shape profiler with submillimeter precision using a digital light processing device and a new efficient algorithm for absolute phase retrieval. *Opt. Eng.* *54*, 034102-034102.
- Leong-Hoï, A., Claveau, R., Flury, M., Uhring, W., Serio, B., Anstotz, F., & Montgomery, P.C. (2015b). Detection of defects in a transparent polymer with high resolution tomography using white light scanning interferometry and noise reduction. In *Proceedings SPIE*, pp. 952807-952807-952812.
- Leong-Hoï, A., Montgomery, P.C., Serio, B., Twardowski, P., & Uhring, W. (2016a). High-dynamic-range microscope imaging based on exposure bracketing in full-field optical coherence tomography. *Opt. Lett.* *41*, 1313.
- Leong-Hoï, A., Claveau, R., Montgomery, P.C., Serio, B., Uhring, W., Anstotz, F., & Flury, M. (2016b). High-resolution full-field optical coherence tomography using high-dynamic range image processing. In *Proceedings SPIE*, C. Gorecki, A.K. Asundi, & W. Osten, eds. p. 98900E.
- Leong-Hoï, A., Montgomery, P.C., Serio, B., Uhring, W., & Pecheva, E. (2016c). Improvement in measurements of hydroxyapatite layers by hybrid high dynamic range image processing in white-light interferometry. In *EMR-S - Nanomaterials, Light Interaction with Nanomaterials*, (Lille, France), p.
- Li, L., Guo, W., Yan, Y., Lee, S., & Wang, T. (2013). Label-free super-resolution imaging of adenoviruses by submerged microsphere optical nanoscopy. *Light Sci. Appl.* *2*, e104.
- Lin, S.K., Lin, I.C., & Tsai, D.P. (2006). Characterization of nano recorded marks at different writing strategies on phase-change recording layer of optical disks. *Opt. Express* *14*, 4452.
- Lindek, S., Salmon, N., Cremer, C., & Stelzer, E.H.K. (1994). Theta microscopy allows phase regulation in 4Pi(A)-confocal two-photon fluorescence microscopy. *Optik* *98*, 15-20.
- Litwiller, D. (2001). CCD vs. CMOS. *Photonics Spectra* *35*, 154-158.
- Liu, H. (2014). *Microscopie tomographique diffractive et profilométrie multivue à haute résolution* (Mulhouse).
- Liu, Y., & Zhang, X. (2011). Metamaterials: a new frontier of science and technology. *Chem. Soc. Rev.* *40*, 2494.
- Liu, B., Wang, X., Jin, W., Chen, Y., Liu, C., & Liu, X. (2012). Infrared image detail enhancement based on local adaptive gamma correction. *Chin. Opt. Lett.* *10*, 21002.
- Liu, H., Bailleul, J., Simon, B., Debailleul, M., Colicchio, B., & Haeberlé, O. (2014). Tomographic diffractive microscopy and multiview profilometry with flexible aberration correction. *Appl. Opt.* *53*, 748.

- Liu, Z., Lee, H., Xiong, Y., Sun, C., & Zhang, X. (2007). Far-Field Optical Hyperlens Magnifying Sub-Diffraction-Limited Objects. *Science* 315, 1686–1686.
- Lukas, J., Fridrich, J., & Goljan, M. (2006). Digital camera identification from sensor pattern noise. *IEEE Trans. Inf. Forensics Secur.* 1, 205–214.
- Mahajan, V. (2011). *Optical Imaging and Aberrations, Part II. Wave Diffraction Optics*, Second Edition (1000 20th Street, Bellingham, WA 98227-0010 USA: SPIE).
- Malacara, D. (2007). *Optical Shop Testing* (John Wiley & Sons).
- Mann, S., & Picard, R.W. (1995). Video Orbits of the Projective Group: A New Perspective on Image Mosaicing.
- Masters, B.R. (2009). History of the Electron Microscope in Cell Biology. In *eLS*, (John Wiley & Sons, Ltd), p.
- McCutchen, C.W. (1967). Superresolution in Microscopy and the Abbe Resolution Limit. *J. Opt. Soc. Am.* 57, 1190–1190.
- Meneses, J., Gharbi, T., & Humbert, P. (2005). Phase-unwrapping algorithm for images with high noise content based on a local histogram. *Appl. Opt.* 44, 1207–1215.
- Michel, R., Fordham, J., & Kawakami, H. (1997). Fixed pattern noise in high-resolution, CCD readout photon-counting detectors. *Mon. Not. R. Astron. Soc.* 292, 611–620.
- Montgomery, P.C. (1990). Nanoscopy: nanometre defect analysis by computer aided 3D optical imaging. *Nanotechnology* 1, 54.
- Montgomery, P.C., & Fillard, J.P. (1993). Peak fringe scanning microscopy: submicron 3D measurement of semiconductor components. In *Proceedings of the International Conference on Interferometry: Techniques and Analysis*, (San Diego, USA. Bellingham: Brown G, Kwon OY, Kujawinska M, Reid G.), pp. 12–23.
- Montgomery, P.C., & Fillard, J.P. (1994). Method and apparatus for interferometrically inspecting a surface of an object.
- Montgomery, P.C., & Leong-Hoi, A. (2015). Emerging optical nanoscopy techniques. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 31.
- Montgomery, P.C., & Montaner, D. (1999). Deep submicron 3D surface metrology for 300 mm wafer characterization using UV coherence microscopy.
- Montgomery, P.C., & Weyher, J.L. (2007). L'érosion nanoscopique. In *Voir L'invisible*, sous la direction de J.P. Gex, ed. (Ed. Omniscience), pp. 60–61.
- Montgomery, P., Kazmierski, C., & Bouchoule, S. (1997). Submicron profiling using quasi-monochromatic light interferometry.
- Montgomery, P., Anstotz, F., Johnson, G., & Kiefer, R. (2008). Real time surface morphology analysis of semiconductor materials and devices using 4D interference microscopy. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* 19, 194–198.
- Montgomery, P.C., Montaner, D., Pramatarova, L., & Pecheva, E. (2009). Characterisation of the internal structure and local optical properties of thick layers of hydroxyapatite by Coherence Probe Microscopy. *J. Optoelectron. Adv. Mater.* 11, 1175–1181.

- Montgomery, P.C., Anstotz, F., Montagna, J., Montaner, D., Pramatarova, L., & Pecheva, E. (2010). Towards real time 3D quantitative characterisation of in situ layer growth using white light interference microscopy. *J. Phys. Conf. Ser.* 253, 12017.
- Montgomery, P.C., Anstotz, F., & Montagna, J. (2011). La mesure de changement de forme de surfaces microscopiques par la microscopie 4D. In 12ème Colloque International Francophone Sur Les Méthodes et Techniques Optiques Pour l'Industrie (CMOI 2011), edited by S.F. d'Optique, ed. (Lille, France), p. Actes sur CD.
- Montgomery, P.C., Montaner, D., Anstotz, F., & Serio, B. (2012a). Wide field nanometric materials analysis by diffraction limited far field optical nanoscopy. *J. Phys. Conf. Ser.* 398, 12001.
- Montgomery, P.C., Montaner, D., & Salzenstein, F. (2012b). Tomographic analysis of medium thickness transparent layers using white light scanning interferometry and XZ fringe image processing. In Proceedings SPIE, pp. 843014-843014–843019.
- Montgomery, P.C., Salzenstein, F., Montaner, D., Serio, B., & Pfeiffer, P. (2013). Implementation of a fringe visibility based algorithm in coherence scanning interferometry for surface roughness measurement. In Proceedings SPIE, p. 87883G–87883G–11.
- Montgomery, P.C., Leong-Hoï, A., Anstotz, F., Mitev, D., Pramatarova, L., & Haeberlé, O. (2016). From superresolution to nanodetection: overview of far field optical nanoscopy techniques for nanostructures. *J. Phys. Conf. Ser.* 682, 12010.
- Mookherjea, S., & Grant, H.R. (2012). High dynamic range microscope infrared imaging of silicon nanophotonic devices. *Opt. Lett.* 37, 4705.
- Mullikin, J.C., van Vliet, L.J., Netten, H., Boddeke, F.R., van der Feltz, G., & Young, I.T. (1994). Methods for CCD camera characterization. In Proceedings SPIE, pp. 73–84.
- Nayar, S.K., & Mitsunaga, T. (2000). High dynamic range imaging: spatially varying pixel exposures. In IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, 2000. Proceedings, pp. 472–479 vol.1.
- Neal, W.E.J., & Fane, R.W. (1973). Ellipsometry and its applications to surface examination. *J. Phys. [E]* 6, 409.
- Nyquist, H. (1928). Thermal Agitation of Electric Charge in Conductors. *Phys. Rev.* 32, 110–113.
- Oshikane, Y., Kataoka, T., Okuda, M., Hara, S., Inoue, H., & Nakano, M. (2007). Observation of nanostructure by scanning near-field optical microscope with small sphere probe. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 8, 181–185.
- Pang, H., Cao, A., Du, C., Qiu, Q., Deng, Q., & Yin, S. (2015). Spectrum analysis of liquid immersion to transparent microsphere based optical nanoscopy. *Opt. - Int. J. Light Electron Opt.* 126, 3079–3083.
- Patorski, K. (1993). Handbook of the moiré fringe technique (Amsterdam: Elsevier Science).
- Pecheva, E., Montgomery, P., Montaner, D., & Pramatarova, L. (2007). White Light Scanning Interferometry Adapted for Large-Area Optical Analysis of Thick and Rough Hydroxyapatite Layers. *Langmuir* 23, 3912–3918.
- Pendry, J.B. (2000). Negative Refraction Makes a Perfect Lens. *Phys. Rev. Lett.* 85, 3966–3969.

- Petrou, M., & Petrou, C. (2010). *Image Processing: The Fundamentals* (Chichester: John Wiley & Sons).
- Pförtner, A., & Schwider, J. (2001). Dispersion Error in White-Light Linnik Interferometers and its Implications for Evaluation Procedures. *Appl. Opt.* *40*, 6223–6228.
- Pichon, J. (2008). *Enregistrement optique haute densité : étude physique et physico-chimique du phénomène de Super-Résolution*. Institut National Polytechnique de Grenoble - INPG.
- Pirodda, L. (1982). Shadow and projection moiré techniques for absolute or relative mapping of surface shapes. *Opt. Eng.* *21*, 214640–214640.
- Pramatarova, L., Radeva, E., Pecheva, E., Hikov, T., Krasteva, N., Dimitrova, R., Mitev, D., Montgomery, P., Sammons, R., & Atlankov, G. (2011). The advantages of polymer composites with detonation nanodiamond particles for medical applications. In *On Biomimetics*, Ch.14, L.D. Pramatarova, ed. (InTech), pp. 297–320.
- van Putten, E., Akbulut, D., Bertolotti, J., Vos, W., Legendijk, A., & Mosk, A. (2011). Scattering Lens Resolves Sub-100 nm Structures with Visible Light. *Phys. Rev. Lett.* *106*, 193905.
- Quan, C., Chen, W., & Tay, C.J. (2010). Phase-retrieval techniques in fringe-projection profilometry. *Opt. Lasers Eng.* *48*, 235–243.
- Reinhard, E., Heidrich, W., Debevec, P., Pattanaik, S., Ward, G., & Myszkowski, K. (2010). *High Dynamic Range Imaging: Acquisition, Display, and Image-Based Lighting* (Morgan Kaufmann).
- Restrepo, R., Uribe-Patarroyo, N., & Belenguer, T. (2012). Improvement of the signal-to-noise ratio in interferometry using multi-frame high-dynamic-range and normalization algorithms. *Opt. Commun.* *285*, 546–552.
- Robertson, M.A., Borman, S., & Stevenson, R.L. (1999). Dynamic range improvement through multiple exposures. (IEEE), pp. 159–163.
- Roblin, G. (1999). *Microscopies optiques à balayage*. Tech. Ing. Mes. Contrô *R7*.
- Russ, J.C. (2002). *The image processing handbook* (Boca Raton, Florida: CRC Press).
- Salzenstein, F., Montgomery, P., & Boudraa, A.O. (2014). Local frequency and envelope estimation by Teager-Kaiser energy operators in white-light scanning interferometry. *Opt. Express* *22*, 18325.
- Sandoz, P., Devillers, R., & Plata, A. (1997). Unambiguous profilometry by fringe-order identification in white-light phase-shifting interferometry. *J. Mod. Opt.* *44*, 519–534.
- Seibert, J.A., Boone, J.M., & Lindfors, K.K. (1998). Flat-field correction technique for digital detectors. In *Proceedings SPIE*, pp. 348–354.
- Seppä, J., Kassamakov, I., Heikkinen, V., Nolvi, A., Paulin, T., Lassila, A., & Hægström, E. (2013). Quasidynamic calibration of stroboscopic scanning white light interferometer with a transfer standard. *Opt. Eng.* *52*, 124104–124104.
- Serio, B., Hunsinger, J.J., & Cretin, B. (2004). In-plane measurements of microelectromechanical systems vibrations with nanometer resolution using the correlation of synchronous images. *Rev. Sci. Instrum.* *75*, 3335–3341.

- Shannon, C.E. (1949). Communication in the Presence of Noise. *Proc. IRE* 37, 10–21.
- Shannon, C.E. (2001). A Mathematical Theory of Communication. *SIGMOBILE Mob Comput Commun Rev* 5, 3–55.
- Simon, B., Debailleul, M., Georges, V., Lauer, V., & Haeberlé, O. (2008). Tomographic diffractive microscopy of transparent samples. *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* 44, 29–35.
- Stahl, H.P. (1991). Review of phase-measuring interferometry. In *San Dieg-DL Tentative*, (International Society for Optics and Photonics), pp. 704–719.
- Vargas, J., Restrepo, R., Quiroga, J.A., & Belenguer, T. (2011). High dynamic range imaging method for interferometry. *Opt. Commun.* 284, 4141–4145.
- Vlad, A., Huynen, I., & Melinte, S. (2012). Wavelength-scale lens microscopy via thermal reshaping of colloidal particles. *Nanotechnology* 23, 285708.
- Wang, Y., & Zhang, S. (2012). Novel phase-coding method for absolute phase retrieval. *Opt. Lett.* 37, 2067–2069.
- Wang, F., Liu, L., Yu, P., Liu, Z., Yu, H., Wang, Y., & Li, W.J. (2016a). Three-Dimensional Super-Resolution Morphology by Near-Field Assisted White-Light Interferometry. *Sci. Rep.* 6, 24703.
- Wang, Y., Guo, S., Wang, D., Lin, Q., Rong, L., & Zhao, J. (2016b). Resolution enhancement phase-contrast imaging by microsphere digital holography. *Opt. Commun.* 366, 81–87.
- Wang, Z., Nguyen, D.A., & Barnes, J.C. (2010). Some practical considerations in fringe projection profilometry. *Opt. Lasers Eng.* 48, 218–225.
- Wang, Z., Guo, W., Li, L., Luk'yanchuk, B., Khan, A., Liu, Z., Chen, Z., & Hong, M. (2011). Optical virtual imaging at 50 nm lateral resolution with a white-light nanoscope. *Nat. Commun.* 2, 218.
- Wastiaux, G., & Locquin, M.V. (1994). *La microscopie optique moderne* (Paris, France).
- Watkins, L.R. (2010). Phase recovery using the wavelet transform. In *AIP Conference Proceedings*, (AIP Publishing), pp. 101–105.
- Weisenburger, S., & Sandoghdar, V. (2015). Light microscopy: an ongoing contemporary revolution. *Contemp. Phys.* 56, 123–143.
- Weyher, J.L., & Montgomery, P.C. (1990). DSL photoetching and near infrared phase contrast microscopy on grown-in defects in Si doped LEC GaAs. *J. Cryst. Growth* 106, 476–480.
- Williams, C.S., & Becklund, O.A. (1989). *Introduction to the Optical Transfer Function* (SPIE Press).
- Xu, K., Babcock, H.P., & Zhuang, X. (2012). Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton. *Nat. Methods* 9, 185–188.
- Yao, L., Ye, Y.-H., Feng Ma, H., Cao, L., & Hou, J. (2015). Role of the immersion medium in the microscale spherical lens imaging. *Opt. Commun.* 335, 23–27.
- Ye, R., Ye, Y.-H., Ma, H.F., Cao, L., Ma, J., Wyrowski, F., Shi, R., & Zhang, J.-Y. (2014). Experimental imaging properties of immersion microscale spherical lenses. *Sci. Rep.* 4.

- Zhang, J., Rao, B., Yu, L., & Chen, Z. (2009). High-dynamic-range quantitative phase imaging with spectral domain phase microscopy. *Opt. Lett.* *34*, 3442–3444.
- Zhao, H., Chen, W., & Tan, Y. (1994). Phase-unwrapping algorithm for the measurement of three-dimensional object shapes. *Appl. Opt.* *33*, 4497.
- Zheng, D., & Da, F. (2012a). Self-correction phase unwrapping method based on Gray-code light. *Opt. Lasers Eng.* *50*, 1130–1139.
- Zheng, D., & Da, F. (2012b). Phase coding method for absolute phase retrieval with a large number of codewords. *Opt. Express* *20*, 24139–24150.
- Zhong, J., Huang, Y., & Weng, J. (2010). Fringe Analysis Based On an Adaptive Windowed Fourier Transform. In *AIP Conference Proceedings*, (AIP Publishing), pp. 135–140.
- Zuylen, J. (1981). The microscopes of Antoni van Leeuwenhoek. *J. Microsc.* *121*, 309–328.



---

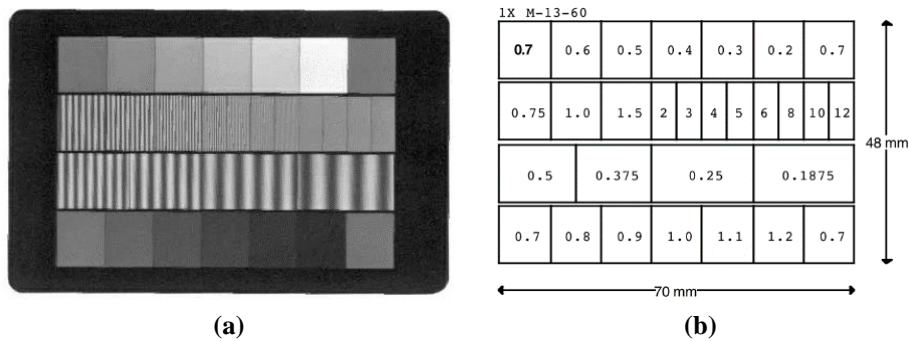
# Annexes

---

Annexe 1. Mesure de la FTM sur la mire « Reflection sinusoidal test pattern array M-13-60 » .....	142
Annexe 2-1. N-step phase shifting .....	143
Annexe 2-2. Extension de la phase entre 0 et $2\pi$ et erreur en S .....	145
Annexe 2-3. Correction gamma .....	146
Annexe 2-4. Fiches techniques de la camera et du projecteur .....	147
Annexe 2-5. Mesure de la profondeur de champ .....	148
Annexe 2-6. Comparaison des méthodes .....	149
Annexe 3-1. Fiche technique de la caméra CCD Basler .....	150
Annexe 3-2. Fiche technique de la caméra CMOS Photonfocus .....	151
Annexe 3-3. Etude sur la lampe incandescente .....	152
Annexe 3-4. Comparaison du bruit des caméras CCD Basler et CMOS Photonfocus .....	154
Annexe 4. RS-N resolution standard .....	157
Annexe 5. Améliorations du logiciel « CSI 2105 » en LabView .....	160

## Annexe 1. Mesure de la FTM sur la mire « Reflection sinusoidal test pattern array M-13-60 »

La photo et les caractéristiques de la mire « Reflection sinusoidal test pattern array M 13 60 » sont données dans la figure ci-dessous.

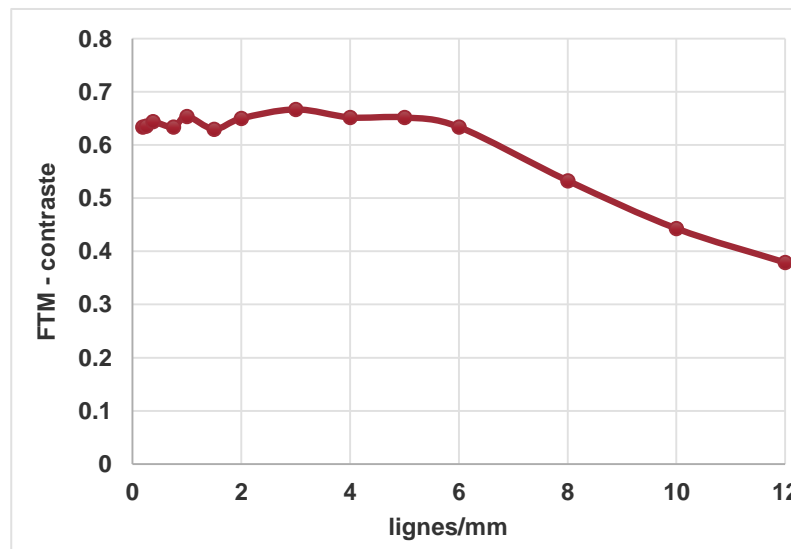


(a) Photo de la mire « Reflection sinusoidal test pattern array M-13-60 ». (b) Schéma de la mire avec sur les 1<sup>ère</sup> et 4<sup>ème</sup> lignes les valeurs de densité et sur les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> lignes les fréquences en lignes par millimètre.

En mesurant la FTM, comme donnée par l'équation Eq. (1-5), on peut obtenir la courbe ci-dessous (dont les valeurs sont données dans le tableau ci-dessous) avec le système composé d'une caméra CCD monochrome Prosilica EC1380 et d'un objectif de caméra pour la macroscopie de grossissement x0,2 (ON = 0,06). La fréquence pour laquelle la courbe FTM est à 50% de son contraste maximal correspond alors à la fréquence de coupure et la résolution latérale du système optique est alors déduite.

Valeurs de la FTM obtenues après les mesures de chaque champ de la mire.

l/mm	FTM
0,187	0,63
5	0,63
0,25	0,64
0,375	0,64
0,75	0,63
1	0,65
1,5	0,63
2	0,65
3	0,67
4	0,65
5	0,65
6	0,63
8	0,53
10	0,44
12	0,38



FTM de la mire « Reflection sinusoidal test pattern array M-13-60 » avec une caméra CCD monochrome Prosilica EC1380 et un objectif de caméra de grossissement x0,2 (ON = 0,06).

## Annexe 2-1. N-step phase shifing

Les calculs de l'équation pour déterminer la phase relative avec la technique à 3 sauts sont donnés ci-dessous :

N : nombre de sauts  
P : période des franges

F : nombre de franges  
i = {1, ..., N} : itération

$$I_i^{\text{generated}} = \frac{1}{2} \left[ 1 + \cos \left( \frac{2\pi}{P} x + \frac{2\pi}{N} i \right) \right]$$

$$I_i = I' + I'' \cos \left( \varphi + \frac{2\pi}{N} i \right)$$

$$\Phi_{\text{relative}} = - \operatorname{atan} \left[ \frac{\sum_{i=1}^N I_i * \sin \left( \frac{2\pi}{N} i \right)}{\sum_{i=1}^N I_i * \cos \left( \frac{2\pi}{N} i \right)} \right]$$

### Calcul pour N=3

$$\begin{aligned} \Phi_{\text{relative}} &= - \operatorname{atan} \left[ \frac{\sum_{i=1}^3 I_i * \sin \left( \frac{2\pi}{3} i \right)}{\sum_{i=1}^3 I_i * \cos \left( \frac{2\pi}{3} i \right)} \right] \\ &= - \operatorname{atan} \left[ \frac{I_1 * \sin \left( \frac{2\pi}{3} \right) + I_2 * \sin \left( \frac{4\pi}{3} \right) + I_3 * \sin(2\pi)}{I_1 * \cos \left( \frac{2\pi}{3} \right) + I_2 * \cos \left( \frac{4\pi}{3} \right) + I_3 * \cos(2\pi)} \right] \end{aligned}$$

$\sin(2\pi) = 0$  et  $\cos(2\pi) = 1$

$$\Phi_{\text{relative}} = - \operatorname{atan} \left[ \frac{I_1 * \sin \left( \frac{2\pi}{3} \right) + I_2 * \sin \left( \frac{4\pi}{3} \right)}{I_1 * \cos \left( \frac{2\pi}{3} \right) + I_2 * \cos \left( \frac{4\pi}{3} \right) + I_3} \right]$$

$$\sin \left( \frac{2\pi}{3} \right) = \frac{\sqrt{3}}{2} ; \sin \left( \frac{4\pi}{3} \right) = -\frac{\sqrt{3}}{2}$$

$$\cos \left( \frac{2\pi}{3} \right) = \cos \left( \frac{4\pi}{3} \right) = -\frac{1}{2}$$

$$\Phi_{\text{relative}} = - \operatorname{atan} \left[ \frac{\frac{\sqrt{3}}{2} (I_1 - I_2)}{\frac{1}{2} (-I_1 - I_2) + I_3} \right] = - \operatorname{atan} \left[ \frac{\sqrt{3} (I_1 - I_2)}{2I_3 - I_1 - I_2} \right]$$

$$I_1 = \frac{1}{2} \left[ 1 + \cos \left( \frac{2\pi}{P} x + \frac{2\pi}{3} \right) \right] \leftrightarrow I_2 = \frac{1}{2} \left[ 1 + \cos \left( \frac{2\pi}{P} x + \frac{2\pi}{3} \right) \right]$$

$$I_2 = \frac{1}{2} \left[ 1 + \cos \left( \frac{2\pi}{P} x + \frac{4\pi}{3} \right) \right] \leftrightarrow I_3 = \frac{1}{2} \left[ 1 + \cos \left( \frac{2\pi}{P} x + \frac{4\pi}{3} \right) \right]$$

$$I_3 = \frac{1}{2} \left[ 1 + \cos \left( \frac{2\pi}{P} x \right) \right] \leftrightarrow I_1 = \frac{1}{2} \left[ 1 + \cos \left( \frac{2\pi}{P} x \right) \right]$$

$$\Phi_{\text{relative}} = - \operatorname{atan} \left[ \frac{\sqrt{3} (I_1 - I_2)}{2I_3 - I_1 - I_2} \right] \leftrightarrow \Phi_{\text{relative}} = - \operatorname{atan} \left[ \frac{\sqrt{3} (I_2 - I_3)}{2I_1 - I_2 - I_3} \right] \leftrightarrow \Phi_{\text{relative}} = \operatorname{atan} \left[ \frac{\sqrt{3} (I_3 - I_2)}{2I_1 - I_2 - I_3} \right]$$

$$\cos(a + b) = \cos(a) \cos(b) - \sin(a) \sin(b)$$

$$\begin{aligned} \cos\left(\frac{2\pi}{P}x + \frac{2\pi}{3}\right) &= \cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right) \cos\left(\frac{2\pi}{3}\right) - \sin\left(\frac{2\pi}{P}x\right) \sin\left(\frac{2\pi}{3}\right) \\ &= -\frac{1}{2} \cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right) - \frac{\sqrt{3}}{2} \sin\left(\frac{2\pi}{P}x\right) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \cos\left(\frac{2\pi}{P}x + \frac{4\pi}{3}\right) &= \cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right) \cos\left(\frac{4\pi}{3}\right) - \sin\left(\frac{2\pi}{P}x\right) \sin\left(\frac{4\pi}{3}\right) \\ &= -\frac{1}{2} \cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right) + \frac{\sqrt{3}}{2} \sin\left(\frac{2\pi}{P}x\right) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} I_1 - I_2 &= 1/2 \left( 1 + \cos\left(\frac{2\pi}{P}x + \frac{2\pi}{3}\right) - 1 - \cos\left(\frac{2\pi}{P}x + \frac{4\pi}{3}\right) \right) \\ &= \frac{1}{2} \left[ -\frac{1}{2} \cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right) - \frac{\sqrt{3}}{2} \sin\left(\frac{2\pi}{P}x\right) + \frac{1}{2} \cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right) - \frac{\sqrt{3}}{2} \sin\left(\frac{2\pi}{P}x\right) \right] \\ &= \frac{1}{2} \left[ \frac{1}{2} \left( -\cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right) \right) - \frac{\sqrt{3}}{2} \left( \sin\left(\frac{2\pi}{P}x\right) + \sin\left(\frac{2\pi}{P}x\right) \right) \right] \\ &= -\frac{\sqrt{3}}{2} \sin\left(\frac{2\pi}{P}x\right) \end{aligned}$$

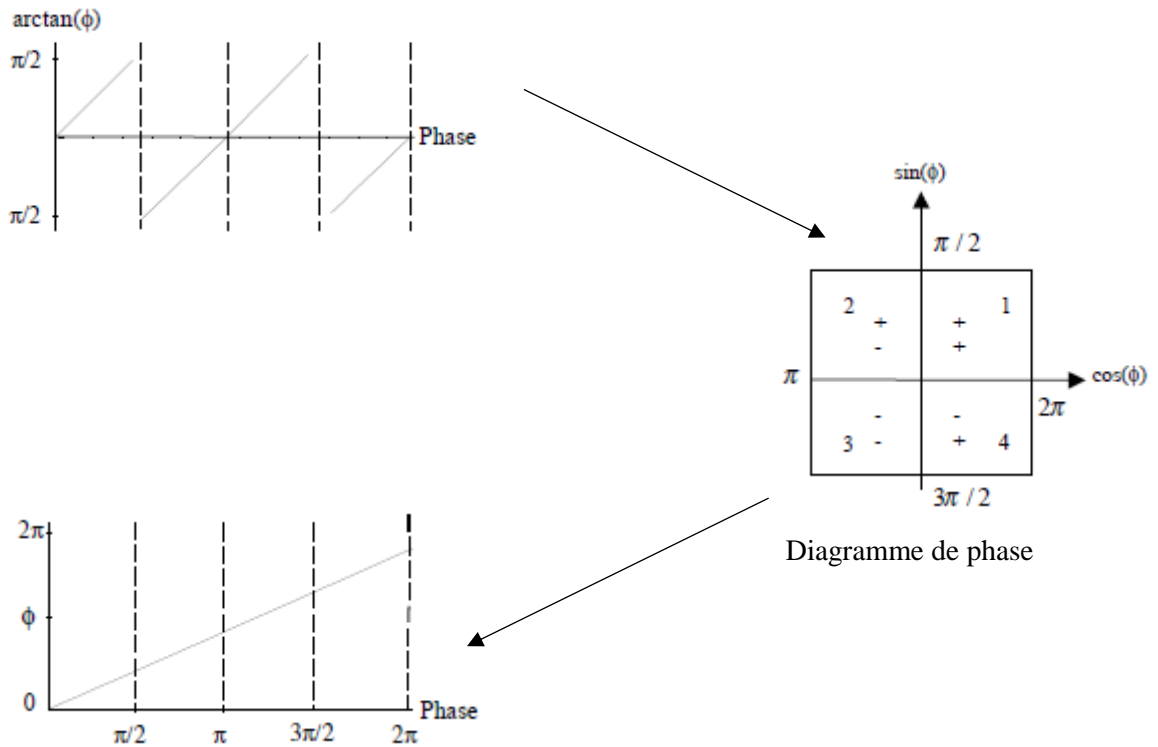
$$\begin{aligned} 2I_3 - I_1 - I_2 &= 1 + \cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right) - \frac{1}{2} \left[ 1 + \cos\left(\frac{2\pi}{P}x + \frac{2\pi}{3}\right) + 1 + \cos\left(\frac{2\pi}{P}x + \frac{4\pi}{3}\right) \right] \\ &= 1 + \cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right) \\ &\quad - \frac{1}{2} \left[ 2 - \frac{1}{2} \cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right) - \frac{\sqrt{3}}{2} \sin\left(\frac{2\pi}{P}x\right) - \frac{1}{2} \cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right) + \frac{\sqrt{3}}{2} \sin\left(\frac{2\pi}{P}x\right) \right] \\ &= 1 + \cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right) - 1 \\ &\quad - \frac{1}{2} \left[ -\frac{1}{2} \left( \cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right) \right) + \frac{\sqrt{3}}{2} \left( -\sin\left(\frac{2\pi}{P}x\right) + \sin\left(\frac{2\pi}{P}x\right) \right) \right] \\ &= \cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right) - \frac{1}{2} \cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right) \\ &= \frac{3}{2} \cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right) \end{aligned}$$

$$\frac{\sqrt{3}(I_1 - I_2)}{2I_3 - I_1 - I_2} = \sqrt{3} \frac{-\frac{\sqrt{3}}{2} \sin\left(\frac{2\pi}{P}x\right)}{\frac{3}{2} \cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right)} = -\frac{\sin\left(\frac{2\pi}{P}x\right)}{\cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right)}$$

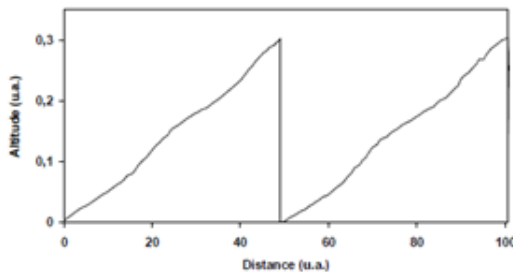
$\Phi_{\text{relative}} = -\text{atan} \left[ \frac{\sqrt{3}(I_1 - I_2)}{2I_3 - I_1 - I_2} \right] = -\text{atan} \left[ -\frac{\sin\left(\frac{2\pi}{P}x\right)}{\cos\left(\frac{2\pi}{P}x\right)} \right] = \frac{2\pi}{P}x$
--

## Annexe 2-2. Extension de la phase entre 0 et $2\pi$ et erreur en S

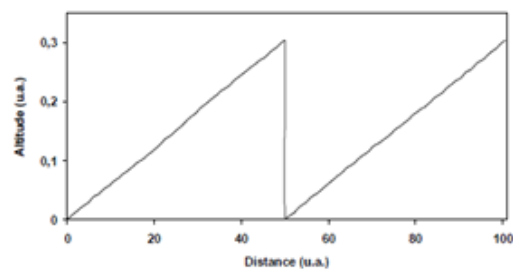
Dans les algorithmes basés sur le décalage de phase, la fonction *arctangente* est utilisée pour retrouver la phase du front d'onde. Cela implique que les valeurs sont comprises entre  $-\frac{\pi}{2}$  et  $\frac{\pi}{2}$  (Creath, 1988). Il est possible d'étendre la valeur de la phase entre 0 et  $2\pi$  en observant les signes des fonctions  $\sin\phi$  et  $\cos\phi$ . Le diagramme de phase montre comment corriger la valeur de la fonction *arctangente* en observant le signe des fonctions sinus et cosinus, afin d'étendre la phase entre 0 et  $2\pi$ .



Un inconvénient de la technique à 3 sauts de phase est le problème de linéarité entre 2 sauts. En effet, les surfaces ont une forme en S au lieu d'être complètement droite. La technique à cinq sauts de phase permet de résoudre ce problème même si le temps de calcul est plus élevé par rapport à la technique à trois sauts.



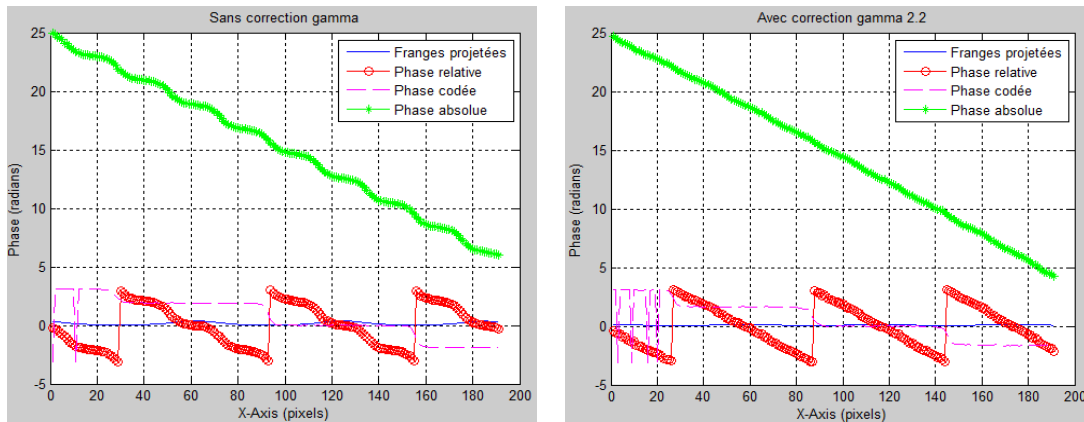
Technique à 3 sauts (de  $\pi/2$ )



Technique à 5 sauts (de  $\pi/2$ )

## Annexe 2-3. Correction gamma

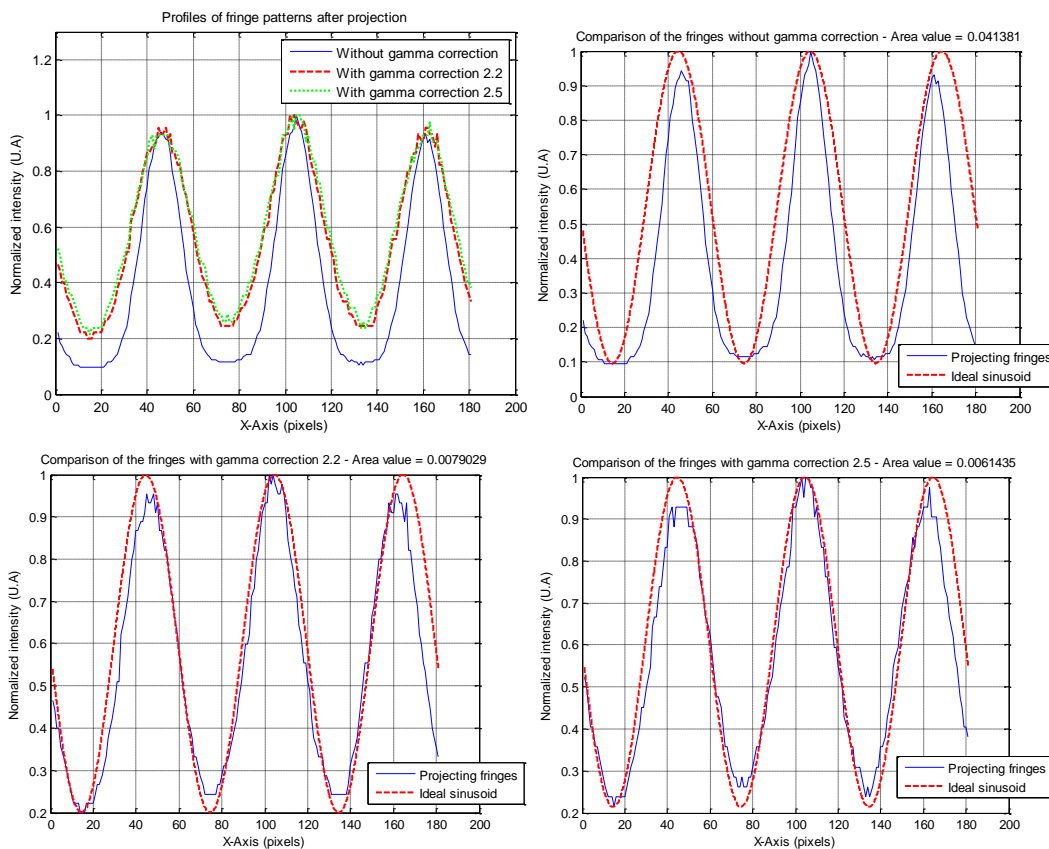
La correction gamma  $\gamma = 2,2$  donne de meilleures franges sinusoidales projetées et de meilleurs résultats pour la phase relative et la phase absolue.



Pour comparer les franges projetées à une sinusoïde parfaite, on calcul l'aire entre les deux courbes :

$$\text{Area value} = \frac{1}{N} \int_1^N [\text{franges}_{\text{projetées}}(x) - \text{sinusoïde}_{\text{idéale}}(x)] dx$$

Si elle tend vers 0 alors les franges projetées tendent vers des sinusoides.



On remarque qu'avec la correction gamma  $\gamma = 2,5$ , l'aire entre la courbe après projection et une sinusoïde idéale est plus proche de 0.

## Annexe 2-4. Fiches techniques de la camera et du projecteur

### PicoPix

PPX2055



# PHILIPS

### Caractéristiques techniques

#### Technologie / Optique

Technologie d'affichage..... WVGA 0,3" DLP  
 Source lumineuse..... LED RGB  
 Résolution..... 854 × 480 pixels (16:9)  
 Résolutions compatibles..... SVGA/XGA/WXGA  
 Puissance lumineuse (Bright Mode)..... jusqu'à 55 lumens  
 Rapport de contraste..... 1000:1  
 Taille d'image projetée..... 12–120 pouces  
 Écart avec la surface de projection..... 0,5 m à 3 m  
 Taux de rafraîchissement horizontal..... 31–69 kHz  
 Taux de rafraîchissement vertical..... 56–85 Hz  
 Alimentation..... sur branchement USB  
 Dimensions (L × H × P)..... 72 × 27 × 72 mm  
 Poids..... 0,115 kg  
 Température ambiante conseillée..... 5–35 °C  
 Humidité relative..... 15–80 % (sans condensation)

#### Exigences PC minimales

Processeur..... Intel Pentium M ou AMD Athlon  
 Fréquence..... 2GHz  
 Système d'exploitation..... Windows XP Professional (SP2),  
 Vista, Windows 7, Mac OS 10.6  
 Mémoire vive..... 1Go DDR SDRAM  
 Espace mémoire disponible..... 40 Mo  
 Interface USB..... USB 2.0  
 Toutes les données ne sont que des indications.  
 Sagemcom se réserve le droit d'effectuer des changements sans notification préalable.

PROSILICA
EC1380  
CCD Camera

---

EC1380 • Machine Vision Camera

Ultra Compact

High Sensitivity

Fast Framerate

Features	EC1380
<ul style="list-style-type: none"> <li>20 fps at full resolution</li> <li>1360x1024 pixel resolution</li> <li>Sony ICX-285 CCD sensor</li> <li>Firewire IEEE-1394</li> <li>Ultra-small size and light weight</li> <li>DCAM compliant (IIDC 1.31)</li> <li>Region of interest readout</li> <li>Snapshot shutter</li> <li>External trigger and sync</li> <li>Continuously variable exposure control</li> </ul>	<p>Prosilica's EC1380 firewire camera packs a lot of performance into a small package. The EC1380 is distinguished by its small size, high sensitivity, excellent image quality and great performance.</p> <p>The EC1380 CCD camera contains a range of high-performance features including snapshot shutter, region-of-interest readout, binning, and external trigger/sync. The EC1380 is truly plug-and-play and does not require a frame-grabber but communicates with the host computer through a firewire (IEEE-1394) interface.</p>

Prosilica Inc. Tel: 604-875-8855 Fax: 604-875-8856 E-mail: info@prosilica.com

### PROSILICA

### EC1380

#### Machine Vision Camera

#### FEATURES/BENEFITS

- Ultra compact design to fit into tight spaces
- Firewire interface (IEEE-1394)
- Sony ICX-285 CCD sensor with ExView has high sensitivity
- 20 frames per second at full-resolution—faster with ROI
- Region of interest function for increased speed and reduced data volume
- DCAM compliant for plug-and-play compatibility
- Industrial ruggedness for tough environments
- Snapshot shutter for stop action imaging
- Software development kit for easy camera integration
- Firmware updates via Firewire port

#### APPLICATIONS

- Semiconductor and electronics inspection
- Manufacturing quality control
- Food and beverage inspection
- Security and military applications
- Other automation and machine vision applications



Specifications	
Sensor Size (H x V)	1360x1024
Sensor Format	2/3" inch
Sensor Type	ICX-285 CCD with ExView Technology
Exposure Type	Snapshot shutter
Pixel Size	6.45 um x 6.45 um
Frame Rate	20 fps at full resolution, faster with ROI
Output Type	IEEE 1394a
DCAM Compliance	IIDC 1.31
Output Format	8 and 10 bits/pixel
Synchronization	Optically isolated Trigger-in and Sync-out
Exposure Control	Programmable
Power	3W 12VDC
Lens Mount	C-mount (adjustable back-focus)
Housing size	38 x 33 x 46 mm (L x W x H)
Weight	89 g

Prosilica Inc.  
 Suite 110—8868 Frisvold Court  
 Burnaby, B.C. Canada V3J 2B9  
 Tel: 604.875.8855 Fax: 604.875.8856  
 www.prosilica.com

© Prosilica Inc. 2005 All Rights Reserved

## Annexe 2-5. Mesure de la profondeur de champ

La profondeur de champ est la zone de l'espace dans laquelle doit se trouver un objet de petites dimensions afin que son image soit nette. La largeur à mi-hauteur de la courbe d'intensité définit la profondeur de champ d'un microscope.

### Étapes pour mesurer la profondeur de champ :

Trouver la position z où l'image de l'échantillon sur la caméra est nette.

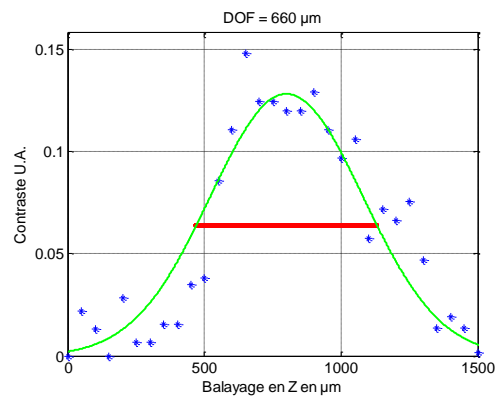
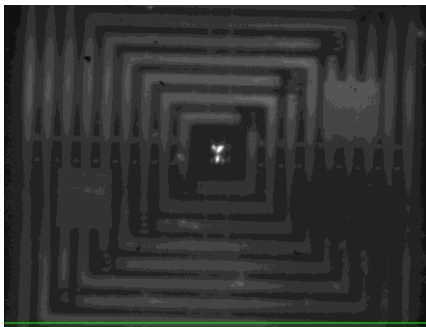
Reculer la caméra.

Prendre une image de l'échantillon (par exemple une mire de Ronchi).

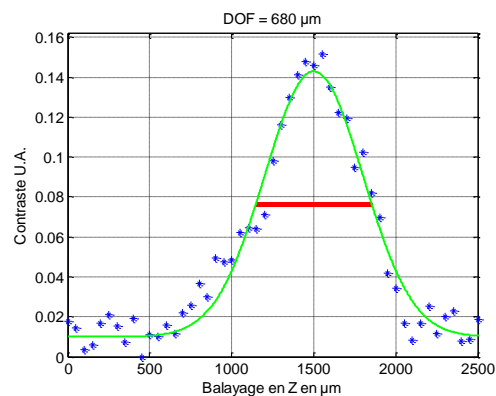
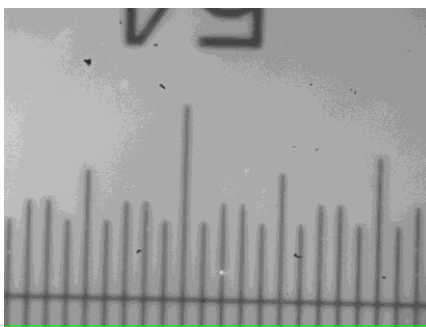
Avancer avec le nanocube (avec un pas de 5 µm par exemple).

Prendre des images et recommencer.

On calcule le contraste  $C = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}}$  pour chaque image. On trace la courbe de C en fonction de la distance de travail z. La largeur à mi-hauteur correspond à la profondeur de champ.



### Mesure de la profondeur de champ avec la mire Geller MR-S-3



### Mesure de la profondeur de champ avec d'une règle graduée

**Conclusion** : La profondeur de champ est d'environ 670 µm.



## Annexe 2-6. Comparaison des méthodes

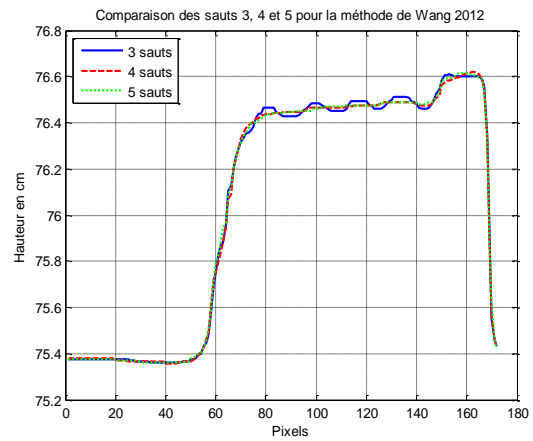
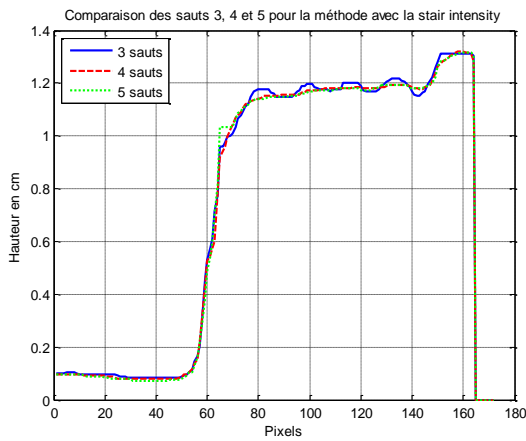
Paramètres

Camera : Gain 0, Shutter 2030

Franges : Image 800x480 px, Période 200 px, correction gamma 2,5.

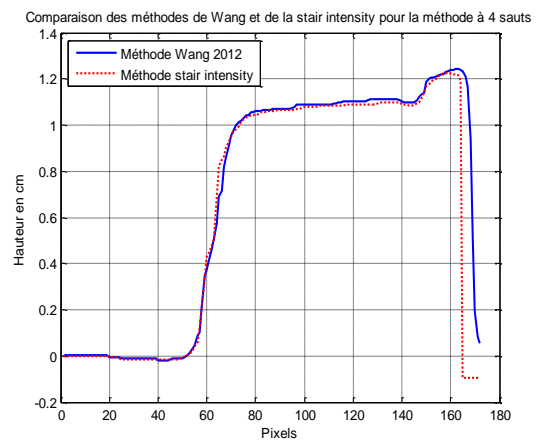
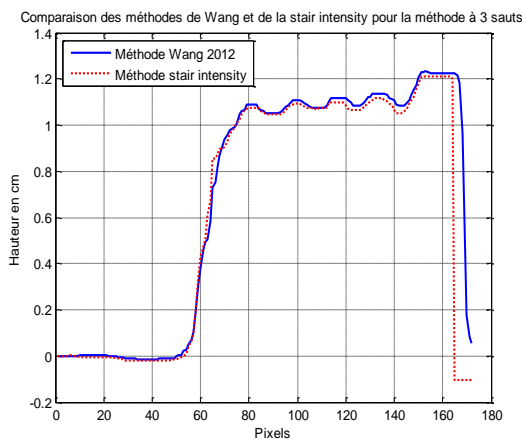


Images des franges projetées sur un plan puis sur un objet



Comparaison des sauts 3,4,5 pour la méthode de la stair intensity

Comparaison des sauts 3,4,5 pour la méthode de Wang et Zhang 2012



Comparaison des méthodes de Wang et Zhang 2012 et de la stair intensity pour la méthode à 3 sauts

Comparaison des méthodes de Wang et Zhang 2012 et de la stair intensity pour la méthode à 4 sauts

# Annexe 3-1. Fiche technique de la caméra CCD Basler

## Basler aviator

AREA SCAN CAMERAS



- 1 to 4 megapixels and up to 120 fps
- Brilliant CCD color with 12 bit image quality
- High speed thanks to four tap sensor technology
- Outstanding performance



### OVERVIEW

#### Fast Readout and Sensitivity

The Basler aviator family is a series of high speed mainstream CCD cameras with Gigabit Ethernet and Camera Link interface and a very attractive price/performance ratio. It features mono and color camera models with resolutions of 1.2 (4.3 and HDTV), and 4 megapixels with progressive scan readout and global shutter technology.

Superior image quality, even at high image capture rates, makes a convincing argument for this advanced camera family. Basler aviator cameras are equipped with ON Semiconductor KAI CCD sensor generation with four tap readout technology. These sensors are up to four times faster than standard CCD sensors of the same resolution. With the aviator, Basler has applied the unique tap balancing competence we gained during the development of our earlier camera families such as the Basler pilot series, which also employs ON Semiconductor multi-tap sensors.



The Camera Link interface is the best way to integrate the full performance of the aviator's four tap ON Semiconductor sensors into your application with no bandwidth related delays. The Basler aviator GigE models benefit from our extensive experience designing and building GigE cameras and feature 100 meter cable length, easy integration and a cost-saving system layout.

Basler aviator cameras are an ideal fit for a variety of applications including semiconductor and electronics manufacturing, traffic applications (ITS), metrology, or medical imaging.

#### Your benefits include:

- Excellent linearity, dynamic range, and noise level
- The best tap balance by performing individual tap calibration during production
- More than 25 camera features such as auto-gain, auto-exposure or the signal input debouncer support, easy system integration
- More than 100 megabytes of data per second and up to 100 meter cable length with GigE
- The widest bandwidth connection for maximum grabbing speed with Camera Link and compatibility with all common frame grabbers
- Additional opto-isolated I/Os for external devices (e.g., strobe) in the Camera Link models
- Rugged housing featuring safe locking connections and easy integration due to different mounting positions
- Field-proven pylon Camera Software Suite with both filter and performance drivers
- "ConiCam over Camera Link" or direct register access support
- Very attractive price/performance ratio

### TECHNICAL DETAILS

#### Specifications



Basler aviator	avA1000-100gm/gc	avA1600-80gm/gc	avA1600-50gm/gc	avA3200-38gm/gc
<b>Camera</b>				
Resolution (H x V pixels)	1024 x 1024	1600 x 1200	1920 x 1080	2320 x 1750
Sensor	KAI-04030	KAI-02050	KAI-07550	KAI-04030
Sensor Size (optical)	1/2"	2/3"	2/3"	1"
Sensor Technology	Progressive Scan CCD, global shutter			
Pixel Size	5.5 µm x 5.5 µm			
Frame Rate	107 fps	55 fps	51 fps	26 fps
Mono / Color	Mono / Color			
Video Output Format	Mono 8, Mono 12, Mono 12 Packed, YUV 4:2:2 Packed, YCrCb (4:2:2, YUVY) Packed, Bayer Gr B, Bayer Gr B, Bayer Gr B Packed			
Interface	Gigabit Ethernet (1000 Mbit/s)			
Synchronization	Via external trigger, via the Ethernet connection, or free-run			
Exposure Control	Via external trigger signal or programmable via the camera API			

#### Mechanical / Electrical

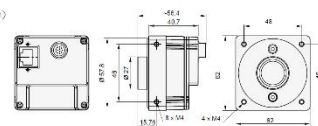
Housing Size (L x W x H)	40.7 mm x 62 mm x 62 mm			
Housing Temperature	Up to 50 °C			
Lens Mount	C-mount			
Digital I/O	2 opto-isolated input / 4 opto-isolated output			
Power Requirements	12 VDC (±5%) via 4-pin Hirose connector			
Power Consumption (typical)	5.6 W	5.6 W	5.6 W	6.5 W
Weight (typical)	<300 g			
Conformity	CE, FCC, RoHS, REACH			

#### Software / Driver

Driver	Basler pylon camera software suite or 3rd party GigE Vision Software			
Operating System	Windows, Linux - 32 bit and 64 bit			
Conformity	GigE Vision, GenICam			

Specifications are subject to change without prior notice. Latest specifications can be found on our website. Please visit [www.baslerwebcam.com/manuals](http://www.baslerwebcam.com/manuals) for the detailed camera User's Manual and [www.baslerwebcam.com/Handbook](http://www.baslerwebcam.com/Handbook) for information on third party software.

#### Dimensions (in mm)



# Annexe 3-2. Fiche technique de la caméra CMOS Photonfocus



## MV1-D2048-96-G2

The camera series MV1-D2048(I/C)-G2 is based on the CMOSIS CMV4000 CMOS image sensor

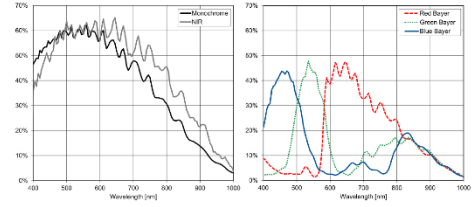
### Features

- CMOSIS CMV4000 CMOS image sensor
- 2048 x 2048 pixel resolution
- Good NIR spectral response
- Suitable for standard and low light applications
- Up to 22fps @ full resolution
- Global shutter
- Available in monochrome, NIR and color
- Extended sensor and camera features
- Up to 10bit greyscale resolution
- Boardlevel and OEM solution available
- GigEvision interface



## MV1-D2048-96-G2

### Quantum Efficiency Image Sensor



### Image Sensor Specifications

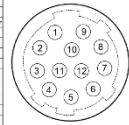
Manufacturer / Type	CMOSIS / CMV4000
Technology	CMOS
Optical format	1"
Optical diagonal	15.92mm
Resolution	2048 x 2048
Pixel size	5.5µm x 5.5µm
Active optical area	11.26mm x 11.26mm
Dark current	125e-/s
Read out noise	13e
Full well capacity / SNR	11ke / 105:1
Spectral range	Monochrome: < 350 to 950nm (to 10% of peak responsivity) NIR: < 300 to 1000nm (to 10% of peak responsivity) Color: < 350 to 670nm (to 10% of peak responsivity)
Responsivity	Monochrome: 1100 x 10 <sup>7</sup> DN / (J/m <sup>2</sup> ) @ 850nm / 8bit NIR: 900 x 10 <sup>7</sup> DN / (J/m <sup>2</sup> ) @ 850nm / 8bit Color: 857 x 10 <sup>7</sup> DN / (J/m <sup>2</sup> ) @ 540nm / 8bit
Quantum Efficiency	Monochrome: > 60% NIR: > 60% Color: > 45%
Optical fill factor	42% without micro lenses
Dynamic range	60dB
Characteristic curve	Linear, Piecewise linear
Shutter mode	Global shutter

### Camera Specifications

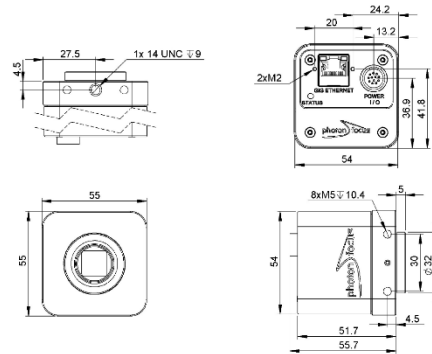
Interface	GigE
Frame rate	22fps
Pixel clock	48MHz
Camera taps	2
Greyscale resolution	8Bit / 10Bit
Fixed pattern noise (FPN)	< 1DN RMS @ 8Bit
Exposure time range	24µs - 349ms
Analog gain	yes
Digital gain	0.1 to 15.99 (FineGain)
Trigger Modes	Free running (non triggered), external Trigger, SWTrigger
Features	Configurable region of interest (ROI), Up to 8 regions of interest (MROI), Decimation in y-direction, 2 look-up tables (12-to-8Bit) on user-defined image region (Region-LUT), Constant frame rate independent of exposure time, Crosshairs overlay on the image, Temperature monitoring of camera, Camera information's readable over SDK, Ultra low trigger delay and low trigger jitter, Extended trigger input and strobe output functionality, Status line in picture
Operation temperature / moisture	0°C ... + 50°C / 20% ... 80%
Storage temperature / moisture	-25°C ... + 60°C / 20% ... 95%
Power supply	+12VDC (-10%) ... +24VDC (+10%)
Power consumption	< 5.1W
Lens mount	C-Mount (CS-Mount optional)
I/O inputs	2x Opto-Isolated 2x RS-422 Opto-Isolated
I/O Outputs	2x Opto-Isolated
Dimensions	55 x 55 x 52mm <sup>3</sup>
Mass	285g
Connector I/O (Power)	Hirose 12-pole (mating plug HR10A-10P-12S)
Connector interface	RJ-45
Conformity	CE / RoHS / WEEE
IP Code	IP20

### Connectors

Pin	I/O Type	Name	Description
1	PWR	CAMERA_GND	Camera GND 0V
2	PWR	CAMERA_PWR	Camera Power 12V ... 24V
3	I	ISO_OUT0	Default Sense out, normally Pulled up to ISO_PWR with 40k Resistor
4	I	ISO_IN0_N	IN0 differential input (I2: RS-422, HC: HTL), negative polarity
5	I	ISO_IN0_P	IN0 differential input (I2: RS-422, HC: HTL), positive polarity
6	PWR	ISO_PWR	Power supply 0V ... 24V for output signals
7	I	ISO_IN0	IN0 input signal
8	O	ISO_OUT1 (MOC)	DI output from PLC, no Pull up to ISO_PWR, can be used as additional output by adding Pull up as configurable switch (max. 150mA, no capacitive or inductive load) Default: Trigger HI
9	I	ISO_IN1(Trigger IN)	
10	I	ISO_IN1_N	IN1 differential input (I2: RS-422, HC: HTL), negative polarity
11	I	ISO_IN1_P	IN1 differential input (I2: RS-422, HC: HTL), positive polarity
12	PWR	ISO_GND	ISO GND 0V

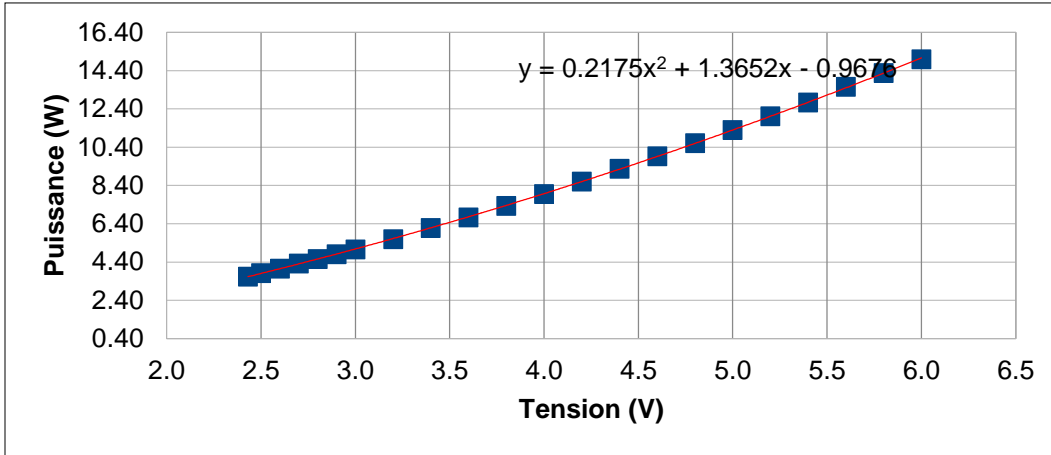


### Dimensions



### Annexe 3-3. Étude sur la lampe incandescente

Une étude préalable sur la lampe incandescente du microscope a été effectuée. L'ampoule incandescente a une température de couleur entre 2400 K et 2700 K, un courant max de 3A et une tension max de 6V.



Puissance de la lampe incandescente en fonction de la tension.



Photo de la manipulation avec le spectromètre.

#### Calculs des paramètres radiométriques

L'irradiance en  $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$  est :

$$I_{\text{reference}} = \tau_{\text{optique}} * \tau_{\text{fibre}} * \varepsilon(\lambda, T) * \frac{C_1}{\lambda^5 \left( \exp\left(\frac{C_2}{\lambda T}\right) - 1 \right)} * \Delta\lambda * d\Omega$$

$\tau_{\text{optique}}$  : facteur de transmission du système optique (perte de 4% par optique)

$\tau_{\text{fibre}} \approx 0.8$  : facteur de transmission de la fibre

$C_1$  : première constante de Planck =  $1,19 \cdot 10^8 \text{ W}\cdot\mu\text{m}^4\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sr}$ ,

$C_2$  : deuxième constante de Planck =  $14388 \mu\text{m}\cdot\text{K}$ ,

T en K dans la formule,  $\lambda$  en  $\mu\text{m}$  dans la formule.

$\Delta\lambda = 1.5 \text{ nm}$  : résolution du spectro.

$d\Omega$  : angle solide en sr

Pour le tungstène le facteur d'émission est :  $\varepsilon_\lambda = 0.42$ .

**Données :**

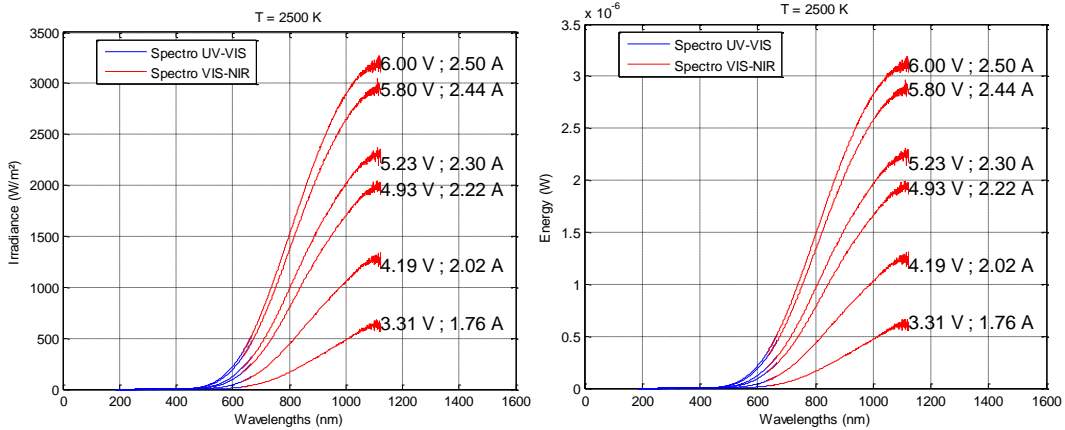
$\tau_{\text{optique}} = 0.96 ; \tau_{\text{fibre}} = 0.8 ; \Delta\lambda = 1.5 \text{ [nm]} ;$

$d\Omega = \frac{\pi * (\frac{\theta}{2})^2}{d^2} = \frac{\pi * (\tan\alpha * d)^2}{d^2}$ , avec  $\alpha = 13^\circ = 0.2269 \text{ rad}$  et  $n=1$ , on a donc  $ON = n * \sin\alpha = 0.2250$ .

Donc

$d\Omega = \pi * \tan(\alpha)^2 = 0.1675 \text{ [sr]}$  et  $\epsilon_\lambda = 0.42$ .

*Remarque : Surface d'un pixel du capteur : 125 μm x 7.8 μm*



Courbes de l'irradiance (W/m²) et de l'énergie (W) de la lampe incandescente.

Energie d'un photon :  $E_{1\text{photon}} = \frac{hc}{\lambda} \text{ [J]}$

Or  $E_T = \phi_\lambda * \text{temps [W.s]} = N_{\text{photons}} * E_{1\text{photon}} = N_{\text{photons}} * \frac{hc}{\lambda}$

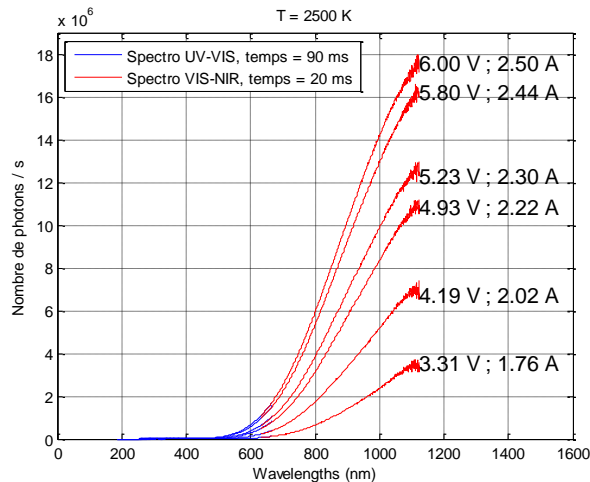
Avec  $\phi_\lambda = I_{\text{reference}} * \text{Surface\_pixel [W]}$

Donc

$N_{\text{photons}} = \phi_\lambda * (1 \text{ second}) * \frac{\lambda}{hc} \text{ [photons/s]}$

**Données :**

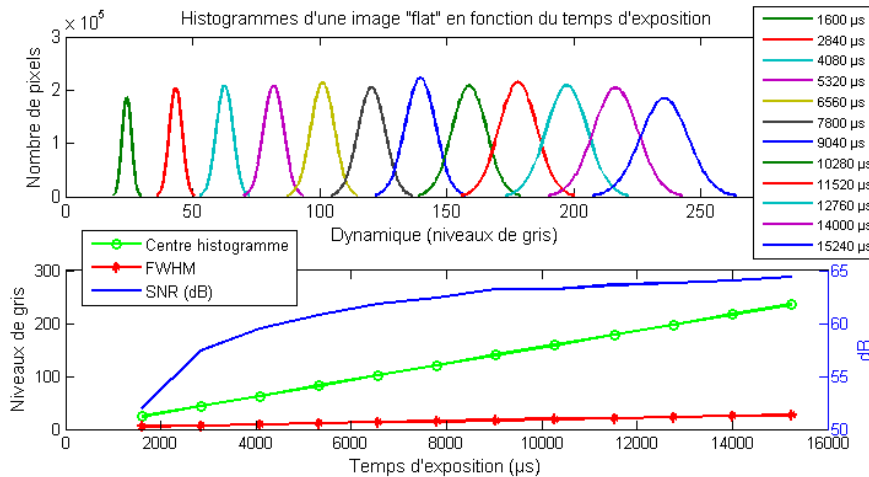
$h \approx 6,626 \ 069 \ 57 \times 10^{-34} \text{ [J} \cdot \text{s]} ; c = 3.00 \times 10^8 \text{ [m/s]} ; \text{Surface\_pixel} = 125 \times 7.8 \text{ [}\mu\text{m}^2\text{]}.$



Courbe du nombre de photons / s après calculs.

### Annexe 3-4. Comparaison du bruit des caméras CCD Basler et CMOS Photonfocus

Bruit spatial de la CCD Basler : en faisant varier le temps d'exposition de la CCD Basler, on peut obtenir les différents histogrammes en fonction d'une image « flat » (cf. figure ci-dessous).

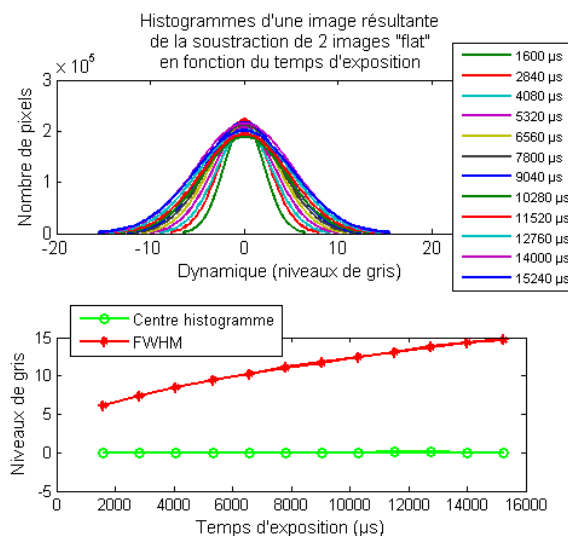


Histogrammes d'une image « flat » prise avec la CCD Basler à différents temps d'exposition.

Valeurs des courbes de la figure 3.

Tps exp. (µs)	1600	2840	4080	5320	6560	7800	9040	10280	11520	12760	14000	15240
μ (niv. gris)	24,11	43,35	62,61	81,89	101,19	120,45	139,69	158,91	178,06	197,32	216,54	235,69
FWHM (niv. gris)	5,08	6,94	9,05	11,07	13,00	15,02	16,72	19,03	20,92	22,95	24,91	26,65
SNR (dB)	51,93	57,44	59,48	60,81	61,83	62,43	63,25	63,25	63,62	63,83	64,04	64,39

Bruit temporel de la CCD Basler : en faisant la différence entre deux images « flat » prises consécutivement avec le même temps d'exposition, on obtient les résultats donnés dans la figure suivante.

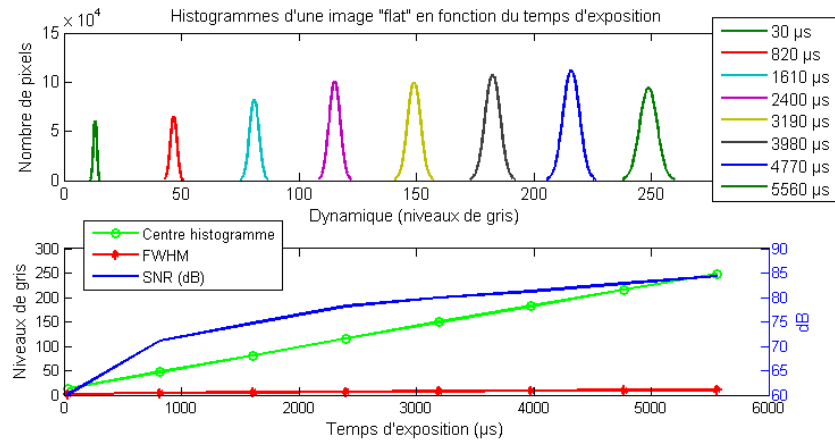


Histogrammes d'une image résultante de la soustraction de 2 images « flat » prise consécutivement avec la CCD Basler pour différents temps d'exposition.

Valeurs des largeurs à mi-hauteur des histogrammes de la figure 4.

Tps exp. ( $\mu\text{s}$ )	1600	2840	4080	5320	6560	7800	9040	10280	11520	12760	14000	15240
FWHM (niv. gris)	6,10	7,44	8,48	9,44	10,26	11,09	11,71	12,46	13,07	13,75	14,33	14,70

Bruit spatial de la CMOS Photonfocus : en faisant varier le temps d'exposition de la CMOS Photonfocus, on peut obtenir les différents histogrammes en fonction d'une image « flat » (cf. figure ci-dessous).

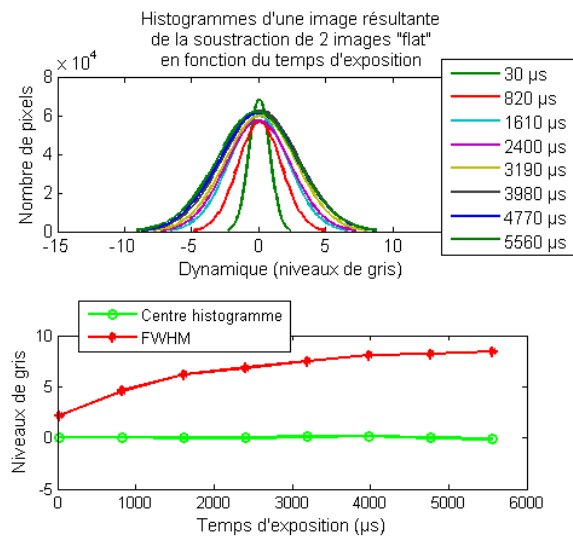


Histogrammes d'une image « flat » prise avec la CMOS Photonfocus à différents temps d'exposition.

Valeurs des courbes de la figure 5.

Tps exp. ( $\mu\text{s}$ )	30	820	1610	2400	3190	3980	4770	5560
$\mu$ (niv. gris)	13,24	46,67	81,01	115,21	149,04	182,47	215,92	248,82
FWHM (niv. gris)	1,86	3,76	5,46	6,53	7,73	8,91	9,68	10,35
SNR (dB)	60,07	71,16	74,73	78,21	79,98	81,19	82,89	84,38

Bruit temporel de la CMOS Photonfocus : en faisant la différence entre deux images « flat » prises consécutivement avec le même temps d'exposition, on obtient les résultats donnés dans la figure suivante.

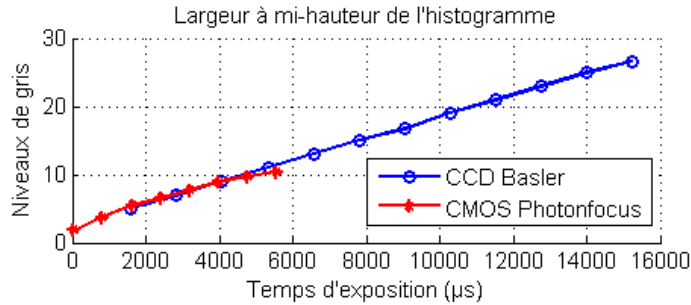


Histogrammes d'une image résultante de la soustraction de 2 images « flat » prise consécutivement avec la CMOS Photonfocus pour différents temps d'exposition.

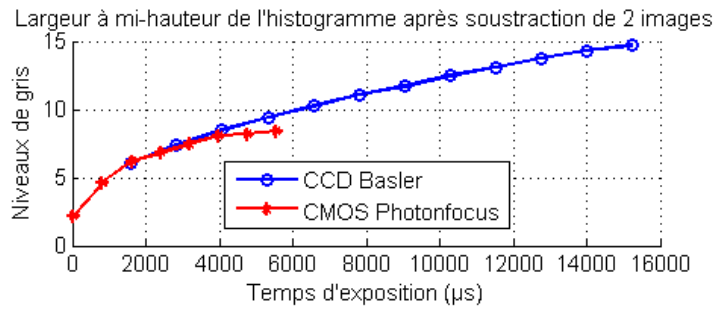
Valeurs des courbes de la figure 6.

Tps exp. ( $\mu$ s)	30	820	1610	2400	3190	3980	4770	5560
FWHM (niv. gris)	2,18	4,60	6,22	6,83	7,48	8,07	8,22	8,43

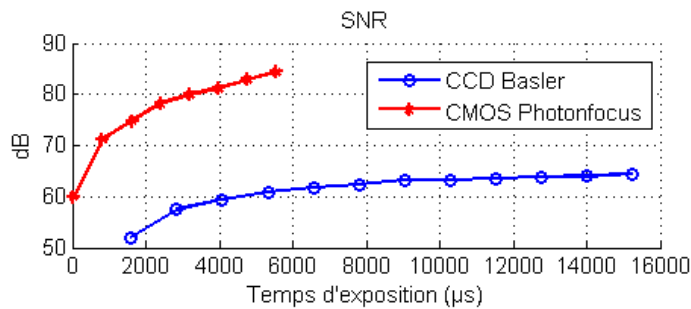
En comparant les largeurs à mi-hauteurs et les SNR des deux caméras, on peut obtenir les courbes présentées sur les figures ci-dessous.



Largeurs à mi-hauteur des histogrammes d'une image « flat » en fonction du temps d'exposition de la caméra CCD Basler et CMOS Photonfocus.



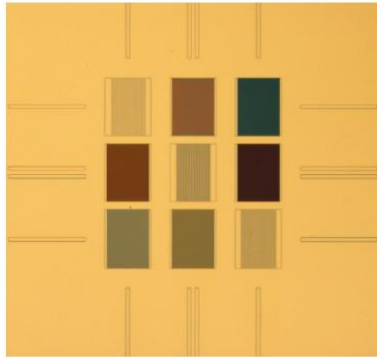
Largeurs à mi-hauteur des histogrammes d'une image résultante de la soustraction de 2 images « flat » prise consécutivement en fonction du temps d'exposition de la caméra CCD Basler et CMOS Photonfocus.



SNR d'une image « flat » en fonction du temps d'exposition de la caméra CCD Basler et CMOS Photonfocus.



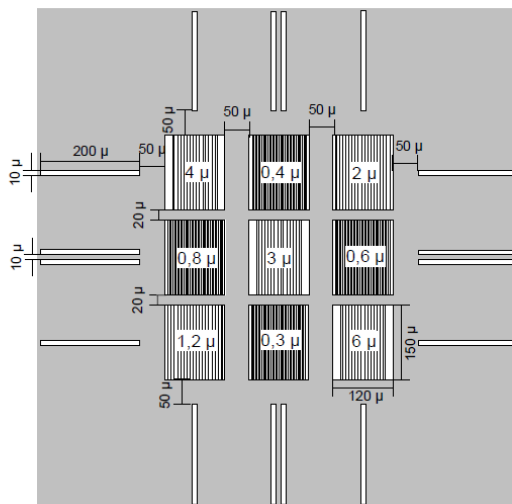
## Annexe 4. RS-N resolution standard



Resolution Standard  
Type RS-N

### 1. Structure

The standard can be used generally as a set of gratings. Especially it is developed as a resolution standard to serve the determination of the short wavelength cutoff of interferential and confocal microscopes allowing to compare results of these instruments with results of mechanical instruments.



The resolution standard of type RS-N consists of a set of 9 gratings, these are areas with different pitch values. The range of the pitch values lasts from 0.3  $\mu\text{m}$  to 6  $\mu\text{m}$  with the subdivision 0.4-0.6-0.8-1.2-2.0-3.0-4.0  $\mu\text{m}$ . The widths of the grooves of the gratings are approximately equal to the space between the grooves.

Each grating is neighbored by two broader adjacent grooves for the comparison of the depth. To support the finding of the small field of the gratings (460  $\mu\text{m}$   $\times$  490  $\mu\text{m}$ ) 8 grooves and 4 double grooves (each 4 resp. 2 horizontal and vertical) are realised.

The standards with a size of 10 mm  $\times$  10 mm are made out of Si wafers of {100}-orientation (thickness 525  $\mu\text{m}$ ). All grooves of the resolution standard should have the same or a similar depth. They are dry etched up to the nominal depth of 190 nm. This process produces nearly vertical sidewalls. The depth is smaller in the narrow grooves (140 nm for pitch = 0.3 nm).



SiMETRICS GmbH  
www.simetrics.de  
info@simetrics.de

Resolution Standard  
RS-N

## 2. Operation procedure

### 2.1 Use for validating interference or confocal microscopes

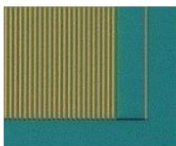
The short wavelength cutoff is an important parameter that needs to be considered when surface topography is evaluated. This especially holds true in cases when different measurement techniques are compared with each other. Within the field of different contact stylus instruments a certain degree of unification is achieved by the  $\lambda_s$ -filter in the signal processing according to ISO 3274. However, among the optical topography measuring instruments (like interference microscopes, confocal microscopes, micro fringe projection) there is some confusion in the meaning of the short wavelength limitation.

The applications of the standard described here are derived from the guideline VDI 2655-1 (Optical measurement and micro topographies: Calibration of interference microscopes and depth measurement standards for roughness measurement, 2005).

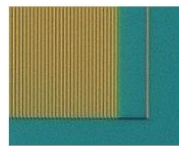
In a first step the user has to measure the depth of a groove for which the wavelength is well within the transfer band (e. g. in an adjacent groove about 190 nm). This is like the use of a depth measurement standard. In a second step that grating section has to be found out for which the measured depth is clearly smaller (e. g. the half, about 95 nm) than the long wavelength depth.

### 2.2 Use for validating the lateral resolution of optical microscopes

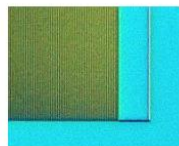
The magnitude of an object which can be observed in an optical microscope depends on the wavelength  $\lambda$  of the light and the numerical aperture  $A$  of the objective. Commonly two points can be resolved if the distance between them is larger than  $\lambda$ . The pictures illustrate the resolution limit of about 400 nm of an objective with  $A = 0.90$  (magnification 100x). The grooves with a pitch of 0.3  $\mu\text{m}$  cannot be resolved.



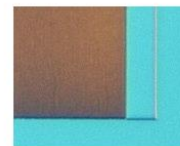
pitch 0.8  $\mu\text{m}$



pitch 0.6  $\mu\text{m}$



pitch 0.4  $\mu\text{m}$



pitch 0.3  $\mu\text{m}$

Concerning the depth and pitch values the standard is available with a calibration certificate of the PTB (PTB: Physikalisch-Technische Bundesanstalt, the national metrology institute of Germany). These values can be certificated within different regions.



SiMETRICS GmbH  
www.simetrics.de  
info@simetrics.de

Resolution Standard  
RS-N

### 3. Packaging, Handling and Cleaning

For a better handling the standards are mounted on borosilicate glass with a size of 5 cm x 5 cm as substrate. Further sizes are possible on request. The chips are mounted by an epoxy resin adhesive.

The standards are stored in a membrane box. The grating does not come into contact with the membrane.

Do not touch the standard especially the regions destined for measuring and calibration. Use suitable (plastic) tweezers for handling.

For cleaning the resolution standards please contact SiMETRICS for a cleaning process.

### 4. Assortment and Specification

Type	Nominal etch depth (nm)
<b>RS-N</b>	190

Pitch (µm)	Typical depth (nm)	Number of pitches	Field size of grating (µm x µm)	Width of adjacent grooves (µm)
0.3	140	366.67	110 x 150	5
0.4		275	110 x 150	5
0.6	160	183.3	110 x 150	5
0.8		137.5	110 x 150	5
1.2	192	91.67	110 x 150	5
2.0	192	55	110 x 150	5
3.0		30	90 x 150	15
4.0	192	22.5	90 x 150	15
6.0	192	15	90 x 150	15



SiMETRICS GmbH  
www.simetrics.de  
info@simetrics.de

**Resolution Standard  
RS-N**

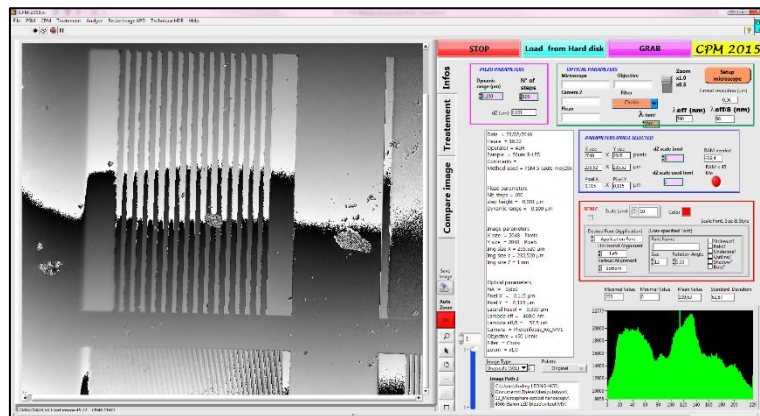
## Annexe 5. Améliorations du logiciel « CSI 2105 » en LabVIEW

Tout au long de ces trois années de thèse, j'ai participé à l'amélioration du logiciel d'instrumentation pour piloter plusieurs microscopes interférométriques (Leitz Linnik, Leica DMR-X et Fogale modifiés ainsi qu'un microscope « Thorlabs » dont les éléments optiques ont été assemblés par Rémy Claveau) développé en LabVIEW 2014 et IMAQ VISION sous Windows 7 (64 bits) sur un HP Z800 Workstation (Intel Xeon, 2,4 GHz, 8 Go de RAM) pour la caractérisation de rugosités surfaces et pour faire de la tomographie des couches transparentes ( $< 20 \mu\text{m}$ ).

Les différentes versions du logiciel "CPM 2011", "CPM 2014" et actuellement "CSI 2015" ont été développées par Audrey Leong-Hoi, Freddy Anstotz, Paul Montgomery et Denis Montaner. Une version "CSI 2016" est en cours de réalisation avec Stéphane Perrin.

Dans la version "CSI 2015" :

- J'ai optimisé le programme principal en utilisant la fonction "event structure". J'ai modifié la face-avant du logiciel (*front panel*) pour qu'elle soit plus ergonomique, plus intuitive et plus simple d'utilisation.



Nouvelle interface du logiciel CSI 2015

- Avec la nouvelle version du logiciel, il est maintenant possible de contrôler les différents microscopes, caméras, objectifs et platines piézoélectriques.
- Un programme de calibration automatique du système a été réalisé afin de mesurer la taille d'un pixel, puisque celle-ci dépend du microscope, de la caméra et de l'objectif utilisés.
- Une base de données a été créée afin de sauvegarder les tailles de pixels mesurées en fonction du microscope, de la caméra et de l'objectif, afin de pouvoir les récupérer automatiquement lorsque l'on change un des éléments du système.
- De nouvelles fonctions de réduction de bruit ont été intégrées au logiciel (moyennage, corrections *Dark* et *Flat*, HDR).
- Dans le programme "Line Profile" dans lequel des mesures de profils sont effectuées, il est désormais possible de corriger une pente, de faire le profil d'une image de phase, de dérouler la phase et de corriger une courbure. De plus, une option permet de trouver la période du profil en passant par une transformée de Fourier rapide.
- Le programme pour les mesures en PSM a été modifié afin de pouvoir choisir la position de la table piézo-électrique pour le début des acquisitions.
- Un programme générant des mesures avec l'algorithme PSM à 5 sauts en temps réel a été créé.

---

# Curriculum Vitae détaillé

---

## INFORMATIONS PERSONNELLES

Audrey LEONG-HOI  
Née le 04/03/1990

E-mail : [audrey.leonghoi@gmail.com](mailto:audrey.leonghoi@gmail.com)  
Permis de conduire : B

## DIPLOMES

- 2013 Diplôme du Master (M2) – Spécialité Nanophotonique**  
*Télécom Physique Strasbourg, Strasbourg (67) - France*
- 2013 Diplôme d'ingénieur : Télécom Physique Strasbourg**  
(Anciennement : Ecole Nationale Supérieure de Physique de Strasbourg)  
*Strasbourg (67) - France*
- 2012 CLES 2 Allemand – Niveau B1**  
*Strasbourg (67) - France*
- 2010 Attestation du parcours de formation en classe préparatoire aux grandes écoles dans la filière Mathématiques-Physique (MP)**  
*Lycée Leconte De Lisle, Saint-Denis – la Réunion (974)*
- 2008 Double Baccalauréat :**  
Baccalauréat Série S, section Abibac (Allemand), mention Bien  
Abitur (Diplôme équivalent au Baccalauréat allemand)  
*Lycée Leconte De Lisle, Saint-Denis – la Réunion (974)*

## EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

- 2013 – 2016 › **DOCTORANTE** › *LABORATOIRE ICUBE UDS-CNRS UMR 7357*
- › Sujet de thèse : « Etude des techniques de super-résolution pour améliorer la résolution latérale en microscopie interférométrique ».
  - › Directeurs de thèse : Paul MONTGOMERY (ICube) et Bruno SERIO (LEME, Université Paris Ouest Nanterre).
  - › Résumé : L'objectif de ma thèse est d'étudier et d'implémenter des techniques de super-résolution pour améliorer la résolution latérale du microscope interférométrique en lumière blanche disponible au laboratoire. Je suis également chargée de modifier le programme LabVIEW initial dans le but de pouvoir contrôler les trois microscopes disponibles au laboratoire, ainsi que de créer un programme permettant de calibrer les microscopes.
- Strasbourg (67) – France

MARS 2013 – JUILLET 2013 (5 MOIS) › **STAGIAIRE** › LABORATOIRE ICUBE UDS-CNRS  
UMR 7357

- > Sujet de fin d'étude : « Etude et développement d'un système de reconstruction tridimensionnelle de surface par microscopie sous illumination structurée ».
- > Responsable : Bruno SERIO.
- > Résumé : Le projet consistait à développer un système de mesure optique en utilisant un projecteur pico DLP pour la projection de franges et une caméra CCD pour l'acquisition des images. Un algorithme de reconstruction de la phase absolue d'un objet macroscopique puis microscopique a été développé puis implémenté. Pour mon projet, toutes les étapes nécessaires à la reconstruction ont été automatisées à l'aide du logiciel LabVIEW.

Strasbourg (67) – France

JUIN 2012 – AOUT 2012 (3 MOIS) › **STAGIAIRE** › LEICA GEOSYSTEMS (HEXAGON  
TECHNOLOGY CENTER

- > Sujet de stage : « Caractérisation d'un interféromètre de référence ».
- > Responsable : Alexandre PADUCH.
- > Résumé : Le projet « Optical Probe » dans lequel j'ai effectué mon stage consistait à remplacer la tête mécanique d'une machine à mesurer tridimensionnelle par une tête optique. La mesure en 3D d'un objet se fera donc sans contact, en utilisant la méthode du temps de vol. Ainsi, en envoyant un faisceau laser sur un objet, le faisceau est réfléchi par celui-ci et la distance entre la source et l'échantillon à mesurer est calculée. Des tests et des mesures de répétabilité ont été effectués afin de déterminer la taille de l'étalon de référence en Zéro dur qui doit être utilisé dans la tête optique.

Heerbrugg – Suisse

JANVIER 2011 – AVRIL 2012 (15 MOIS) › **RESPONSABLE COMMUNICATION** ›  
TELECOM PHYSIQUE STRASBOURG

- > Projet ingénieur : « Call by Localization ».
- > Clients : Oliver DITRIECH, François SCHMUTZ et Maxime DIDAOUI.
- > Résumé : Le projet portait sur la création d'une application pour le téléphone "My IC Phone" d'Alcatel-Lucent, permettant d'appeler un bureau en cliquant sur la salle correspondante affichée à l'écran. Une base de données, d'un serveur Apache et d'un site web représentant l'interface du téléphone a été créée. Les langages de programmation utilisés sont : HTML & CSS, PHP et JavaScript.

Strasbourg (67) – France

JUILLET 2011 – AOUT 2011 (1 MOIS) › **STAGIAIRE** › PHARMACIE « PAILLE-EN-  
QUEUE NORD »

- > Activités : Rangements des médicaments et gestion des stocks.

Saint-Denis – La Réunion (974) – France

ETES 2007 – 2008 › **EMPLOYEES** › SUPERETTE D'ALIMENTATION GENERALE  
« REUNIPRIX »

- > Activités : « Vente de pâtisseries et mise en rayon. Contact avec la clientèle.

Saint-Denis – La Réunion (974) – France

## MISSION ENSEIGNEMENT ET ENCADREMENT

- Travaux pratiques, 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> années d'école d'ingénieurs (M1), Instrumentation et mesures (LabVIEW), 176h.
- Travaux pratiques, 1<sup>ère</sup> année d'école d'ingénieurs, Outils numériques (Matlab), 16h.
- Formation interne, Doctorants, Formation sur les bases du logiciel LabVIEW donnée aux membres de l'équipe.
- Encadrement, M1, 2 projets ingénieurs pour la manipulation du logiciel LabVIEW.
- Encadrement d'un stagiaire de 1 mois, 1<sup>ère</sup> année d'école d'ingénieurs, Première rencontre avec la microscopie 3D.
- Présentation, lycéens de 2<sup>nd</sup>, la microscopie 3D.
- Présentation et travaux pratiques, Collégiens de 6<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup>, Opération « Kids University » organisée par le Jardin des Sciences : la microscopie optique et microscopie interférométrique 3D.

THÈMES DE RECHERCHE	COMPÉTENCES	LANGUES
<ul style="list-style-type: none"><li>• Microscopie multimodale</li><li>• Super-résolution</li><li>• Nanoscopie 3D</li><li>• Traitements d'images</li></ul> <p>Mots clés : Microscopie 3D interférométrique super-résolue, Traitements d'images, Labview, Matlab, Optique, Photonique.</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>• LabVIEW, Matlab</li><li>• Notions en CodeV, Comsol, Lighttools</li><li>• Gimp</li><li>• Word, Powerpoint, Excel</li><li>• LaTeX</li><li>• Zotero</li><li>• AutoCAD</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Anglais : écrit, lu, parlé (TOEIC : 815)</li><li>• Allemand : écrit, lu, parlé (Abitur et B1)</li><li>• Chinois (Cantonais) : parlé (quelques notions)</li></ul>

## ACTIVITÉ EN MATIÈRE D'ADMINISTRATION ET D'AUTRES RESPONSABILITÉS COLLECTIVES

- Responsable des doctorants de l'équipe IPP et membre du conseil des doctorants du laboratoire ICube.
- Membre du conseil du laboratoire ICube.
- Membre du conseil Ecole de Télécom Physique Strasbourg.
- Membre du conseil de perfectionnement de Télécom Physique Strasbourg.
- Participation active à la vie de l'équipe IPP et du laboratoire : organisations et participations à des séminaires, organisations de réunions des doctorants de l'équipe, des AG et autres évènements, participation à la gestion du wiki de l'équipe, inventaire etc.





---

# Publications et communications

---

- 5 articles dans des revues internationales avec comité de lecture (dont 3 en premier auteur).
- 12 communications internationales avec actes (dont 4 en premier auteur, 1 présentation orale et 1 présentation poster).
- 4 communications nationales ou francophones avec actes (dont 2 en premier auteur, 2 présentations poster).
- 1 communication internationale sans acte.
- 7 publications en cours (articles dans des revues internationales avec comité de lecture, dont 1 en premier auteur).

---

## ARTICLES DANS DES REVUES INTERNATIONALES AVEC COMITE DE LECTURE

---

- A. Leong-Hoï, P. C. Montgomery, B. Serio, W. Uhring, E. Pecheva, Improvement in measurements of hydroxyapatite layers by hybrid high dynamic range image processing in white-light interferometry, *Materials today: proceedings*, 2016.
- P. Montgomery, A. Leong-Hoï, F. Anstotz, D. Mitev, L. Pramatarova, O. Haeberle. From superresolution to nano-detection: overview of far field optical nanoscopy techniques for nanostructures, *Journal of Physics: Conference Series*, IOP Publishing, Vol. 682:012010, février 2016. ( SNIP : 0.247, SJR : 0.211 )
- A. Leong-Hoï, P. Montgomery, B. Serio, P. Twardowski, W. Uhring. High-dynamic-range microscope imaging based on exposure bracketing in full-field optical coherence tomography, *Optics Letters*, Optical Society of America, Vol. 41(7):1313, 2016. ( IF : 3.04, SNIP : 1.532, SJR : 2.397 )
- P. Montgomery, A. Leong-Hoï. Emerging optical nanoscopy techniques, *Nanotechnology, Science and Applications*, Dove Medical Press, Vol. 2015:8:31–44, septembre 2015. ( SNIP : 3.666, SJR : 2.078 ). Video: [http://youtu.be/\\_IU2jATHQwA](http://youtu.be/_IU2jATHQwA)
- A. Leong-Hoï, P. Montgomery, B. Serio, P. Twardowski. High speed implementation of a three-dimensional shape profiler with submillimeter precision using a digital light processing device and a new efficient algorithm for absolute phase retrieval, *Optical Engineering*, Society of Photo-optical Instrumentation Engineers (SPIE), Vol. 54(3):034102-034102, 2015. ( IF : 0.984, SNIP : 0.85, SJR : 0.485 )

- P.C. Montgomery, S. Lecler, A. Leong-Hoï & P Pfeiffer, 3D nano surface profilometry by combing the photonic nanojet with interferometry, 19th INTERNATIONAL SCHOOL ON CONDENSED MATTER PHYSICS, Advances in Nanostructured Condensed Matter: Research and Innovations, Varna, Bulgaria, 2016.
- P.C. Montgomery, P. Chapuis, A. Leong-Hoï, F. Anstotz, A. Rubin, J. Bachnagel, C. Gauthier, G. Reiter & G.B. McKenna, Optical nanoscopy characterization of nanofilms, WG4-Workshop “Membrane and Liquid Crystal Nanostructures“ (ME-LI-NA 2016), Bulgaria, 2016.
- T. Hikov, E. Pecheva, P. Montgomery, F. Antoni, A. Leong-Hoï, T. Petrov, Precise femtosecond laser ablation of dental hard tissue: preliminary investigation on adequate laser parameters, the 19th International School of Condensed Matter Physics, Bulgaria, 2016.
- G.Gianto, P. Montgomery, F. Salzenstein, A. Leong-Hoï, Study of robustness of 2D fringe processing in Coherence Scanning Interferometry for the characterization of a transparent polymer film, ICA, Indonesia, 2016.
- A. Leong-Hoï, P. Montgomery, B. Serio, W. Uhring, E. Pecheva. Improvement in measurements of hydroxyapatite layers by hybrid high dynamic range image processing in white-light interferometry, dans *EMR-S - Nanomaterials, Light interaction with nanomaterials*, Lille, France, mai 2016.
- A. Leong-Hoï, R. Claveau, P. Montgomery, B. Serio, W. Uhring, F. Anstotz, M. Flury. High resolution full-field optical coherence tomography using high dynamic range image processing, dans *Optical Micro- and Nanometrology, SPIE Photonics Europe*, SPIE (Eds.), Bruxelles, Belgium, avril 2016.
- P. Montgomery, A. Leong-Hoï, F. Anstotz, H. Liu, B. Simon, M. Debailleul, O. Haeberle. Overview of unlabelled far field optical nanoscopy techniques for nanometrology, dans *Optical Micro- and Nanometrology, SPIE Photonics Europe*, Bruxelles, Belgium, avril 2016.
- M. Husneni, A. Leong-Hoï, R. Claveau, P. Montgomery, F. Anstotz. Performance comparison of air and immersion Linnik objectives in coherence scanning interferometry, dans *The 9th International Conference on Nanophotonics (ICNP 2016)*, Taipei, Taiwan, mars 2016.
- P. Montgomery, A. Leong-Hoï, F. Anstotz, D. Mitev, L. Pramatarova, O. Haeberle. From superresolution to nano-detection: overview of far field optical nanoscopy techniques for nanostructures, dans *Light in Nanoscience and Nanotechnology (LNN 2015)*, Hissar, Bulgaria, octobre 2015.
- A. Leong-Hoï, R. Claveau, M. Flury, W. Uhring, B. Serio, F. Anstotz, P. Montgomery. Detection of defects in a transparent polymer with high resolution tomography using white light scanning interferometry and noise reduction, dans *SPIE Optical Metrology 2015*, Vol. Proc. SPIE 9528:952807, Munich, Germany, juin 2015.
- A. Leong-Hoï, B. Serio, P. Twardowski, P. Montgomery. Three-dimensional surface reconstruction by combining a pico-digital projector for structured light illumination and an imaging system with high magnification and high depth of field, dans *SPIE Photonics Europe, Proceedings of the Society of Photo-optical Instrumentation Engineers*, Vol. 9132(913219), C. Gorecki, A.K. Asundi, W. Osten (Eds.), Bruxelles, Belgium, avril 2014.

## COMMUNICATIONS NATIONALES OU FRANCOPHONES AVEC ACTES

---

- P. Montgomery, A. Leong-Hoï, R. Claveau, F. Salzenstein. Amélioration des performances en Full-Field OCT par traitement d'images pour la caractérisation d'un film de polymère, dans *Journées Imagerie Optique Non Conventionnelle (JIONC), GDR ISIS & GDR ONDES*, Paris, France, mars 2016.
- R. Claveau, A. Leong-Hoï, W. Uhring, M. Flury, B. Serio, P. Montgomery. Algorithmes de réduction de bruit en tomographie interférométrique à haute résolution pour la détection de pores dans un polymère transparent, dans *Mesures et techniques optiques pour l'industrie (CMOI)*, Lannion, France, novembre 2015.
- A. Leong-Hoï, P. Montgomery, P. Pfeiffer, F. Anstötz. Les techniques émergentes de nanoscopie optique, dans *XXIIIe congrès général de la Société Française de Physique (SFP)*, Strasbourg, France, août 2015.
- A. Leong-Hoï, P. Montgomery, B. Serio, P. Twardowski. La nanoscopie en champ lointain, dans *18ème conférence Horizons de l'Optique, Optique Bretagne 2015*, Rennes, France, juillet 2015.

## COMMUNICATIONS INTERNATIONALES SANS ACTES

---

- F. Le Normand, F. Antoni, F. Aweke, D. Muller, S. Zafeiratos, W. Luo, J. Hulik, P. Pfeiffer, A. Leong-Hoï, R. Claveau, M. Abdesselam, P. Montgomery. Graphene-based films on Diamond Like Carbon: preparation, characterization and optoelectronics, dans *E-MRS Spring Meeting Symposium EE: Carbon- and Nitrogen-Containing Nanostructured Thin Films*, European Materials Research Society (Eds.), Lille, France, mai 2016.
- P. Montgomery, A. Leong-Hoï, R. Claveau, M. Flury, F. Anstötz, H. Liu, B. Simon, M. Debailleul, O. Haeberle. Review of label-free far field optical nanoscopy techniques for the characterization of nanomaterials, dans *Energy, Materials, Nanotechnology (EMN) 2D Materials Meeting*, San Sebastian, Spain, mai 2016.

## PUBLICATIONS EN COURS

---

- I. Kassamakov, P. Montgomery, A. Nolvi, S. Lecler, A. Leong-Hoï and E. Hægström, 3D Superresolution Label-free Imaging, en préparation.
- P.C. Montgomery, S. Lecler, A. Leong-Hoï & P Pfeiffer, 3D nano surface profilometry by combing the photonic nanojet with interferometry, *Journal of Physics: Conference Series*, IOP Publishing, 2016.
- P.C. Montgomery, A. Leong-Hoï, S. Lecler, & P Pfeiffer, Profilométrie nanoscopique par la combinaison du jet photonique avec l'interférométrie, *Mesures et techniques optiques pour l'industrie (CMOI)*, Le Mans, France, 2017.
- S. Perrin, A. Leong-Hoï, S. Lecler, P. Pfeiffer, I. Kassamakov, A. Nolvi, E. Haeggström, P. C. Montgomery, 3D nanoscopy: white light interferometry using a photonic jet lens, *Optica*, 2017

- P.C. Montgomery, S. Lecler, A. Leong-Hoi, S. Perrin, P. Pfeiffer, Sub-diffraction surface topology measurement using a microsphere assisted Linnik interferometer, SPIE, Optical Measurement Systems for Industrial Inspection (OM101), Munich, Juin 2017.
- S. Perrin, A. Leong-Hoi, S. Lecler, P. C. Montgomery, Impact of the coherence on the ultramicroscopy technique, SPIE, Conference Modeling Aspects in Optical Metrology (Conference OM102), Munich, Juin 2017.
- P. Chapuis, P.C. Montgomery, F. Anstotz, A. Leong-Hoi, C. Gauthier, J. Bachnagel, G. Reiter, G.B. McKenna, A. Rubin, Viscoelastic Properties of Ultrathin Polymer Films, RSI.



## Résumé

Ce manuscrit de thèse présente l'étude des techniques de super-résolution latérale en nanoscopie optique, qui est une des nouvelles techniques d'imagerie haute résolution, aujourd'hui largement utilisée en biophysique et en imagerie médicale, pour imager et caractériser des nanostructures, tout en conservant les avantages de l'imagerie optique en champ lointain comme un vaste champ, la visualisation et l'analyse en temps réel... Un des défis futurs de la microscopie 3D super-résolue est d'éviter l'utilisation des marqueurs fluorescents. La microscopie interférométrique fait partie des techniques d'imagerie 3D sans marquage permettant la détection de nanostructures. Pour améliorer le pouvoir de détection de ce système optique, un premier protocole de traitement d'images a été développé et implémenté, permettant ainsi de révéler des structures initialement non mesurables. Puis, pour améliorer la résolution latérale du système, une nouvelle technique combinant l'interférométrie et le principe du nano-jet photonique a été développée permettant l'observation d'objets de taille inférieure à la limite de diffraction de l'instrument optique.

**Mots-clés :** Super-résolution, Nanoscopie optique, Microscopie interférométrique, FF-OCT, Nano-détection, techniques de traitement d'images, Rapport signal à bruit, Reconstruction 3D, Lentille par nano-jet photonique, Amélioration de la résolution latérale.

## Résumé en anglais

This manuscript presents the study of the lateral super-resolution techniques in optical nanoscopy, which is a new high-resolution imaging method now widely used in biophysics and medical imaging, to observe and measure nanostructures, with the advantages of far field optical imaging, such as a large field of view, visualization and analysis in real time... One of the future challenges of 3D super-resolution microscopy is to avoid the use of fluorescent markers. Interferometric microscopy is a 3D label-free imaging technique enabling the detection of nanostructures. To improve the detection capability of this optical system, a first version of a protocol composed of image processing methods was developed and implemented, revealing structures initially unmeasurable. Then, to improve the lateral resolution of the system, a new technique combining interferometry and the principle of the photonic nano-jet has been developed, thus allowing the observation of objects of a size smaller than the diffraction limit of the optical instrument.

**Keywords:** Super-resolution, Optical nanoscopy, Interference microscopy, Full-field optical coherence tomography, Nano-detection, Image processing techniques, Signal-to-noise ratio, 3D reconstruction, Photonic nano-jet lens, Lateral resolution improvement.