



HAL
open science

IMAGERIE OPTIQUE MICROSCOPIQUE EN 3D Calcul de la Réponse Impulsionnelle Optique en Microscopie de Fluorescence.

Haeberlé Olivier

► **To cite this version:**

Haeberlé Olivier. IMAGERIE OPTIQUE MICROSCOPIQUE EN 3D Calcul de la Réponse Impulsionnelle Optique en Microscopie de Fluorescence.. Master. 2013. sfo-00845218

HAL Id: sfo-00845218

<https://hal-sfo.ccsd.cnrs.fr/sfo-00845218>

Submitted on 16 Jul 2013

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

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

IMAGERIE OPTIQUE MICROSCOPIQUE EN 3D

Calcul de la Réponse Impulsionnelle Optique en Microscopie de Fluorescence.

Olivier Haeberlé

*Laboratoire MIPS – EA2332, Université de Haute-Alsace
IUT de Mulhouse, 61 rue Albert Camus, F-68093 MULHOUSE Cedex, FRANCE*

olivier.haeberle@uha.fr

Résumé :

Le microscope optique est devenu un instrument-clé pour la compréhension des mécanismes biologiques, grâce à ces possibilités uniques d'imagerie en 3D, sur des spécimens vivants. Son champ d'utilisation s'étend aussi à d'autres domaines comme la physique des surfaces et interfaces, la métallurgie, la cristallographie ou la pétrographie, le contrôle non destructif et l'inspection qualité.

Sa résolution reste cependant limitée quand on la compare aux résultats obtenus en microscopie électronique, ou par les techniques de microscopie en champ proche (électronique ou optique).

De nombreux groupes travaillent donc à l'amélioration de la résolution de cet instrument, ce qui requiert une parfaite compréhension des mécanismes de formation des images.

Ce cours a pour but de montrer comment se calcule la limite de résolution en microscopie de fluorescence « classique »

Mots clés :

Microscopie Optique, Diffraction, Résolution, Mécanisme de Formation d'Images, Réponse Impulsionnelle Optique.

Pré-requis :

Ce cours de master peut se lire à deux niveaux :

- le lecteur peu familier avec les calculs de diffraction pourra se contenter des passages de texte et des équations principales, qui concluent les paragraphes, et utilisera les logiciels cités.
- le lecteur plus spécialiste du domaine (licence-master avec de bonnes bases en optique diffractive) trouvera toutes les étapes nécessaires à l'établissement des intégrales de diffraction permettant le calcul des réponses impulsionnelles optiques en fluorescence.

1. MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE

1.1. Principe

Dans un microscope optique, l'image est formée par les photons en provenance de l'objet. Ces photons peuvent être de deux types. Les photons émis par une source de lumière d'éclairage peuvent être simplement transmis (microscopie en transmission) ou réfléchis (microscopie en réflexion pour la métallographie par exemple) par l'objet.

En microscopie de fluorescence, le phénomène d'émission de lumière par l'objet est fondamentalement différent. Le passage d'une molécule d'un niveau d'énergie bas à un état excité (niveau d'énergie supérieur) se fait par absorption d'énergie.

Dans le cas de la microscopie de fluorescence, cet apport d'énergie est accompli par les photons émis par une source d'excitation, lampe à mercure ou krypton, ou laser. Pour revenir à son état bas, la molécule doit perdre cette même quantité d'énergie. Dans certains cas, cette perte d'énergie se fait partiellement par une émission photonique. Si la longueur d'onde de cette dernière se trouve dans la partie visible du spectre, il y a luminescence. Ce phénomène est de deux types, selon la durée séparant l'absorption de la réémission. Si cette durée est faible, on parle de fluorescence, si cette durée est plus importante, on parle de phosphorescence.

L'électron une fois excité perd cependant toujours une partie de son énergie sous forme de vibrations moléculaires ou de collisions avec d'autres électrons. En conséquence, l'énergie réémise sous forme lumineuse est inférieure à l'énergie d'excitation et la longueur d'onde d'émission est donc plus élevée : on observe à une longueur d'onde différente de la longueur d'onde d'« éclairage ». La Figure 1 décrit les niveaux d'énergie concernés dans un processus d'émission et d'excitation d'un fluorophore (Diagramme de Jablonski).

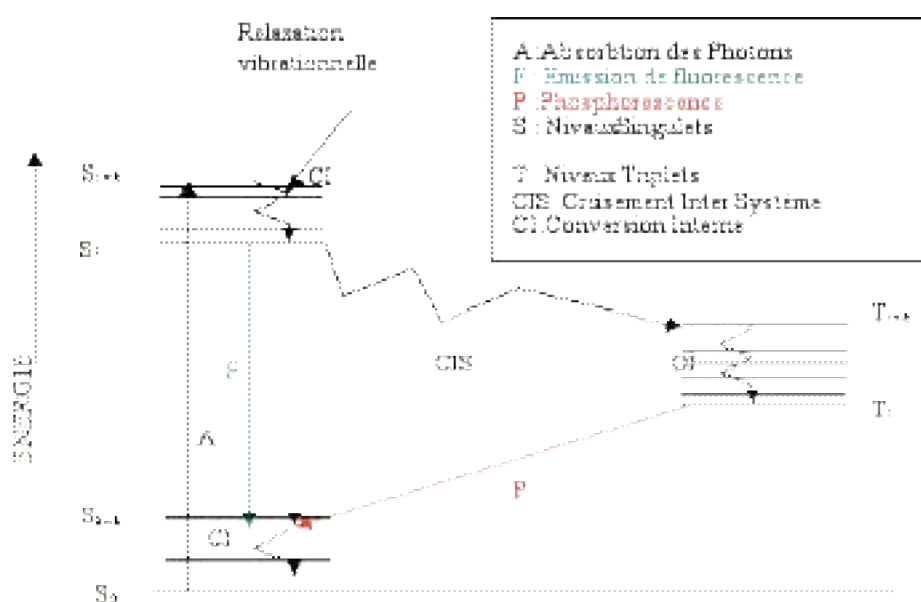


FIG. 1. Diagramme de Jablonski simplifié

Le microscope de fluorescence est un cas à part dans la mesure où on ne fait pas la détection à la longueur d'onde d'éclairage. Ceci est imposé par le phénomène de fluorescence, et présente ainsi l'avantage de permettre la détection de zones spécifiques qui sont celles qui présenteront une fluorescence. Celle-ci peut être naturelle (fluorescence endogène) ou provoquée par un marqueur. On a ainsi développé une immense variété de sondes spécifiques à telle ou telle zone ou fonction cellulaire.

Un point très important est qu'il faut pouvoir séparer le rayonnement d'excitation du rayonnement de fluorescence. On équipe donc le microscope d'un filtre dichroïque, qui réfléchit (et rejette donc) le rayonnement à longueur d'onde d'excitation éventuellement renvoyée vers le capteur tout en laissant passer le rayonnement de fluorescence.

L'image du spécimen est formée de manière globale à travers l'objectif pour être observée directement à l'œil ou enregistrée par une caméra. La Figure 2 indique les chemins optiques pour la détection d'un point dans le plan focal et d'un point hors plan focal.

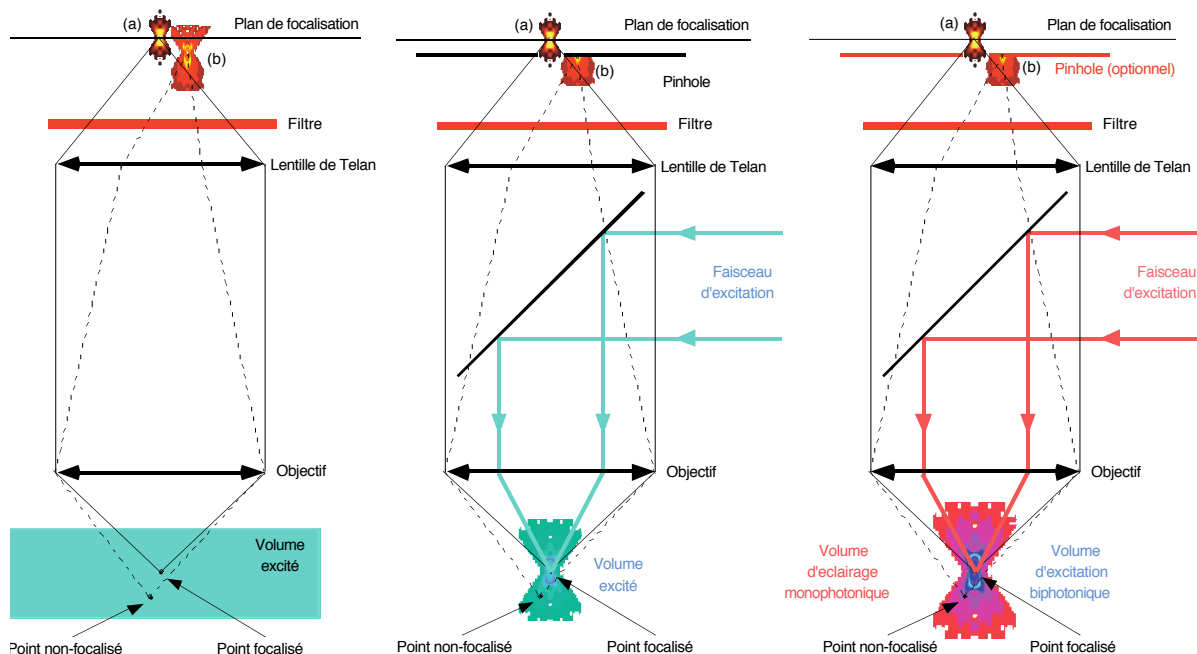


FIG. 2. Focalisation dans un microscope classique, confocal, et biphoton

A cause des limitations du système optique, l'image d'un point n'est pas un point, mais une tache d'Airy (a), qui définira la résolution du microscope. Notons aussi que dans un microscope conventionnel, l'image d'un point en dehors du plan de focalisation est aussi présente dans le plan de détection (plan image), bien que floue (b). De ce fait, l'image d'un plan, si elle contient bien l'image du plan observé, est aussi dégradée par les informations des autres plans. Les observations en trois dimensions sont donc difficiles, et il est impératif de restaurer les images avant toute analyse.

D'autres types de microscopes utilisent des changements de longueurs d'ondes entre l'excitation et la détection pour obtenir une information du spécimen. Citons par exemple, la

génération de seconde ou troisième harmonique, où la réponse non-linéaire des parties non centro-symétriques du spécimen est exploitée, ou la microscopie Raman.

D'autre part, le microscope moderne peut être couplé à des techniques d'imagerie rapide (étude de la décroissance temporelle de la fluorescence), multispectrale (étude de co-localisation) ou spectroscopique. Les développements se poursuivent à l'heure actuelle pour combiner ces diverses techniques, et la microscopie donnant traditionnellement des images en 2 dimensions, après avoir évoluée vers la 3D tends maintenant vers la 4D (espace + temps, espace + spectroscopie, espace + durée de vie de fluorescence) voire la 5D. Il ne fait aucun doute que les besoins de la recherche feront encore évoluer cet instrument.

1.2. Microscopie confocale

Pour palier les défauts du microscope conventionnel, on peut utiliser un montage confocal (Figure 2). L'illumination est alors faite par un faisceau laser focalisé dans le plan d'observation et qui balaye celui-ci. L'excitation n'est plus globale, mais quasi-ponctuelle.

D'autre part, la détection se fait au travers d'un « pinhole » en position confocale par rapport au spot d'excitation, c'est à dire que le système de détection ne voit que la zone de focalisation du faisceau d'excitation.

Ce montage permet de rejeter une très grande partie de la lumière (b) qui provient des plans autres que le plan de focalisation : la résolution verticale du microscope confocal est donc meilleure que celle du microscope conventionnel. Le signal est détecté à l'aide d'un photomultiplicateur, et l'image est donc formée point par point par balayage de l'objet.

Si l'image est bien meilleure en termes de résolution, on peut cependant noter trois défauts inhérents à ce système :

- L'acquisition est souvent plus lente, à cause de la nécessité de balayer le spécimen pour former une image.
- Le rapport signal sur bruit est généralement plus faible que pour un microscope classique.
- L'illumination par un faisceau laser focalisé engendre des intensités locales très grandes qui peuvent endommager le spécimen.

Ce système avait été proposé par Marvin Minsky dès les années 50. Il a cependant fallut attendre les progrès des sources (laser) et des détecteurs (sensibilité, rapidité), et des moyens de reconstruction (ordinateur) pour que la microscopie confocale prenne vraiment son essor dans les années 90.

Le microscope confocal est principalement utilisé en fluorescence, mais on trouve aussi des microscopes confocaux en réflexion. C'est d'ailleurs l'industrie de la microélectronique qui a dès les années 80 ressentit le besoin d'une meilleure résolution pour les systèmes de diagnostics et de test des semiconducteurs (progrès de la miniaturisation).

Le microscope confocal est en principe aussi utilisable en transmission. Cette configuration est cependant très délicate (difficultés d'alignement) et donc peu utilisée.

1.3. Microscopie multiphoton

Le microscope confocal a constitué un très grand progrès, mais certains problèmes persistent avec les spécimens biologiques vivants. Lorsque les molécules d'un fluorochrome sont excitées, il arrive souvent qu'elles génèrent des radicaux libres toxiques pour le spécimen observé. Ainsi si l'on veut conserver ce spécimen vivant, il faut limiter le temps d'observation et l'intensité lumineuse. D'autre part, la fluorescence diminue avec l'exposition (phénomène de photobleaching). Le microscope bi-photon permet de réduire ces 2 phénomènes.

Pour cela, on utilise le phénomène d'absorption simultanée de deux photons. Ce phénomène a été prévu théoriquement dès 1931, mais il a fallu attendre 1990 pour le voir appliquer à la microscopie. C'est maintenant un outil «courant».

L'énergie nécessaire à la transition est fournie par deux photons délivrant chacun la moitié de l'énergie nécessaire (on peut aussi considérer une excitation triphotonique). Comme la probabilité d'absorption décroît comme le carré de l'excitation, la transition d'excitation n'a lieu que dans un tout petit volume autour du point de focalisation (Figure 2). Loin de celui-ci, comme il n'y a pas d'excitation, il n'y a ni photobleaching, ni phototoxicité. La détection peut alors se faire de manière classique (sans pinhole) tout en conservant les capacités de coupes optiques. De plus, l'infra rouge est beaucoup moins sujet à la diffusion, ce qui permet l'étude en profondeur de spécimens diffusants comme la peau.

Un inconvénient est que seul des lasers femtosecondes (type TiS) délivrent des impulsions suffisamment puissantes permettant d'induire l'effet biphoton. On retrouve aussi les inconvénients du microscope confocal : relative lenteur d'acquisition, rapport signal sur bruit souvent faible. On peut aussi confocaliser le microscope biphoton pour améliorer la résolution.

Notons qu'il est aussi possible d'utiliser d'autres phénomènes non-linéaires, comme la génération de seconde harmonique ou l'effet Raman pour provoquer une émission lumineuse par le spécimen. Ces deux effets par exemple ont l'avantage qu'ils ne nécessitent pas forcément de marqueur spécifique, contrairement à la fluorescence.

1.4. Coupes sériées optiques

Par construction, le microscope (conventionnel, confocal ou (confocal) bi-photon) est un instrument fait pour prendre des images en deux dimensions. Par déplacement du plan focal à travers le spécimen, il est cependant possible d'acquérir une pile d'images 2D permettant de former une image en 3D. C'est la technique des coupes sériées (optical sectioning). On peut effectuer ce balayage axial soit en déplaçant l'objet via une platine motorisée, soit en déplaçant l'objectif par rapport au spécimen, généralement à l'aide d'un élément piézo-électrique.

La Figure 3 décrit un dispositif complet de mesure par coupes sériées. Il est constitué d'un microscope de fluorescence équipé d'un mécanisme de déplacement sur l'axe optique et d'un capteur permettant de former une image. L'ensemble du pilotage et de l'acquisition se fait à partir de la station informatique qui accompagne cet équipement. Elle peut également servir à traiter et à visualiser ces images, à partir de connaissances sur le système et d'outil de reconstruction.

Pour décrire correctement l'image en 3D ainsi obtenue, il est nécessaire de connaître les caractéristiques du système d'acquisition, et donc de l'objectif qui en est l'élément essentiel. Pour étudier les propriétés de l'objectif, il faut faire appel à la théorie de la diffraction. Cette théorie s'applique à tous les types de microscopes considérés ici. Nous verrons ensuite diverses techniques qui permettent de s'affranchir des limites imposées par le phénomène de diffraction, et d'obtenir une meilleure résolution.

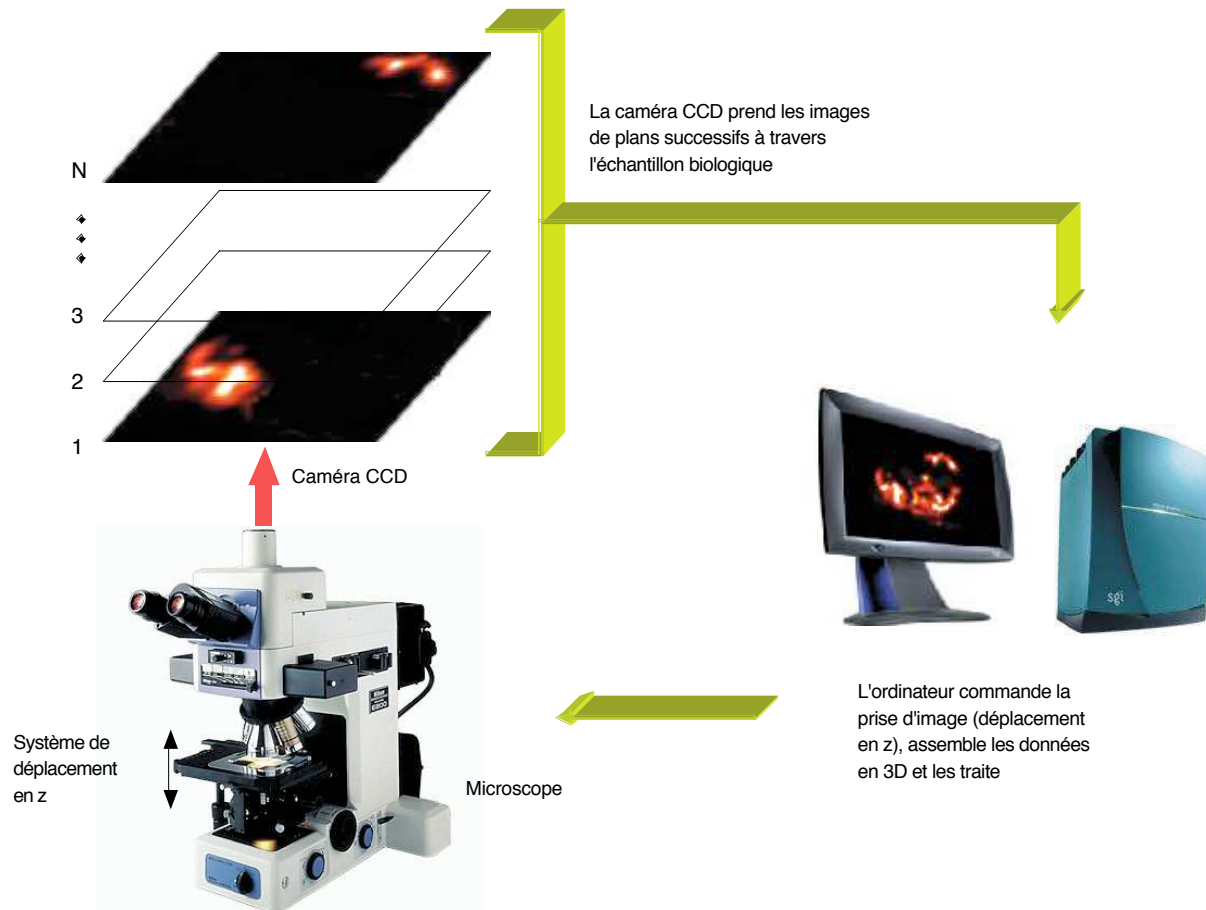


FIG. 3. Principe des coupes séries optiques

1.5. Lien entre les réponses impulsionnelles optiques de ces microscopes

Pour décrire correctement l'image en 3D ainsi obtenue, il est nécessaire de connaître les caractéristiques du système d'acquisition, dont l'objectif est l'élément essentiel. Pour cela, il faut faire appel à la théorie de la diffraction, qui s'applique à tous les types de microscopes considérés ici. De manière très simplifiée, le schéma de la Figure 2 indique que :

- la RIO d'un microscope grand champ est la RIO de détection,
- la RIO d'un microscope confocal est le produit de l'illumination par la détection,
- la RIO d'un microscope biphoton multipliant la RIO d'illumination par elle-même.

Le chapitre suivant décrit différents modèles de calcul de RIO (ou PSF Point Spread Function en anglais). Le lecteur intéressé par les détails y trouvera les développements complets nécessaires à la compréhension de ces modèles, sinon, il pourra directement aller à la troisième partie, où sont très brièvement présentés quelques logiciels de calcul de PSF.

2. MECANISMES DE FORMATION D'IMAGES – RESOLUTION

2.1. Limite de résolution.

Dès la fin du XIX^{ème} siècle, on avait remarqué que le pouvoir de résolution du microscope était en fait limité, et qu'augmenter le grandissement des images ne faisaient pas apparaître de détails supplémentaires. Karl Zeiss et Ernst Abbe ont travaillé en étroite collaboration à l'amélioration de cet instrument, et l'étude théorique du mécanisme de formation des images à l'aide de la (alors) toute nouvelle théorie ondulatoire de Fresnel a permis à Ernst Abbe d'expliquer les limites alors atteintes.

La Figure 4 montre la réponse impulsionnelle optique (RIO) en 3D d'un microscope classique, calculée pour un objectif à immersion à eau d'ouverture numérique (Numerical Aperture N.A.) 0.8. La coupe en x-y montre une tache d'Airy classique, un disque entouré d'un anneau d'amplitude environ 1/10 du pic central.

La coupe x-z montre une tache beaucoup plus allongée, et on distingue de la lumière dans tous les plans de l'image. En fait, on montre facilement que l'intégrale dans un plan ($x,y,z=cste$) est une constante selon z . Cela traduit simplement la conservation de l'énergie, celle-ci étant simplement distribuée différemment suivant les plans z .

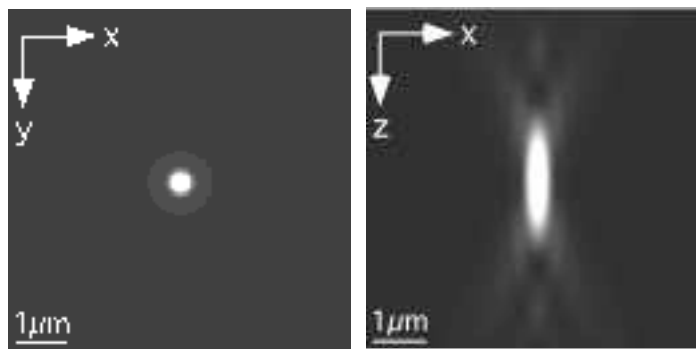


FIG. 4. Tache d'Airy 3D

La théorie scalaire de la diffraction permet de montrer que la RIO (ou Point Spread Function PSF en anglais) se calcule selon l'expression :

$$PSF(u,v) = \left| \int_0^1 P(\rho) J_0(v\rho) \exp\left(-\frac{1}{2}iu\rho^2\right) \rho d\rho \right|^2 \quad \begin{array}{l} v = (2\pi/\lambda)nr \sin\alpha \\ u = 4(2\pi/\lambda)nz \sin^2(\alpha/2) \end{array} \quad (1)$$

On obtient alors les limites de résolution latérale et longitudinale :

$$R_{lat} = \frac{0.61\lambda}{N.A.} \quad R_{long} = \frac{2\lambda}{N.A.^2} \quad (2)$$

On voit donc que la résolution longitudinale est toujours plus mauvaise que la résolution latérale, mais surtout qu'elle se dégrade beaucoup plus vite lorsque l'ouverture numérique diminue. Les propriétés de la RIO calculée à l'aide de la théorie scalaire de la diffraction sont décrites en détail dans le Born & Wolf (Paragraphe 8.8). *Dans tout ce chapitre, on se limitera au cas du microscope de fluorescence, le plus simple à traiter.*

2.2. Rappels d'optique ondulatoire

Cette première partie est tirée de la thèse de doctorat de Alain Chomik (Université de Haute-Alsace, 1997), qui a effectué un gros travail de synthèse/présentation de l'approche de Gibson et Lanni, qui a inspirée de nombreux travaux sur le calcul des RIO en microscopie de fluorescence. Qu'il en soit remercié ici.

Le phénomène de diffraction se traduit par le fait que la lumière n'est pas toujours focalisée selon les règles de l'optique géométrique. Il s'observe lorsque les dimensions du système considéré deviennent petites, ce qui inclut naturellement toutes les transitions brusques (bord d'écran ou de lentille par exemple). La diffraction joue un rôle décisif dans la formation des images puisque tout système optique limite forcément l'étendue de l'onde incidente. L'interprétation de ce phénomène s'appuie sur la théorie ondulatoire de la lumière, régie par le principe d'Huygens-Fresnel.

Le principe d'Huygens-Fresnel s'énonce comme suit :

- Chaque élément de surface atteint par une onde lumineuse se comporte comme une source secondaire qui réémet des ondes sphériques dont l'amplitude est proportionnelle à la taille de cet élément (contribution d'Huygens).
- L'amplitude complexe de la vibration lumineuse en un point est la somme des amplitudes complexes des vibrations produites par toutes les sources secondaires : ces vibrations interfèrent pour former la vibration au point considéré (contribution de Fresnel).

Kirchhoff a ensuite traduit mathématiquement le principe d'Huygens-Fresnel. On part de l'équation de propagation de Helmholtz :

$$\left(\nabla^2 + k^2\right)U = 0 \quad \text{avec } k = \frac{\omega}{c} \quad (3)$$

On applique le théorème de Green, qui spécifie que pour deux fonctions scalaires U et V satisfaisant les conditions usuelles de continuité et d'intégrabilité, on a :

$$\int \int_{\mathcal{S}} (V \text{grad}_{\mathbf{n}} U - U \text{grad}_{\mathbf{n}} V) d\mathcal{S} = \int \int \int_{\mathcal{V}} (\nabla^2 U - U \nabla^2 V) d\mathcal{V} \quad (4)$$

L'intégrale surfacique est évaluée sur une surface fermée \mathcal{S} (qui sera l'ouverture diffractante) et l'intégrale volumique est calculée sur le volume \mathcal{V} délimité par cette surface. Par $\text{grad}_{\mathbf{n}}$, on désigne la composante normale du gradient à la surface d'intégration.

Si U et V obéissent à l'équation de propagation :

$$\nabla^2 U = \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 U}{\partial t^2} \quad \nabla^2 V = \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 V}{\partial t^2} \quad (5)$$

et si U et V ont une dépendance temporelle harmonique de la forme $e^{\pm i\omega t}$, alors l'intégrale volumique est égale à zéro. Le théorème de Green se réduit alors à :

$$\int \int_{\mathcal{S}} (V \text{grad}_{\mathbf{n}} U - U \text{grad}_{\mathbf{n}} V) d\mathcal{S} = 0 \quad (6)$$

On considère alors une onde sphérique progressive convergeant vers un point P ($\rho=0$) et obéissant à l'équation :

$$V = V_0 \frac{e^{i(kr + \omega t)}}{r} \quad (7)$$

dans le volume délimité par la surface d'intégration comportant le point P. Comme V n'est pas définie en P, on exclut ce point de l'intégration par une méthode standard consistant à soustraire du résultat l'intégrale sur une petite sphère de rayon ρ centrée en P (voir Figure 17). Sur cette petite sphère, $r=\rho$ et $\text{grad}_{\mathbf{n}} = -\partial/\partial r$. On obtient alors :

$$\int \int_{\mathcal{S}} \left(\frac{e^{ikr}}{r} \text{grad}_{\mathbf{n}} U - U \text{grad}_{\mathbf{n}} \frac{e^{ikr}}{r} \right) d\mathcal{S} - \int \int_{\mathcal{S}} \left(\frac{e^{ikr}}{r} \frac{\partial U}{\partial \mathbf{r}} - U \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} \frac{e^{ikr}}{r} \right)_{r=\rho} \rho^2 d\Omega = 0 \quad (8)$$

l'élément $d\Omega$ étant l'angle solide sur la sphère centrée en P et $\rho^2 d\Omega$ représentant l'élément surfacique correspondant (le facteur commun $V_0 e^{i\omega t}$ n'intervient pas dans le calcul et a donc été négligé). La Figure 5 décrit le schéma d'intégration :

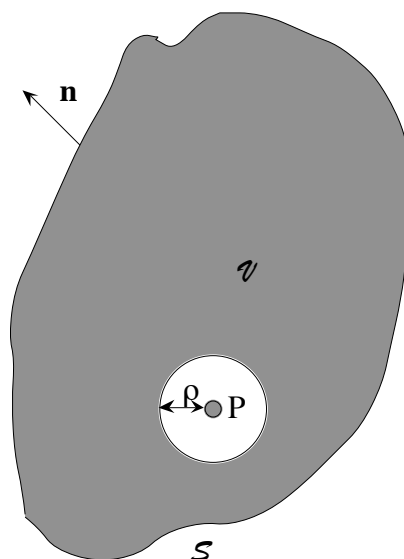


FIG. 5. Surface d'intégration pour démontrer le théorème de l'intégrale de Kirchhoff

On fait maintenant tendre ρ vers zéro. Dans ces conditions, l'intégrale surfacique autour du point P tend vers une valeur de U au point P appelée U_p , et donc :

$$\int \int_{\mathcal{S}} U_p d\Omega = 4\pi U_p \quad (9)$$

Finalement, on obtient :

$$U_p = -\frac{1}{4\pi} \int \int_{\mathcal{S}} \left(U \text{grad}_{\mathbf{n}} \frac{e^{ikr}}{r} - \frac{e^{ikr}}{r} \text{grad}_{\mathbf{n}} U \right) d\mathcal{S} \quad (10)$$

Cette intégrale porte le nom d'intégrale de Kirchhoff. Elle relie la valeur de n'importe quelle fonction d'onde scalaire en n'importe quel point P situé à l'intérieur d'une surface fermée à la valeur de la fonction d'onde sur cette surface.

Nous allons maintenant appliquer le théorème de Kirchhoff au problème de la diffraction de la lumière par une ouverture, selon le schéma de la Figure 6.

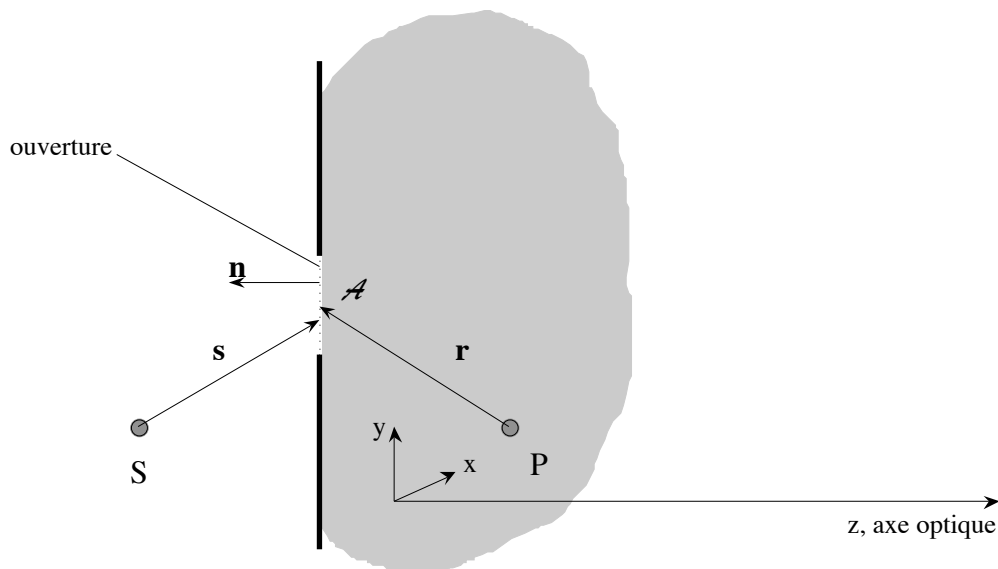


FIG. 6. Application du théorème de Kirchhoff à la diffraction par une ouverture

On cherche donc à déterminer la perturbation optique provenant de la source S émettant des ondes sphériques au point P. Pour appliquer l'intégrale de Kirchhoff, nous choisissons une surface d'intégration qui inclue le point de réception P et l'ouverture de l'écran.

On effectue cependant deux hypothèses :

- La fonction d'onde U et son gradient contribuent de façon négligeable dans l'intégrale, excepté sur l'ouverture \mathcal{A} .
- Les valeurs de U et $\text{grad } U$ sur l'ouverture seraient les mêmes en l'absence de l'écran.

Soit s un point sur l'ouverture par rapport à la source S. On a :

$$U = U_0 \frac{e^{i(ks - \omega t)}}{s} \quad (11)$$

En appliquant le théorème de Kirchhoff, on obtient :

$$U_P = - \frac{U_0 e^{-i\omega t}}{4\pi} \int_{\mathcal{A}} \left(\frac{e^{ikr}}{r} \text{grad}_{\mathbf{n}} \frac{e^{iks}}{s} - \frac{e^{iks}}{s} \text{grad}_{\mathbf{n}} \frac{e^{ikr}}{r} \right) d\mathcal{S} \quad (12)$$

On a d'autre part :

$$\text{grad}_{\mathbf{n}} \frac{e^{ikr}}{r} = \cos(\mathbf{n}, \mathbf{r}) \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} \frac{e^{ikr}}{r} = \cos(\mathbf{n}, \mathbf{r}) \left(\frac{ike^{ikr}}{r} - \frac{e^{ikr}}{r^2} \right) \quad (13a)$$

$$\text{grad}_{\mathbf{n}} \frac{e^{iks}}{s} = \cos(\mathbf{n}, \mathbf{s}) \frac{\partial}{\partial \mathbf{s}} \frac{e^{iks}}{s} = \cos(\mathbf{n}, \mathbf{s}) \left(\frac{i\mathbf{k}e^{iks}}{s} - \frac{e^{iks}}{s^2} \right) \quad (13b)$$

où (\mathbf{n}, \mathbf{r}) et (\mathbf{n}, \mathbf{s}) représentent les angles entre les vecteurs \mathbf{r} et \mathbf{s} et la normale \mathbf{n} à la surface d'intégration. Dans les conditions courantes, \mathbf{r} et \mathbf{s} sont beaucoup plus grands que la longueur d'onde de la lumière émise. Les termes en $1/x^2$ sont donc négligeables devant les termes en $1/x$. On peut donc simplifier les équations précédentes :

$$U_p = - \frac{ikU_0 e^{-i\omega t}}{4\pi} \int_{\mathcal{A}} \left(\frac{e^{ik(r+s)}}{rs} [\cos(\mathbf{n}, \mathbf{r}) - \cos(\mathbf{n}, \mathbf{s})] \right) d\mathcal{S} \quad (14)$$

Cette équation intégrale porte le nom d'intégrale de Fresnel-Kirchhoff.

2.3. Modèle scalaire de Gibson et Lanni

Gibson et Lanni ont introduit un modèle scalaire de formation d'image à travers un objectif de microscope optique. Ce modèle, en dépit de certaines limitations, à l'avantage de sa simplicité : il fait apparaître clairement les différentes composantes du système optique considéré, et peut aussi être utilisé pour calculer les PSF de microscopes confocaux et bi-photon. De plus, ce modèle est à la base du logiciel COSMOS, pour le calcul de RIO et la déconvolution d'images de microscopie de fluorescence.

En microscopie, l'ouverture de l'objectif est circulaire, et va diffracter l'onde sphérique provenant d'une source de lumière pour créer une figure de diffraction. Nous allons maintenant voir comment établir l'expression de Gibson et Lanni en 3D. On réécrit tout d'abord l'intégrale de Fresnel-Kirchhoff dans le repère (décrit à la Figure 7) utilisé par Gibson et Lanni (dans ce repère, le sens de la norme \mathbf{n} est modifié ce qui explique le changement de signe).

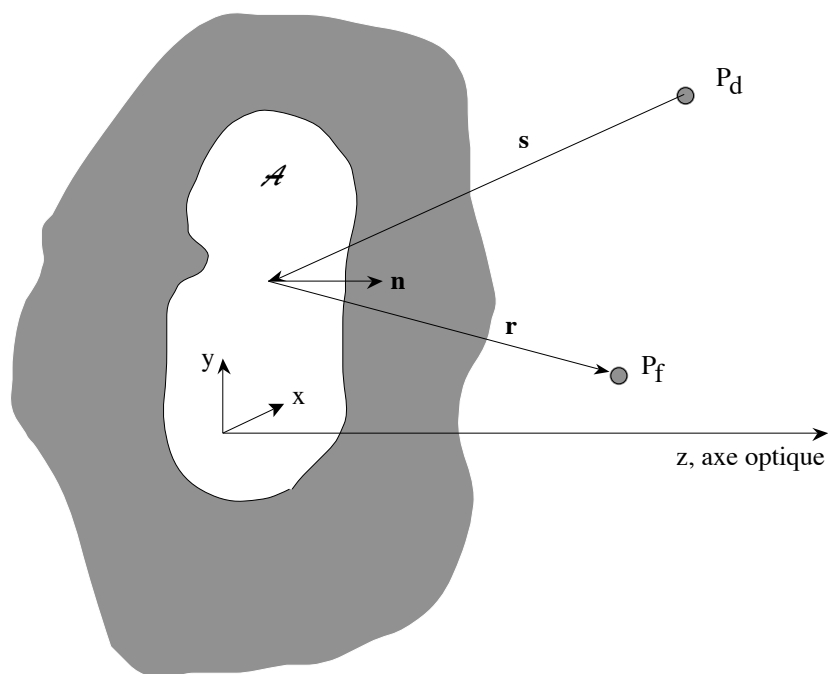


FIG. 7. : système de coordonnées Gibson et Lanni

$$U(P_d; P_f) = - \frac{i}{2\lambda} \int_{\mathcal{A}} \frac{|U(\mathcal{A})| e^{-ik(r-s)}}{s} [\cos(\mathbf{n}, \mathbf{r}) - \cos(\mathbf{n}, \mathbf{s})] d\mathcal{S} \quad (15)$$

avec :

$$|U(\mathcal{A})| = \frac{U_0}{r} \quad \text{et} \quad k = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (16)$$

Dans le microscope, l'angle du champ de l'image est petit. Le terme $[\cos(\mathbf{n}, \mathbf{r}) - \cos(\mathbf{n}, \mathbf{s})]$ variant donc lentement sur l'ouverture, il peut être approximé par une constante égale à 2.

L'amplitude $|U(\mathcal{A})|$ varie lentement dans l'intégrale et peut être approximée par une constante A_0 .

Ainsi, l'amplitude complexe de la figure de diffraction de l'équation (15) peut alors être approximée par l'équation suivante :

$$U(P_d; P_f) \approx - \frac{i A_0}{\lambda} \int_{\mathcal{A}} \frac{e^{-ik(r-s)}}{s} d\mathcal{S} \quad (17)$$

Cette approximation de l'intégrale de Fresnel-Kirchhoff constitue la base de départ de toutes les expressions permettant de modéliser la réponse impulsionnelle optique du microscope. Les différentes formulations que l'on trouve dans la littérature diffèrent seulement par l'estimation que l'on fait du facteur $1/s$ qui varie lentement dans l'intégrale et du facteur $(r-s)$ responsable des fluctuations rapides sur l'intégrale dans l'exponentielle complexe $e^{-ik(r-s)}$. La précision de chaque modèle est déterminée par la précision de ces estimations.

L'approximation qui sert de point de départ au modèle de Gibson et Lanni a été proposée par Sheppard. Il propose d'utiliser l'expression suivante :

$$U_s(P_d/P_f) = \frac{-i 2\pi A_0 a^2}{\lambda z_d} \exp(ik\epsilon) \int_{\mathcal{A}} \exp\left[-ik \frac{a^2 \rho^2}{2} \left(\frac{1}{z_f} - \frac{1}{z_d}\right)\right] \times J_0\left[k a \rho \frac{\sqrt{x_d^2 + y_d^2}}{z_d}\right] \rho d\rho \quad (18)$$

Gibson et Lanni ont montré que la différence de chemin optique donnée par Sheppard :

$$-k \frac{a^2 \rho^2}{2} \left(\frac{1}{z_f} - \frac{1}{z_d}\right) \quad (19)$$

était équivalente à calculer la différence de chemin optique entre les conditions idéales et réelles d'utilisation de l'objectif du microscope.

En effet, lors d'une observation dans un microscope, le spécimen est souvent placé entre une lame (support) et une lamelle (protection du spécimen). Un contact optique est utilisé pour augmenter l'ouverture numérique de l'objectif, couramment de l'huile ou de l'eau. Les objectifs à immersion à air sont réservés à l'examen de grand spécimen à faible grossissement. La Figure 8 décrit le système optique considéré, qui est en fait un milieu stratifié, constitué du milieu d'immersion, de la lamelle et du spécimen lui-même :

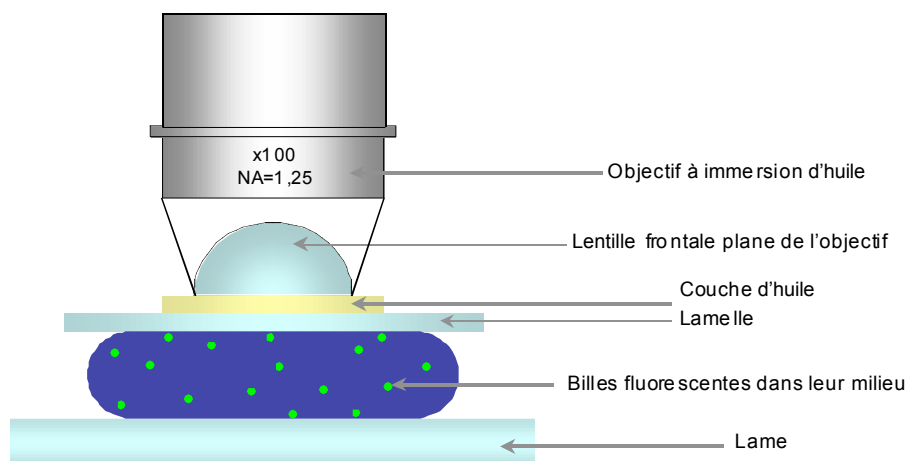


FIG. 8. :Milieu stratifié considéré dans le modèle de Gibson et Lanni

Gibson et Lanni calculent alors l'onde diffractée par un objectif de microscope en tenant compte du chemin optique à travers les différentes couches séparant le spécimen de l'objectif et de la symétrie cylindrique du problème :

$$U(P_d; W(\rho)) = \frac{C}{z_d} \int_0^1 J_0 \left(k_a \rho \frac{\sqrt{x_d^2 + y_d^2}}{z_d} \right) \exp(i W(\rho)) \rho \, d\rho \quad (20)$$

où C est une constante complexe et (x_d, y_d, z_d) sont les coordonnées du point d'observation. Le terme a représente le rayon de l'ouverture limitante de l'objectif projeté dans le plan focal arrière tel que $0 < \rho < 1$. La PSF en intensité est alors obtenue en calculant le carré de cette intégrale.

Le terme $W(\rho)$ représente les aberrations de phase introduites par l'utilisation de l'objectif du microscope dans des conditions autres que celles préconisées par le constructeur (dites conditions standards) qui garantissent un minimum d'aberration. On a :

$$W(\rho) = k \, \text{OPD} \quad \text{avec } k = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (21)$$

où k est le vecteur d'onde et OPD représente la différence de chemin optique entre un rayon dans les conditions standard et un autre dans les conditions non standard.

Pour calculer cette OPD, on considère deux rayons, l'un dans les conditions standard et l'autre non, entrant parallèlement dans l'objectif du microscope. La Figure 9 donne la représentation des chemins optiques. Après être rentrés dans le système optique, ces deux rayons ont une longueur de chemin optique similaire et se coupent dans le plan focal arrière du système de lentilles. La propagation dans le système de lentilles est telle que la longueur du chemin optique $[abco]$ est égale à $[pqo]$.

Alors, OPD est égale à la différence des chemins optiques de la source ponctuelle aux points a et p où ils entrent dans le système optique. Ainsi OPD se résume à la différence des chemins optiques de la source ponctuelle aux points d'entrée du rayon dans les conditions standard et du rayon dans les conditions non-standard.

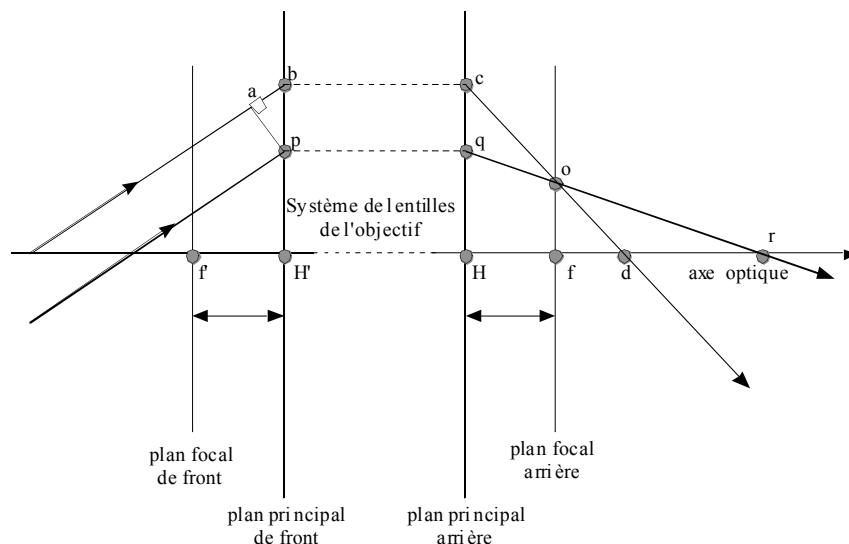


FIG. 9. Propagation de deux rayons parallèles dans un système optique.

La Figure 10 montre deux rayons se propageant parallèlement selon le même angle θ et pénétrant dans l'objectif après avoir traversé la lamelle et le milieu d'immersion. Le chemin ABCD correspond à une propagation de la source ponctuelle en A dans des conditions non-standard. PQRS représente le chemin optique idéal dans les conditions standard.

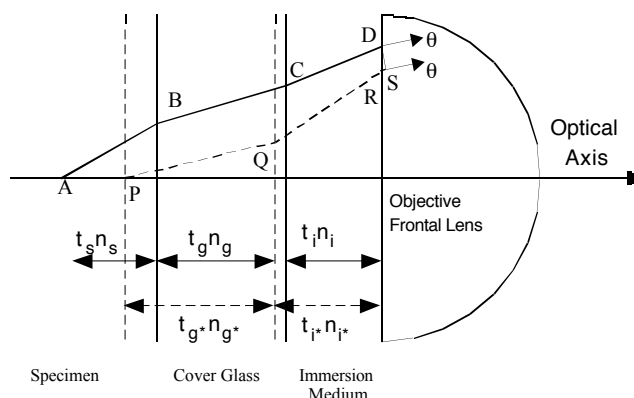


FIG. 10. Passage dans le milieu stratifié de deux rayons pénétrant parallèlement l'objectif

- ABCD : chemin d'un rayon partant d'une source ponctuelle et entrant dans la lentille frontale dans les conditions non-standard.
- PQRS : chemin d'un rayon partant d'une source ponctuelle et entrant dans la lentille frontale dans les conditions standard d'utilisation.
- θ : angle de propagation des deux rayons dans la lentille frontale.
- t_s : profondeur de l'objet sous la lamelle.
- n_s : indice de réfraction du milieu dans lequel se trouve l'objet.
- t_g : épaisseur de la lamelle.
- n_g : indice de réfraction de la lamelle.
- t_{oil} : épaisseur de l'huile d'immersion.
- n_{oil} : indice de réfraction de l'huile d'immersion.
- n : indice de réfraction de la lentille frontale de l'objectif.
- * : épaisseurs et indices de réfractons dans les conditions standard d'utilisation.

On a donc finalement:

$$OPD = [ABCD] - [PQRS] \quad (22)$$

OPD est donc fonction des différents indices optiques et épaisseur des milieux traversés :

$$OPD = n_s AB + n_g BC + n_{oil} CD - (n_{g^*} PQ + n_{oil^*} QR + n RS) \quad (23)$$

Après transformation, on a :

$$OPD = \frac{n_s t_s}{\cos \theta_s} + \frac{n_g t_g}{\cos \theta_g} + \frac{n_{oil} t_{oil}}{\cos \theta_{oil}} - \left(\frac{n_{g^*} t_{g^*}}{\cos \theta_{g^*}} + \frac{n_{oil^*} t_{oil^*}}{\cos \theta_{oil^*}} + n\gamma \right) \quad (24)$$

dans laquelle n est l'indice de réfraction de la lentille frontale de l'objectif et :

$$\gamma = RS = \sin \theta DR \quad (25)$$

$$\gamma = \sin \theta \left(t_s \tan \theta_s + t_g \tan \theta_g + t_{oil} \tan \theta_{oil} - t_{g^*} \tan \theta_{g^*} - t_{oil^*} \tan \theta_{oil^*} \right) \quad (26)$$

Le microscope respectant la loi de réfraction, on a:

$$NA = n \sin \theta = n_s \sin \theta_s \Rightarrow \cos \theta_s = \sqrt{1 - \left(\frac{n \sin \theta}{n_s} \right)^2} = \sqrt{1 - \left(\frac{NA}{n_s} \right)^2} \quad (27)$$

La différence de chemin optique devient :

$$OPD = n_s t_s \sqrt{1 - \left(\frac{n \sin \theta}{n_s} \right)^2} + n_g t_g \sqrt{1 - \left(\frac{n \sin \theta}{n_g} \right)^2} + n_{oil} t_{oil} \sqrt{1 - \left(\frac{n \sin \theta}{n_{oil}} \right)^2} - n_{g^*} t_{g^*} \sqrt{1 - \left(\frac{n \sin \theta}{n_{g^*}} \right)^2} - n_{oil^*} t_{oil^*} \sqrt{1 - \left(\frac{n \sin \theta}{n_{oil^*}} \right)^2} \quad (28)$$

OPD peut s'écrire en termes de coordonnées d'espace image pour un microscope satisfaisant à la condition des sinus d'Abbe. Cette condition exprime une relation entre θ et ϕ , angles entre l'axe optique et un rayon entrant et sortant du système dans les conditions standard (voir Figure 11).

$$n_{obj} \sin \theta = n_{img} M \sin \phi \quad (29)$$

où M représente le grandissement transversal du microscope. Ainsi un rayon émis par un objet se propagera dans la lentille frontale de l'objectif avec un angle θ et arrivera à l'intersection de l'axe optique et du plan d'image gaussienne avec un angle ϕ .

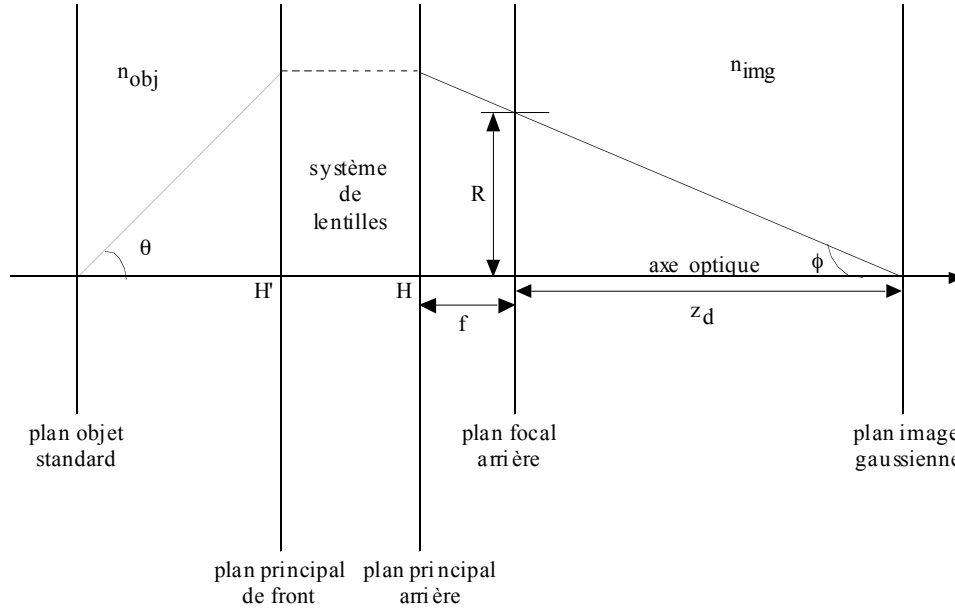


FIG. 11. condition des sinus d'Abbe appliquée à un microscope

D'après l'équation (29) on peut écrire :

$$n \sin \theta = M \sin \phi = \frac{MR}{\sqrt{R^2 + z_d^2}} \quad (30)$$

avec R la distance entre l'axe optique et le point d'intersection du rayon lumineux avec le plan focal arrière. On introduit alors la distance radiale normalisée ρ tel que :

$$\rho = R/a \quad (31)$$

a étant le rayon de l'ouverture limitante de l'objectif projeté dans le plan focal arrière, avec $0 \leq \rho \leq 1$. Il en résulte que :

$$n^2 \sin^2 \theta = M^2 \sin^2 \phi = \frac{M^2 a^2 \rho^2}{a^2 \rho^2 + z_d^2} = \frac{NA^2 \rho^2}{1 - \left(\frac{NA}{M}\right)^2 (1 - \rho^2)} \quad (32)$$

Comme $(NA/M)^2$ est très faible en pratique ($NA \approx 1$, $M > 10$), le dénominateur est approximé à 1. On remplace alors $n \sin \theta$ dans l'équation (28) par $NA\rho$:

$$\begin{aligned} OPD \approx & n_s t_s \sqrt{1 - \left(\frac{NA \rho}{n_s}\right)^2} + n_g t_g \sqrt{1 - \left(\frac{NA \rho}{n_g}\right)^2} + n_{oil} t_{oil} \sqrt{1 - \left(\frac{NA \rho}{n_{oil}}\right)^2} \\ & - n_g^* t_g^* \sqrt{1 - \left(\frac{NA \rho}{n_g^*}\right)^2} - n_{oil}^* t_{oil}^* \sqrt{1 - \left(\frac{NA \rho}{n_{oil}^*}\right)^2} \end{aligned} \quad (33)$$

Lorsque les valeurs réelles diffèrent des valeurs standard recommandées par le constructeur, des aberrations de phase apparaissent. La présence d'aberrations de phase va entraîner une dégradation de la qualité de l'image et une diminution du contraste dans le plan focal. Par conséquent, il est indispensable que le microscope soit utilisé dans des conditions aussi proches que possible des conditions standard.

Un problème particulier existe quand l'objet observé possède un indice de réfraction différent de celui du milieu d'immersion : l'image de chaque plan de cet objet subira des aberrations différentes ce qui complique encore le processus de formation des images : en effet dans ce cas, la PSF varie alors avec la profondeur du spécimen

Pour palier ce problème, les fabricants de microscopes ont développé des objectifs à immersion à eau. L'examen de l'équation (33) montre en effet que si l'indice du milieu d'immersion (n_i) est égal à l'indice du spécimen (n_s) et si les autres paramètres correspondent aux conditions préconisées, alors l'influence de la profondeur du spécimen devient nulle. Le deuxième terme est identiquement nul quel que soit t_s : la PSF est donc invariante avec la profondeur.

Lors de l'acquisition d'une PSF ou de l'image d'un spécimen, la coupe optique est généralement réalisée par déplacement du porte-échantillon devant l'objectif. De fait, l'épaisseur du milieu d'immersion varie du fait du déplacement relatif de l'objectif par rapport à l'échantillon.

Soit Δz la défocalisation causée par le déplacement du plateau porte préparation :

$$\frac{\Delta z}{n_{oil}} = \frac{t_s}{n_s} + \frac{t_g}{n_g} + \frac{t_{oil}}{n_{oil}} - \frac{t_{g^*}}{n_{g^*}} - \frac{t_{oil^*}}{n_{oil^*}} \quad (34)$$

En exprimant t_{oil} en fonction de Δz et des autres :

$$t_{oil} = n_{oil} \left[\frac{\Delta z}{n_{oil}} + \left(\frac{t_{g^*}}{n_{g^*}} - \frac{t_g}{n_g} \right) + \left(\frac{t_{oil^*}}{n_{oil^*}} - \frac{t_s}{n_s} \right) \right] \quad (35)$$

On obtient alors finalement :

$$\begin{aligned} OPD = & n_i z \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i} \right)^2} \\ & + n_g t_g \left(\sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_g} \right)^2} - \left(\frac{n_i}{n_g} \right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i} \right)^2} \right) \\ & - n_g^* t_g^* \left(\sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_g^*} \right)^2} - \left(\frac{n_i}{n_g^*} \right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i} \right)^2} \right) \\ & - n_i^* t_i^* \left(\sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i^*} \right)^2} - \left(\frac{n_i}{n_i^*} \right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i} \right)^2} \right) \\ & + n_s t_s \left(\sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_s} \right)^2} - \left(\frac{n_i}{n_s} \right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i} \right)^2} \right) \end{aligned} \quad (36)$$

Un avantage de cette approche est qu'elle fait explicitement apparaître les paramètres d'utilisation recommandés par le fabricant, et les paramètres d'acquisition réels. Il souffre cependant de certaines limitations.

Tout d'abord la fonction d'apodization $a(\theta) = (\cos \theta)^{1/2}$ pour un système aplanétique obéissant à la condition des sinus d'Abbe n'est pas introduite.

D'autre part, les rayons lumineux sont considérés comme traversant les diverses interfaces sans réflexion, c'est-à-dire à intensité constante. Cette hypothèse est discutable en particulier pour les objectifs à grande ouverture numérique pour lesquels les rayons extrémaux arrivent à grande incidence sur les diverses interfaces et aussi lorsqu'il existe de grandes différences d'indices entre les différents milieux. Même si on considère la théorie scalaire comme limite de la théorie vectorielle lorsqu'on moyenne les effets de polarisation, il faudrait introduire un coefficient moyen de transmission.

Enfin, cette approche ne peut, par sa nature même, tenir compte, ni des possibles effets de polarisation induits par la traversée des diverses interfaces, ni de la possible polarisation de la lumière émise par le spécimen lui-même (émission dipolaire, spécimen polarisant en cristallographie par exemple).

Ces limitations ont poussé divers auteurs à perfectionner les modèles de formation d'images dans un microscope pour tenir compte de la nature vectorielle de la lumière. Parmi les différentes approches proposées, celle de Török et Varga, généralisant le formalisme de Wolf, est sans doute la plus élégante. Cette théorie est exposée dans le chapitre suivant.

2.4. Modèle vectoriel pour la RIO illumination

Le modèle de Gibson et Lanni est basé sur la théorie scalaire de la diffraction de la lumière. Il est donc limité en précision, spécialement pour les objectifs à grande ouverture numérique, pour lesquels les rayons marginaux pénètrent à grande incidence les diverses interfaces. Pour ces rayons, la différence entre les coefficients de transmission pour les deux cas de polarisation est loin d'être négligeable. Pour cette raison, plusieurs auteurs se sont efforcés de développer des modèles vectoriels de formation d'image.

Parmi ces différentes approches, la plus élégante est probablement celle proposée par Peter Török, à base d'équations intégrales. Elle est dérivée du modèle de diffraction vectoriel proposé par Richards et Wolf adapté au cas d'une focalisation à travers plusieurs milieux. Par soucis de simplicité, le modèle général a été adapté au cas de la focalisation d'une onde à travers trois milieux, qui correspondent au milieu d'immersion, à la lamelle et au spécimen dans le cas du microscope qui nous intéresse ici.

La Figure 12 décrit la géométrie utilisée. Le système forme l'image d'une source ponctuelle située dans l'espace objet à $z=-\infty$ et émettant une onde plane monochromatique et polarisée linéairement suivant l'axe x . Cette onde est focalisée par un objectif sans aberration. L'origine O du repère (x,y,z) correspond au point focal théorique du système imageant dans un milieu homogène. Le point d'observation $P(x,y,z)$ est repéré par le vecteur r_p .

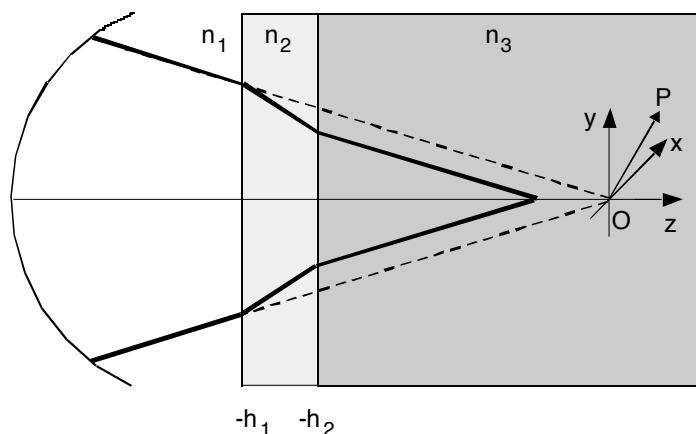


FIG. 12. Focalisation d'une onde dans un milieu stratifié (modèle de Török et Varga)

Le modèle de Török et Varga pour calculer la focalisation d'une onde plane dans un milieu stratifié fait appel à des concepts comme les matrices de Jones généralisées qui vont au-delà des ambitions de ce cours. Nous rappellerons donc ici simplement les résultats essentiels.

La RIO en intensité peut se calculer en fonction du champ électromagnétique comme :

$$PSF(x, y, z) = |\mathbf{E}|^2 = |\mathbf{E}_{3x} + \mathbf{E}_{3y} + \mathbf{E}_{3z}|^2 \quad (37)$$

Les composantes du champ électromagnétique étant données par :

$$\begin{aligned} E_{3x} &= -i(I_{0ill} + I_{2ill} \cos 2\phi) \\ E_{3y} &= -i(I_{2ill} \sin 2\phi) \\ E_{3z} &= -2I_{1ill} \cos \phi \end{aligned} \quad (38)$$

avec les intégrales de diffraction :

$$\begin{aligned} I_{0ill} &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta_1} \sin \theta_1 J_0(k_1(x^2 + y^2)^{1/2} \sin \theta_1) \\ &\quad \times (T_{2s} + T_{2p} \cos \theta_3) \exp(ik_0 \Psi_i) \exp(ik_3 z \cos \theta_3) d\theta_1 \\ I_{1ill} &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta_1} \sin \theta_1 J_1(k_1(x^2 + y^2)^{1/2} \sin \theta_1) \\ &\quad \times T_{2p} \sin \theta_3 \exp(ik_0 \Psi_i) \exp(ik_3 z \cos \theta_3) d\theta_1 \\ I_{2ill} &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta_1} \sin \theta_1 J_2(k_1(x^2 + y^2)^{1/2} \sin \theta_1) \\ &\quad \times (T_{2s} - T_{2p} \cos \theta_3) \exp(ik_0 \Psi_i) \exp(ik_3 z \cos \theta_3) d\theta_1 \end{aligned} \quad (39)$$

La présence des différents milieux implique une aberration initiale donnée par :

$$\Psi_i = h_2 n_3 \cos \theta_3 - h_1 n_1 \cos \theta_1 \quad (40)$$

et les coefficients de transmission de Fresnel pour un milieu stratifié s'écrivent :

$$T_{2s,p} = \frac{t_{12s,p} t_{23s,p} \exp(i\beta)}{1 + r_{12s,p} r_{23s,p} \exp(2i\beta)} \quad (41)$$

avec $\beta = k_2 |h_2 - h_1| \cos \theta_2$ et les plus classiques coefficients de transmission et de réflexion de Fresnel pour une interface simple :

$$\begin{aligned} t_{nm+1,s} &= \frac{2n_n \cos \theta_n}{n_n \cos \theta_n + n_{n+1} \cos \theta_{n+1}} \\ t_{nm+1,p} &= \frac{2n_n \cos \theta_n}{n_{n+1} \cos \theta_n + n_n \cos \theta_{n+1}} \\ r_{nm+1,s} &= \frac{n_n \cos \theta_n - n_{n+1} \cos \theta_{n+1}}{n_n \cos \theta_n + n_{n+1} \cos \theta_{n+1}} \\ r_{nm+1,p} &= \frac{n_{n+1} \cos \theta_n - n_n \cos \theta_{n+1}}{n_{n+1} \cos \theta_n + n_n \cos \theta_{n+1}} \end{aligned} \quad (42)$$

Notons qu'il a aussi été développé un modèle diffractif vectoriel basé sur le principe de Huygens-Fresnel. Ce modèle est cependant limité au cas d'une seule interface. Dans ce cas, il a été montré que les deux approches étaient compatibles.

Ce second modèle est cependant beaucoup moins pratique à utiliser. En effet, il est basé sur une résolution numérique du principe de Fermat pour minimiser le chemin optique à la traversée de l'interface, et est donc délicat à mettre en œuvre (possibles problèmes de convergence).

La théorie de Török et Varga permet donc de modéliser rigoureusement une réponse impulsionnelle optique en illumination. On peut ainsi calculer la RIO d'illumination d'un microscope confocal. Le modèle s'applique au cas d'une onde polarisée linéairement, mais s'étend de manière directe au cas d'une onde non-polarisée, ou d'une onde polarisée elliptiquement, en moyennant le champ E_3 par rapport à l'angle Φ_p .

Ce modèle est cependant relativement difficile à utiliser dans la pratique. En effet, si l'on considère un objectif de microscope donné, celui-ci est conçu pour travailler dans des conditions précises (indice du milieu d'immersion, indice et épaisseur de la lamelle), ce qui signifie que sa conception intègre ces données pour minimiser les aberrations. Il faut donc les introduire manuellement dans le calcul pour tenir en compte.

De plus, on considère dans cette théorie un rayonnement se propageant de l'objectif vers le spécimen. Stricto sensu, elle n'est donc pas appropriée pour modéliser l'observation d'un spécimen (RIO de détection).

Une approximation couramment utilisée est de considérer que les RIO en illumination et en détection sont identiques. Dans ce cas, on peut alors modéliser un microscope conventionnel ou confocal à l'aide du modèle de Török et Varga. Cette approximation est souvent vraie, mais peut poser problème dans certaines configurations. Ainsi, un dipôle émettant un rayonnement électromagnétique dans des conditions particulières ne peut être traité par cette théorie, car le champ au foyer ne correspond pas forcément à un champ dipolaire.

Enfin, pour un milieu stratifié, les coefficients de transmission de Fresnel ne sont pas les mêmes lorsque l'on passe du verre à l'eau ou de l'eau au verre. Les RIO n'ont donc pas de raison a priori d'être strictement identiques.

Notons cependant que cette approche est complète et rigoureuse pour un microscope biphoton non confocalisé. En effet, pour un tel microscope, la résolution est entièrement déterminée par le dispositif d'illumination du spécimen, car la détection se fait généralement de manière « non-descannée », avec un détecteur à champ large (sans pin-hole donc).

2.5. Modèle vectoriel en détection

Plusieurs modèles rigoureux de calcul de la PSF de détection d'un microscope existent. Ces modèles sont cependant limités par le fait qu'ils se limitent à un milieu d'observation homogène. Or en biologie, le spécimen est souvent observé à travers un milieu d'immersion et protégé par une lamelle.

Si l'on considère que la PSF de détection est identique à la PSF d'illumination, on a alors un moyen simple de calculer la PSF d'un microscope classique, confocal ou multiphoton. Cette approche a été utilisée par de nombreux auteurs. Notons cependant qu'en toute rigueur, il ne s'agit que d'une approximation. En effet, les coefficients de Fresnel en réflexion et en transmission diffèrent lorsque l'on passe de la lamelle au spécimen, ou du spécimen à la lamelle. Les PSF de détection et d'illumination doivent donc être différentes.

La Figure 13 décrit la géométrie considérée. La molécule fluorescente est placée à l'origine du système de coordonnées (i,j,k) . Le dipôle qu'elle constitue a pour moment $\mathbf{p} = p_x, p_y, p_z$.

Török a montré que le champ électromagnétique pouvait s'écrire dans le milieu 1, juste avant l'objectif, sous la forme :

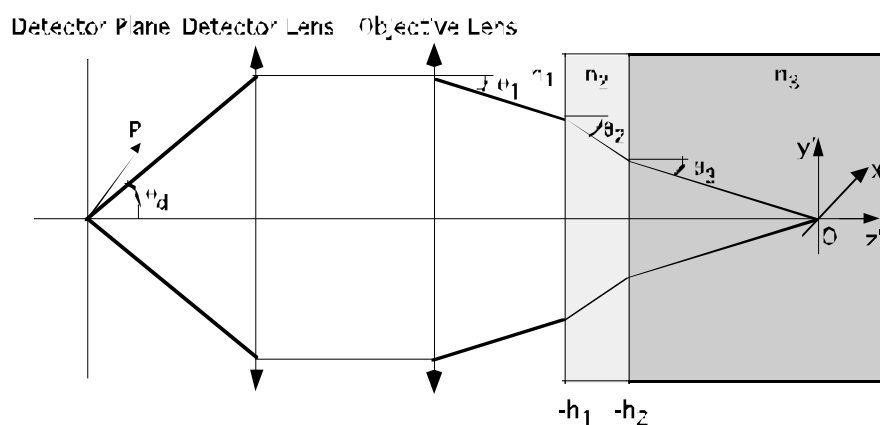


FIG. 13. Observation d'un dipôle à travers un milieu stratifié (Modèle de Haeblerlé *et al*)

$$E_{1x'} = \frac{1}{2} \left[p_{ex}^* (T'_s + T'_p \cos \theta'_N \cos \theta'_1) - 2 p_{ez}^* T'_p \sin \theta'_N \cos \theta'_1 \cos \phi_1 - (T'_s - T'_p \cos \theta'_N \cos \theta'_1) (p_{ex}^* \cos 2\phi_1 + p_{ey}^* \sin 2\phi_1) \right] \quad (43a)$$

$$E_{1y'} = \frac{1}{2} \left[p_{ey}^* (T'_s + T'_p \cos \theta'_N \cos \theta'_1) - 2p_{ez}^* T'_p \sin \theta'_N \cos \theta'_1 \sin \phi_1 \right. \\ \left. - (T'_s - T'_p \cos \theta'_N \cos \theta'_1) (p_{ex}^* \sin 2\phi_1 - p_{ey}^* \cos 2\phi_1) \right] \quad (43b)$$

$$E_{1z'} = \left[p_{ez}^* T'_p \sin \theta'_N \sin \theta'_1 - T'_p \cos \theta'_N \sin \theta'_1 (p_{ex}^* \cos \phi_1 + p_{ey}^* \sin \phi_1) \right] \quad (43c)$$

Pour le milieu stratifié, on a maintenant

$$T'_{2s,p} = \frac{t_{32s,p} t_{21s,p} \exp(-i\beta)}{1 + r_{32s,p} r_{21s,p} \exp(-2i\beta)} \quad (44)$$

avec $\beta = k_2 |h_2 - h_1| \cos \theta'_2$

Les coefficients de Fresnel en transmission et réflexion sont maintenant calculés dans le sens de propagation du milieu 3 vers le milieu 1 (c'est à dire dans le sens inverse que précédemment):

$$t_{nm-1,s} = \frac{2n_n \cos \theta'_n}{n_n \cos \theta'_n + n_{n-1} \cos \theta'_{n-1}} \\ t_{nm-1,p} = \frac{2n_n \cos \theta'_n}{n_{n-1} \cos \theta'_n + n_n \cos \theta'_{n-1}} \\ r_{nm-1,s} = \frac{n_n \cos \theta'_n - n_{n-1} \cos \theta'_{n-1}}{n_n \cos \theta'_n + n_{n-1} \cos \theta'_{n-1}} \\ r_{nm-1,p} = \frac{n_{n-1} \cos \theta'_n - n_n \cos \theta'_{n-1}}{n_{n-1} \cos \theta'_n + n_n \cos \theta'_{n-1}} \quad (45)$$

La lentille de l'objectif refocalise le champ sous forme d'ondes planes, et on montre qu'on peut alors écrire le champ après l'objectif sous la forme :

$$E_{x'} = \cos^{-1/2} \theta_1 \left\{ p_{ex}^* [(T'_s + T'_p \cos \theta'_N) - (T'_s - T'_p \cos \theta'_N) \cos 2\phi_1] \right. \\ \left. - p_{ey}^* (T'_s - T'_p \cos \theta'_N) \sin 2\phi_1 \right. \\ \left. - 2p_{ez}^* T'_p \sin \theta'_N \cos \phi_1 \right\} \quad (46a)$$

$$E_{y'} = \cos^{-1/2} \theta_1 \left\{ -p_{ex}^* (T'_s - T'_p \cos \theta'_N) \sin 2\phi_1 \right. \\ \left. + p_{ey}^* [(T'_s + T'_p \cos \theta'_N) + (T'_s - T'_p \cos \theta'_N) \cos 2\phi_1] \right. \\ \left. - 2p_{ez}^* T'_p \sin \theta'_N \sin \phi_1 \right\} \quad (46b)$$

$$E_{z'} = 0 \quad (46c)$$

Ce champ est refocalisé sur le détecteur par la lentille de détection. On considère par la suite une lentille de détection de faible ouverture numérique. On peut alors simplifier le traitement en disant que cette lentille effectue une transformée de Fourier partielle des composantes individuelles du champ incident :

$$E_{x'} = FT(E_{x'}) = p_{ex}^* (I_{0\text{det}} + I_{2\text{det}} \cos 2\phi_d) + p_{ey}^* (I_{2\text{det}} \sin 2\phi_d) - 2iI_{1\text{det}} p_{ez}^* \cos \phi_d \quad (47a)$$

$$E_{y'} = FT(E_{y'}) = p_{ex}^* I_{2\text{det}} \sin 2\phi_d + p_{ey}^* (I_{0\text{det}} - I_{2\text{det}} \cos 2\phi_d) - 2iI_{1\text{det}} p_{ez}^* \sin \phi_d \quad (47b)$$

Et on a les intégrales de diffraction en détection :

$$\begin{aligned} I_{0\text{det}} &= \int_0^{\alpha_d} (\cos \theta'_1)^{-1/2} \sin 2\theta_d J_0(k_3 \rho' \sin \theta_d) (T'_s + T'_p \cos \theta'_3) \exp(-ik_0 \Psi_{\text{det}}) \exp(-ik_1 z' \cos \theta'_1) d\theta_d \\ I_{1\text{det}} &= \int_0^{\alpha_d} (\cos \theta'_1)^{-1/2} \sin 2\theta_d J_1(k_3 \rho' \sin \theta_d) T'_p \sin \theta'_3 \exp(-ik_0 \Psi_{\text{det}}) \exp(-ik_1 z' \cos \theta'_1) d\theta_d \\ I_{2\text{det}} &= \int_0^{\alpha_d} (\cos \theta'_1)^{-1/2} \sin 2\theta_d J_2(k_3 \rho' \sin \theta_d) (T'_s - T'_p \cos \theta'_3) \exp(-ik_0 \Psi_{\text{det}}) \exp(-ik_1 z' \cos \theta'_1) d\theta_d \end{aligned} \quad (48)$$

Notons en particulier la présence d'une fonction d'apodization inverse par rapport aux intégrales de diffraction pour la focalisation.

La fonction d'aberration initiale en détection est donnée par :

$$\Psi_{\text{det}} = n_1 h_1 \cos \theta'_1 - n_N h_{N-1} \cos \theta'_N \quad (49)$$

La relation reliant les angles d'incidence à l'entrée de l'objectif et sur le détecteur étant :

$$\frac{k_1 \sin \alpha_1}{k_d \sin \alpha_d} = \frac{k_1 \sin \theta'_1}{k_d \sin \theta_d} = \beta \quad (50)$$

où β est le grandissement nominal de l'objectif, et n_d est l'indice du milieu du détecteur (le détecteur étant généralement placé dans l'air, on a $n_d = 1$).

La PSF de détection se calcule alors simplement sous la forme :

$$PSF(x, y, z) = |E_x|^2 + |E_y|^2 \quad (51)$$

Nous disposons donc maintenant d'un modèle rigoureux de formation d'image pour la détection dans un microscope. Ce modèle s'applique au microscope conventionnel.

En le combinant au modèle rigoureux de Török et Varga pour l'illumination, nous avons maintenant un modèle complet et rigoureux du microscope confocal. Pour cela, on considère que le champ d'illumination induit le dipôle, dont le moment est proportionnel au champ incident (illumination monophotonique), au carré ou au cube de ce champ (effet biphoton et triphoton).

Cependant, ce modèle, tout comme le modèle de Török et Varga, et pour les mêmes raisons, est relativement difficile à utiliser dans la pratique, car il faut introduire manuellement dans le calcul les possibles corrections d'aberration.

2.6. Simplifications pour les spécimens biologiques

Le modèle scalaire de Gibson et Lanni a pour avantage d'introduire explicitement les paramètres du système optique considéré (spécimen + lamelle + milieu d'immersion + objectif), tels que recommandés par le fabricant et tels qu'ils sont en réalité (si connus). De ce fait, ce modèle a remporté un certain succès de part sa facilité d'utilisation. Il souffre cependant de plusieurs limitations. Tout d'abord la fonction d'apodisation $\cos^{1/2}\theta$ pour un objectif aplanétique obéissant à la condition des sinus d'Abbe n'est pas introduite. D'autre part, ce modèle considère que les rayons lumineux traversant le milieu stratifié sont transmis sans réflexion aux interfaces, c'est-à-dire à intensité constante. Même si l'on considère une émission de lumière non-polarisée, ce qui a pour effet de moyenniser les différentes composantes, on peut légitimement douter de la précision des résultats obtenus avec ce modèle, en particulier pour les objectifs à grande ouverture numérique, pour lesquels les rayons marginaux arrivent à grande incidence.

En biologie, trois cas courants sont à considérer : les objectifs à immersion à air, à immersion à huile, et à immersion à eau. Comme l'ont fait remarquer Török et Varga, pour de tels milieux les coefficients de Fresnel r_s et r_p (équation (42)) sont très faibles et le dénominateur de l'expression (41) peut donc être considéré égal à un. En conséquence, la fonction d'aberration pour le milieu stratifié à trois composants peut s'écrire :

$$\Psi = \sum_{j=1}^3 h_j (n_{j+1} \cos \theta_{j+1} - n_j \cos \theta_j) \quad (52)$$

On se limitera au cas où l'ouverture numérique de l'objectif est limitée de telle sorte qu'il n'y a pas de rayons subissant une réflexion totale. On peut alors réécrire l'équation (52) avec les notations de Gibson et Lanni ($\rho = n_1 \sin \theta_1 / NA$, $n_1 \sin \alpha = NA$, $n_3 = n_s$, $n_2 = n_g$, $h_2 = t_s$ et $h_1 = t_s + t_g$) sous la forme :

$$\Psi = -(t_s + t_g) n_i \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i}\right)^2} + n_s t_s \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_s}\right)^2} + n_g t_g \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_g}\right)^2} \quad (53)$$

La comparaison de l'équation (53) avec l'équation (36) met en évidence le parallèle entre les deux approches. Le second terme représente l'aberration introduite par la focalisation de l'onde à une profondeur ($h_2 = t_s$) sous la lamelle. Il est identique dans les deux cas. Le troisième terme représente l'aberration introduite par la lamelle. On le retrouve dans l'équation (36), accompagné d'un terme de compensation qui exprime le fait que l'objectif pré-introduit une aberration qui est exactement compensée quand une lamelle ayant les caractéristiques recommandées par le constructeur est utilisée.

Le premier terme de l'équation (53) est à séparer en deux :

$$\Psi_i = \Psi_{i1} + \Psi_{i2} = -t_g n_i \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i}\right)^2} - t_s n_i \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i}\right)^2} \quad (54)$$

L'équation (54) représente la fonction d'aberration initiale. Le premier terme ne dépend que de ρ , et ne dépend pas de la profondeur du spécimen. Il est alors aisé de corriger

cette aberration sphérique initiale en introduisant un terme de compensation, en disant que l'objectif introduit une aberration définie par :

$$\Psi_{obj} = +t_{g^*} n_{i^*} \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_{i^*}}\right)^2} \quad (55)$$

de telle sorte que lorsqu'une lamelle d'épaisseur optimale est utilisée en combinaison avec un milieu d'immersion d'indice optimal, ces deux facteurs se compensent.

Török et Varga considèrent le cas d'une onde plane focalisée dans un milieu à travers la lamelle, ce qui explique la présence d'un deuxième terme dans l'équation (54), qui n'est pas présent dans la formulation de Gibson et Lanni. Dans ce modèle, on considère au contraire un balayage d'une source ponctuelle pour acquérir la PSF en 3D. L'épaisseur du milieu d'immersion varie donc au cours du processus d'acquisition de l'image 3D. En écrivant la variation d'épaisseur en fonction de la défocalisation, on obtient alors :

$$t_i = n_i \left[\frac{z}{n_i} + \left(\frac{t_{g^*}}{n_{g^*}} - \frac{t_g}{n_g} \right) + \left(\frac{t_{i^*}}{n_{i^*}} - \frac{t_s}{n_s} \right) \right] \quad (56)$$

En réécrivant la différence de chemin optique à l'aide de cette équation, on obtient alors l'expression finale de l'OPD qui fait apparaître les termes correspondants aux contributions des différentes composantes (spécimen, lamelle et milieu d'immersion) du système optique :

$$\begin{aligned} OPD = & n_i z \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i}\right)^2} \\ & + n_g t_g \left(\sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_g}\right)^2} - \left(\frac{n_i}{n_g}\right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i}\right)^2} \right) \\ & - n_g^* t_g^* \left(\sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_g^*}\right)^2} - \left(\frac{n_i}{n_g^*}\right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i}\right)^2} \right) \\ & - n_i^* t_i^* \left(\sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i^*}\right)^2} - \left(\frac{n_i}{n_i^*}\right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i}\right)^2} \right) \\ & + n_s t_s \left(\sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_s}\right)^2} - \left(\frac{n_i}{n_s}\right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_i}\right)^2} \right) \end{aligned} \quad (57)$$

avec z la défocalisation due au balayage à travers le spécimen et NA l'ouverture numérique de l'objectif.

On reconnaît maintenant dans le premier terme de l'équation (57) le terme présent dans l'expression de Török et Varga. Nous avons ainsi établi l'équivalence entre les deux méthodes pour calculer les termes d'aberration. Ainsi, on peut maintenant proposer de

combiner les deux méthodes, en calculant la RIO avec les intégrales de diffraction rigoureuses de Török et Varga pour lesquelles on calcule la différence de chemin optique par la méthode de Gibson et Lanni :

$$\begin{aligned}
I_{0ill} &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos\theta_1} \sin\theta_1 J_0(k_1(x^2 + y^2)^{1/2} \sin\theta_1) \\
&\quad \times (t_{12s}t_{23s} + t_{12p}t_{23p} \cos\theta_3) \exp(ik_0OPD) d\theta_1 \\
I_{1ill} &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos\theta_1} \sin\theta_1 J_1(k_1(x^2 + y^2)^{1/2} \sin\theta_1) \\
&\quad \times t_{12p}t_{23p} \sin\theta_3 \exp(ik_0OPD) d\theta_1 \\
I_{2ill} &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos\theta_1} \sin\theta_1 J_2(k_1(x^2 + y^2)^{1/2} \sin\theta_1) \\
&\quad \times (t_{12s}t_{23s} - t_{12p}t_{23p} \cos\theta_3) \exp(ik_0OPD) d\theta_1
\end{aligned} \tag{58}$$

Une analyse rapide de la fonction d'aberration et des coefficients de Fresnel en détection montre que ceux-ci ont la même forme que la fonction d'aberration et les coefficients de Fresnel en illumination. Le raisonnement précédent peut donc s'appliquer aussi aux intégrales de diffraction en détection.

On peut donc calculer les intégrales de diffraction en détection selon les expressions :

$$\begin{aligned}
I_{0det} &= \int_0^{\alpha_d} (\cos\theta'_1)^{-1/2} \sin 2\theta'_d J_0(k_d(x'^2 + y'^2)^{1/2} \sin\theta'_d) \\
&\quad \times (t_{32s}t_{21s} + t_{32p}t_{21p} \cos\theta'_3) \exp(-ik_0OPD') d\theta'_d \\
I_{1det} &= \int_0^{\alpha_d} (\cos\theta'_1)^{-1/2} \sin 2\theta'_d J_1(k_d(x'^2 + y'^2)^{1/2} \sin\theta'_d) \\
&\quad \times t_{32p}t_{21p} \sin\theta'_3 \exp(-ik_0OPD') d\theta'_d \\
I_{2det} &= \int_0^{\alpha_d} (\cos\theta'_1)^{-1/2} \sin 2\theta'_d J_2(k_d(x'^2 + y'^2)^{1/2} \sin\theta'_d) \\
&\quad \times (t_{12s}t_{23s} - t_{12p}t_{23p} \cos\theta'_3) \exp(-ik_0OPD') d\theta'_d
\end{aligned} \tag{59}$$

Avec OPD' calculé avec $\rho = n_i \sin\theta'_1 / NA$.

Pour conclure, nous disposons donc maintenant de modèles vectoriels rigoureux aussi bien pour le calcul des PSF d'illumination que pour le calcul des PSF de détection. De plus, ces modèles sont faciles à utiliser, grâce à leur modification à l'aide de la méthode de Gibson et Lanni pour calculer la fonction d'aberration.

2.7. Modélisation des microscopes confocal et multiphoton

Nous disposons maintenant de tous les éléments nécessaires à une modélisation rigoureuse du microscope confocal, à savoir un modèle précis de calcul de l'illumination, ainsi qu'un modèle rigoureux de détection. Le point fondamental restant est la modélisation de l'interaction entre le champ incident et le spécimen, qui donnera naissance au champ électromagnétique détecté. Dans le cas de la fluorescence, quatre cas extrêmes sont à considérer suivant la nature de l'excitation du dipôle et le mécanisme de réémission photonique :

- - Dipôle permanent à l'excitation et fixe à l'émission
- - Dipôle permanent à l'excitation et libre à l'émission
- - Dipôle induit à l'excitation et fixe à l'émission
- - Dipôle induit à l'excitation et libre à l'émission

Lorsque le dipôle est fixe à l'excitation, on obtient le moment d'excitation simplement par le produit scalaire du moment dipolaire par le champ électrique d'excitation, calculé à partir de la RIO en illumination. Lorsque le dipôle est induit, on considère que le moment dipolaire est proportionnel au champ électrique d'excitation, et colinéaire à celui-ci (on négligera les phénomènes de saturation).

En microscopie de fluorescence, les temps de pose nécessaires à l'acquisition d'une image sont longs devant les phénomènes d'excitation et de désexcitation. Le signal enregistré correspond donc toujours à une moyenne. Lorsque le dipôle est libre de tourner sur lui-même entre l'excitation et la désexcitation, cela revient donc à moyenniser la PSF de détection sur toutes les orientations spatiales possibles du dipôle. Dans ce cas, on montre que la PSF du microscope confocal non-polarisé est obtenu en multipliant la PSF d'illumination par la PSF de détection. Dans les travaux précédemment publiés, on considère que ces deux PSF sont identiques, ce dont nous allons discuter maintenant.

Nous avons donc la possibilité de calculer simplement la PSF d'un microscope confocal en combinant les modèles développés auparavant pour l'excitation et la détection. La Figure 14 décrit le principe. La PSF d'illumination est calculée dans le repère (x,y,z) centré en O . Une molécule fluorescente au voisinage de O est excitée par le champ incident. Cette molécule réémet un champ électromagnétique calculé dans le référentiel (x',y',z') centré en O' . Pour la lisibilité du schéma, la distance entre O et O' a été grandement exagérée.

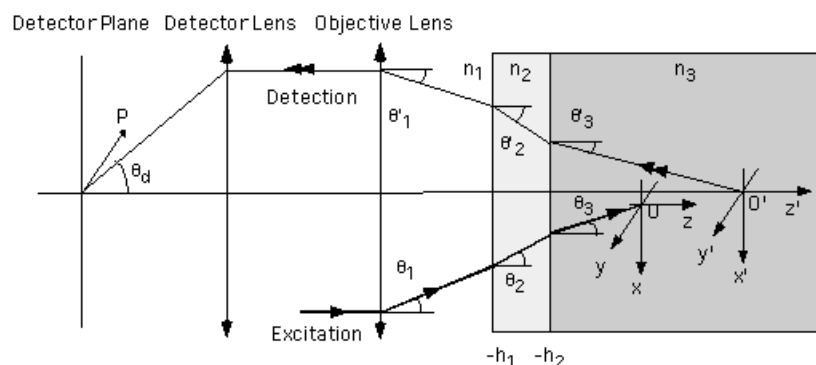


FIG. 14. Modèle d'un microscope confocal

3. LOGICIELS DE CALCUL DES RIO

Il existe de nombreux logiciels de calculs de RIO basés sur les modèles que nous venons de décrire, ou sur des extensions de ces modèles (si on peut utiliser ces logiciels (presque) sans connaissance des méthodes de calcul associées, il convient cependant d'être toujours prudent quant à la validité des modèles). On peut citer par exemple :

COSMOS : <http://cirl.memphis.edu/cosmos.php> est un logiciel multi-plateforme de traitement d'image en microscopie, qui inclut plusieurs modèles de calcul de RIO.

ImageTrak : <http://www.ucalgary.ca/styslab/imagetrak> est un logiciel Mac OSX de traitement d'image en microscopie intégrant diverses approches de calcul de RIO. Inspiré de XCOSM, qui est l'ancêtre de COSMOS.

ImageJ : <http://rsb.info.nih.gov/ij/> est un logiciel gratuit en Java de traitement d'image en microscopie, qui inclut via des modules additionnels plusieurs modèles de calcul de RIO.

PSFLab : <http://onemolecule.chem.uwm.edu/software> est un utilitaire multi-plateforme dédié au calcul de RIO en microscopie de fluorescence.

ICY : <http://icy.bioimageanalysis.org> est un logiciel communautaire de gestion/traitement d'images en biologie, et dispose de modules de calcul de RIO pour microscope grand champ.

4. CONCLUSION

Nous disposons maintenant de plusieurs modélisation de la RIO d'un microscope de fluorescence. Divers logiciels permettent de calculer cette RIO, et d'étudier en particulier l'influence des paramètres d'acquisition sur celle-ci : profondeur d'observation, milieu d'immersion etc...

On retiendra en particulier que la RIO est limitée par la diffraction uniquement lorsque l'on travaille dans les conditions prévues par le fabricant, et que la résolution du microscope est rapidement dégradée, en particulier par l'aberration sphérique.

Une bonne connaissance de ces modèles de formation d'image permet alors d'imaginer diverses configurations visant à améliorer la résolution.

5. REFERENCES

Il existe de très nombreux articles traitant du calcul de la réponse impulsionnelle optique en microscopie de fluorescence. La liste donnée ici correspond surtout à ceux ayant servi à la préparation de ce cours ou pouvant en constituer un complément direct.

- Abbe E., Arch. Mikrosk. Anat. **9**, 413-468 (1873)
- S.F. Gibson and F. Lanni, J. Opt. Soc. Am. A **6**, p. 1357 (1989)
- S.F. Gibson and F. Lanni, J. Opt. Soc. Am. A **8**, p. 1601 (1991)
- E. Wolf, Proc. R. Soc. London Ser. A **253**, 349-357 (1959)
- B. Richards and E. Wolf, Proc. R. Soc. London Ser. A **253**, 358-379 (1959)
- P. Török, P. Varga, Z. Laczik, and G.R. Booker, J. Opt. Soc. Am. A **12**, 325-332 (1995)
- P. Török, P. Varga, and G.R. Booker, J. Opt. Soc. Am. A **12**, 2136-2144 (1995)
- P. Török, P. Varga, A. Konkol, and G.R. Booker, J. Opt. Soc. Am. A **13**, 2232-2238 (1996)
- P. Török and P. Varga, Appl. Opt. **36**, 2305-2312 (1997)
- P. Török, Optical Memory and Neural Networks **8**, 9-24 (1999)
- C.J.R. Sheppard and P. Török, Optik **105**, 77-82 (1997)
- P. Török, P.D. Higdon and T. Wilson, J. Mod. Opt. **45**, 1681-1698 (1998)
- P. Török, P.D. Higdon and T. Wilson, Opt. Comm. **148**, 300-315 (1998)
- P.D. Higdon, P. Török and T. Wilson, J. Microsc. (Oxford) **193**, 127-141 (1998)
- P. Török, Opt. Lett. **25**, 1463-1465 (2000)
- O. Haeberlé, M. Ammar, H. Furukawa, K. Tenjimabayashi and P. Török, Opt. Exp. **11**, 2964-2969 (2003) <http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=OPEX-11-22-2964>
- O. Haeberlé, Opt. Comm. **216**, 55-63 (2003)
- O. Haeberlé, Opt. Comm. **235**, 1-10 (2004)
- S.W. Hell, G. Reiner, C. Cremer, and E.H.K. Stelzer, J. Microsc. (Oxford) **169**, 391-405 (1993)
- A. Egner and S.W. Hell, J. Microsc. (Oxford) **193**, 244-249 (1999)
- M. Minsky, Scanning **10**, 128-138 (1988)
- Denk W., Strickler J.H. and Webb W.W., Science **248**, 73-75 (1990)
- K. König, J. Microsc. **200**, 83-104 (2000)
- M. Schrader, K. Bahlmann and S.W. Hell, Optik **104**, 116-124 (1997)
- L. Moreaux, O. Sandre and J. Mertz, JOSA B **17**, 1685-1694 (2000)