



HAL
open science

Développement d'algorithmes de reconstruction tomographique pour l'analyse PIXE d'échantillons biologiques

Duy Thuy Nguyen

► **To cite this version:**

Duy Thuy Nguyen. Développement d'algorithmes de reconstruction tomographique pour l'analyse PIXE d'échantillons biologiques. Physique Nucléaire Théorique [nucl-th]. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I; Université des Sciences Naturelles - Hanoi, 2008. Français. NNT: . tel-00404564

HAL Id: tel-00404564

<https://theses.hal.science/tel-00404564>

Submitted on 16 Jul 2009

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.

THÈSE

en cotutelle entre

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ECOLE DOCTORALE DE PHYSIQUE ET SCIENCES DE L'INGENIEUR

et

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES NATURELLES

DE L'UNIVERSITÉ NATIONALE à HANOI

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

par **NGUYEN Duy Thuy**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

Spécialité : Astrophysique, Plasmas, Corpuscules

**DEVELOPPEMENT D'ALGORITHMES DE RECONSTRUCTION TOMOGRAPHIQUE
POUR L'ANALYSE PIXE D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES**

Thèse soutenue le 19 Mai 2008

Après avis de :

M. S. BOHIC, Chargé de recherche, INSERM, ESRF, Grenoble

Rapporteurs

M. C. MOREL, Professeur, Université Marseille II

Devant la commission d'examen formée de :

M. Ph. QUENTIN, Professeur, Université Bordeaux I

Président

M. S. BOHIC, Chargé de recherche, INSERM, ESRF, Grenoble

Rapporteur

M. C. MOREL, Professeur, Université Marseille II

Rapporteur

M. Ph. MORETTO, Professeur Université Bordeaux I

M. M. C. NGUYEN, Docteur, Université Nationale à Hanoi, Viêt Nam

M. Q. H. PHAM, Professeur, Université Nationale à Hanoi, Viêt Nam

Mme. C. HABCHI, Maître de Conférences, Université Bordeaux I

Membre invité

Remerciements

Je tiens à remercier Monsieur Bernard HAAS, Directeur de Recherche au CNRS et directeur du Centre d'Etude Nucléaire Bordeaux Gradignan, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie très vivement Monsieur Philippe QUENTIN, Professeur à l'Université Bordeaux I, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Merci pour tout ce que vous avez fait, pour m'avoir donné l'occasion de faire mes études à Bordeaux.

Je tiens à remercier mes rapporteurs de thèse, Monsieur Christian MOREL, Professeur à l'Université Marseille II, et Monsieur Sylvain BOHIC, Chargé de recherche INSERM pour m'avoir fait l'honneur de lire attentivement mon mémoire. Leurs commentaires sur mon manuscrit ont été très enrichissants et leur présence à la soutenance m'a fait ressentir une valorisation importante de mon travail.

Je remercie Monsieur PHAM Quoc Hung, Professeur de l'Université Nationale à Hanoï, d'avoir accepté d'être le co-directeur de cette thèse relativement éloignée de ses thématiques de recherche. Je tiens également à remercier Monsieur NGUYEN Mau Chung, Docteur de l'Université Nationale à Hanoï, qui a accepté de participer à ce jury.

J'explique ma profonde reconnaissance à Monsieur Philippe MORETTO, Professeur à l'Université Bordeaux I et en charge de l'équipe Interface Physique Biologie, qui m'a permis d'effectuer ce doctorat, de m'avoir soutenu tout au long de ma thèse. Je vous remercie pour toute la disponibilité et la patience dont vous avez fait preuve au parcours de mes séjours au laboratoire.

Je suis particulièrement reconnaissant à Madame Claire HABCHI, Maître de Conférences à l'Université Bordeaux I, qui a encadré ma thèse avec zèle et dévouement. Mon travail a pleinement profité de toute son expertise, qu'elle a distillée avec cordialité. Ses remarques et conseils au moment de la rédaction de ce manuscrit en ont amélioré la présentation, la clarté et le contenu. Merci pour toutes les discussions enthousiastes que nous avons pu partager.

Je tiens également à remercier Monsieur Philippe BARBERET, maître de conférences à l'Université de Bordeaux I. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée, notamment pour avoir contribué à faire des jours de faisceau des moments si particuliers.

Mes remerciements s'adressent également à toute l'équipe Interface Physique Biologie qui m'a accompagné tout au long de cette aventure : Sébastien INCERTI, Hervé SEZNEC, Marina SIMON, Frédéric ANDERSSON, Merci à tous.

Je tiens à remercier à l'ensemble du personnel du CENBG pour avoir fait de ce laboratoire un lieu de travail privilégié. Trop nombreux pour être cités nommément, que chacun trouve ici l'expression de ma sympathie.

MERCI à mes parents, ma sœur, ma Van Anh, mes ami(e)s d'avoir été là sans toujours comprendre ce après quoi je courrais, même pieds nus !

Table des matières

Introduction.....	5
Chapitre I.....	11
1.1 Technique STIM (Scanning Transmission Ion Microscopy)	13
1.1.1 Principe d'une analyse STIM.....	13
1.1.2 Introduction aux phénomènes physique.....	13
a. Parcours des ions.....	13
b. Les pouvoirs d'arrêt	15
1.1.3 Calcul des pouvoirs d'arrêt	17
a. Calcul des pouvoirs d'arrêt des protons	17
b. Calcul des pouvoirs d'arrêt des alphas.....	18
c. La loi d'additivité de Bragg	18
d. Calcul d'épaisseur	19
1.1.4 Cartographie STIM bidimensionnelle.....	20
a. Cartographie 2D par fenêtrage	20
b. Énergie médiane et moyenne	22
c. Résolution spatiale	23
d. Résolution en énergie.....	24
1.2 La technique PIXE (Particle Induced X-ray Emission)	24
1.2.1 Principe d'une analyse PIXE.....	24
1.2.2 L'émission X.....	25
1.2.3 Section efficace d'émission X.....	28
a. Section efficace d'ionisation	28
b. Rendement de fluorescence.....	29
c. Section efficace totale de production X	30
1.2.4 Calcul des concentrations élémentaires.....	30
a. Le cas des cibles minces.....	30
b. Le cas des cibles épaisses.....	31
c. Fluorescence secondaire.....	32
1.2.5 Les limites de la technique PIXE	32
a. Les éléments accessibles à l'analyse PIXE.....	32
b. Bruit de fond.....	33
1.3 Procédure d'analyse par tomographie STIM & PIXE.....	33
1.3.1 Analyse par tomographie STIM.....	34

1.3.2	Analyse par tomographie PIXE.....	35
1.3.3	La procédure d'analyse choisie	36
Chapitre II.....		39
2.1	Problème de la tomographie.....	41
2.2	Méthodes analytiques.....	43
2.2.1	Méthode de rétroprojection directe	43
2.2.2	Méthode de rétroprojection filtrée.....	44
2.2.3	Limitations expérimentales	46
2.2.4	Forme des filtres.....	47
2.3	Méthodes algébriques	48
2.3.1	Principe.....	48
2.3.2	La méthode ART	49
2.3.3	La méthode SIRT	50
2.3.4	L'algorithme MLEM.....	51
2.4	Applications aux cas des tomographies STIM et PIXE	52
2.4.1	Considérations générales.....	52
2.4.2	Tomographie STIM : méthode de rétroprojection filtrée.....	52
2.4.3	Tomographie PIXE : méthode ITEM.....	53
a.	Modélisation en cible épaisse.....	53
b.	Composition homogène.....	54
c.	Composition hétérogène.....	55
d.	Limites de la méthode ITEM	56
2.4.4	Tomographie PIXE : algorithme MLEM.....	56
2.4.5	Tomographie PIXE : le code DISRA.....	58
Chapitre III.....		59
3.1	Principe du code originel DISRA.....	63
3.1.1	Schéma général	63
3.1.2	Reconstruction de référence	63
3.1.3	Tomogramme à l'ordre zéro.....	64
3.1.4	Simulations.....	65
3.1.5	Correction des données et critère de convergence	66
3.1.6	Pour résumer	67

3.2	Détermination de concentrations élémentaires	69
3.2.1	Calcul de la densité de masse	69
3.2.2	Traitement du spectre PIXE expérimental	70
3.2.3	Modélisation de la production des raies X	71
3.2.4	Modélisation de l'atténuation des raies X	72
3.2.5	Efficacité de détection	74
3.2.6	Visualisation et analyse des résultats	74
3.3	Détermination du centre de rotation	75
3.3.1	Calcul du centre de rotation pour STIMT	75
3.3.2	Choix du centre de rotation pour PIXET	77
3.4	Procédures de correction des données expérimentales	78
3.4.1	Correction des sinogrammes	78
3.4.2	Correction de la reconstruction à l'ordre zéro	80
3.5	Tomographie PIXE de plans de coupe isolés	82
3.5.1	Problématique de la reconstruction	82
3.5.2	Méthode de résolution	83
3.6	Calculs d'atténuation à partir un objet fantôme	84
3.6.1	Principe des simulations effectuées	84
3.6.2	Morphologie du fantôme	84
3.6.3	Paramètres de simulation	86
3.6.4	Résultats et discussion	87
3.6.5	Convergence et durée de la reconstruction	91
Chapitre IV	97
4.1	Les accélérateurs	99
4.2	La microsonde nucléaire	102
4.2.1	Principe	102
4.2.2	Dispositif de focalisation	102
4.2.3	Système de balayage électrostatique	104
4.3	Dispositif expérimental pour la tomographie	104
4.3.1	Positionnement de l'échantillon	105
4.3.2	Détecteurs	107
4.3.3	Acquisition des données	107

4.4	Validation STIMT sur fibre micro-composite de référence.....	108
4.4.1	Echantillon de référence (SiC/AlN):.....	108
4.4.2	Conditions expérimentales	110
4.4.3	Traitement des données.....	110
4.4.4	Reconstruction et analyse quantitative.....	111
Chapitre V.....	113
5.1	Etude comparative de tomographie STIMT 3D d'une algue unicellulaire marine (Diatomée).....	115
5.1.1	Préparation des échantillons.....	115
5.1.2	Conditions expérimentales	116
5.1.3	Reconstruction tomographique 3D.....	117
5.1.4	Distributions 3D	120
5.1.5	Résultats comparatifs	122
5.2	Analyse STIMT / PIXET d'un échantillon de référence	123
5.2.1	Caractéristiques des échantillons de référence.....	123
5.2.2	Conditions expérimentales	125
5.2.3	Tomographie STIMT 3D	127
5.2.4	Reconstruction de référence et tomogramme à l'ordre zéro	130
5.2.5	Comparaison des résultats obtenus avec et sans correction d'atténuation.....	135
5.2.6	Discussion sur les paramètres numériques et expérimentaux	139
5.3	Analyse STIMT / PIXET d'une cellule humaine isolée	140
5.3.1	Préparation des échantillons.....	140
5.3.2	Conditions expérimentales	141
5.3.3	Paramètres de reconstruction STIMT / PIXET	142
5.3.4	Imagerie 3D de la cellule	143
5.3.5	Distributions élémentaires et composition	145
5.3.6	Discussion	148
Conclusion.....	149
Bibliographie.....	153

Introduction

Le développement de techniques de microscopie 3D offrant une résolution spatiale de l'ordre du micromètre ou moins a ouvert ces dernières années un large champ d'investigation pour l'étude de la constitution interne d'objets microscopiques. En biologie cellulaire notamment, ces techniques pourraient permettre l'observation de la pénétration de composés exogènes, comme des molécules d'intérêt pharmacologique ou bien des toxiques. D'un point de vue méthodologique, on pourrait classer ces techniques en trois groupes : la microtomographie, à partir de différentes sources (ions, électrons, rayonnement X synchrotron), la microscopie confocale et la spectrométrie de masse. Ces techniques apparaissent comme complémentaires du point de vue des possibilités offertes.

- La microscopie confocale peut permettre l'observation de cellules vivantes. Des mécanismes biologiques peuvent être suivis par l'intermédiaire de molécules fluorescentes, soit naturellement soit par le biais de fluorophores, ce qui limite en pratique le nombre de phénomènes pouvant être suivis simultanément.
- La spectrométrie de masse (SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry), en mode dynamique, permet le dosage 3D du contenu isotopique et élémentaire des échantillons étudiés par ablation progressive de la surface analysée, mais s'avère totalement destructive et nécessite de plus l'utilisation d'échantillons standards pour la normalisation des résultats.
- La microtomographie par électrons permet d'atteindre une résolution spatiale plus fine, de 2 à 5 nm, sur des coupes ne dépassant pas 500 nm d'épaisseur, ce qui permet l'étude de la morphologie et/ou de la composition d'organelles intracellulaires. Cependant les méthodes de préparation typiques nécessitent une cryofixation, substitution et solidification par des résines, ce qui pourrait altérer l'état originel des cellules. Cet inconvénient a été récemment résolu par la micro-tomographie de coupes cellulaires cryofixées (Baumeister et al., 1999; Leapman et al., 2004).
- La microtomographie par rayonnement synchrotron offre différentes possibilités (absorption, diffusion Compton, contraste de phase) pour l'étude de la morphologie 3D de cellules isolées avec une résolution spatiale de quelques centaines de nanomètres. Une information sur la composition interne est obtenue via l'analyse du spectre de fluorescence, qui permet d'atteindre des concentrations de l'ordre de $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, du fait des fortes intensités de fluorescence produites (Goloso et al., 2003). Un accès à la spéciation chimique (XANES : X-ray Absorption Near Edge Structure) est

également possible. De plus le rayonnement synchrotron peut être utilisé directement sur des cellules hydratées cryofixées. Cependant la complexité et les difficultés d'accès à ce type d'expériences restreignent ses applications à des études très spécifiques.

- La microtomographie par faisceau d'ions présente de fortes analogies avec les techniques par rayonnement synchrotron. L'étude de la perte en énergie des ions transmis (STIM : Scanning Transmission Ion Microscopy) donne accès d'une façon directe à la distribution 3D de la « densité », la masse volumique en g.cm^{-3} . Associée à une technique d'émission de rayonnement X (PIXE : Particle Induced X-ray Emission) les intensités de fluorescence peuvent être ainsi normalisées pour obtenir des concentrations en $\mu\text{g.g}^{-1}$, et ce d'une façon directe, sans l'intermédiaire d'étalons. La multiélémentarité de la technique PIXE, et sa sensibilité de l'ordre du $\mu\text{g.g}^{-1}$ se présentent comme des atouts intéressants. Du point de vue de la préparation des échantillons, bien que l'analyse sous vide interdise l'utilisation d'échantillons biologiques hydratés, ceux-ci peuvent être traités par cryofixation puis lyophilisation, ce qui permet de préserver leur structure microscopique. La taille des échantillons est notamment limitée par le parcours des protons dans la matière, soit quelques centaines de micromètres de diamètre pour des amas cellulaires déshydratés.

La microtomographie par faisceaux d'ions est ainsi très tôt apparue comme une technique séduisante par son principe simple et par l'obtention directe de résultats quantitatifs absolus. Les premières tentatives ont été réalisées assez rapidement après la construction des premières microsondes nucléaires, permettant d'atteindre des faisceaux d'un diamètre de l'ordre du micromètre. Citons les travaux pionniers de Schofield et Lefevre (1992), qui ont pour la première fois associés les tomographies STIM et PIXE pour l'étude des concentrations 3D en zinc et manganèse d'un dard de scorpion, démontrant les possibilités de ces techniques pour l'étude d'échantillons biologiques.

Cependant, les applications de la microtomographie par faisceaux d'ions sont restées relativement rares, essentiellement limitées à des études d'échantillons de référence, principalement du fait de deux difficultés majeures :

- La préparation des échantillons : des objets de quelques dizaines de micromètres de diamètre qui doivent être fixés au sommet d'un axe de rotation afin d'être visualisés sous différents angles sous faisceau ;

- Le développement d'algorithmes de traitement des données spécifiques, capables notamment de simuler précisément l'atténuation du rayonnements X depuis leur point d'émission jusqu'au détecteur.

Le souhait de disposer d'une technique non destructive d'analyse 3D à l'échelle cellulaire a motivé le développement de la microtomographie par faisceau d'ions auprès de la microsonde nucléaire du CENBG. Après des études de faisabilité à l'échelle cellulaire (Michelet et Moretto, 1999a et 1999b) la nécessité de disposer de codes de reconstruction adaptés s'est imposée. Un code complet a ainsi été réalisé pour la tomographie STIM, accompagné de procédures de visualisation et de traitement des données 3D (Michelet-Habchi *et al.*, 2005a). Le traitement des données de tomographie PIXE, entrepris par quelques laboratoires dans le monde, a posé plus de difficultés. Du point de vue algorithmique, le principal défi était de simuler correctement la production ainsi que l'atténuation des raies X dans un angle solide expérimental large, en disposant de données relativement bruitées du fait de la faible statistique de comptage. Le programme de reconstruction DISRA (Discrete Image Space Reconstruction Algorithm), développé à l'université de Melbourne par Sakellariou *et al.* (2002) a répondu de la façon la plus complète à ce jour à ce problème. Du point de vue expérimental en revanche, son application est dédiée au cas idéal de données tomographiques 3D complètes, ce qui pour des échantillons biologiques pose deux problèmes majeurs :

- des durées d'acquisition qui auraient été rédhibitoires ;
- des dommages sous faisceau qui auraient été importants pour des échantillons aussi fragiles.

Puisque l'application visée au CENBG était l'étude de la pénétration intracellulaire de composés exogènes, nous avons envisagé de remédier à ces difficultés en considérant certaines particularités du problème :

- les échantillons biologiques cellulaires présentent une composition globale relativement homogène, essentiellement d'éléments légers ;
- lorsque des structures d'intérêt sont identifiées, il serait suffisant de sonder ces structures par plans de coupes isolés, et non pas forcément tout le volume de l'échantillon.

L'extension du code DISRA pour le traitement de données de microtomographie d'échantillons biologiques a constitué l'objectif majeur de ce travail de thèse. En plus d'une modification de la structure du code, et l'ajout de procédures particulières, nous avons

également travaillé sur l'interfaçage de ce programme, qui n'était au départ constitué que de sous programmes individuels appelés par des lignes de commandes sous Linux. Une interface utilisateur complète a ainsi été développée.

Dans la description de ce travail, je commencerai par une introduction des principaux aspects théoriques et expérimentaux concernant les techniques STIM et PIXE ainsi que des contraintes liées aux expériences de tomographie.

Dans un deuxième temps, je présenterai un panorama des algorithmes de reconstruction les plus utilisés à l'heure actuelle. Les caractéristiques des techniques analytiques et itératives seront discutées, ce qui nous permettra d'appréhender les raisons des choix effectués pour les tomographies STIM et PIXE, et en particulier le choix du code DISRA.

Nous détaillerons dans le troisième chapitre les développements et modifications du programme DISRA, en fonction des exigences liées au dispositif expérimental du CENBG. Chacune des étapes de la reconstruction sera décrite, avec son principe et sa contribution au résultat final. L'ensemble de la procédure, développé dans le cadre d'une interface dans l'environnement Windows, sera ensuite présenté, illustré par des exemples issus de simulations numériques et/ou de données expérimentales.

Le chapitre 4 sera consacré à une description du dispositif expérimental de tomographie sur la ligne microfaisceau du CENBG. Une première validation du code DISRA pour la tomographie en densité a été réalisée grâce à une expérience de tomographie STIM sur une fibre micro-composite de référence, de composition et de densité connues.

Des applications à l'échelle cellulaire seront présentées dans le dernier chapitre. Une expérience de tomographie STIM d'une algue unicellulaire marine, une diatomée en l'occurrence, est utilisée afin de comparer deux méthodes de reconstruction, analytique et itérative. Deux codes de tomographie développés au CENBG, TomoRebuild et DISRA, sont comparés via la mesure de la distribution en densité de la diatomée. Les deux premiers exemples de reconstruction de tomographie PIXE avec le code développé seront ensuite présentés : le premier est un échantillon de référence composé de microsphères de verre de quelques micromètres de diamètre dans une matrice polymère, et le deuxième l'analyse d'un groupe de cellules cancéreuses humaines. Ces exemples permettront une discussion sur les paramètres numériques et expérimentaux utilisés pour ces analyses, et suggéreront des perspectives tant au point de vue des techniques expérimentales que des algorithmes de reconstruction.

Chapitre I

Techniques STIM et PIXE

1.1 Technique STIM (Scanning Transmission Ion Microscopy)

1.1.1 Principe d'une analyse STIM

La microscopie ionique en transmission (STIM) est basée sur la mesure de l'énergie résiduelle des ions après traversée de l'échantillon à cartographier. L'information que fournit la perte d'énergie permet de calculer la densité de cet échantillon. Le ralentissement de l'ion incident dépend en effet de la masse surfacique de la matière traversée et de sa composition. Généralement, le faisceau d'ions (typiquement des protons ou alphas de 2 à 4 MeV) est délivré par un accélérateur de particules puis focalisé jusqu'à des dimensions transverses de l'ordre du micromètre. Un système de déflection placé devant la cible permet alors de balayer le faisceau et de le positionner précisément en un point donné. Le contraste en densité, obtenu pixel par pixel, fournit une image de l'échantillon. Une représentation schématique d'une expérience STIM est montrée sur la figure 1.1.

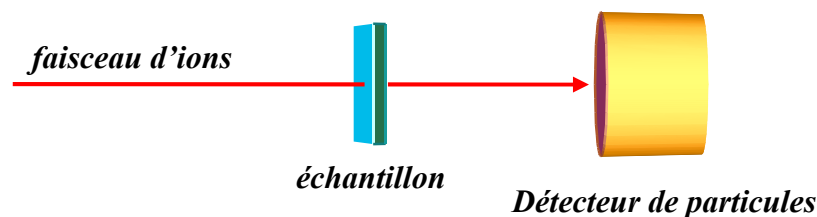


Figure 1.1 : Représentation schématique d'une expérience STIM avec détection « dans l'axe »

Dans cette configuration, le détecteur est placé dans l'axe du faisceau (à l'angle de 0° par convention). Les détecteurs solides de type semi-conducteur (Si), grâce à une efficacité très proche de 100 %, autorisent l'utilisation de faisceaux de très faible intensité de courant, typiquement quelques milliers de particules par seconde. Ceci permet d'optimiser la résolution spatiale du faisceau, qui peut alors être fortement collimaté avant focalisation. Cependant, ces détecteurs de particules sont encore soumis à des dommages, la zone d'impact du faisceau restant très localisée.

1.1.2 Introduction aux phénomènes physique

a. Parcours des ions

En pénétrant dans l'échantillon (fig. 1.2), les ions perdent graduellement leur énergie jusqu'à éventuellement leur arrêt complet. Pour être pris en compte dans l'analyse, tous les ions doivent traverser le spécimen et être enregistrés par le détecteur, ce qui limite la technique à

l'analyse d'échantillons minces. Elle est donc bien adaptée à l'analyse d'échantillons biologiques déshydratés.

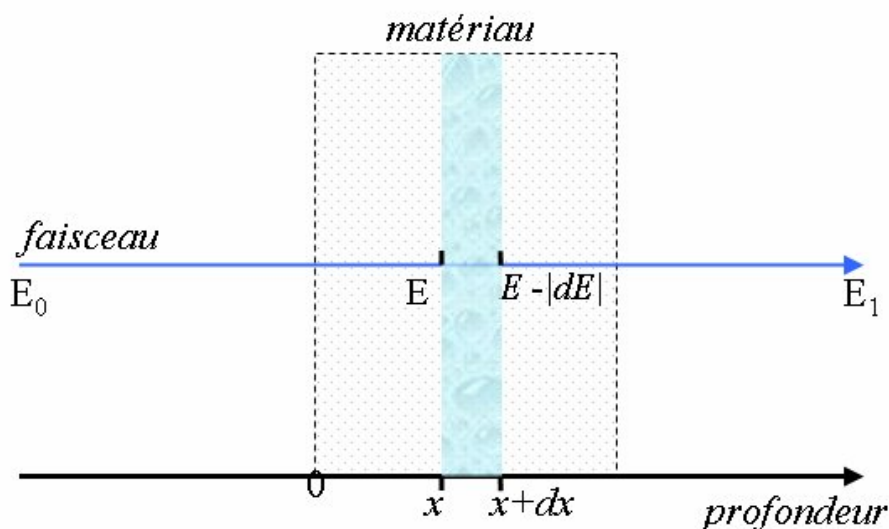


Figure 1.2 : Ralentiement du faisceau d'ions à travers l'échantillon

La taille maximale des spécimens qui peuvent être analysés est donc limitée par l'énergie des ions incidents. On peut évaluer les dimensions accessibles pour une énergie d'incidence donnée en utilisant le pouvoir d'arrêt de l'ion dans un matériau donné. Ce pouvoir d'arrêt est défini comme la perte d'énergie par unité de longueur ($\text{MeV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) ou de masse surfacique traversée ($\text{MeV} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$). Par exemple, les pouvoirs d'arrêt de protons dans le carbone (masse volumique $\rho = 2,253 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$) sont portés dans le tableau 1.1 pour quelques énergies (Ziegler, 2004).

Energie (MeV)	- dE/dx	
	$\text{MeV} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	$\text{MeV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$
3	105,2	0,024
2	142	0,32
1	230	0,518

Tableau 1.1 : Pouvoir d'arrêt des protons dans du carbone.

On peut, par ailleurs, évaluer simplement la dimension des échantillons analysables par cette méthode en calculant le parcours des ions. De manière générale, les échantillons biologiques à analyser contiennent en effet jusqu'à 70 % d'eau. La préparation de ces échantillons nécessite leur déshydratation par des méthodes cryogéniques afin de les placer ensuite dans une

chambre d'analyse sous vide. Cette étape permet d'extraire l'eau par sublimation de la glace de l'échantillon original, ce dernier subissant alors une perte de masse, et donc de densité, qui peut aller jusqu'à 70 %. La masse volumique sèche est alors de l'ordre de $0,3 \text{ g.cm}^{-3}$. Si l'on considère que la matière organique est essentiellement composée de C, H, O et N, nous pouvons évaluer le parcours des ions en considérant du carbone pur. Le résultat, après calcul par le code de simulation SRIM2003 (Stopping and Range of Ions in Matter) (Ziegler, 2004) est donné sur la figure 1.3 en fonction de l'énergie d'incidence.

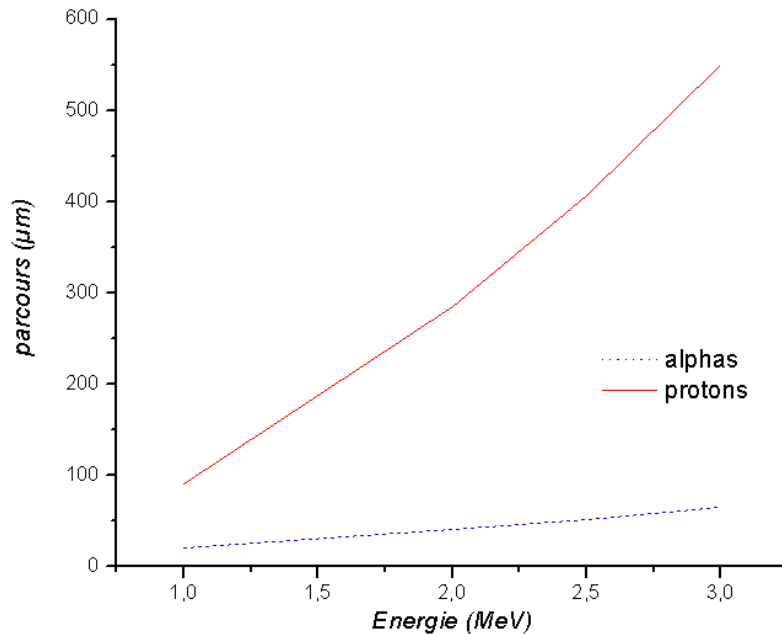


Figure 1.3 : Parcours des ions dans un échantillon biologique déshydraté avec une masse volumique de $0,3 \text{ g.cm}^{-3}$, basé sur une composition de carbone pur.

b. Les pouvoirs d'arrêt

La perte d'énergie du faisceau sur une unité de longueur est calculée en multipliant le pouvoir d'arrêt du faisceau à l'énergie donnée par la masse surfacique locale de l'échantillon. Le pouvoir d'arrêt est différent pour chaque composé traversé et dépend de l'énergie instantanée de l'ion. La variation du pouvoir d'arrêt en fonction de l'énergie est présentée sur la figure 1.4. Le comportement de ce pouvoir d'arrêt dépend du mécanisme d'interaction mis en jeu :

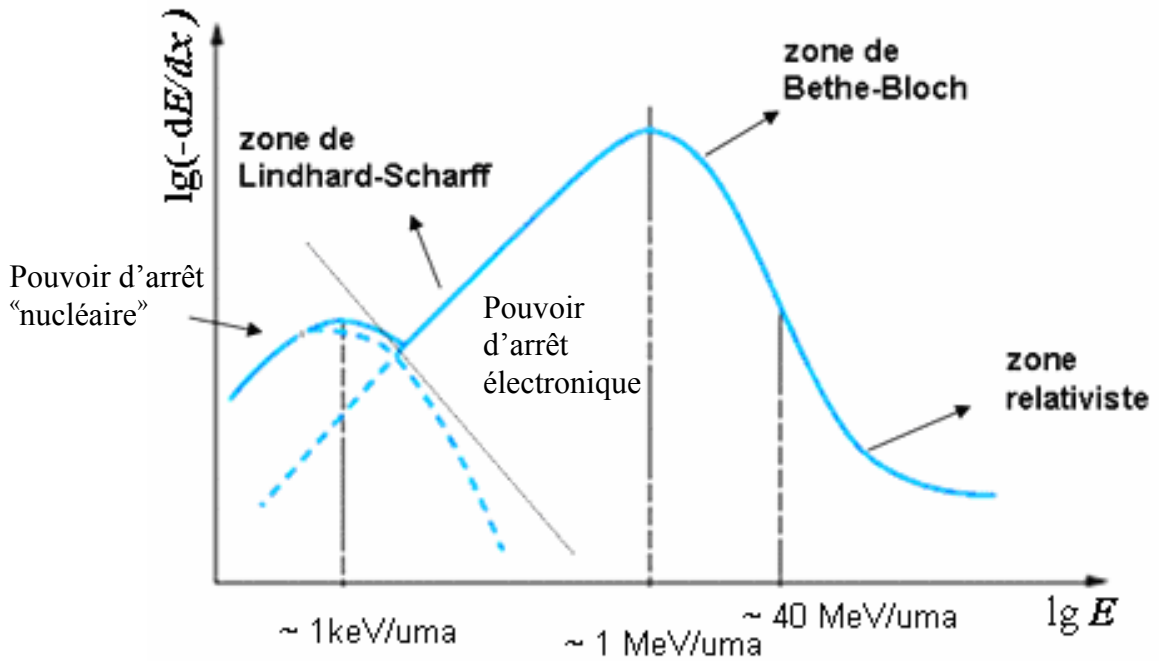


Figure 1.4: Variation du pouvoir d'arrêt en fonction de l'énergie de l'ion. Adapté de (Berger et Revel, 2005)

Dans le domaine d'énergie qui nous concerne (1 – 4 MeV), le pouvoir d'arrêt électronique est prépondérant. La collision élastique des ions sur les électrons des atomes cible est modélisée par la formule de Bethe-Bloch (Leo, 1987).

$$-\frac{dE}{\rho dx} = K \frac{z^2}{\beta^2} \frac{Z}{A} \left[\ln \left(\frac{2m_e c^2 \beta^2 \gamma^2}{I} \right) - \beta^2 - \frac{\delta}{2} \right] \quad (\text{Eq. 1.1})$$

Dans cette formule :

$\frac{dE}{\rho dx}$ est le pouvoir d'arrêt en $\text{MeV} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^2$;

ρ est la masse volumique du matériau, exprimée en $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$;

Z et z sont les charges respectives des atomes cible et du noyau incident ;

A le nombre de masse des atomes cible ;

$\beta = v/c$ où v est la vitesse de l'ion et c la vitesse de la lumière dans le vide ;

$K = 4\pi N_A r_e^2 m_e c^2 \approx 0,3071 \text{ MeV} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ où N_A est le nombre d'Avogadro, m_e est la masse de

l'électron et r_e est le rayon classique de l'électron ($r_e = 2,817 \cdot 10^{-13} \text{ cm}$) ;

$\gamma = \frac{1}{\sqrt{1-\beta^2}}$; $\delta = 28,816 \sqrt{\rho(Z/A)} \text{ eV}$ est la correction pour les effets de densité de charge ;

I est un potentiel moyen d'excitation dépendant du milieu traversé.

Cette formule met en évidence une dépendance du pouvoir d'arrêt en fonction de la charge de l'ion incident de la forme z^2/β^2 . Par exemple, une particule alpha devrait perdre 4 fois plus d'énergie qu'un proton lors de la traversée d'un même milieu Z/A avec la même vitesse β .

Lorsque la vitesse du projectile diminue et devient du même ordre de grandeur que celle des électrons de la matière traversée, l'ion incident échange des charges avec les atomes de la cible. La charge Z initiale du projectile n'est alors plus adaptée et doit être remplacée par une charge effective (Z^*) dépendant de la vitesse (domaine de Lindhard-Scharff).

$$Z^* = Z\gamma = Z \left(1 - \exp\left(-\frac{v}{v_0 Z^{2/3}}\right) \right) \quad (\text{Eq. 1.2})$$

où v_0 est la vitesse de Bohr des électrons du milieu ($v_0 = 2.2 \times 10^6$ m/s)

Connaissant le pouvoir d'arrêt électronique du proton, le concept de charge effective peut être appliqué afin de calculer le pouvoir d'arrêt électronique des ions lourds dans une gamme d'énergie faible et moyenne. Ce terme implique une nouvelle dépendance du pouvoir d'arrêt en fonction de la vitesse du projectile (Yarlagadda et Robinson, 1978). Il est souvent utilisé comme un facteur de correction de la formule de Bethe-Bloch.

Aux énergies les plus faibles, un régime de collision dit «nucléaire» intervient. Il s'agit d'un régime de collision élastique avec les atomes de la cible. Le pouvoir d'arrêt «nucléaire» est largement prépondérant à basse énergie alors que le ralentissement électronique domine à haute énergie. Des pertes d'énergie nucléaires peuvent être associées significativement à la diffusion angulaire. Dans le domaine d'énergie au dessus de quelques centaines de keV pour des protons, le ralentissement nucléaire est négligeable.

1.1.3 Calcul des pouvoirs d'arrêt

a. Calcul des pouvoirs d'arrêt des protons

L'énergie perdue par les ions après traversée de l'échantillon peut être convertie en masse surfacique (en g.cm^{-2}) par l'intermédiaire du pouvoir d'arrêt. De nombreuses mesures expérimentales des pouvoirs d'arrêt sont disponibles et ont permis à Ziegler et al. (1985) de mettre en place un modèle semi-empirique permettant de calculer des pouvoirs d'arrêt dans différents milieux.

Dans ce modèle, l'équation suivante est utilisée pour calculer le pouvoir d'arrêt instantané de protons dans des solides. Elle est valide pour des énergies de proton entre 25 keV et 10 MeV. Les valeurs du pouvoir d'arrêt sont données en $\text{keV.cm}^2.\text{mg}^{-1}$.

$$-\frac{dE}{\rho dx} = S_Z(E) = \frac{602.22}{A_Z} \times \frac{S_L S_H}{S_L + S_H}, \quad (\text{Eq. 1.3})$$

Où

$$S_L = aE^b + cE^d$$

$$S_H = \left(\frac{e}{E^f}\right) \ln\left(\frac{g}{E} + hE\right)$$

Les coefficients a, b, c, d, e, f, g et h dépendent du numéro atomique Z de l'élément cible, A_Z est la masse atomique du mélange d'isotopes, E est l'énergie du proton en keV.

L'incertitude est évaluée à environ 2 % dans la gamme d'énergie de 1 à 4 MeV et de l'ordre 5 % pour des énergies supérieures à 4 MeV.

b. Calcul des pouvoirs d'arrêt des alphas

Pour des ions plus lourds que des protons, le pouvoir d'arrêt électronique peut être calculé à partir du celui des protons en utilisant la loi d'échelle (Ziegler, 1977):

$$S_E = \frac{S_e^{ref} (\gamma Z_1)^2}{(Z_1^{ref})^2} \quad (\text{Eq. 1.4})$$

Où S_e^{ref} et Z_1^{ref} sont le pouvoir d'arrêt et la charge nucléaire d'un ion pris comme référence se déplaçant à la même vitesse que l'ion incident ($Z_1^{ref} = 1$ pour un proton), γZ_1 est la charge effective de l'ion incident. Le paramètre γ qui dépend de la vitesse du projectile a été introduit au paragraphe a).

En raison de sa dépendance en fonction de la charge d'ion incident, la perte d'énergie des alphas est beaucoup plus grande que celle des protons. Par exemple, le pouvoir d'arrêt des alphas de 3 MeV dans le carbone est de $1130 \text{ MeV} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^2$, soit 10 fois plus élevé que pour des protons de même énergie. Enfin, compte tenu du fait que plus l'énergie perdue dans le milieu est élevée, plus la mesure de la densité est précise, un faisceau d'alphas est particulièrement bien adapté pour l'analyse de couches d'épaisseur très faible.

c. La loi d'additivité de Bragg

Le pouvoir d'arrêt $S_C(E)$ dans un milieu composé C peut être obtenu à partir des pouvoirs d'arrêt des éléments constitutifs grâce à la loi d'additivité de Bragg. L'équation suivante permet alors de calculer le pouvoir d'arrêt du composé connaissant les fractions massiques w_z des éléments dans le milieu composé.

$$S_C(E) = \sum_{Z \in C} w_Z S_Z(E) \quad (\text{Eq. 1.5})$$

D'une manière générale, cette relation est valide pour le calcul du pouvoir d'arrêt électronique. Pour les matériaux organiques, la loi est relativement bien vérifiée. En bombardant différents polymères organiques avec un faisceau de protons, L'Hoir et Schmaus (1984), en utilisant des feuilles de mylar ($C_{10}H_8O_4$) et Rauhala et Raisanen (1985), en utilisant des feuilles de kapton ($C_{22}H_{18}O_5N_2$) et de mylar, ont vérifié cette loi en comparant les valeurs calculées à l'aide des pouvoirs d'arrêt de Ziegler aux valeurs expérimentales. Les écarts vont de 2 à 4 % dans la gamme d'énergie de protons de 0.5 à 2.4 MeV. Cependant des disparités peuvent apparaître selon la nature physique du matériau cible. Par exemple, le pouvoir d'arrêt calculé est généralement plus grand dans la phase gazeuse que dans la phase solide. Pour les matériaux organiques, l'écart entre ces deux phases est de 5 à 10 % pour des protons et des alphas (Thwaites, 1987).

d. Calcul d'épaisseur

Les calculs d'épaisseur, plus exactement de masse surfacique, nécessitent la connaissance de la composition élémentaire. Cette information est obtenue en général à l'aide d'une autre technique. Les méthodes d'analyse basées sur l'utilisation des faisceaux d'ions sont utilisables: PIXE (Particle Induced X-ray Emission) et/ou RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry). L'information élémentaire de composition, $C(x, y)$, est employée pour calculer le pouvoir d'arrêt des ions $S(E)$, puis la masse surfacique grâce à l'intégrale suivante :

$$\rho_A = \int_{E_0}^{E_r} [S(E)]^{-1} dE \quad (\text{Eq. 1.6})$$

où E_0 est l'énergie de l'ion d'incident, et E_r est l'énergie résiduelle mesurée.

Le pouvoir d'arrêt global des ions dans le matériau est obtenu par la règle de Bragg vue précédemment.

Pour les échantillons biologiques, le cas est tout à fait favorable car le pouvoir d'arrêt des ions légers n'est pas très différent pour trois des éléments majeurs (C, N, O) en raison d'un rapport Z/A qui diffère peu de la valeur 1/2. Notons cependant l'exception de l'hydrogène ($Z/A = 1$), qui présente un pouvoir d'arrêt plus grand d'un facteur 2. Du fait de cette similarité de pouvoirs d'arrêt, le ralentissement peut être converti en épaisseur avec une précision de quelques pourcents même si on l'on ne connaît qu'une composition approximative de l'échantillon (Lefevre H.W., 1987). La figure 1.5 montre les pouvoirs d'arrêt électroniques

des protons calculés à l'aide du code SRIM2003 dans différents matériaux, carbone, azote, oxygène et également dans un modèle de tissu biologique dont la composition est typique de cellules humaines déshydratées ($C_{10}H_8O_{0.8}N_{1.3}$), composition déterminées par microanalyse RBS d'un grand nombre de cellules sur le microfaisceau du CENBG.

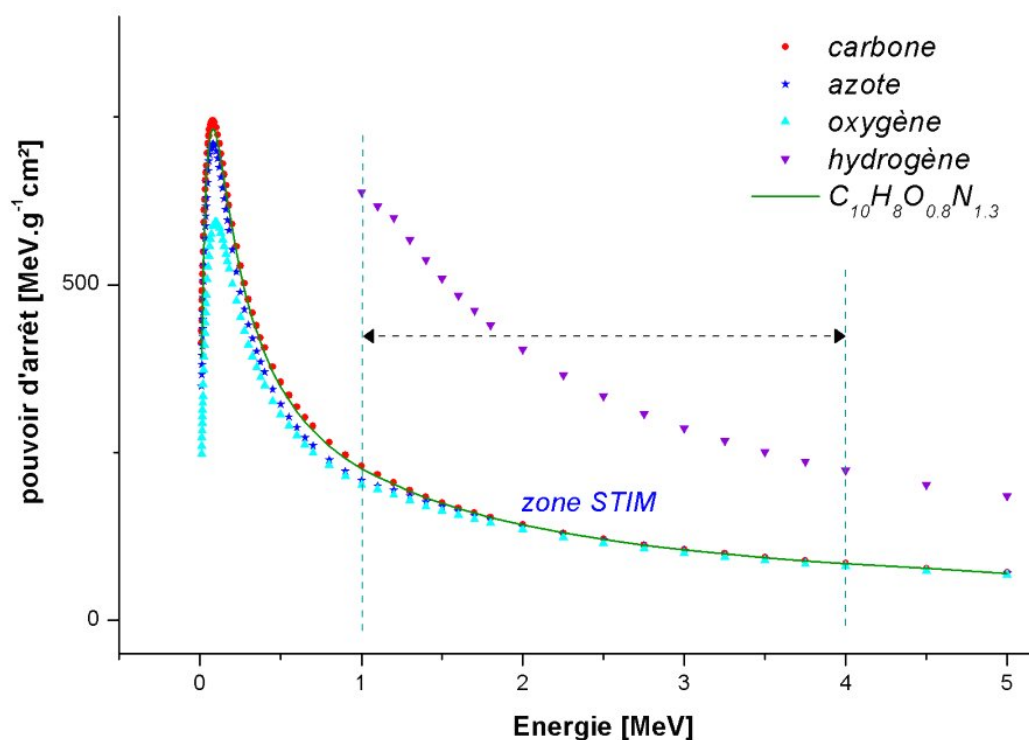


Figure 1.5 : Pouvoir d'arrêt électronique des protons calculé par SRIM2003 dans les milieux purs de carbone, d'azote et d'oxygène ainsi qu'une comparaison avec celui de protons dans un milieu solide organique de composition $C_{10}H_8O_{0.8}N_{1.3}$.

1.1.4 Cartographie STIM bidimensionnelle

a. Cartographie 2D par fenêtrage

En balayant le faisceau d'ions point par point sur la cible et en mesurant l'énergie résiduelle pour chaque position du faisceau, la relation entre l'énergie perdue et la densité locale nous permet d'obtenir une cartographie 2D de la masse surfacique de l'échantillon, connaissant sa composition chimique.

Un exemple de cartographie 2D de l'énergie transmise est donné sur la figure 1.6. Il s'agit de l'étude de la structure de cellules humaines (cultivées in vitro) réalisées au CENBG. Dans cet exemple, la cartographie a été réalisée sur 128×128 pixels en utilisant un faisceau de protons de 2,9 MeV sur un balayage carré de côté $150 \mu\text{m}$. La distribution en énergie est caractéristique de l'épaisseur de l'échantillon. En choisissant des fenêtres en énergie et en ne

cartographiant que les évènements ainsi sélectionnés dans chaque fenêtre, différentes régions de l'échantillon apparaissent en fonction de leur densité ou plus exactement de la masse surfacique offerte au faisceau. Les plus basses énergies transmises correspondent aux régions de haute densité (ou de grande épaisseur traversée), par exemple le verre du micro-capillaire utilisé pour fixer la cellule (flèche image 1). La région 2 est caractéristique de la colle époxy employée pour monter les cellules. Les régions 3 et 4 correspondent aux régions de moins en moins dense (zones minces) des cellules. Dans ces 4 images, le contraste est seulement dû à la statistique de comptage ou encore au nombre d'évènements par pixel. L'échelle de gris est linéaire et s'étend de 0 (en blanc) au nombre maximal d'évènements par pixel dans la fenêtre d'énergie sélectionnée (55, en noir). Le pic dans la région 5 du spectre correspond au ions détectés sans avoir été ralentis dans l'échantillon et donc ayant gardé l'énergie d'incidence de 2.9 MeV.

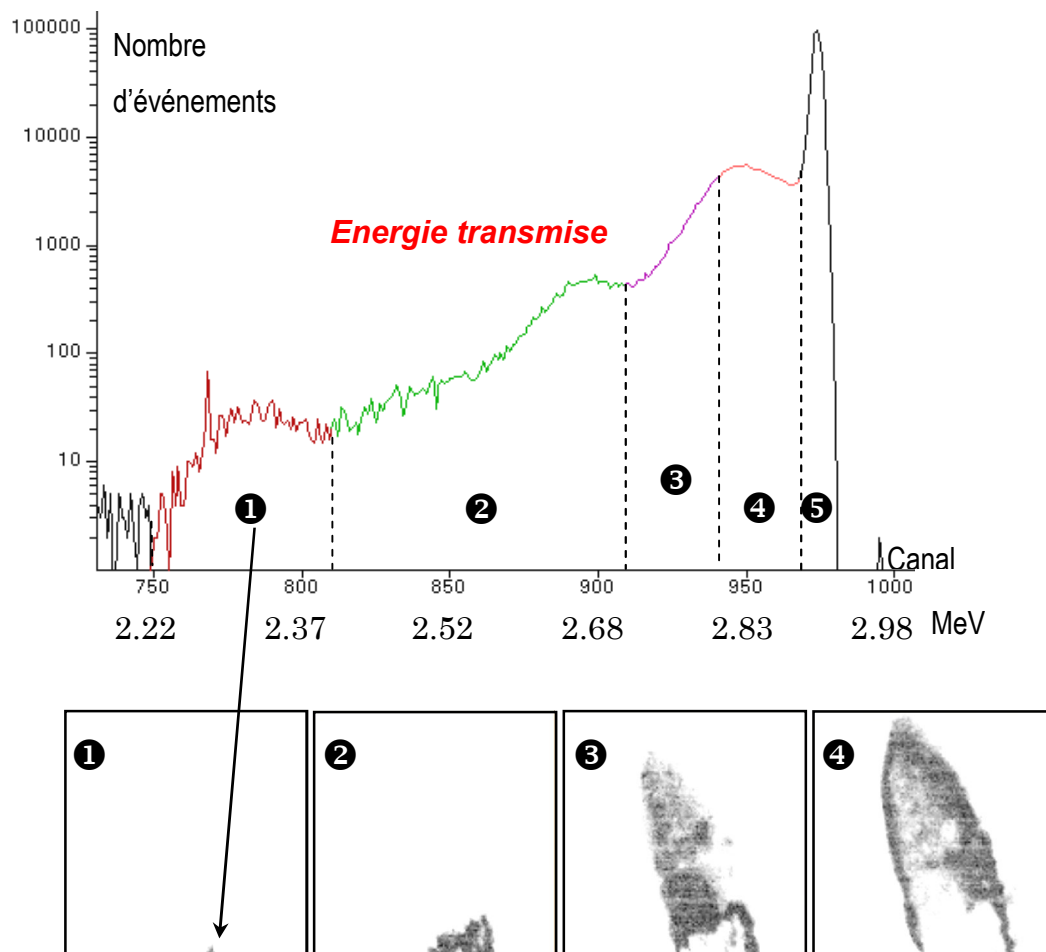


Figure 1.6: Projections bidimensionnelles STIM après traversée d'une cellule humaine déshydratée (Michelet-Habchi *et al.*, 2005b).

b. Énergie médiane et moyenne

Une manière plus intuitive de représenter les données consiste à calculer l'énergie résiduelle moyenne par pixel, ou de manière plus avancée la masse surfacique correspondante, et de la coder en échelle de gris comme sur une radiographie médicale ou bien en échelle de couleurs. En principe, un seul ion par pixel serait suffisant pour calculer l'épaisseur d'échantillon traversée puisque l'efficacité des détecteurs est très proche de 100 %. Mais notons que la perte d'énergie est un processus statistique. Ceci conduit à une dispersion en énergie (straggling en énergie) des ions ayant interagi. De plus, les collisions ions/électrons conduisent à un léger élargissement progressif du faisceau avec la profondeur (straggling angulaire). Ceci contribue à une incertitude sur l'énergie résiduelle des ions collectés par le détecteur. Pour toutes ces raisons, le spectre d'énergie mesuré en un pixel donné n'est donc pas un pic de Dirac mais idéalement une gaussienne, dont la largeur dépend de la résolution du détecteur, du straggling en énergie et du straggling angulaire. Afin de diminuer les incertitudes et obtenir une image de qualité, un nombre substantiel de particules doit être « tiré » à chaque pixel au détriment du temps passé pour réaliser les cartographies, ce qui est un paramètre particulièrement crucial en mode tomographie.

L'optimisation du temps de mesure en tomographie STIM nécessite le tirage d'un nombre d'ions relativement faible. Dans ces conditions de faible statistique, l'énergie moyenne est sujette à des fluctuations importantes d'un pixel à l'autre, étant par exemple très sensible à des événements éloignés du centre de la distribution, comme ceux provenant du bruit de fond. De ce point de vue, l'énergie médiane est moins sensible à ce type de fluctuation. Le filtrage médian apparaît particulièrement robuste, il réduit efficacement le bruit et tendra à choisir l'énergie transmise la plus probable à chaque position de faisceau, même avec une faible statistique de comptage.

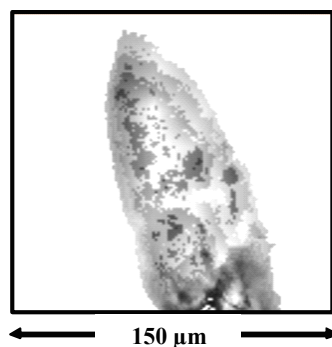


Figure 1.7: Cartographie 2D de l'énergie résiduelle calculée par filtrage de médiane

Une étude détaillée de ce type de filtrage pour l'imagerie STIM a notamment été effectuée par (Overley et al., 1988). Une cartographie 2D de l'énergie résiduelle basée sur un filtrage médian est montrée sur figure 1.7. Dans cette cartographie, l'échelle de gris s'étend de 2.5 MeV (noir) à 2.9 MeV (blanc). Ce type de représentation permet de visualiser les variations d'épaisseur de l'objet analysé sur une seule image, contrairement au fenêtrage utilisé souvent de façon plus habituelle (figure 1.6).

c. Résolution spatiale

Un des paramètres essentiels qui détermine la résolution spatiale des images STIM est le profil transverse du faisceau incident. Bien que le faisceau d'ions puisse être focalisé à l'échelle du micromètre, lorsqu'ils traversent le spécimen, les ions incidents subissent des interactions coulombiennes avec les constituants du milieu qui dévient faiblement leur trajectoire, ce qui a pour effet de dégrader progressivement la résolution spatiale au fur et à mesure que le faisceau pénètre en profondeur. C'est l'origine du straggling angulaire introduit au paragraphe précédent. Ce phénomène peut être évalué par le code de simulation SRIM où le calcul de transport des ions dans un matériau donné est basé sur le code TRIM (Transport of Ions in Matter). La simulation est cependant peu précise puisqu'une sous-estimation d'environ 40 % par rapport aux valeurs expérimentales a été rapportée par certains auteurs (Michelet *et al.*, 2001).

Une approche plus précise consiste à utiliser le code Monte-Carlo GEANT4 (Agostinelli *et al.*, 2003; Allison et al., 2006). Ce logiciel a été développé au CERN pour la simulation du transport des particules à travers la matière à des énergies très diverses (de quelques centaines d'eV au TeV). Le code GEANT4 (dans sa version 6.2-P02, incluant une prise en compte des événements de faible énergie (Ivantchenko, 1999) a été utilisé pour calculer le straggling angulaire dû à la traversée d'un échantillon biologique. Un faisceau de 10^4 protons monoénergétiques de 3 MeV avec une distribution spatiale initiale de type gaussienne et de largeur totale à mi-hauteur (FWHM) de $0,9 \mu\text{m}$ a été simulé lors de la traversée d'un échantillon biologique typique (de composition $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_{0,8}\text{N}_{1,3}$) de $100 \mu\text{m}$ d'épaisseur (soit environ $3000 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de masse surfacique). La largeur à mi-hauteur du faisceau transmis a été évaluée à $(1,091 \pm 0,009) \mu\text{m}$, soit un élargissement d'environ $0,2 \mu\text{m}$ par rapport au faisceau incident. Bien que cet élargissement soit mesurable, il n'est donc pas de nature à dégrader drastiquement la résolution spatiale des images STIM.

d. Résolution en énergie

Lors de la mise en œuvre de la technique STIM, le faisceau est fourni par l'accélérateur de la nouvelle plateforme AIFIRA. La très bonne stabilité en énergie de cette machine ($\Delta E/E \sim 2,5 \times 10^{-5}$), bien meilleure qu'avec l'ancien accélérateur de type Van de Graff ($\Delta E/E \sim 10^{-3}$) a permis de réduire la dispersion en énergie du faisceau incident à un niveau négligeable devant la résolution en énergie des détecteurs utilisés (de l'ordre de 11 keV) et de la dispersion introduite par le passage des ions dans l'échantillon. Ce straggling a pu être estimé à partir de la simulation GEANT4 introduite au paragraphe précédent, avec le même faisceau de protons simulé de 3 MeV. La traversée de 100 μm de l'échantillon biologique précédemment défini conduit à une distribution en énergie de FWHM ($21,9 \pm 0,24$) keV, le ralentissement subi étant de 121 keV. Ce straggling en énergie est donc relativement faible mais pas négligeable. Au niveau de la reconstruction, le principal effet de ce phénomène est d'augmenter l'incertitude sur la valeur des densités mesurées.

1.2 La technique PIXE (Particle Induced X-ray Emission)

1.2.1 Principe d'une analyse PIXE

Cette méthode d'analyse est basée sur l'ionisation des couches internes de l'atome cible par les ions incidents et sur la détection du rayonnement X émis lors du réarrangement du cortège électronique. L'énergie des raies X produites étant caractéristique de l'élément ionisé, des informations sur la composition élémentaire de l'échantillon peuvent être tirées du spectre X obtenu.

La figure 1.8 montre un schéma de principe de l'analyse PIXE et de la production des raies X. Dans cette configuration, le détecteur (typiquement un détecteur en dispersion d'énergie) est placé vers l'arrière, de façon notamment à le protéger des particules du faisceau qui sont diffusées vers l'avant avec une forte probabilité.

La méthode peut être mise en œuvre avec un microfaisceau d'ions qui, lorsqu'il est balayé point par point sur l'échantillon, permet de réaliser des cartographies 2D de l'ensemble des éléments détectés. Chaque cartographie est construite en sélectionnant tous les événements X correspondant à une raie particulière sur le spectre.

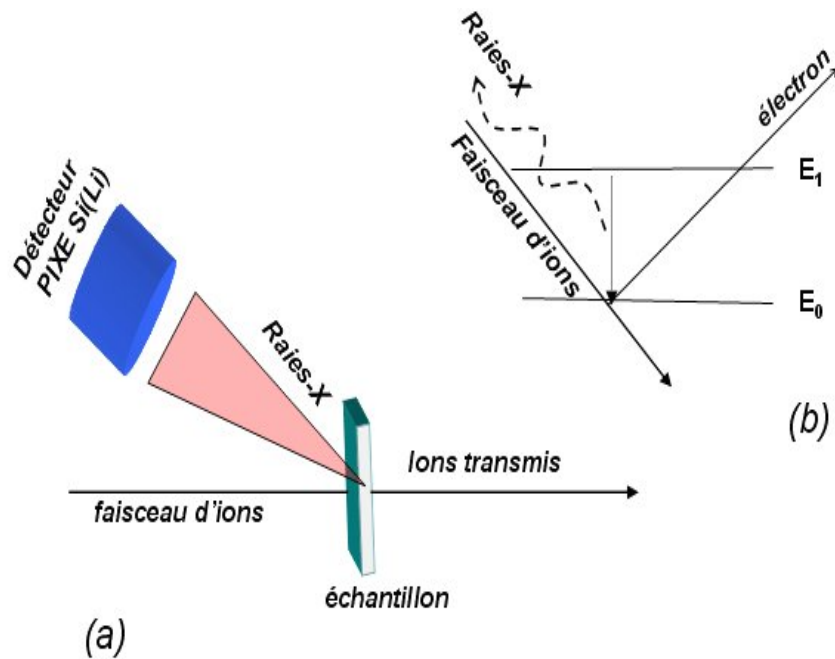


Figure 1.8 : Schéma de principe de l'analyse PIXE (a) et de production des photons X par ionisation de l'atome cible par un ion incident (b)

1.2.2 L'émission X

L'interaction coulombienne entre les ions incidents et les électrons liés des couches atomiques profondes induit l'ionisation de ces couches. Le réarrangement du cortège électronique résultant de la création des lacunes dans une couche interne (K, L ou M) peut alors s'accompagner de l'émission de raies X caractéristiques. Lorsque la lacune est comblée par un électron provenant d'une couche plus externe, la transition libère une énergie correspondant à la différence des énergies de liaison des couches électroniques impliquées. Les principales transitions radiatives permises sont présentées sur la figure 1.9.

Dans le formalisme du modèle en couches atomiques, seules certaines transitions électromagnétiques, de type dipolaire électrique, sont autorisées par les règles de sélection:

$$\Delta n \geq 1, \quad \Delta l = \pm 1 \quad \text{et} \quad \Delta J = \pm 1 \text{ ou } 0$$

où n , l et J représentent respectivement le nombre quantique principal et les nombres quantiques associés aux moments angulaires orbital et total.

Il en résulte que les seules raies X qui puissent être émises à la suite d'une ionisation de la couche K proviennent des transitions L_2 -K et L_3 -K (d'après la nomenclature de Siegbahn, raies $K_{\alpha 1}$ et $K_{\alpha 2}$) ou encore des transitions M-K et N-K (raies $K_{\beta 1}$, $K_{\beta 2}$ et $K_{\beta 3}$). Bien que les probabilités relatives d'émission varient en fonction du numéro atomique, l'émission du

groupe K_β est généralement moins probable que celle du groupe K_α . Par ailleurs, les différences d'énergie entre les raies $K_{\alpha 1}$, $K_{\alpha 2}$, puis entre $K_{\beta 1}$, $K_{\beta 2}$ et $K_{\beta 3}$, sont inférieures à la résolution des détecteurs Si(Li), et ce jusqu'au numéro atomique $Z = 35$. Ces raies K sont donc au moins partiellement convoluées et apparaissent, sur les spectres X obtenus avec de tels détecteurs, sous la forme d'un doublet de raies $K_\alpha - K_\beta$ très caractéristique (fig. 1.10),

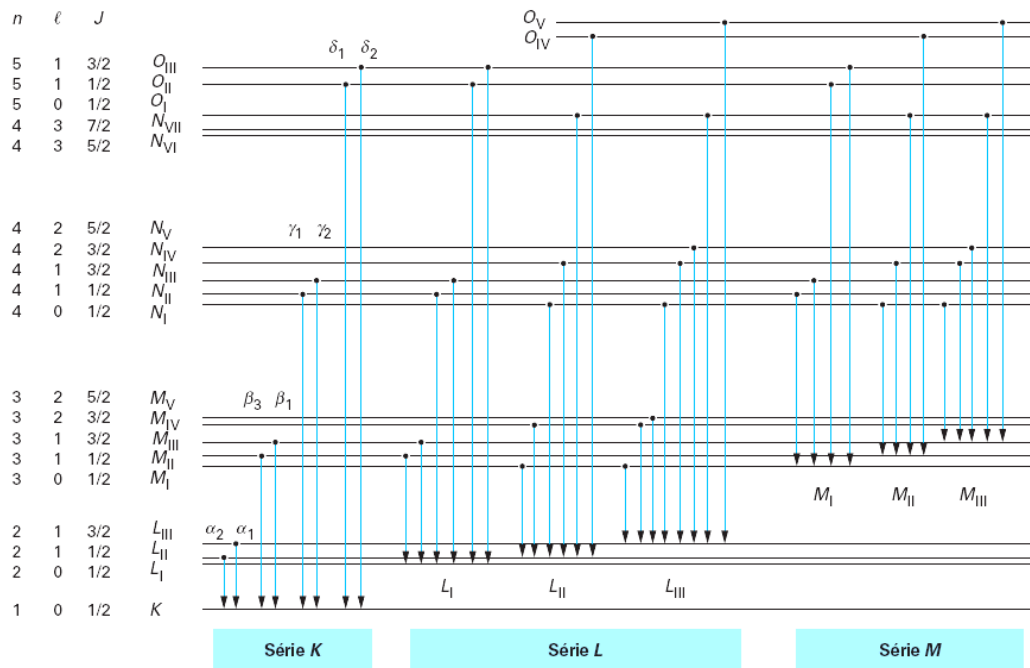


Figure 1.9 : Principales transitions radiatives permises (séries K, L et M). Les nombres quantiques caractérisant les couches atomiques sont indiqués à gauche

Les énergies des principales raies X sont portées sur la figure 1.11 en fonction du numéro atomique Z de l'atome émetteur. Pour un atome émetteur Z donné, les raies les plus énergétiques sont les raies K; viennent ensuite les raies L puis M.

En fonction du numéro atomique de l'élément recherché dans un échantillon, l'analyse se fera préférentiellement soit par la détection des raies K, soit par les raies L. La variation des sections efficaces d'ionisation et l'évolution du rendement de fluorescence en fonction de Z conditionnent ce choix. Par ailleurs, l'efficacité des détecteurs Si(Li) est quasi constante dans l'intervalle 5 – 25 KeV mais chute rapidement pour les énergies supérieures et inférieures à cette gamme d'énergie. Cette caractéristique technique détermine également en partie quelle raie X pourra être utilisée pour l'analyse. Normalement, les éléments dans l'intervalle $11 \leq Z$

≤ 50 seront analysés via leurs raies K, tandis que les éléments de $Z > 50$ le seront par leurs raies L.

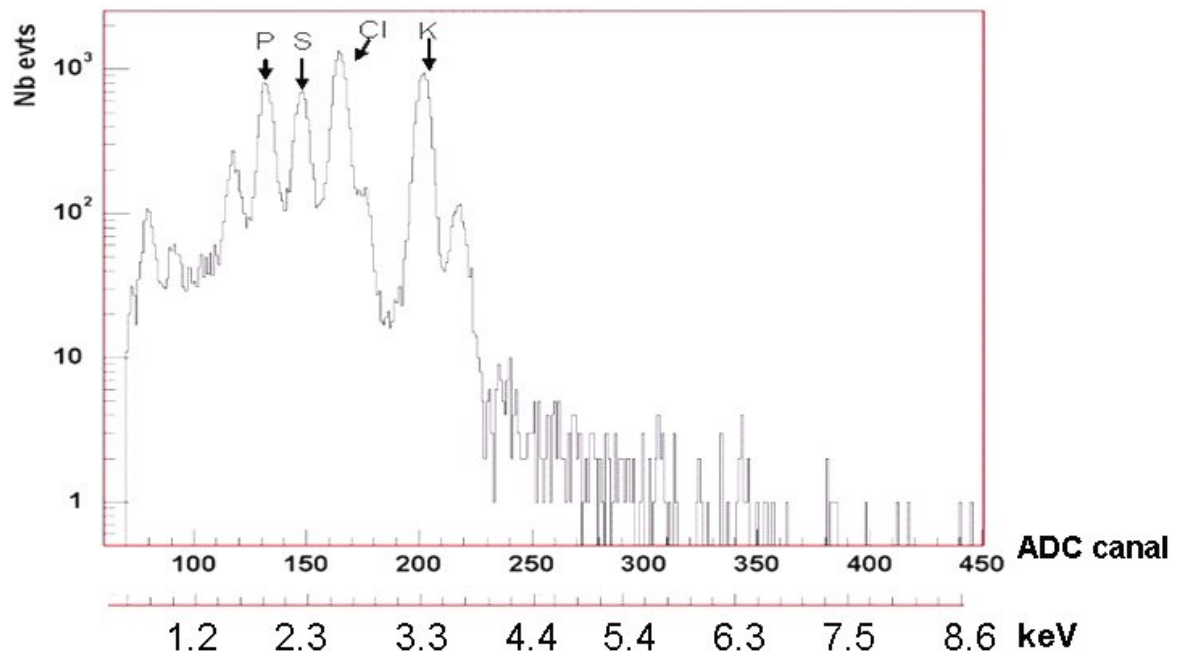


Figure 1.10 : Exemple de spectre X caractéristique (détection en dispersion d'énergie).

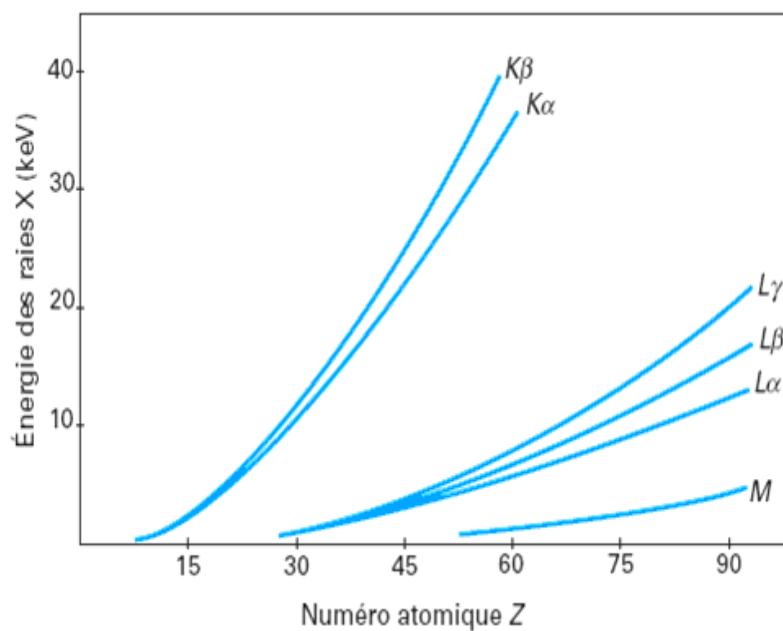


Figure 1.11 : Energie caractéristique des raies X (K, L et M) en fonction du numéro atomique Z de l'élément émetteur (Mitchell et Barfoot, 1981)

1.2.3 Section efficace d'émission X

a. Section efficace d'ionisation

Des particules chargées légères (protons ou alphas) sont le plus souvent utilisées comme projectiles. Dans la gamme d'énergie considérée, soit 0,5-5 MeV par nucléon, les modèles théoriques permettant de rendre compte de l'ionisation des couches atomiques profondes sont basés sur l'interaction coulombienne entre un électron lié et le noyau de la particule chargée incidente. On parle alors de collision rapide ou directe et les partenaires de la collision peuvent être considérés comme des charges ponctuelles. Parmi les modèles les plus couramment employés, on peut citer l'approximation de Born en ondes planes (Plane Wave Born Approximation) (Merzbacher et Lewis, 1958) l'approximation semi-classique (Semi-classical Approximation, SCA) (Hansteen et Mosebeke, 1973), ou encore l'approximation du choc binaire (Binary Encounter Approximation, BEA) (Garcia, 1970).

La probabilité d'ionisation d'une couche atomique est décrite par la section efficace d'ionisation $\sigma_z(E)$ qui varie en fonction du numéro atomique de l'atome cible, de la couche ionisée, du type de projectile et de son énergie E . Les valeurs prédites par les différents modèles théoriques sont en général en bon accord ($\pm 30\%$) avec les données expérimentales, ce qui semble satisfaisant si l'on note que les variations en fonction du numéro atomique Z de l'atome ionisé peuvent atteindre 3 à 4 ordres de grandeurs. Elles rendent compte en particulier:

- de la décroissance rapide de $\sigma_z(E)$ en fonction du numéro atomique Z de l'atome cible, pour une énergie d'incidence E fixée ;
- de la variation de $\sigma_z(E)$ en fonction de l'énergie E d'incidence pour un atome cible donné. $\sigma_z(E)$ croît en fonction de E et atteint une valeur maximale lorsque la vitesse de l'ion incident est comparable à celle de l'électron sur sa couche. Ceci explique notamment l'utilisation préférable de particules légères (protons de quelques MeV) si l'on veut optimiser la section efficace ;

L'incertitude sur la valeur absolue de ces sections efficaces est cependant encore trop grande pour qu'elles puissent être employées dans le calcul de résultats quantitatifs lors de la mise en œuvre d'une technique d'analyse. Une nouvelle approche développée sur la base des travaux de Merzbacher et Lewis (1958), la théorie dite ECPSSR, prend en compte les différentes corrections illustrées dans cette abréviation : Energy loss, Coulomb field, Perturbation of the

atomic Stationary States, Relativistic effects. Ce modèle, développé par Brandt et Lapicki (1981) est ensuite utilisé par Cohen et Harrigan (1985) pour calculer et publier une table des sections efficaces d'ionisation en protons et particules alpha qui est aujourd'hui couramment employée. Enfin Johansson et Campbell (1988) vérifient les valeurs prédites par la théorie ECPSSR. Ces valeurs font actuellement référence dans le domaine. Elles sont utilisées en particulier par GUPIX, un programme de traitement des données pour l'analyse PIXE, développé par Campbell et largement utilisé aujourd'hui (Maxwell et al. 1989).

b. Rendement de fluorescence

L'atome ionisé peut retourner à son état fondamental soit par émission radiative, soit en évacuant l'énergie disponible sous la forme d'un électron éjecté d'une orbitale moins liée. Cette transition non radiative est appelée émission Auger. Généralement, la probabilité de ce mécanisme est maximale pour les éléments de faible Z . La compétition entre transitions radiatives et non radiatives est caractérisée par le rendement de fluorescence ω_i . Ce paramètre représente la probabilité pour qu'une lacune créée sur une couche donnée donne lieu à l'émission d'un photon X. La dépendance en Z de ce rendement est illustrée par la figure 1.12.

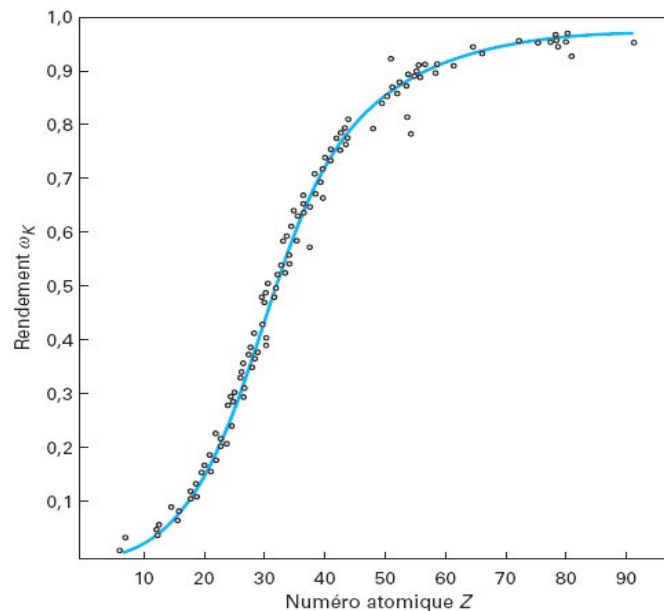


Figure 1.12 : Rendement de fluorescence expérimental ω_K de la couche K en fonction du numéro atomique Z (Bambynek, 1972).

c. Section efficace totale de production X

La section efficace totale de production σ_i d'une raie X particulière i (par exemple la raie K_{α}) à partir d'une couche donnée d'un élément de numéro atomique Z est obtenue à partir de la section efficace d'ionisation $\sigma_Z(E)$ de la couche j considérée de la manière suivante :

$$\sigma_i(E) = b_i \omega_j \sigma_Z(E) \quad (\text{Eq. 1.7})$$

où ω_j est le rendement de fluorescence de la couche j et b_i est le rapport de branchement de la raie i considérée.

1.2.4 Calcul des concentrations élémentaires

La technique PIXE permet d'obtenir des résultats quantitatifs absolus sans faire appel à l'utilisation de standards dans la mesure où les sections efficaces d'émission X sont bien connues. Pour calculer les concentrations élémentaires on distingue deux cas : les cibles minces et les cibles épaisses.

a. Le cas des cibles minces

Dans le cas où la section efficace en cible mince peut être employée, le ralentissement des ions incidents et l'atténuation des raies X dans la cible sont négligeables, le nombre de photons Y_i enregistrés par détecteur peut alors être calculé en utilisant la formule suivante :

$$Y_i = \frac{\Omega}{4\pi} \varepsilon_{\text{det}} \sigma_i N_p C_Z \frac{N_A}{A_Z} \Delta t \quad (\text{Eq. 1.8})$$

Où :

Ω	est l'angle solide du détecteur
ε_{det}	l'efficacité intrinsèque du détecteur
σ_i	la section efficace de production de raie X
C_Z	le nombre d'atomes de l'élément Z
N_p	le nombre d'ions incidents
N_A	le nombre d'Avogadro
A_Z	le nombre de masse de l'élément Z
Δt	la masse surfacique de la cible (g.cm^{-2})

A partir de la formule ci-dessus, on peut déterminer la concentration C_Z si l'on parvient à déterminer N_p et Δt . Les autres paramètres sont soit mesurés pendant l'expérience (comme Y_i , le nombre de photons X détectés), soit étalonnés avant l'analyse (comme l'angle solide du détecteur et son efficacité). Le nombre d'ions incidents peut être déterminé par l'intermédiaire de la charge totale Q déposée sur l'échantillon :

$$N_p = \frac{Q}{Ze} \quad (\text{Eq. 1.9})$$

avec $e = 1,6 \cdot 10^{-19}$ C pour un ion de charge Ze .

Cette valeur Q peut être mesurée par l'électronique via un intégrateur de charge ou bien déterminée à partir d'une expérience RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry). L'épaisseur Δt peut être déterminée par une autre méthode d'analyse par faisceau d'ions, par exemple RBS ou STIM.

b. Le cas des cibles épaisses

Le cas d'une cible épaisse est plus complexe car il faut prendre tout d'abord en compte la variation de la section efficace d'ionisation en fonction de l'énergie des ions lorsqu'ils interagissent en profondeur dans la cible. La section efficace de production des raies X est donc fonction de la profondeur d'interaction. Parallèlement, l'atténuation des photons X lorsqu'ils sont émis en profondeur dans l'échantillon doit être corrigée. Cette absorption est quantifiée par le coefficient d'atténuation massique (μ/ρ) qui s'exprime en $\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ et dépend de la composition du matériau traversé ainsi que de l'énergie de la raie X considérée.

Pour un milieu traversé composé de différents éléments, que l'on notera (C), le coefficient d'atténuation peut être calculé de la manière suivante :

$$(\mu/\rho)_C(E) = \sum_Z w_Z (\mu/\rho)_Z(E) \quad (\text{Eq. 1.10})$$

où w_Z est la fraction massique de l'élément Z dans le milieu.

Dans le cas d'une cible épaisse, le nombre Y de photons effectivement enregistrés par le détecteur peut être calculé à partir du nombre Y_i de photons émis dans le cône de détection caractérisé par l'angle solide, en intégrant le coefficient d'atténuation massique le long de la trajectoire des photons X entre leur point d'émission et le détecteur :

$$Y = Y_i e^{-\int (\mu/\rho)_C(E,s) \rho(s) ds} \quad (\text{Eq. 1.11})$$

Dans cette expression, $dt = \rho(s)ds$ correspond à une épaisseur élémentaire (en g.cm^{-2}) avec

$$Y_i = \frac{N_p N_A}{A_z} \frac{\Omega}{4\pi} \varepsilon_{\text{det}} C_z \int \sigma_i(E(s)) \rho(s) ds \quad (\text{Eq. 1.12})$$

où $E(s)$ est l'énergie du faisceau d'ions à la profondeur s . L'expression de Y_i prend en compte la variation de la section efficace d'ionisation en fonction de l'énergie des ions à la profondeur s .

Dans la plupart des cas, on considère une cible de composition et de densité homogènes afin de simplifier le calcul de l'intégrale. Dans le cas où la composition et la densité sont hétérogènes, il faut alors avoir recours à une technique permettant de déterminer la densité volumique $\rho(x, y)$ locale. Nous verrons plus loin que la technique de tomographie STIM peut apporter cette information.

c. Fluorescence secondaire

Dans le cas d'une cible épaisse, il y a une probabilité non négligeable pour que des photons X émis en profondeur puissent ioniser d'autres atomes sur leur trajet de sortie de l'échantillon. La probabilité d'ionisation par effet photoélectrique est maximale quand l'énergie de la raie X initiale est supérieure mais très proche de l'énergie de liaison d'une couche électronique d'un atome présent dans le voisinage du point d'émission. Ce phénomène, appelé fluorescence secondaire, modifie alors artificiellement le rendement des raies X et devrait donc être corrigé. En réalité et sauf cas particulier (par exemple, raie d'énergie voisine très intense), la probabilité de ce mécanisme reste en général assez faible et le rendement n'est que rarement corrigé.

1.2.5 Les limites de la technique PIXE

a. Les éléments accessibles à l'analyse PIXE

Le domaine des éléments accessibles à l'analyse PIXE est limité pour les faibles Z pour des raisons techniques liées aux détecteurs X en dispersion d'énergie. En effet les détecteur de type Si(Li) ou Ge voient leur efficacité intrinsèque limitée à basse énergie par l'atténuation des photons X dans la fenêtre d'entrée ainsi que dans la zone morte en surface du cristal. L'efficacité des détecteurs standards est très faible pour des énergies de photons inférieures à 1 keV, ce qui interdit de détecter les raies K des éléments plus légers que le sodium ($Z = 11$).

Heureusement, l'analyse RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry) vient compléter la technique PIXE pour l'identification et le dosage des éléments légers majeur (C, N, O) dans les cibles organiques. En pratique, l'analyse RBS peut être réalisée en même temps que l'analyse PIXE, en plaçant un détecteur de type silicium vers l'arrière pour la détection des particules rétrodiffusées. Pour l'analyse d'échantillons biologiques, la mesure RBS donne la masse organique de l'échantillon étudié, ce qui permet de normaliser les concentrations élémentaires avec la masse sèche des tissus étudiés.

Pour les éléments lourds, la limitation vient essentiellement des sections efficaces d'ionisation qui décroissent de manière quasi-exponentielle en fonction du numéro atomique, que ce soit pour l'ionisation des couches K ou celle des couches L. Pour les éléments très lourds, la détection des raies L ne suffit pas toujours à conserver une sensibilité suffisante pour détecter des traces.

b. Bruit de fond

Le bruit de fond continu présent sur un spectre X obtenu lors d'une analyse PIXE est une des raisons qui limitent la sensibilité de la méthode. Ce bruit de fond provient essentiellement du rayonnement de freinage (bremsstrahlung) des électrons secondaires émis lors de l'impact des ions ainsi que du rayonnement de freinage des ions incidents eux-mêmes. Le rayonnement de freinage provenant des électrons secondaires se limite à la partie basse énergie du spectre (en dessous de 10 keV). Au-dessus, seul le rayonnement de freinage des ions du faisceau apparaît. L'ampleur de ce bremsstrahlung dépend de la position du détecteur. En plaçant le détecteur à un angle convenable par rapport à la direction du faisceau, son importance peut être diminuée sur le spectre. Il est maximal à l'angle de 90° et diminue lorsque la direction de détection s'en éloigne. Sur la plupart des dispositifs expérimentaux, le détecteur est placé entre 130° et 160° .

Lorsque l'énergie des ions incidents est suffisante pour induire des réactions nucléaires dans l'échantillon (excitation coulombienne ou réaction $(p, p'\gamma)$), un fond supplémentaire peut apparaître sous la forme de diffusion Compton du rayonnement gamma dans le cristal du détecteur.

1.3 Procédure d'analyse par tomographie STIM & PIXE

Les techniques STIM et PIXE permettent d'accéder à l'épaisseur (masse surfacique) et la composition d'un échantillon sous forme de cartographie 2D. Dans certains cas, il est nécessaire d'accéder de manière détaillée à la structure interne tridimensionnelle

d'échantillons microscopiques tout en les gardant intacts, par opposition à des techniques basées par exemple sur des coupes sériées. On cherche alors à obtenir la distribution tridimensionnelle de la masse volumique ainsi que des éléments majeurs et trace dans tout le volume de cet échantillon.

Ces techniques, dites de tomographie, développées initialement dans le domaine de l'imagerie médicale, peuvent maintenant être mises en œuvre à l'échelle microscopique par les méthodes de tomographie STIM et PIXE (STIMT et PIXET). Les données mesurées à différents angles de projection de l'échantillon permettent la reconstruction des distributions 3D à l'aide d'algorithmes dédiés. Dans cette partie, nous présentons brièvement les étapes expérimentales permettant d'acquérir les données. Les algorithmes de reconstruction seront présentés dans le chapitre suivant.

1.3.1 Analyse par tomographie STIM

En microtomographie, par opposition aux méthodes macroscopiques d'imagerie médicale, c'est l'échantillon qui est soumis à un mouvement de rotation selon un axe vertical. Cet échantillon est donc monté sur un support vertical fixé sur l'axe de rotation d'un moteur (fig. 1.13).

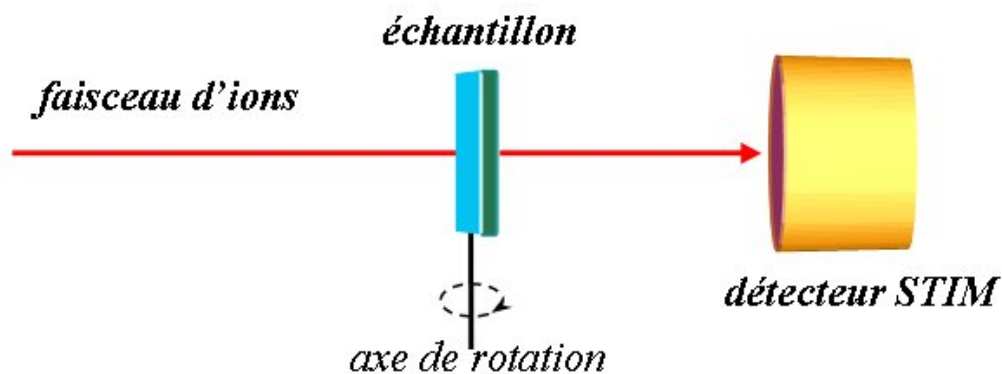


Figure 1.13 : Représentation schématique d'une analyse STIMT

Généralement, une expérience de tomographie STIM s'effectue en 3 étapes :

- Pour un angle de projection donné, le faisceau est balayé point par point le long d'un axe horizontal (orthogonal à l'axe de rotation) de manière à explorer un plan horizontal (dans le cas de tomographie 2D) ou plusieurs plans horizontaux (dans le cas de tomographie 3D) de l'échantillon. A chaque position du faisceau, l'énergie résiduelle des ions sortant est mesurée par un détecteur de particules placé dans l'axe,

ce qui permet de déduire la masse surfacique locale (en g.cm^{-2}). L'ensemble de ces données constitue une projection de l'échantillon.

- Après avoir effectué une rotation de l'échantillon d'un petit angle, la première étape est répétée autant de fois que nécessaire (par exemple une centaine de fois pour un intervalle total de rotation de 180°).
- Les projections sont ensuite traitées par des algorithmes de reconstruction, ce qui permet soit d'obtenir des plans individuels horizontaux (tomographie 2D), soit une reconstruction complète tridimensionnelle de l'objet (tomographie 3D).

Avec la technique STIMT, la reconstruction fournit une distribution de la masse volumique (en g.cm^{-3}) en tout point du volume analysé. Le nombre de projections (nombre d'angles de prise de vue) doit être choisi de manière à sonder totalement un plan de l'échantillon avec une résolution suffisamment fine. Elle dépend en particulier de la résolution latérale du faisceau d'ions utilisé, de la précision de son balayage ainsi que de la précision dans la rotation de l'échantillon. Si la composition de la matrice de l'échantillon est relativement homogène, il n'y a pas de différence fondamentale entre l'accumulation des données autour de l'échantillon sur un angle de 180° ou de 360° . C'est le cas notamment des échantillons biologiques, pour lesquels nous avons choisi expérimentalement une exploration totale sur 180° . Comme pour la technique STIM 2D, la tomographie STIM requiert une intensité de faisceau très faible ($< 1 \text{ fA}$), ce qui en fait une technique réellement non destructive.

1.3.2 Analyse par tomographie PIXE

Pour la tomographie PIXE (PIXET), la procédure d'exploration angulaire de l'échantillon est la même et les trois étapes décrites précédemment sont aussi appliquées. A chaque position du faisceau, ce sont les photons X qui sont détectés à l'aide d'un détecteur placé à un angle compatible avec une analyse PIXE conventionnelle et dans le plan analysé (fig. 1.14). Le spectre en énergie correspondant est enregistré. Pour la reconstruction, seuls les photons caractéristiques des éléments d'intérêt sont utilisés, grâce à un tri effectué sur le spectre en sélectionnant des fenêtres en énergie encadrant les raies caractéristiques.

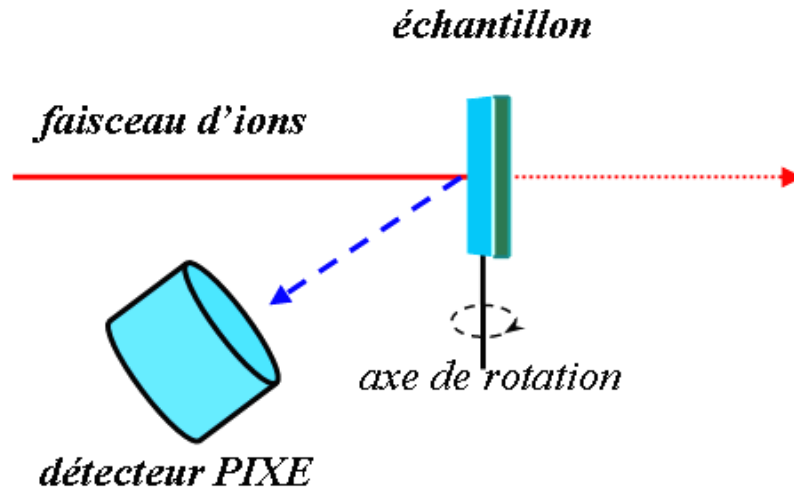


Figure 1.14 : Représentation schématique d'une analyse PIXET

La reconstruction est plus complexe qu'en tomographie STIM dans la mesure où pour chaque photon X détecté, l'atténuation des raies X entre le point d'émission et le détecteur dépend de la trajectoire de ces photons à l'intérieur de l'angle solide de détection. Compte tenu de la géométrie de détection généralement utilisée, avec des cibles trop denses ou trop volumineuses, les raies X produites en fin de trajectoire des ions peuvent être absorbées totalement et la reconstruction est impossible. Pour des échantillons de ce type, une solution consiste à reconstruire les données PIXE collectées sur une gamme angulaire couvrant 360° autour de l'échantillon. Dans le cas d'échantillons biologiques, l'atténuation des raies X dans le matériau relativement est faible et nous avons donc choisi de collecter les données sur 180° seulement.

Un autre point délicat de la technique PIXET concerne le nombre d'évènements collecté nécessaire pour mesurer avec précision les concentrations élémentaires. Compte tenu des sections efficaces d'émission X, il est nécessaire d'utiliser une intensité de faisceau plus forte que pour STIMT, soit quelques centaines de pA, en fonction de la brillance du faisceau utilisé et de la résolution spatiale nécessaire. En général, le temps d'acquisition des données reste quand même assez long pour obtenir une statistique suffisante. De ce fait, nous avons choisi de reconstruire des plans individuels par PIXET au lieu d'avoir systématiquement recours à des reconstructions 3D complètes.

1.3.3 La procédure d'analyse choisie

Compte tenu des contraintes présentées précédemment, les analyses STIMT et PIXET doivent être couplées. On doit avoir recours à une analyse STIMT préalable en 3D complet de

manière à déterminer la structure de l'échantillon et guider ensuite le choix des plans d'intérêt pour l'analyse PIXET. Ce choix a conditionné la mise en œuvre et surtout le développement des algorithmes de reconstruction puisque nous avons dû adapter le code DISRA, basé initialement sur une reconstruction 3D complète. Par ailleurs, les calculs de concentration des éléments dans l'échantillon nécessitent de connaître l'information sur la densité locale de la matrice pour normaliser les résultats d'émission X. Le nombre des événements collectés par le détecteur dépend en effet de la production et de l'atténuation des raies X dans l'échantillon. Ces paramètres dépendent de la densité locale et de l'énergie instantanée des ions pour chaque voxel que le faisceau traverse. Les calculs exacts de concentration exigent donc une analyse fine de la masse volumique pour chaque voxel, information qui ne peut être obtenue qu'avec une analyse STIMT. En réalité, cette masse volumique seule ne suffit pas. Il faut également connaître la composition chimique locale pour procéder à ces corrections. C'est donc finalement vers un processus itératif prenant en compte à la fois les données STIM et PIXE que nous nous sommes tournés pour le développement des algorithmes de reconstruction.

Chapitre II

Reconstruction par Tomographie

L'obtention d'une cartographie 3D de l'échantillon à partir de projections mesurées repose sur l'utilisation de techniques numériques de reconstruction qui sont le cœur du programme de traitement des données. En tomographie par faisceau d'ions, nous l'avons vu, les « densités » dont on cherche à reconstruire la distribution (2D ou 3D) sont la masse volumique d'une part (STIMT) et la composition, sous la forme de fractions de masse élémentaires, d'autre part (PIXET). Les projections à traiter sont respectivement l'énergie résiduelle des ions transmis et l'intensité des raies X caractéristiques. Depuis les balbutiements des premières méthodes de reconstruction numérique dans les années 1970, une grande variété d'algorithmes a été proposée. Les spécificités de la tomographie par faisceau d'ions posent le problème du choix d'un algorithme adapté. Nous allons dans ce chapitre donner un panorama des principales méthodes existantes, en précisant leurs points forts et leurs faiblesses au contraire défavorables. Nous discuterons ensuite du choix des algorithmes retenus pour nos applications.

2.1 Problème de la tomographie

Du point de vue expérimental, la tomographie par faisceau d'ions se caractérise par une géométrie dite « parallèle », c'est-à-dire un faisceau rectiligne, balayé perpendiculairement à la cible selon des directions parallèles les unes aux autres (en première approximation). La reconstruction est ainsi réalisée par plans de coupe successifs, horizontaux si le faisceau est horizontal (fig. 2.1). La distribution en volume sera obtenue par la superposition numérique des plans adjacents.

Les bases de la théorie mathématique de la reconstruction d'un objet à partir de la connaissance de ses projections ont été énoncées par Radon (1917), bien que les méthodes développées successivement à partir des années 1950 aient souvent été « réinventées » par leurs initiateurs. La géométrie de l'expérience (fig. 2.1) est modélisée à l'aide de deux repères, l'un associé à l'échantillon $(0, x, y)$, l'autre au faisceau $(0, s, u)$. Les équations permettant de passer d'un système de coordonnées à l'autre sont simplement :

$$\begin{cases} x = s \cos \theta - u \sin \theta \\ y = s \sin \theta + u \cos \theta \end{cases} \Leftrightarrow \begin{cases} s = x \cos \theta + y \sin \theta \\ u = -x \sin \theta + y \cos \theta \end{cases} \quad (\text{Eq. 2.1})$$

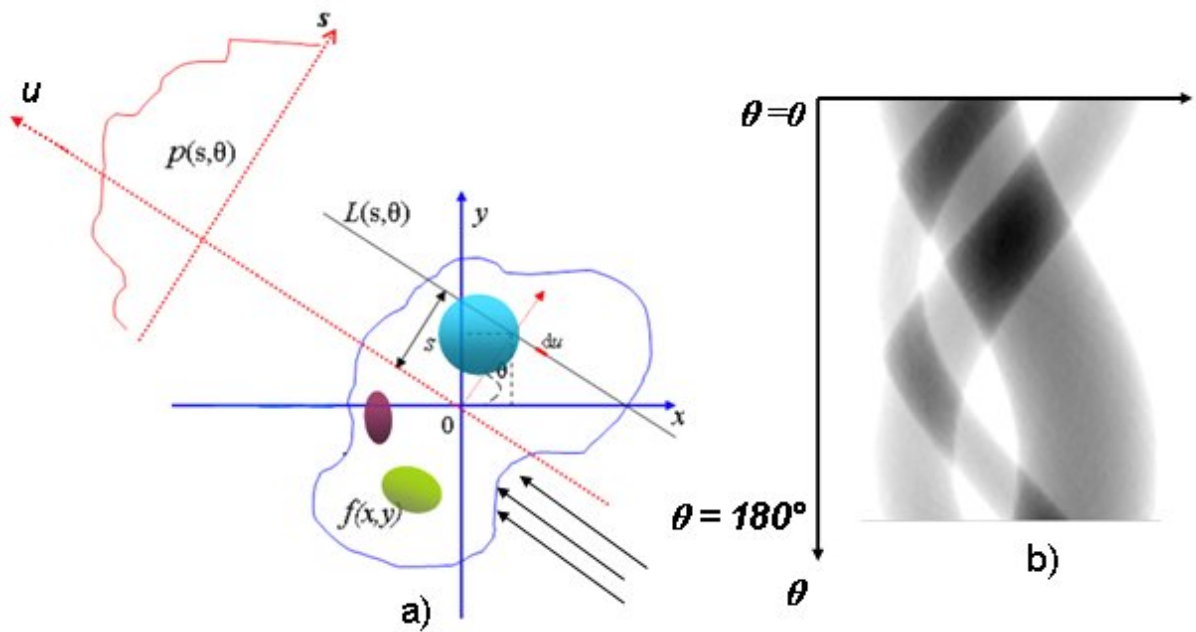


Figure 2.1 : Vue d'un plan de coupe de l'objet analysé et mesure des projections $p(s,\theta)$ (a) - Allure schématique du sinogramme correspondant à ce plan de coupe (échelle de nuances de gris arbitraire).

Chaque projection est modélisée par la transformée de Radon $p(s,\theta)$ de la fonction $f(x,y)$ représentant la grandeur locale à reconstruire, que nous appellerons « densité » dans la suite. La transformée de Radon (notée par l'opérateur \mathfrak{R} dans la formule suivante) représente l'intégrale des valeurs $f(x,y)$ le long de la ligne L , appelée rayon de projection, qui est définie par deux paramètres : s sa distance à l'origine et θ l'angle entre l'axe $0x$ et l'axe $0s$, qui est perpendiculaire à la direction de projection donnée par l'axe $0u$.

$$\begin{aligned}
 p(s,\theta) &= \mathfrak{R}\{f(x,y)\} = \int_L f(x,y) du \\
 &= \int_{-\infty}^{+\infty} f(s \cos \theta - u \sin \theta, s \sin \theta + u \cos \theta) du
 \end{aligned}
 \tag{Eq. 2.2}$$

Le rayon de projection L matérialise la direction du faisceau incident. Le pas d'intégration du représente une variation élémentaire de longueur sur cette droite d'intégration L (fig. 2.1).

Lorsque les valeurs des projections sont représentées par un code de couleurs en fonction des positions θ et s , on obtient un sinogramme (figure 2.1b). Chaque ligne horizontale du sinogramme représente la projection du plan de coupe considéré à un angle donné. L'image à reconstruire est un ensemble de pixel 3D dont le contenu local est déterminé à partir de ces projections. C'est donc bien un problème d'inversion qu'il faut résoudre.

En principe, on distingue deux approches différentes de reconstruction : les méthodes analytiques, qui sont basées sur une inversion analytique de la transformée de Radon, et les

méthodes itératives qui commencent par une évaluation et puis essaient de reconstruire l'image itérativement, comme nous allons le voir maintenant.

2.2 Méthodes analytiques

2.2.1 Méthode de rétroprojection directe

Historiquement, c'est une méthode simple pour estimer f à partir de ses projections parallèles.

La fonction \hat{f} est obtenue à partir de l'ensemble des projections ($p_\theta; \theta \in [0, \pi]$) par la formule suivante :

$$\hat{f}(x, y) = \int_0^\pi p(s, \theta) d\theta \quad (\text{Eq. 2.3})$$

À chaque point $M(x, y)$ du plan de coupe considéré, la rétroprojection directe consiste à superposer les contributions de l'ensemble des rayons passant par le point, c'est-à-dire en intégrant $p(s, \theta)$ pour toutes les valeurs de θ .

En fait, les méthodes analytiques expriment le problème de la reconstruction dans un espace continu et leur mise en œuvre nécessite une étape de discrétisation des formules de reconstruction, l'intégrale précédente s'écrit alors :

$$\hat{f}(x, y) = \sum_{k=1}^{n_\theta} p(s, \theta_k) \Delta\theta \quad (\text{Eq. 2.4})$$

Où n_θ est le nombre total de projections, θ_k est la $k^{\text{ème}}$ position angulaire et $\Delta\theta$ est le pas angulaire entre deux projections successives : $\Delta\theta = \frac{\pi}{n_\theta}$.

Cette méthode ne fournit malheureusement qu'une estimation grossière de la distribution f . En effet elle génère à l'extérieur de l'objet que l'on souhaite reconstruire des voxels non nuls, alors qu'ils ne contiennent aucune information en réalité. En conséquence, des artefacts, dits « artefacts en étoile » apparaissent sur l'image reconstruite (figure 2.2). Le résultat obtenu \hat{f} n'est donc pas une inversion exacte de la projection. Il nous faut utiliser une méthode qui permette l'élimination de ces artefacts : c'est la méthode de rétroprojection filtrée, qui est basée sur un calcul dans le plan de Fourier.

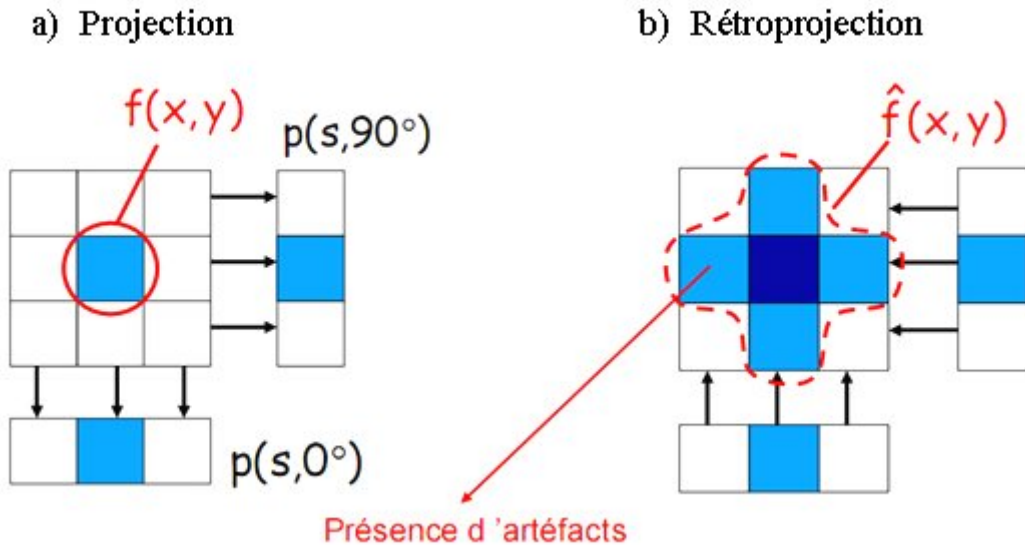


Figure 2.2 : Reconstruction tomographique d'un objet simple composé d'un seul voxel non nul au centre (a). La rétroprojection directe génère des artefacts en étoile autour du voxel central (b)

2.2.2 Méthode de rétroprojection filtrée

Il est important de comprendre le concept de la fréquence spatiale pour appréhender le rôle du filtrage dans la reconstruction d'image. Une fréquence spatiale dans une image correspond à une variation de l'amplitude dans n'importe quelle direction sur une distance donnée. Comme il y a de grands et petits objets, toute image inclura habituellement plusieurs fréquences. En utilisant la transformée de Fourier, une image peut être ainsi traduite dans le domaine fréquentiel. Pour éliminer l'effet de « flou » (artefacts en étoile) apparaissant dans la méthode de rétroprojection directe, un filtre spécifique peut être utilisé : c'est le principe de la rétroprojection filtrée.

La transformée de Fourier monodimensionnelle $P(v, \theta)$ de la projection $p(s, \theta)$ est présentée dans l'équation suivante :

$$P(v, \theta) = \int_{-\infty}^{+\infty} p(s, \theta) e^{-i2\pi v s} ds \quad (\text{Eq. 2.5})$$

En remplaçant $p(s, \theta)$ par sa valeur donnée par l'équation Eq. 2.2, il vient :

$$P(v, \theta) = \int_{-\infty}^{+\infty} \left[\int_{-\infty}^{+\infty} f(x, y) du \right] e^{-i2\pi v s} ds \quad (\text{Eq. 2.6})$$

Un changement de variable permet d'obtenir l'expression de la transformée de Fourier bidimensionnelle de l'objet :

$$\begin{aligned}
P(\nu, \theta) &= \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} f(x, y) e^{-i2\pi\nu(x\cos\theta+y\sin\theta)} dx dy \\
&= \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} f(x, y) e^{-i2\pi(x(\nu\cos\theta)+y(\nu\sin\theta))} dx dy \\
&= F(\nu\cos\theta, \nu\sin\theta)
\end{aligned} \tag{Eq. 2.7}$$

On obtient donc que la transformée de Fourier à une dimension de projection $p(s, \theta)$ est égale à la transformée de Fourier à deux dimensions de $f(x, y)$ le long de l'axe de fréquences qui est perpendiculaire à la direction de projection et dont l'équation paramétrique est donnée par la relation ($\nu_x = \nu\cos\theta, \nu_y = \nu\sin\theta$). Ceci constitue le théorème de la coupe centrale, pivot de l'inversion de la transformée de Radon. Finalement, la transformée de Fourier inverse permet ainsi d'estimer $f(x, y)$ à partir de $F(\nu_x = \nu\cos\theta, \nu_y = \nu\sin\theta)$:

$$\begin{aligned}
f(x, y) &= \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} F(\nu_x, \nu_y) e^{i2\pi(x\nu_x+y\nu_y)} d\nu_x d\nu_y \\
&= \int_0^{2\pi} \int_0^{\infty} F(\nu\cos\theta, \nu\sin\theta) e^{i2\pi\nu s} \nu d\nu d\theta
\end{aligned} \tag{Eq. 2.8}$$

D'après le théorème de la coupe centrale, en passant des coordonnées cartésiennes (ν_x, ν_y) aux coordonnées polaires (ν, θ) du plan fréquentiel et en notant que $P(\nu, \theta) = P(-\nu, \pi + \theta)$, il s'ensuit :

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} P(\nu, \theta) |\nu| e^{i2\pi\nu s} d\nu d\theta \tag{Eq. 2.9}$$

L'intégrale interne dans cette expression représente mathématiquement une projection filtrée $p^*(s, \theta)$ sous la forme :

$$p^*(s, \theta) = \int_{-\infty}^{+\infty} P(\nu, \theta) |\nu| e^{i2\pi\nu s} d\nu \tag{Eq. 2.10}$$

Le filtre fréquentiel utilisé, appelée "filtre de rampe", prend la forme : $G(\nu) = |\nu|$

Ce calcul revient donc à effectuer une rétroprojection de projections filtrées $p^*(s, \theta)$, c'est - à -dire :

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} p^*(s, \theta) d\theta \tag{Eq. 2.11}$$

Il apparaît donc que la fonction f peut être obtenue de façon analytiquement exacte à partir de la transformée de Fourier des projections mesurées. L'action du filtrage dans la méthode rétroprojection filtrée peut être comprise comme suit: après filtrage par le filtre $|\nu|$, les

projections filtrées peuvent contenir des valeurs négatives. La sommation de ces valeurs négatives et positives se compense de telle sorte que l'on obtient une image f correspondant à l'image réelle de l'objet, alors que les artefacts en étoile apparaissant par rétroprojection directe sont, en théorie, éliminés.

Pour résumer, on obtient donc ici la solution mathématiquement exacte du problème de reconstruction. L'algorithme de rétroprojection filtrée apparaît alors comme la succession de 3 grandes étapes :

- Acquisition des projections $p(s, \theta)$;
- Calcul des projections filtrées $p^*(s, \theta)$;
- Rétroprojection, c'est-à-dire sommation sur tous les angles θ des projections filtrées $p^*(s, \theta)$ afin d'obtenir l'image f .

2.2.3 Limitations expérimentales

Dans toutes les étapes ci-dessus, nous avons traité le problème dans le cas continu : on a reconstruit une fonction f continue à partir de projections p continues. Ceci suppose notamment un nombre de projections mesurées infini. Ces conditions ne sont évidemment pas réalisées en pratique, car les systèmes d'acquisition permettent d'obtenir des projections pour un nombre fini d'angles. De plus, les projections sont enregistrées sur des points discrets, il y a donc un nombre fini de rayons de projection. De ce fait, l'image obtenue n'est pas la solution mathématiquement exacte du problème d'inversion, mais seulement une approximation de la fonction f . En particulier il faut noter que la densité reconstruite peut parfois prendre des valeurs négatives dues à des artefacts de reconstruction.

Le fait que le pas d'échantillonnage w des projections (distance entre deux rayons consécutifs) ne soit pas infiniment fin conduit à une limitation de bande sur les fréquences spatiales ν :

$$|\nu| \leq \nu_c \quad (\text{eq. 2.12})$$

La fréquence maximale ν_c est dite « fréquence de coupure ». Elle est reliée au pas d'échantillonnage w par :

$$\nu_c = \frac{1}{2w} \quad (\text{Eq. 2.13})$$

2.2.4 Forme des filtres

L'application de la limitation de bande conduit à modifier le filtre $G(\nu)$ en le limitant par une fenêtre rectangulaire sur l'intervalle $[-\nu_c; +\nu_c]$:

$$G(\nu) = \begin{cases} |\nu| & \text{si } |\nu| \leq \nu_c \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \quad (\text{Eq. 2.14})$$

Expérimentalement, le spectre en fréquence de l'objet analysé s'étend en réalité au-delà de la fenêtre $[-\nu_c; +\nu_c]$ car il existe toujours des structures plus fines que le pas d'échantillonnage, en particulier aux bords aigus de l'objet. La limitation de bande conduit alors à l'apparition de fréquences parasites lors de la reconstruction. En outre, le processus de détection des données fait apparaître du bruit dans les projections collectées. Cela affecte directement l'exactitude de l'image reconstruite. On peut partiellement remédier à ces problèmes en remplaçant le filtre de rampe par un filtre lissant, qui réduit le poids des composantes de haute fréquence. Le choix du filtre lissant est dicté par un compromis entre la réduction du bruit et la dégradation de la résolution spatiale qui en résulte. La figure 2.3 permet de visualiser la forme de quelques filtres fréquemment utilisés : Hann, Butterworth, Hamming et Parzen, ce dernier étant le plus lissant des filtres présentés ici.

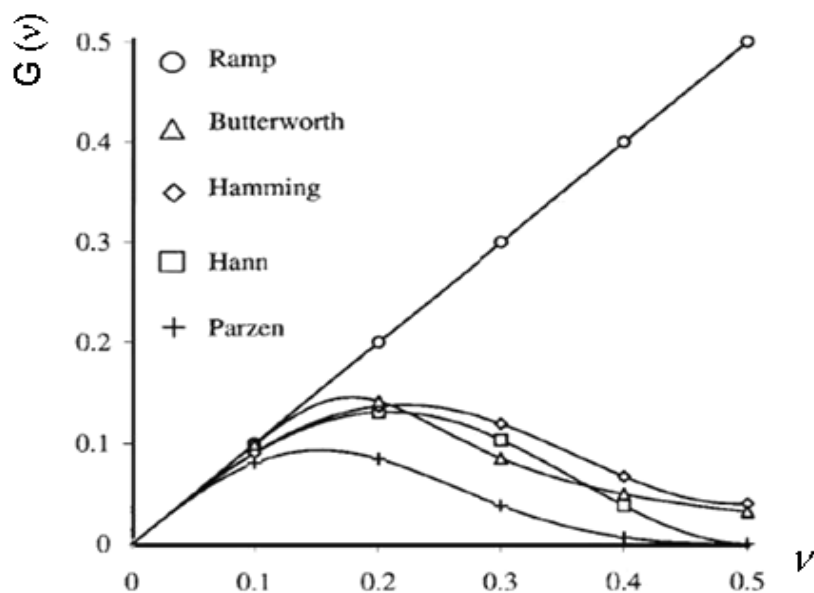


Figure 2.3 : Filtres de rétroprojection. Adapté de (Bruyant 2002)

2.3 Méthodes algébriques

Alors que les méthodes analytiques reposent sur une solution mathématiquement exacte du problème de reconstruction, les techniques itératives sont plutôt à considérer comme des méthodes d'optimisation. Le but est de déterminer la meilleure évaluation de la distribution de l'objet basée sur les projections mesurées. Un critère d'ajustement entre l'évaluation reconstruite et les données mesurées est employé pour mesurer la précision de la reconstruction obtenue.

2.3.1 Principe

Contrairement aux méthodes analytiques, les méthodes algébriques expriment le problème de la reconstruction directement dans un espace discret. Les algorithmes obtenus sont alors considérés comme de « bonnes approximations » des formules continues.

On définit un vecteur p des projections $\{p_j; 1 \leq j \leq n\}$ où n est égal au nombre total de rayons de projection pour tous les angles de vue. On définit un vecteur f de la grandeur locale à reconstruire $\{f_i; 1 \leq i \leq m\}$ où m est le nombre de voxels à reconstruire. On pose alors :

$$p_j = \sum_{i=1}^m R_{ji} f_i \quad (\text{Eq. 2.15})$$

La matrice des coefficients R est appelée matrice de projection. Le coefficient R_{ji} caractérise la contribution du voxel i au rayon de projection j (fig. 2.4). Il exprime la probabilité qu'un événement du pixel i soit détecté dans la projection j .

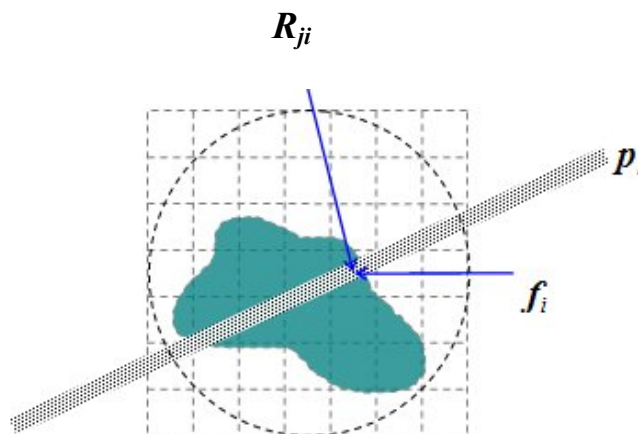


Figure 2.4 : Géométrie du problème de reconstruction pour les méthodes itératives. Le coefficient R_{ji} modélise le recouvrement du pixel i et du rayon j .

Cette formulation mathématique permet d'exprimer le problème comme la résolution d'un système linéaire classique. A priori, l'inversion directe de la matrice permettrait de résoudre le problème de reconstruction une fois pour toutes, pour une géométrie d'acquisition donnée. Cependant ceci n'est pas réalisable en pratique, en raison de la taille de la matrice à inverser. Par exemple, si on considère une expérience de tomographie d'un seul plan de coupe avec 128×128 soit $\sim 10^4$ voxels à reconstruire, et environ 100×128 soit $\sim 10^4$ rayons de projection mesurés, on revient à résoudre un système de $\sim 10^8$ équations à $\sim 10^8$ variables. En réalité, il faut toutefois noter que les éléments de matrice sont en grande partie nuls, puisque seul un nombre restreint de pixels contribue à une projection donnée. Notons enfin que, les données expérimentales étant inévitablement bruitées, ce système d'équations peut être inconsistant, c'est-à-dire qu'il n'admet pas en général une solution unique.

Pour toutes ces raisons, l'inversion de cette matrice n'est pas effectuée de manière directe, mais par itérations successives. Le principe général consiste à partir d'une estimation initiale de f , que nous noterons $f^{(0)}$, et à corriger pas à pas cette estimation. Pour obtenir la distribution $f^{(k+1)}$ à l'ordre $k+1$ des itérations, on modifie $f^{(k)}$ par des facteurs de correction déterminés en comparant les projections calculées $p(k)$ et les projections réelles p . On distingue différentes catégories d'algorithmes itératifs, selon la façon d'effectuer cette correction.

Nous distinguerons :

- tout d'abord les méthodes itératives classiques, comme la méthode ART (Algebraic Reconstruction Technique) et la méthode SIRT (Simultaneous Iterative Reconstruction Technique) ;
- ensuite, les méthodes itératives statistiques, qui prennent en compte la nature statistique des données acquises comme la méthode MLEM (Maximum Likelihood Expectation Maximization).
- enfin les algorithmes de rétroprojection filtrée itératifs, qui ont été largement utilisés pour la tomographie PIXET.

2.3.2 La méthode ART

La méthode ART a été publiée pour la première fois par Gordon (1970). Le principe général de cet algorithme itératif est de partir d'une image initiale $f^{(0)}$ et de la corriger pas à pas pour

obtenir une image satisfaisante. Le calcul consiste à comparer les projections de l'image $f^{(k)}$ et les projections mesurées, la correction étant effectuée rayon par rayon. L'algorithme ART peut se traduire par exemple par l'expression suivante :

$$f_i^{(k+1)} = f_i^{(k)} + \lambda_k \frac{p_j - \sum_{i=1}^N f_{ij}^{(k)}}{N} \quad (\text{Eq. 2.16})$$

p_j : projection expérimentale, mesurée à s et θ fixés

λ : facteur accélérateur de convergence de l'algorithme

$\sum_{i=1}^N f_{ij}^{(k)}$: Somme des événements de N pixels traversés par le rayon j pour l'itération k

En résumé, chaque rayon j est utilisé pour corriger tous les pixels i qu'il traverse. Le processus itératif est arrêté lorsque l'écart entre les projections expérimentales et les valeurs calculées est estimé suffisamment petit. L'algorithme ART présente l'avantage de converger assez rapidement. En revanche il est instable en présence de données bruitées. Une étude détaillée de cette méthode est publiée par Gordon (1974).

2.3.3 La méthode SIRT

Les méthodes de type SIRT consistent à corriger simultanément un pixel i en utilisant les rayons p_j qui le traversent, comme l'illustre la figure (Fig. 2.5) suivante :

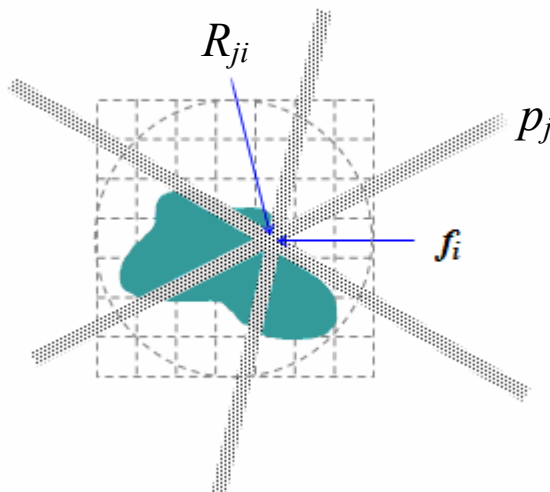


Figure 2.5: Principe de la méthode SIRT

Ce type de méthode est surtout employé pour la reconstruction à partir de données bruitées. Dans ce cas, ces méthodes sont plus consistantes que les méthodes ART. Cependant expérimentalement, ces méthodes convergent moins vite vers une solution que les méthodes

ART. Une itération de SIRT correspond environ à n_θ itérations de ART (n_θ étant le nombre de projections).

2.3.4 L'algorithme MLEM

L'algorithme MLEM (Maximum Likelihood Expectation Maximization) prend en compte la nature des fluctuations statistiques affectant les événements mesurés afin de proposer une valeur la plus vraisemblable de f . Le critère est de maximiser la fonction de vraisemblance, qui représente la probabilité qu'une image f génère les données de projection mesurées p_j . L'algorithme itératif de méthode MLEM peut être écrit suivant (Lange et Carson, 1984)

$$f_i^{(k+1)} = f_i^{(k)} \frac{1}{\sum_j R_{ji}} \sum_j R_{ji} \frac{P_j}{\sum_{i'} R_{ji'} f_{i'}^{(k)}} \quad (\text{Eq. 2.17})$$

où $f_i^{(k)}$ est l'estimation du voxel i de l'image f à l'itération k , p_j est la projection expérimentale au rayon j et $\sum_i R_{ji} f_i^{(k)}$ représente la projection calculée à l'ordre k à partir des valeurs $f_i^{(k)}$. L'estimation $f_i^{(k+1)}$ est donc obtenue à partir de $f_i^{(k)}$, corrigée par un facteur multiplicatif qui s'exprime comme la rétroprojection du rapport des projections mesurées sur les projections estimées. Plus intuitivement, on peut finalement représenter la formule ci-dessus de la façon suivante :

$$\text{Image}^{(k+1)} = \text{Image}^{(k)} \times \text{Rétroprojection normalisée de} \left(\frac{\text{Projection mesurée}}{\text{Projection calculée}^{(k)}} \right)$$

Notons que cette correction prend une forme multiplicative. Il est donc important de vérifier que l'image à l'ordre 0 ne prenne que des valeurs de densités positives. Or celle-ci est souvent choisie comme étant soit une distribution uniforme soit l'image de rétroprojection filtrée. Dans ce dernier cas, toutes les valeurs négatives initiales doivent donc être mises à zéro. Bien que robuste, la méthode MLEM converge très lentement par rapport aux autres méthodes itératives. Notons aussi que le critère de convergence est un paramètre délicat, en effet, le résultat MLEM devient bruité lorsque le nombre d'itérations augmente.

2.4 Applications aux cas des tomographies STIM et PIXE

2.4.1 Considérations générales

Les cas des tomographies STIM et PIXE sont à considérer de manière très différente. Dans le premier cas, il s'agit de tomographie par transmission. Les projections sont constituées par la valeur médiane (ou moyenne) de l'énergie résiduelle des ions mesurée à chaque position du faisceau, l'efficacité de détection étant voisine de 100 %. En conséquence, le bruit statistique associé à ces données est très faible. De plus, la modélisation des phénomènes physiques mis en jeu est relativement simple aux énergies considérées, ce qui permet d'obtenir directement la densité d'échantillon par l'intermédiaire du pouvoir d'arrêt. Pour ces raisons, l'utilisation d'une méthode de reconstruction analytique telle que la rétroprojection filtrée, relativement simple et rapide à mettre en œuvre, se justifie.

Dans le deuxième cas (PIXET), la statistique de comptage est beaucoup plus réduite car il s'agit de tomographie par émission de rayonnement X, et de plus l'angle solide expérimental est limité. Ainsi le bruit statistique des données mesurées n'est pas négligeable. De plus, la modélisation des phénomènes physiques est plus complexe, que ce soit au niveau de la production des raies X, de leur atténuation et de la réponse du détecteur. Les algorithmes de reconstruction doivent prendre en compte tous ces phénomènes.

Du point de vue des algorithmes, les différentes équipes de recherche impliquées dans le développement de la tomographie par faisceau d'ions se sont souvent directement inspirées des techniques disponibles dans le domaine de tomographie médicale, par exemple par transmission de rayons X ou par TEMP (tomographie d'émission mono-photonique). Nous allons maintenant brièvement présenter les différentes étapes de ces développements algorithmiques.

2.4.2 Tomographie STIM : méthode de rétroprojection filtrée

La première expérience de tomographie STIM a été effectuée par Ito et Koyama-Ito (1984) avec un faisceau de protons de 25 MeV et de 60 μm de diamètre sur un échantillon de polyéthylène. La reconstruction a été réalisée par rétroprojection filtrée. L'épaisseur traversée a été calculée point par point à partir de l'énergie résiduelle des ions, par l'intermédiaire du pouvoir d'arrêt, en supposant une composition d'échantillon uniforme.

Selon le même principe et de façon indépendante, Pontau et al. (1989) puis Fischer et Mühlbauer (1990) ont appliqué cette méthode à des échantillons biologiques, en utilisant un faisceau d'ions de résolution spatiale de l'ordre du μm . Une étude de diverses techniques de reconstruction (Bench, *et al.*, 1991), comparant rétroprojection filtrée et algorithmes algébriques (ART, maximum d'entropie), montre que pour STIMT la rétroprojection filtrée est à privilégier. En effet, elle permet d'obtenir une image de bonne qualité en un temps de reconstruction minimal.

Au CENBG, c'est ainsi la rétroprojection filtrée qui a été retenue dans les développements algorithmiques réalisés (Michelet, 1998). Les codes ont été inspirés d'une bibliothèque initialement développée pour la tomographie médicale (scanners X, TEMP) appelée « bibliothèque de Donner » (Huesman, 1977), déjà utilisée avec succès pour la tomographie par faisceau d'ions dans d'autres laboratoires (voir partie suivante). Plus récemment, ce code a été transformé en un logiciel complet, dit « TomoRebuild », programmé en C++ dans l'environnement de Windows (Michelet-Habchi *et al.*, 2005a). Dans ce code, les différentes étapes du traitement des données de STIMT sont programmées dans les modules individuels pilotés à partir d'une interface graphique, permettant de paramétrer et de contrôler facilement la reconstruction. Des procédures de correction de bruit de fond dans les sinogrammes sont proposées pour optimiser la qualité de l'image reconstruite. L'image reconstruite 2D ou 3D est visualisée et segmentée à l'aide du logiciel Amira® (Mercury, 2006) afin de calculer la densité des régions d'intérêt dans le volume analysé.

2.4.3 Tomographie PIXE : méthode ITEM

a. Modélisation en cible épaisse

Dans le cas général d'une cible épaisse, la modélisation de PIXET nécessite d'introduire dans le code une simulation de la perte d'énergie du faisceau (qui influence la section efficace d'ionisation des atomes cible) d'une part et, d'autre part, de l'atténuation des rayons X du point d'émission vers le détecteur. Ces deux phénomènes dépendent fortement de la densité locale (masse volumique) $\rho(s)$ sur les deux parcours - du faisceau d'ions et du rayon X - comme cela a été détaillé dans le chapitre 1 (partie 1.2.4), où nous avons montré :

$$Y_\lambda = \frac{N_p N_A}{A_Z} \frac{\Omega}{4\pi} \varepsilon k C_\lambda \left[\int_{\text{faisceau}} \sigma_\lambda(E(s)) \rho(s) ds \right] e^{-\int_{\text{rayon X}} (\mu/\rho)_\lambda(s) \rho(s) ds} \quad (\text{Eq. 2.18})$$

Dans cette expression, Y_λ représente la projection PIXE à la position de faisceau pour la raie λ considérée, c'est-à-dire le nombre d'événements dans cette raie. La première intégrale représente le parcours du faisceau d'ions tout le long du rayon de projection, parcours sur lequel est intégrée la variation de section efficace d'ionisation. La deuxième intégrale modélise l'atténuation des photons X d'intérêt à partir du point d'émission jusqu'au détecteur. C_λ est la fraction de masse d'élément à analyser intégrée sur tout le rayon de projection considéré, N_p le nombre total de protons ayant traversé ce pixel pendant le temps de collection, A_Z le nombre de masse de l'élément, N_A le nombre d'Avogadro, $\sigma_i(E(s))$ est la section efficace de production de raie X à l'énergie incidente $E(s)$ à la profondeur s , k le rapport d'embranchement de la raie considérée, ε l'efficacité du détecteur et $(\mu/\rho)_\lambda$ le coefficient d'atténuation massique de l'échantillon pour la raie λ considérée. D'une façon similaire, on peut obtenir la valeur reconstruite de l'intensité d'émission de la raie λ au voxel (x, y) :

$$X_{\lambda,xy} = \frac{N_p N_A}{A_Z} \frac{\Omega}{4\pi} \varepsilon k C_{\lambda,xy} \sigma_\lambda(\rho_B) D_{xy} e^{-\int_{\text{rayon X}} (\mu/\rho)_\lambda(s) \rho(s) ds} \quad (\text{Eq. 2.19})$$

Où ρ_B est l'épaisseur (masse surfacique) intégrée le long de la direction du faisceau jusqu'au voxel (x, y) d'intérêt, $\sigma_\lambda(\rho_B)$ représente la section efficace de production de raie X au voxel (x, y) , D_{xy} représente la densité de masse au voxel (x, y) , valeur issue de la reconstruction STIMT. Les premiers algorithmes écrits pour la tomographie PIXET se sont basés sur l'utilisation de sous-programmes de la bibliothèque de Donner, initialement conçue pour la tomographie médicale TEMP. Dans les codes TEMP, seule l'atténuation des gammas émis doit être modélisée. Dans ce code, elle était considérée, pour une énergie donnée, comme une constante. Dans le cas de PIXET, les auteurs ont donc dû modifier ces algorithmes itératifs afin de modéliser la production et l'atténuation des raies X par l'intermédiaire d'un facteur de correction effectif. Deux cas ont été successivement étudiés : des échantillons de composition homogène ou bien hétérogènes.

b. Composition homogène

Le premier code de reconstruction PIXET a été proposé par Schofield (1992). Dans cette étude pionnière, la variation de section efficace d'ionisation avec l'énergie du faisceau d'ions à travers l'échantillon est modélisée sous la forme d'un facteur multiplicatif, qui est ensuite

combinée avec les coefficients d'atténuation des raies X pour former un facteur d'atténuation effectif global à chaque voxel.

$$\chi_{\lambda} = \frac{\sigma_{\lambda}(\rho_B)}{\sigma_{\lambda}(0)} e^{-(\mu/\rho)_{\lambda} \rho_D} \quad (\text{Eq. 2.20})$$

Où ρ_D est l'épaisseur traversée par les rayons X jusqu'au détecteur et $\sigma_{\lambda}(0)$ est la section efficace de production de raie λ à l'énergie incidente du faisceau. Les coefficients χ_{λ} sont calculés pour chaque voxel à partir de la reconstruction STIMT, effectuée au préalable en considérant une composition globale homogène. Ces coefficients sont incorporés avec les données de tomographie PIXE mesurées pour obtenir un nombre de raies $\tilde{X}_{\lambda,xy}$ corrigé de l'atténuation dans l'échantillon et de la variation de section efficace d'ionisation à l'énergie incidente du faisceau d'ions :

$$\tilde{X}_{\lambda,xy} = X_{\lambda,xy} / \chi_{\lambda}$$

Donc, $\tilde{X}_{\lambda,xy}$ représente la valeur reconstruite corrigée de l'intensité d'émission de la raie λ au voxel (x, y) . La distribution de la concentration des éléments est obtenue à partir de la formule 2.19 :

$$C_{\lambda,xy} = \frac{A_Z}{N_A N_P} \frac{4\pi}{\Omega} \frac{1}{\varepsilon k} \frac{X_{\lambda,xy}}{\sigma_{\lambda}(\rho_B) D_{xy} e^{-\int_{\text{rayon X}} (\mu/\rho)_{\lambda}(s) \rho(s) ds}} \quad (\text{Eq. 2.21})$$

Dans une cible de composition homogène on peut réaliser l'approximation suivante :

$$\int_{\text{rayon X}} (\mu/\rho)_{\lambda}(s) \rho(s) ds = (\mu/\rho)_{\lambda} \int_{\text{rayon X}} \rho(s) ds = (\mu/\rho)_{\lambda} \rho_D \quad (\text{Eq. 2.22})$$

Donc, la concentration $C_{\lambda,xy}$ s'écrit :

$$C_{\lambda,xy} = \frac{A_Z}{N_A N_P} \frac{4\pi}{\Omega} \frac{1}{\varepsilon k} \frac{X_{\lambda,xy}}{\sigma_{\lambda}(0) \chi_{\lambda} D_{xy}} \quad (\text{Eq. 2.23})$$

$$C_{\lambda,xy} = \frac{A_Z}{N_A N_P} \frac{4\pi}{\Omega} \frac{1}{\varepsilon k} \frac{\tilde{X}_{\lambda,xy}}{\sigma_{\lambda}(0) D_{xy}}$$

c. Composition hétérogène

La méthode ITEM proposée par Schofield est prolongée par Antolak et Bench (1994), de sorte que des compositions élémentaires hétérogènes puissent être modélisées. Pour résoudre

ce problème, le calcul du facteur d'atténuation effective par voxel prend en compte la variation de la densité locale $\rho(x)$ et du coefficient d'atténuation massique $(\mu/\rho)(x)$ en fonction de la composition locale le long des trajectoires considérées :

$$\chi_\lambda = \frac{\sigma_\lambda \left(\int_{\text{faisceau}} \rho(x) dx \right)}{\sigma_\lambda(0)} e^{-\int_{\text{rayon } X} (\mu/\rho)_\lambda(x) \rho(x) dx} \quad (\text{Eq. 2.24})$$

Pour cela, le calcul des coefficients χ_λ est intégré dans le processus de reconstruction itérative. La densité locale $\rho(x)$ et le coefficient d'atténuation massique local $(\mu/\rho)(x)$ sont corrigés successivement dans la boucle d'itération, à partir d'une cible supposée homogène à l'ordre 0 (initialisation des itérations). Les reconstructions STIMT et PIXET sont effectuées successivement dans chaque boucle d'itération :

- les données de composition permettent d'affiner la détermination des masses surfaciques ;
- réciproquement les densités reconstruites sont utilisées pour corriger la reconstruction des concentrations élémentaires.

La convergence est atteinte lorsque les valeurs de concentrations entre deux itérations consécutives sont considérées suffisamment proches.

d. Limites de la méthode ITEM

Cette méthode a permis de résoudre, dans la dernière version proposée, le problème des échantillons de composition hétérogène. Toutefois les calculs d'atténuation sont restés limités à une seule trajectoire de raie X, à partir du voxel d'émission dans le plan reconstruit jusqu'au détecteur. D'un point de vue expérimental, les données devaient pour cette raison être collectées dans un angle solide le plus fin possible, ce qui allongeait les durées d'acquisition. Ceci allait à l'encontre des conditions expérimentales typiquement souhaitables en PIXET, favorisant au contraire de grands angles solides afin d'augmenter les taux de comptage. En conséquence, l'application de cet algorithme se révélait limitée à des échantillons ne présentant pas de fortes variations de composition et/ou de densité.

2.4.4 Tomographie PIXE : algorithme MLEM

La première application de l'algorithme MLEM (Maximum Likelihood Expectation Maximization) en PIXET a été réalisée par Liew et al. (1995). Le problème est discrétisé en

considérant un nombre fini de rayons de projection, paramétrés par l'abscisse s_i et l'angle θ_j . L'intensité de la raie X mesurée à la position (s_i, θ_j) est définie par :

$$Y_{ij} = \sum_m \sum_n A_{ij,mn} c_{mn} \quad (\text{Eq. 2.25})$$

Dans cette expression, c_{mn} est la concentration de l'élément considéré au voxel (m, n) , que l'on cherche à reconstruire. Le coefficient $A_{ij,mn}$ est défini comme précédemment par :

$$A_{ij,mn} = \frac{\eta N_p \Omega}{4\pi\rho} \int_{E_1}^{E_2} \frac{\sigma(E)}{S(E)} e^{-\int_{\text{raie X}} \mu(x,y) ds} dE \quad (\text{Eq. 2.26})$$

Dans cette expression, η est l'efficacité de détection du détecteur, on a posé $S(E)$ le pouvoir d'arrêt de l'ion à l'énergie instantanée E , de sorte que l'intégrale le long du rayon de projection jusqu'au voxel (m, n) se ramène à une intégrale en énergie, où E_1 est l'énergie du faisceau à l'entrée de la cible et E_2 l'énergie en profondeur au voxel (m, n) :

$$ds = -\frac{1}{\rho} \frac{dE}{S(E)} \quad (\text{Eq. 2.27})$$

De même que précédemment, le ralentissement du faisceau d'ions et l'atténuation des raies X sont donc incorporés dans l'algorithme pour obtenir la concentration des éléments détectés par émission X. En reprenant le principe de MLEM, on obtient que la concentration élémentaire peut être évaluée dans la boucle d'itération par la formule suivante :

$$c_{mn}^{(k+1)} = \frac{c_{mn}^{(k)}}{\sum_{i'} \sum_{j'} A_{i'j',mn}} \sum_i \sum_j A_{ij,mn} \left(\frac{Y_{ij}}{\sum_{m'} \sum_{n'} A_{ij,m'n'} c_{m'n'}^{(k)}} \right) \quad (\text{Eq. 2.28})$$

Ce qui peut s'écrire plus simplement :

$$c_{mn}^{(k+1)} = c_{mn}^k \times K_{mn} \quad (\text{Eq. 2.29})$$

La correction est effectuée par le biais du coefficient multiplicatif K_{mn} , calculé à chaque voxel (m, n) , correspondant à la rétroprojection normalisée du rapport entre les projections mesurées et calculées à l'ordre k .

Le point fort de cette méthode est de permettre une reconstruction PIXET même dans le cas où les données sont en nombre insuffisant. Dans une étude, Ng et al. (1997) ont montré de façon surprenante que la reconstruction d'une image de 30×30 voxels peut être effectuée à partir de seulement 4 projections. La méthode MLEM est aussi adaptée au cas où, pour des raisons d'encombrement notamment, l'échantillon ne peut pas être visualisé sous un angle

plein de 360° ou 180° comme discuté dans le chapitre 1 (partie 1.3.2). En revanche, cet algorithme tend à converger lentement et à amplifier le bruit au fur et à mesure des itérations, ce qui a limité son utilisation en pratique pour la PIXET.

2.4.5 Tomographie PIXE : le code DISRA

L'algorithme DISRA (Discrete Image Space Reconstruction Algorithm) a été développé pour la PIXET à l'université de Melbourne par Sakellariou et al. (2002). Il est une extension de la méthode ISRA (Image Space Reconstruction Algorithm) proposée par Daube-Witherspoon et Muehlechner (1986) pour la tomographie par émission de positrons.

Cet algorithme présente des similarités avec l'algorithme MLEM vu précédemment. Cependant les facteurs de correction ne sont pas issus directement de la comparaison entre projections mesurées et simulées, mais de la rétroprojection filtrée de ces valeurs. Une originalité intéressante de ce programme est d'appliquer une discrétisation des valeurs à chaque voxel afin de réduire le bruit qui tendrait à s'accumuler au fur et à mesure des itérations. La densité de masse et les fractions de masse sont limitées à des intervalles de valeurs définis par une largeur de bande qui décroît lorsque le nombre d'itérations augmente. La largeur de bande diminuant, la distribution devient de plus en plus continue, ce qui force la convergence vers des valeurs vraisemblables. Un autre atout majeur de DISRA est de prendre en compte l'atténuation des raies X dans un espace tridimensionnel, autorisant ainsi un grand angle solide de détection. Les informations 3D de STIMT/PIXET sont alors utilisées, en divisant l'angle solide total en angles solides élémentaires à l'intérieur desquels l'atténuation est calculée.

Le code DISRA apparaît ainsi comme le plus complet écrit à ce jour pour la PIXET. Les laboratoires les plus récemment impliqués dans le développement de la micro-tomographie par faisceau d'ions l'ont de ce fait retenu pour le traitement des données, notamment : l'université de Surrey (Beasley et Spyrou, 2005) et l'université de Leipzig (Schwertner *et al.*, 2006). Au CENBG, les développements effectués à partir de DISRA au cours de ce travail de thèse, ont visé à adapter ce code à des conditions usuelles pour l'analyse d'échantillons biologiques à l'échelle cellulaire.

Chapitre III

Reconstruction STIMT/PIXET au CENBG

Le développement de la tomographie PIXE au CENBG vise à répondre notamment à une problématique particulière : l'analyse d'échantillons biologiques de composition globale relativement homogène, à l'intérieur desquels on souhaite mettre en évidence des sites de fixation intracellulaires de molécules ou de particules d'intérêt. La fragilité de ces échantillons sous faisceau interdit de longues durées d'analyse, de ce fait les conditions idéales d'utilisation de DISRA – données à la fois PIXET et STIMT tridimensionnelles, grand nombre de projections, données peu bruitées, n'étaient pas satisfaites. Cela nous a conduits, dans ce travail de thèse, à rechercher des solutions à plusieurs problèmes :

- Reconstruction de plans de coupes isolés de PIXET
- Détermination robuste des centres de rotation STIMT et PIXET
- Correction éventuelle du bruit dans les sinogrammes
- Correction éventuelle des artefacts directement dans l'image STIMT reconstruite à l'ordre zéro.

Le code DISRA originel a ainsi été modifié de façon à inclure ces nouvelles procédures. Par ailleurs, une interface graphique a été développée afin de contrôler plus aisément les nombreux paramètres de reconstruction utilisés par les différents sous-programmes, et de rendre plus conviviale l'utilisation de ce code – initialement constitué de sous programmes individuels appelés par des lignes de commande Linux (fig. 3.1).

Dans un souci de cohérence vis-à-vis des choix déjà réalisés pour la conception du programme TomoRebuild (Michelet-Habchi et al. 2005a), dédié au traitement des données STIMT au CENBG, le développement entrepris à partir du code DISRA a été réalisé en C++ dans l'environnement graphique Windows. Les principales étapes du traitement des données sont accessibles à partir d'une seule fenêtre. Dans un souci de portabilité et d'utilisation par d'autres laboratoires, les principaux paramètres expérimentaux utilisés pour la reconstruction sont aisément modifiables. Notons également qu'un guide utilisateur et une procédure d'installation détaillés ont été réalisés en langue anglaise.

Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord présenter les étapes principales du code DISRA originel puis préciser les modifications apportées. Les différents processus mis en œuvre seront illustrés par des exemples de tomographie expérimentale sur des objets de structure simple. Un test numérique de reconstruction PIXET sera enfin réalisé sur un échantillon biologique « fantôme ».

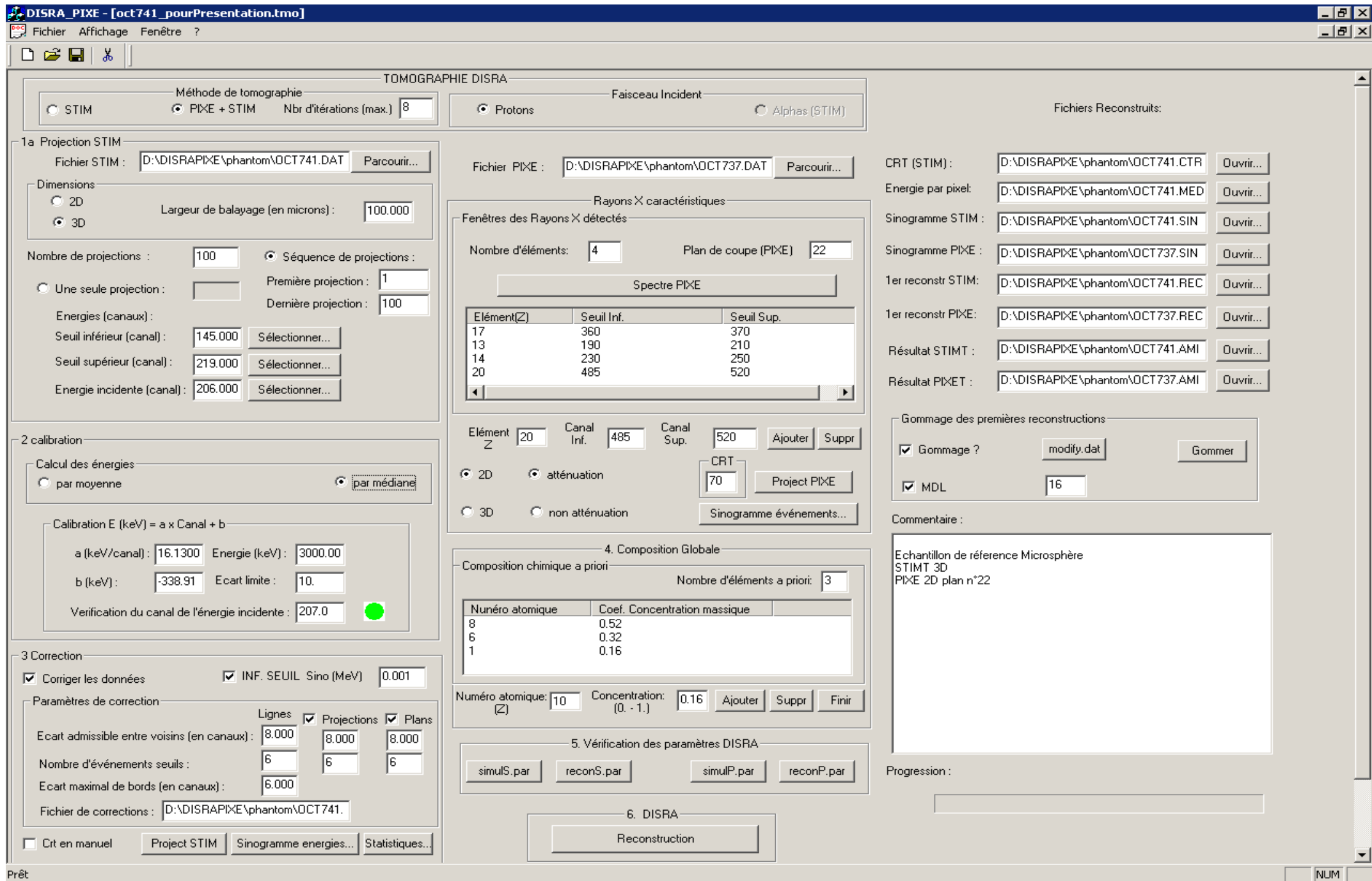


Figure 3.1 : Vue de l'interface utilisateur du code DISRA. Les différentes étapes du traitement des données seront détaillées dans ce chapitre. Un guide utilisateur (en anglais) accompagne ce code.

3.1 Principe du code originel DISRA

3.1.1 Schéma général

L'algorithme DISRA procède par itérations successives, en simulant en même temps les processus physiques de STIMT et de PIXET, puis en comparant les résultats de la simulation effectuée aux résultats expérimentaux, qui servent de référence. L'idée est d'améliorer ainsi à chaque itération le « tomogramme », c'est-à-dire l'image 3D de l'échantillon contenant à chaque voxel les informations de densité de masse (STIMT) et de fraction de masse élémentaire (PIXET).

3.1.2 Reconstruction de référence

Un organigramme simplifié du code DISRA est présenté sur la figure 3.2. Les spectres de STIMT et PIXET sont traités séparément afin d'obtenir les projections de l'énergie résiduelle d'une part et, d'autre part, du nombre d'événements intégré dans la raie X sélectionnée (K_{α} par exemple) pour chaque élément dosé. Le détail de ce traitement des données sera précisé dans la partie 3.2. Les projections expérimentales sont réarrangées sous forme de sinogrammes, résultant ainsi pour chaque plan de coupe en un sinogramme pour la STIMT et un sinogramme par élément dosé pour la PIXET.

La transformée de Radon inverse est effectuée directement sur ces sinogrammes par rétroprojection filtrée. Un ensemble de distributions expérimentales est ainsi obtenu, représentant une image de la morphologie de l'objet (STIMT) et de la répartition de chaque élément (PIXET). On appellera cet ensemble d'images « reconstruction de référence » (R_e). Notons que les valeurs produites dans cette reconstruction de référence ne correspondent pas exactement à la densité ou la fraction de masse élémentaire, mais à une simple rétroprojection des sinogrammes, ce qui n'a pas de signification physique directe. Plus précisément, les valeurs reconstruites auraient pour unités respectives des $\text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ pour la STIMT et des nombres d'événements par μm pour la PIXET.

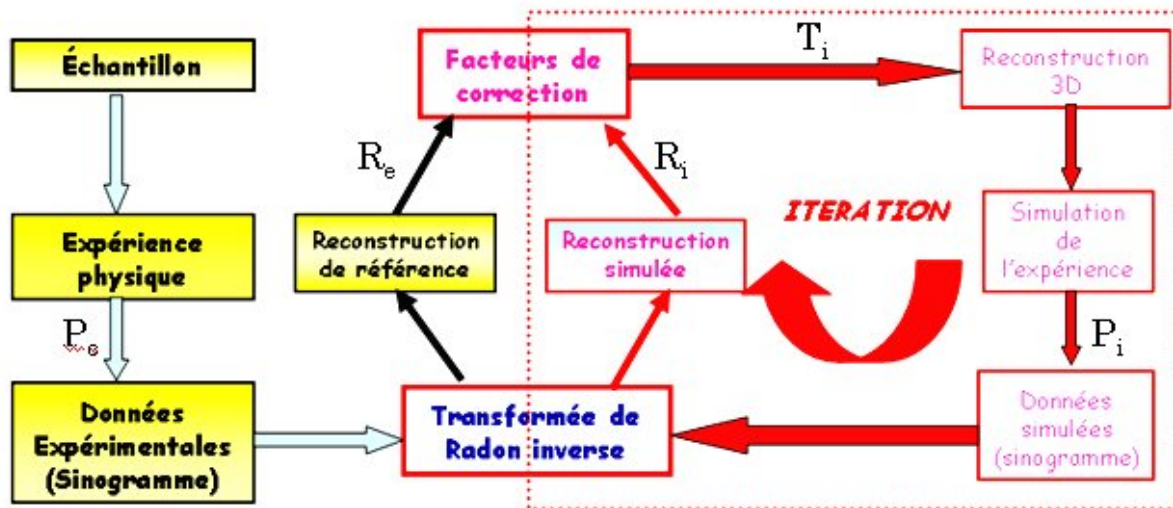


Figure 3.2 : Schéma structure de l'algorithme DISRA (Sakellariou, 2002)

Cette reconstruction de référence présente deux intérêts :

- Elle va servir de base à la construction du tomogramme à l'ordre 0, point de départ des itérations.
- Elle va être utilisée, à chaque itération, pour calculer le facteur de correction à appliquer sur le tomogramme à l'ordre i .

3.1.3 Tomogramme à l'ordre zéro

Le tomogramme à l'ordre zéro T_0 est directement obtenu à partir des valeurs de la reconstruction de référence R_e , en y appliquant quelques modifications cependant :

- toutes les fractions de masse élémentaires d'un voxel dont la densité de masse est nulle sont mises à zéro, ce qui permet ainsi de mettre à zéro tous les voxels identifiés comme étant vides de matière, par exemple à l'extérieur de l'échantillon,
- la somme des fractions de masse des éléments détectés par PIXET et des éléments définis dans la composition a priori de l'échantillon (éléments non détectés par PIXET et dont la composition est entrée par l'utilisateur) est normalisée à 1 à chaque voxel.
- les densités de masse sont si nécessaire renormalisées en appliquant un facteur d'échelle global permettant de partir de valeurs « suffisamment réalistes » à l'ordre zéro.
- les valeurs en chaque voxel sont discrétisées, ce qui est une originalité de DISRA, selon des intervalles de largeur de bande finie. La largeur de bande imposée diminue au fur et à mesure des itérations, ainsi la distribution reconstruite devient de plus en

plus « continue ». Cette discrétisation a été introduite dans le code dans le but de limiter efficacement l'apparition de bruit lors des opérations successives de rétroprojection filtrée (Sakellariou et al., 1997 et Sakellariou, 2002).

3.1.4 Simulations

Le tomogramme à l'ordre 0 sert de point de départ à la simulation. Dans la boucle d'itération, la reconstruction est réalisée en deux étapes :

La première étape consiste à simuler les phénomènes physiques de l'expérience de tomographie à partir du tomogramme, en utilisant les informations de densité et de composition déterminées dans l'étape précédente. Sont ainsi simulés, pour chaque trajectoire de faisceau : le ralentissement du faisceau, la production des raies X et éventuellement leur atténuation jusqu'au détecteur. Cette simulation génère des projections que l'on peut ensuite comparer aux projections expérimentales. Le processus itératif est arrêté lorsque les projections simulées sont « suffisamment proches » des projections expérimentales. Dans le cas contraire, un tomogramme à l'ordre $i+1$ est calculé. Le tomogramme à l'ordre $i+1$ est obtenu en corrigeant le tomogramme à l'ordre i par un facteur multiplicatif calculé à chaque voxel comme suit :

- Tout d'abord, les projections simulées à l'ordre i sont rétroprojetées par rétroprojection filtrée. On obtient ainsi des images simulées R_i des distributions de la densité de masse et des fractions de masse élémentaires de l'objet.
- Ensuite, ces images simulées sont comparées à la reconstruction expérimentale R_e , obtenue quant à elle par rétroprojection filtrée des projections expérimentales. La comparaison de ces deux images point par point fournit ainsi des facteurs de correction à chaque voxel.
- Le tomogramme T_{i+1} est obtenu en utilisant la formule suivante :

$$T_{i+1} = \frac{R_e}{R_i} T_i \quad (\text{Eq. 3.1})$$

De nouvelles projections simulées sont alors générées à partir de ce tomogramme et comparées aux projections expérimentales afin de voir si la convergence est atteinte ou non, autrement dit si le tomogramme T_{i+1} est « suffisamment réaliste ».

3.1.5 Correction des données et critère de convergence

Le critère de convergence compare les projections simulées (P_i) aux données expérimentales (P_e). Plus précisément, l'erreur entre deux ensembles de données peut être estimée sur tous les pixels v par la formule suivante :

$$\Delta\varepsilon = \frac{\sum_v |P_e(v) - P_i(v)|}{\sum_v |P_e(v)|} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

Une valeur typique pour l'arrêt des itérations est d'obtenir une erreur relative de l'ordre de quelques pourcents. Comme nous l'avons expliqué, les facteurs de correction sont calculés à partir de la comparaison des images simulées R_i et des images expérimentales R_e . Afin d'éviter que les étapes de rétroprojection successives n'amplifient le bruit dans les images reconstruites, un processus de discrétisation spécifique à DISRA est mis en place.

Les valeurs en chaque voxel sont contraintes par une largeur de bande ΔD dont la valeur est diminuée (de façon arbitraire) à chaque itération. Les largeurs de bande appliquées pour la densité de masse et les fractions de masse sont différentes. L'évolution de la largeur de bande en fonction du nombre d'itérations pour la distribution de la densité de masse est donnée par la relation :

$$\Delta D_i = 10 \times 2^{-(2+i)} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

Pour les fractions de masse on a :

$$\Delta D_i = 0.5 \times 2^{-(2+i)} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

Ces relations sont semi-empiriques et correspondent à des valeurs typiques de densité et de composition. A chaque itération, la largeur de bande est ainsi réduite d'un facteur 2. Cette discrétisation permet d'amplifier les différences entre voxels. Le but est de pouvoir les comparer avec un degré de finesse allant croissant, afin d'optimiser la convergence, non seulement en valeur moyenne sur l'ensemble de l'image (ce que traduit l'équation 3.1) mais aussi à l'intérieur de régions de densité voisine. Un processus de comparaison entre chaque voxel considéré et les voxels voisins permet en fait de « lisser » le bruit dans le tomogramme tout en préservant les discontinuités au niveau des bords des structures.

L'évolution de la discrétisation en fonction du nombre d'itérations est donnée dans le cas général par les deux relations précédentes. Toutefois, cette évolution peut être, si on le souhaite, forcée par l'utilisateur afin d'atteindre la convergence plus rapidement. Il convient néanmoins de rester prudent car cette convergence forcée peut malgré tout aboutir à des

valeurs moins réalistes. La figure 3.3 compare l'écart entre projections simulées et expérimentales selon deux modes de discrétisation (habituel et forcé) sur un objet « fantôme » constitué d'éléments légers, d'une façon similaire à un échantillon de type biologique par exemple (la constitution de ce fantôme sera définie plus en détail dans la partie 3.6). Dans ce cas, la discrétisation a été forcée à partir de l'ordre 5 afin d'accélérer la convergence.

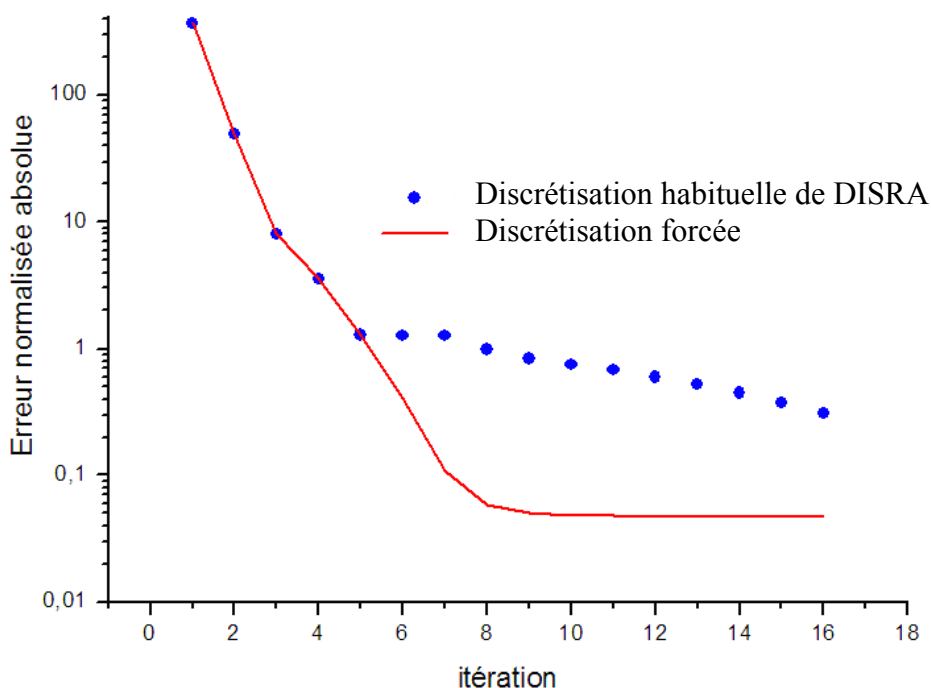


Figure 3.3 : Erreur normalisée absolue (équation 3.1) calculée entre projections expérimentales et simulées à chaque itération : d'une part en utilisant la relation habituelle de DISRA, soit $\Delta D_i = 10 \times 2^{-(2+i)}$ (points), et d'autre part en forçant la largeur de bande à une valeur fixe : $\Delta D = 10^{-5}$ après quatre itérations (trait continu). Ce changement permet d'obtenir une convergence plus rapide entre le tomogramme simulé et le fantôme représentant l'objet analysé.

3.1.6 Pour résumer ...

Nous résumerons les différentes étapes de l'algorithme DISRA grâce à un exemple simple. Nous considérerons ici la reconstruction PIXET d'un objet fantôme simplement constitué de deux sphères accolées de densité et de composition uniformes : une sphère de SiC (90 % C, 10 % Si, densité $2,2 \text{ g.cm}^{-3}$) et une sphère d'AlN (85 % N, 15 % Al, densité $3,6 \text{ g.cm}^{-3}$). Une illustration d'une reconstruction PIXET effectuée à partir de ce fantôme par le code DISRA est illustrée sur la figure 3.3.

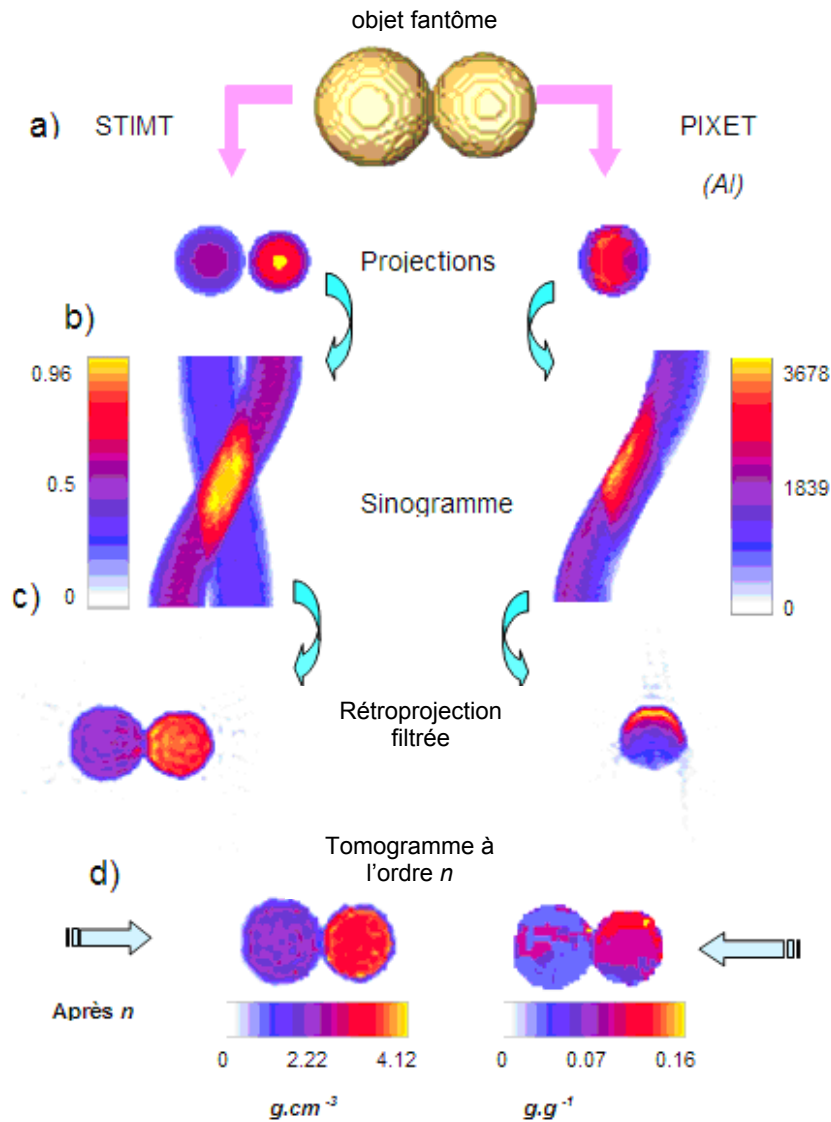


Figure 3.3 : Représentation schématique des différentes étapes d'une reconstruction PIXET d'un fantôme simple, composé de deux sphères de densité et de composition homogènes.

La modélisation des expériences STIMT (à gauche sur la figure précédente) et PIXET (à droite) est réalisée séparément et permet d'obtenir respectivement des projections expérimentales « fantômes » de l'énergie résiduelle et du nombre de raies X émises (seulement les raies K_{α} de Al ont été représentées) (fig. 3.3a). Ces projections sont dans un premier temps réarrangées sous la forme de sinogrammes : pour cela les données sont triées en fonction de la position du faisceau (en abscisses) pour chaque angle de projection (en ordonnées) et représentées sous la forme d'un code de couleur (fig. 3.3b). Une échelle de couleur indicative est ici utilisée respectivement pour coder les valeurs de perte d'énergie (STIMT) et le nombre de photons X caractéristiques (PIXET) à chaque position du faisceau. Dans un deuxième temps, ces sinogrammes sont rétroprojetés par rétroprojection filtrée afin

d'obtenir la reconstruction de référence (fig. 3.3c). Cette reconstruction de référence sert de point de départ pour construire le tomogramme à l'ordre zéro, c'est-à-dire la distribution de la densité de masse et des fractions de masse élémentaires (ici seule la distribution en Al a été représentée). La simulation des expériences physiques de tomographie est réalisée à partir de ce tomogramme dans la boucle itération afin de créer le tomogramme à l'ordre suivant. A chaque itération, les facteurs de corrections précédemment décrits sont appliqués de façon à améliorer le tomogramme jusqu'à ce qu'il soit le plus proche possible des distributions réelles (fig. 3.3d).

3.2 Détermination de concentrations élémentaires

Nous allons maintenant détailler les phénomènes physiques modélisés dans la reconstruction PIXET par le code DISRA. La théorie de ces phénomènes et les principales équations utilisées dans DISRA sont celles présentées au chapitre 1. La formule clef utilisée pour la détermination des fractions de masse est l'équation 1.11. Les calculs sont effectués point par point sur le parcours du faisceau d'ions et des raies X (le pas d'intégration, de l'ordre du μm , est défini par l'utilisateur) afin d'obtenir d'une part la densité de masse locale et l'intensité d'émission X, et d'autre part le coefficient d'atténuation de masse des rayons X dans l'échantillon, dans leur trajet jusqu'au détecteur.

3.2.1 Calcul de la densité de masse

Le pouvoir d'arrêt du matériau traversé est obtenu à l'aide des tables semi-empiriques de Ziegler et al. (1985), en utilisant la règle de Bragg (voir I.1.2) pour tenir compte de la composition du matériau. Plus précisément, la composition est décrite selon deux ensembles de paramètres :

- la « composition globale a priori » représente les éléments non détectés par PIXE, dont la proportion est entrée par l'utilisateur. Leur répartition est supposée uniforme dans tout l'objet analysé, ce qui constitue une approximation raisonnable pour un échantillon biologique.
- la composition complémentaire des éléments mesurés par PIXET, dont la détermination à chaque voxel est affinée au cours des itérations successives.

Le pouvoir d'arrêt est intégré tout le long du trajet du faisceau afin d'obtenir une « projection simulée » (énergie résiduelle après traversée de l'échantillon), qui est ensuite comparée à la

projection mesurée expérimentalement. Les densités de masse en chaque voxel sont alors corrigées pas à pas au fil des itérations.

Les calculs de densité de masse sont utilisés :

- d'une part, pour modéliser la variation d'énergie du faisceau le long du trajet, afin de prendre en compte la variation de section efficace de production X qui en résulte ;
- d'autre part, pour calculer les coefficients d'atténuation massique des raies X entre le point d'émission et le détecteur ;
- Enfin, pour normaliser les nombres d'atomes obtenus par simulation PIXET afin d'obtenir des concentrations élémentaires en terme de fractions de masse.

A chaque itération, les calculs de densité de masse et de composition sont ainsi intimement mêlés : l'information de composition est affinée, et permet en retour d'améliorer également la précision du calcul du pouvoir d'arrêt, et donc de la densité de masse.

3.2.2 Traitement du spectre PIXE expérimental

Les projections PIXET correspondent au nombre d'événement collectés à chaque position du faisceau (rayon de projection) pour une raie - par exemple K_α - caractéristique de l'élément dosé. Les pics sont séparés par un ajustement sous la forme d'une fonction gaussienne, comme l'illustre la figure 3.4 :

$$f(x) = A.e^{-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma^2}} \quad (\text{Eq. 3.4})$$

Où A désigne l'amplitude du pic, x_0 son barycentre et σ est caractéristique de sa largeur. Dans le code DISRA, les limites du pic sont définies directement par l'utilisateur par un seuil inférieur et supérieur. Notons que le bruit n'est pas modélisé dans ce calcul, compte tenu de sa forte variabilité d'un pixel à l'autre et de la faible statistique de comptage.

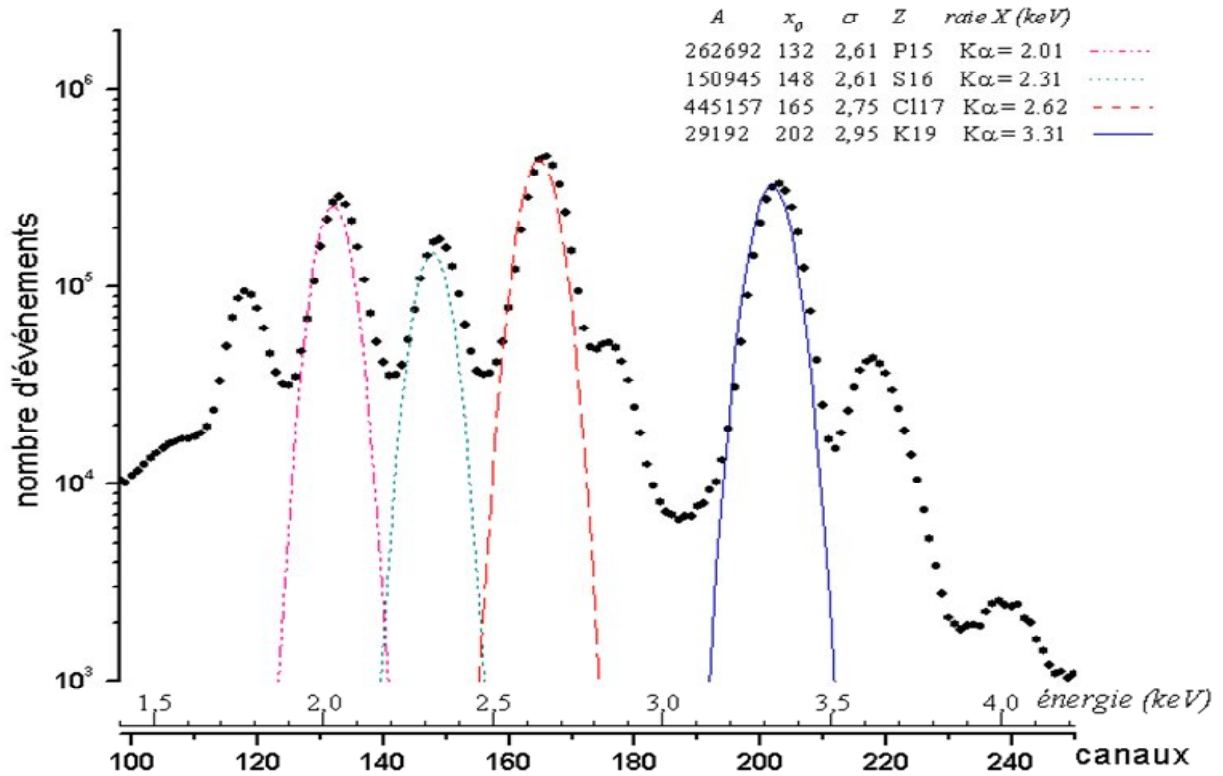


Figure 3.4 : Spectre de tomographie PIXE de cellules humaines isolées. Quatre éléments (P, S, Cl, K) ont ici été dosés à partir des raies K_α correspondantes, à partir d'un fit gaussien des données expérimentales.

3.2.3 Modélisation de la production des raies X

* Raies K

Les données expérimentales de Paul et Sacher (1989) sont employées dans DISRA pour évaluer la section efficace d'ionisation (σ_Z) de la couche de cœur des atomes, conduisant à la production des raies K. Ces données sont basées sur l'analyse de 7800 mesures de section efficace pour les raies K. Les incertitudes estimées pour le calcul de section efficace sont de moins de 4 % dans la gamme de l'énergie de 1 à 5 MeV et pour les éléments au-dessus du silicium dans le tableau périodique.

Bien que les rendements de fluorescence ω_Z de la couche K puissent être calculés théoriquement, la formule semi-empirique de Bambynek (1972) est employée dans DISRA pour déterminer le rendement de fluorescence des raies K par l'intermédiaire des coefficients de Bambynek (B_i) :

$$\left(\frac{\omega_Z}{1 - \omega_Z} \right)^{1/4} = \sum_{i=0}^3 B_i Z^i \quad (\text{Eq. 3.5})$$

La section efficace de production des raies K est ensuite calculée par l'intermédiaire des valeurs ω_Z comme expliqué dans le chapitre 1 (paragraphe 1.2.2) :

$$\sigma_z(E) = b_k \omega_Z \sigma_Z(E) \quad (\text{Eq. 3.6})$$

Les valeurs de rapport d'embranchement b_k sont celles employées dans le code GeoPIXE (Ryan, Cousens *et al.*, 1990). Elles sont basées sur des résultats expérimentaux, mais disponibles seulement pour les éléments avant le calcium ($Z=20$). Pour les autres éléments, les données théoriques de Schofield (1974a,b) sont utilisés.

* Raies L

La section efficace de production des raies L des éléments de l'argent ($Z=47$) à l'uranium ($Z=92$) est interpolée directement à partir des données de Reis et Jesus (1996). Ces données sont basées sur l'analyse statistique de plus 6700 sections efficaces mesurées pour la couche L, qui sont utilisées pour corriger semi-empiriquement les données théoriques déterminées par la théorie ECPSSR. L'incertitude de ces calculs semi-empiriques est d'environ $\pm 10\%$ pour une énergie de protons incidents de 1 à 5 MeV.

3.2.4 Modélisation de l'atténuation des raies X

Les coefficients d'atténuation massique (μ/ρ) exprimés en $\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ sont utilisés afin d'évaluer l'atténuation des raies X depuis le point d'émission jusqu'au détecteur. Ces coefficients sont définis à chaque voxel à partir d'une interpolation des données publiées par Berger et Hubbell (1987). Ces données ont une précision meilleure que de 4 % (Saloman *et al.*, 1988).

Un point fort de DISRA est sa capacité d'effectuer ce calcul d'atténuation en volume dans l'objet, c'est-à-dire que les trajectoires de rayons X sont modélisées dans un angle solide non nul, correspondant à l'angle solide expérimental entré par l'utilisateur. Cette originalité de DISRA est un atout majeur, car l'angle solide en PIXET est habituellement très élevé, afin de réduire la durée d'acquisition et de minimiser les dommages sous faisceau. En pratique, le calcul est effectué de la façon suivante : la surface du détecteur est divisée en plusieurs petites segmentations rectangulaires qui représentent la position du point d'impact du photon X sur le détecteur. Plus cette parcellisation est fine, plus le nombre de trajectoires de rayons X modélisées sera important, et donc plus le calcul d'atténuation sera capable de prendre en compte les variations de densité et de composition dans le cône défini par l'angle solide. En revanche, cela conduit aussi à prolonger la durée des calculs de façon significative. Il est donc important d'utiliser à bon escient cette parcellisation du volume défini par l'angle solide, afin

de l'adapter au caractère homogène ou non de l'objet analysé et également à la précision recherchée. L'image 3.4 illustre cette segmentation de la surface du détecteur PIXE.

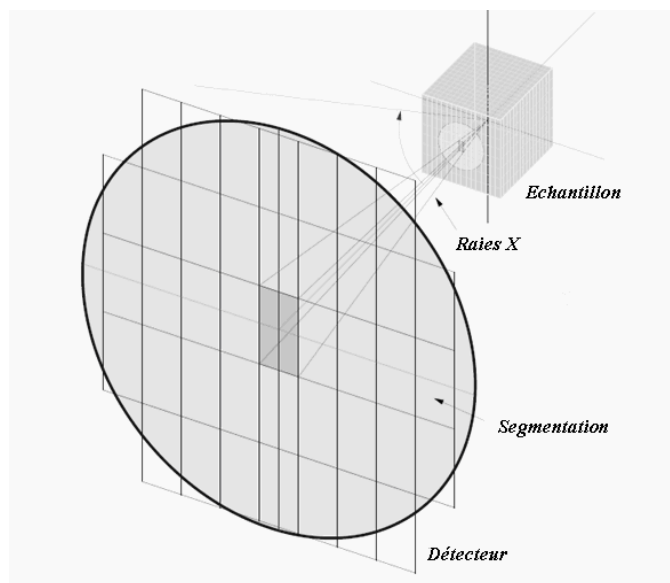


Figure 3.5 : Schéma de la discrétisation la surface du détecteur PIXE en segmentations rectangulaires (Sakellariou, 2002)

En pratique, la correspondance entre le paramètre « facteur de segmentation » entré par l'utilisateur dans DISRA et le nombre de trajectoires de rayons X modélisées est donnée dans le tableau 3.1, en prenant en compte la configuration habituelle dans la chambre d'analyse au CENBG, c'est-à-dire un diamètre de détecteur d'environ 8,74 mm et une distance échantillon-détecteur d'environ 26 mm. L'effet de ce paramètre sur la durée de la reconstruction sera présenté dans la partie 3.6.5.

Facteur de segmentation du détecteur (paramètre entré dans DISRA)	Nombre de trajectoires de rayons X (= nombre de rectangles à la surface du détecteur)
1	609
2	148
3	69
4	37
5	21
10	5

Tableau 3.1 : Nombre des trajectoires des raies X pour le calcul de l'atténuation, dans la configuration normale d'une expérience de tomographie PIXE au CENBG.

3.2.5 Efficacité de détection

Le traitement des données PIXET prend en compte l'efficacité de détection, qui est le produit de l'efficacité géométrique et de l'efficacité intrinsèque. L'efficacité géométrique est une valeur constante quel que soit l'élément considéré. Elle est définie par le rapport $\Omega/4\pi$ où Ω est l'angle solide de détection, et calculée à partir de deux paramètres entrés par l'utilisateur : le diamètre du détecteur et la distance objet-détecteur.

L'efficacité intrinsèque en revanche dépend de l'énergie des X. Elle traduit en particulier l'atténuation des raies X à travers la fenêtre d'entrée du détecteur, constituée dans notre cas par une feuille de béryllium de 8 μm d'épaisseur. Les paramètres entrés dans DISRA ont été obtenus par un calcul réalisé à partir du code GUPIX, très généralement utilisé pour le traitement des spectres PIXE, en prenant en compte les caractéristiques techniques suivantes :

- Epaisseur de la fenêtre de Be : 8 μm
- Epaisseur de la couche de contact Ni : 10^{-6} cm
- Epaisseur du cristal Si : 0,27 cm

Les paramètres entrés dans DISRA correspondent à l'inverse de l'efficacité intrinsèque. (Tableau 3.2).

Elément	L'efficacité intrinsèque (%)	Facteur de multiplication
Al	73,2	1.4
Si	82,3	1.22
P	75,2	1,33
S	81,7	1.22
Cl	86,3	1.16
K	92,01	1.09
Ca	93,7	1.07

Tableau 3.2 : Correction de l'efficacité intrinsèque du détecteur pour le spectre PIXET.

3.2.6 Visualisation et analyse des résultats

Après reconstruction, la densité de masse par voxel (en g.cm^{-3}) et les fractions de masse par voxel (en g.g^{-1}) sont représentées sous forme de matrices 2D (plan de coupe isolé) ou 3D (reconstruction en volume) dont les valeurs sont représentées par un code de couleurs. En termes d'analyse quantitative, on s'intéresse le plus souvent à la détermination de valeurs moyennes de densité et/ou de concentration à l'intérieur d'une région d'intérêt.

Au CENBG, toutes les étapes de visualisation et d'analyse statistique sont réalisées directement à partir des images à l'aide du logiciel Amira[®] 4.1 (Mercury, 2006). Ce logiciel, dédié à l'analyse d'images 3D, permet de segmenter le volume de données en régions d'intérêt pouvant être définies selon différents critères : géométrie définie par l'utilisateur, sélection de régions de densité donnée... Cette étape de segmentation de l'objet est cruciale, d'autant plus que la reconstruction a tendance à générer des artefacts numériques dans certaines régions de l'objet : sur les bords des structures reconstruites notamment. Ainsi les valeurs reconstruites sont toujours à interpréter avec prudence, et seules les valeurs moyennes calculées sur un certain nombre de voxels sont en général fiables. La minimisation de ces artefacts exige un contrôle rigoureux de chaque étape de la reconstruction.

3.3 Détermination du centre de rotation

Une étape clef influant sur la qualité de l'image reconstruite est la détermination de la position de l'axe de rotation. La résolution spatiale requise étant de l'ordre du μm , il serait quasiment impossible de mesurer cette position au cours de l'expérience. Le calcul précis de la position du centre de rotation est en réalité effectué plan par plan à partir des projections mesurées. Le mode de calcul est cependant différent pour les données STIMT et PIXET.

3.3.1 Calcul du centre de rotation pour STIMT

La méthode de calcul du centre de rotation pour chaque plan à reconstruire reposait, dans le code DISRA originel, sur un réarrangement des données mesurées par rapport à la position du centre de masse. Cette méthode s'étant avérée peu robuste en présence de données bruitées, nous avons introduit dans le code un algorithme différent, initialement proposée par Azevedo et al. (1990). Son principe est basé sur la constatation suivante : quel que soit le plan de coupe considéré, tous les points décrivent par définition une trajectoire circulaire autour du centre de rotation. Par conséquent, la trajectoire de tous les points de l'objet projetée sur le sinogramme décrit une sinusoïde. L'axe de symétrie de la sinusoïde est un axe vertical sur le sinogramme, qui, on le rappelle, représente les projections selon les valeurs des coordonnées (s, θ) . Cet axe d'équation $s = \text{constante} = s_r$ représente la position du centre de rotation s_r , qui est le seul point immobile pendant la rotation (fig. 3.6).

L'algorithme proposé par Azevedo et al. consiste à prendre un point de référence particulier, qui est le centre de masse du plan de coupe considéré. Ce point, comme tous les autres, décrit une trajectoire sinusoïdale dans le sinogramme STIMT. Si l'on appelle s_c la position du centre

de masse dans le sinogramme, elle s'écrit donc, par rapport à s_r , position (fixe) du centre de rotation :

$$\bar{s}_c(\theta) = x_c \cos \theta + y_c \sin \theta + s_r$$

Dans cette équation, $\bar{s}_c(\theta)$ représente la position « théorique » du centre de masse dans le sinogramme. Les projections expérimentales étant souvent bruitées, la position calculée s_c diffère légèrement, de façon aléatoire, de cette valeur théorique. Un ajustement de type « moindres carrés » des points expérimentaux $s_c(\theta)$ selon cette fonction sinusoïdale permet d'obtenir les trois paramètres (s_r , x_c , y_c).

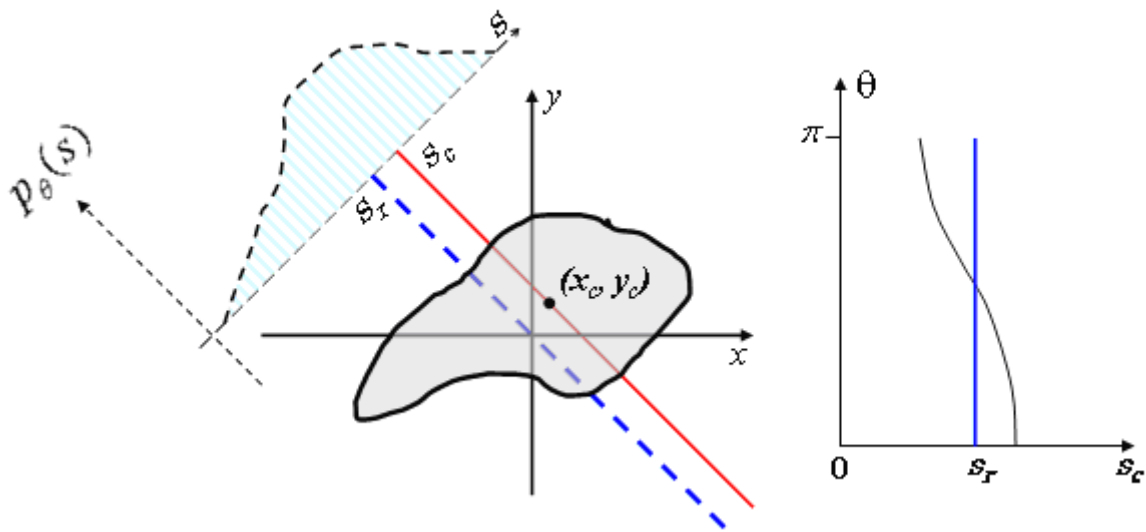


Figure 3.6 : Le centre de masse (x_c, y_c) du plan de coupe considéré est projeté dans le sinogramme (s, θ) représenté à droite. Le mouvement sinusoïdal du centre de masse autour du centre de rotation (axe de symétrie vertical dans le sinogramme) est décrit comme une fonction sinusoïdale de θ .

La détermination du centre de rotation est une donnée cruciale pour la reconstruction tomographique du plan de coupe considéré. Un décalage d'un demi-pixel seulement par rapport à la position réelle génère des artefacts visibles sur la reconstruction. La figure 3.7 illustre l'effet d'un décalage (volontairement exagéré ici) de la position du centre de rotation sur l'image obtenue. Des artefacts en forme caractéristique de « diapason » apparaissent et peuvent modifier de façon importante l'aspect de l'objet reconstruit par rapport à la réalité. L'algorithme décrit ci-dessus s'avère particulièrement robuste pour le calcul de la position du centre de rotation et a, de ce fait, été inséré dans DISRA.

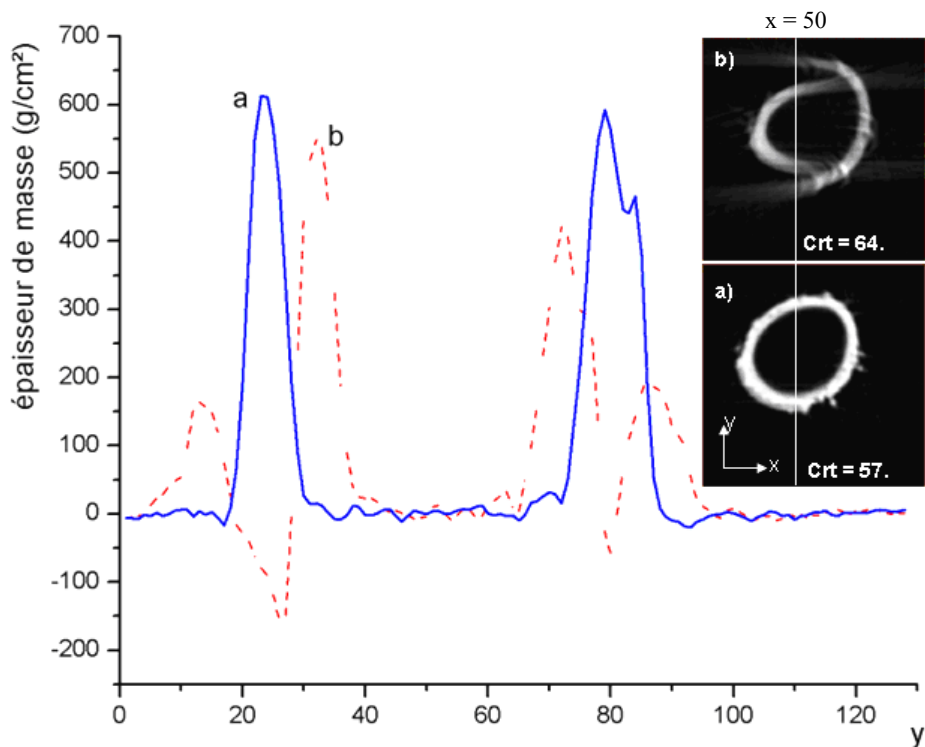


Figure 3.7 : Effet d'un décalage de la position du centre de rotation étudié sur un objet expérimental simple : il s'agit ici un plan de coupe (128×128 voxels) de forme globalement annulaire d'un organisme marin microscopique (foraminifère), dont l'aspect réel est montré sur l'image (a). La position réelle du centre de rotation se situe à l'abscisse $s_c = 57$. L'effet d'un décalage du centre de rotation, fixé arbitrairement à la valeur erronée $s_c = 64$ est visible sur l'image (b). Le profil de la densité le long d'une ligne verticale ($x = 50$) dans chacune des deux images fait apparaître de façon quantitative les variations de densité (à gauche). Une erreur de calcul dans la position du centre de rotation déforme l'aspect de l'objet analysé et amplifie le bruit dans l'image.

3.3.2 Choix du centre de rotation pour PIXET

L'algorithme proposé par Azevedo et al. décrit ci-dessus est basé sur la position du centre de masse, utilisé comme point de référence. Cette donnée est extraite du sinogramme STIMT. Or l'expérience PIXET est le plus souvent réalisée après l'expérience STIMT et non pas en même temps, car elle requiert une intensité de faisceau plus importante. Le réglage du faisceau induit le plus souvent un léger décalage de la position du faisceau sur l'objet, autrement dit, l'axe de rotation est légèrement différent entre les deux expériences PIXET et STIMT. La détermination du centre de rotation dans l'expérience PIXET s'avère plus délicate. En effet, la méthode du centre de masse utilisée pour STIMT ne peut pas être appliquée. Il apparaît très difficile de trouver un algorithme général pour résoudre ce problème, car on ne peut pas trouver de point de référence « général » qui soit le même quel que soit l'objet considéré. La méthode finalement retenue dans ce cas est de procéder en deux

étapes : tout d'abord, on reconstruit l'image PIXET en utilisant la même position de centre de masse qu'en STIMT. Les centres de masse étant généralement décalés de quelques pixels, il apparaît alors des artefacts caractéristiques « en diapason » dans l'image PIXET. On procède ensuite par dichotomie pour trouver une valeur de centre de rotation qui minimise ces artefacts. Malgré son caractère un peu rudimentaire, cette méthode permet d'ajuster assez précisément la position du centre de rotation, typiquement à $\pm 0,5$ pixel près.

3.4 Procédures de correction des données expérimentales

La présence de bruit dans les données est nuisible à deux points de vue : elle introduit des artefacts dans la reconstruction et ralentit la convergence de l'algorithme. Nous avons introduit dans le code DISRA des procédures de correction afin de minimiser d'une part le bruit dans les projections expérimentales et, d'autre part, les artefacts numériques dans les reconstructions de référence. Cette étape est particulièrement importante car les reconstructions de référence sont utilisées comme point de départ des simulations et comme référence pour la correction des tomogrammes.

3.4.1 Correction des sinogrammes

Le processus de ralentissement des ions incidents dans l'échantillon analysé est un phénomène statistique. Généralement, la mesure d'un certain nombre d'événements dont on prend la valeur moyenne ou médiane permet d'obtenir une valeur expérimentale très proche de la valeur la plus probable de la distribution. De même, l'émission de photons X est un phénomène de nature aléatoire, et l'incertitude expérimentale sur le nombre d'événements collectés peut parfois être élevée. En plus de ces phénomènes statistiques, certains éléments peuvent introduire du bruit dans les données : diffusions sur les collimateurs en fin de ligne en STIMT, empilements, bruit électronique, rayonnement de freinage des électrons secondaires en PIXET. En outre, il existe des limitations d'ordre mécanique, comme la précision de l'axe de rotation et la stabilité de l'objet analysé sous faisceau. Ces différentes limitations peuvent conduire à l'apparition de valeurs aberrantes dans le sinogramme. Ce bruit expérimental génère des artefacts dans les images reconstruites. Il est donc important de le minimiser et de le corriger autant que faire se peut.

En pratique, l'observation des sinogrammes est une bonne façon de repérer les pixels aberrants dans les projections mesurées. Nous avons introduit dans DISRA des procédures de correction très fine des sinogrammes STIMT : trois processus de correction peuvent être effectués en comparant les pixels adjacents :

- sur chaque ligne horizontale du sinogramme ;
- sur chaque ligne verticale ;
- sur les plans de coupe adjacents.

La comparaison est effectuée si le nombre d'événements est inférieur à un seuil minimal défini par l'utilisateur. Dans le cas où le nombre d'événements dépasse ce seuil, le pixel est alors considéré comme « fiable ». La comparaison est la suivante : Si la valeur au pixel considéré diffère de ses voisins immédiats au-delà d'un seuil imposé par l'utilisateur, la valeur de ce pixel sera remplacée par la moyenne des deux pixels voisins. Cette procédure permet de réduire très efficacement l'aspect « moucheté » des sinogrammes bruités en STIMT, sans altérer notablement la résolution spatiale de l'image, comme l'illustre la figure 3.7.

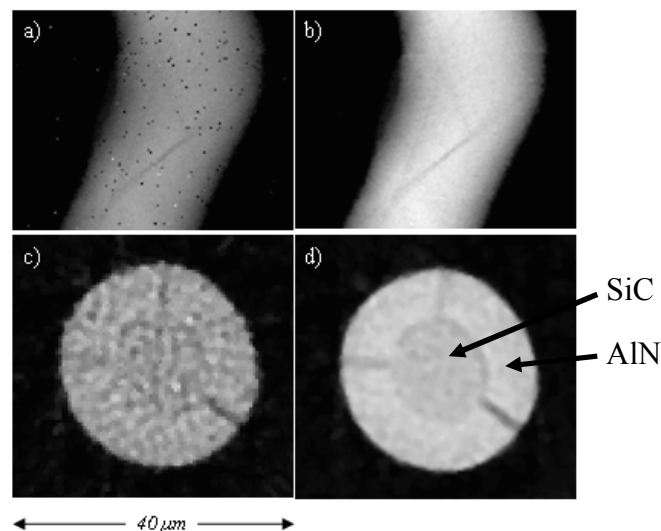


Figure 3.8 : Reconstruction d'un plan de coupe d'un objet de forme simple (cylindrique), une microfibre de SiC recouverte d'un dépôt d'AlN en couche mince, visible sur l'image (d). Le sinogramme STIMT originel (a), particulièrement bruité à cause de la faible statistique sur cet exemple (environ 5 événements par pixel en moyenne) a été corrigé selon la procédure décrite dans le texte (b). Les artefacts dans l'image reconstruite sont ainsi notablement minimisés (d) par rapport à l'image obtenue sans correction préalable des données (c).

Cette procédure de correction s'avère en revanche peu adaptée aux sinogrammes PIXET, qui présentent généralement un aspect beaucoup plus discontinu. La correction des données PIXET est alors effectuée selon des procédures originellement présentes dans DISRA, permettant d'éliminer les pixels présentant des valeurs anormales par comparaison avec les pixels voisins (pas uniquement immédiats).

3.4.2 Correction de la reconstruction à l'ordre zéro

En plus d'une correction des données expérimentales « à la source » dans les sinogrammes, nous avons introduit dans DISRA une correction de l'image de référence R_e (voir partie 3.1) dans la procédure de reconstruction tomographique. En effet, cette image de référence est obtenue directement par rétroprojection filtrée du sinogramme expérimental, ce qui introduit inévitablement des artefacts numériques dans l'image, même si le sinogramme est correct. Cette image de référence est une donnée cruciale de l'algorithme DISRA, puisqu'elle est utilisée pour calculer les facteurs de correction appliqués sur les tomogrammes simulés. Les artefacts présents dans cette image affectent donc directement les résultats obtenus, et également les propriétés de convergence.

Une procédure de correction automatique par seuillage de l'image de référence STIMT existait déjà dans le code originel. Un « seuil minimal de détection » est calculé à chaque voxel, qui dépend de la contribution des valeurs des voxels voisins, l'éloignement maximal r_D de ces voisins étant défini par l'utilisateur. Ce seuil non seulement interdit les valeurs de densité négatives dans l'image, mais met de plus en évidence les fluctuations statistiques caractéristiques du bruit à l'extérieur de l'échantillon. En effet, dans la région des artefacts, les valeurs oscillent et peuvent devenir soit anormalement hautes, soit au contraire négatives. En conséquence, le seuil de détection minimal est une valeur comprise dans cet intervalle de fluctuation locale généré par ces oscillations. Sa valeur est donnée par un lissage sur les voxels voisins. Seuls les voxels de valeur négative sont utilisés pour évaluer ce seuil, afin de ne pas mettre à zéro des voxels contenant de l'information pertinente, relative à l'objet analysé.

Cette correction par seuillage permet ainsi de mettre à zéro de façon très efficace les voxels vides à l'extérieur de l'échantillon. Elle pose cependant problème pour des échantillons biologiques, car les valeurs de densité dans l'objet sont souvent très proches du minimum ainsi calculé, notamment en bordure d'échantillon. Cela conduit, si le seuil déterminé est trop élevé, à mettre à zéro de façon erronée des voxels qui sont en réalité représentatifs de la densité de l'objet. Une méthode de seuillage s'avère donc dans ce cas mal adaptée au problème. Pour le résoudre, nous avons conçu une procédure dans le logiciel Amira permettant de mettre à zéro les voxels artefactuels sélectionnés « manuellement » par l'utilisateur directement sur l'image de référence, et de modifier le fichier de données correspondant. L'effet de cette procédure de correction est illustré sur la figure 3.9.

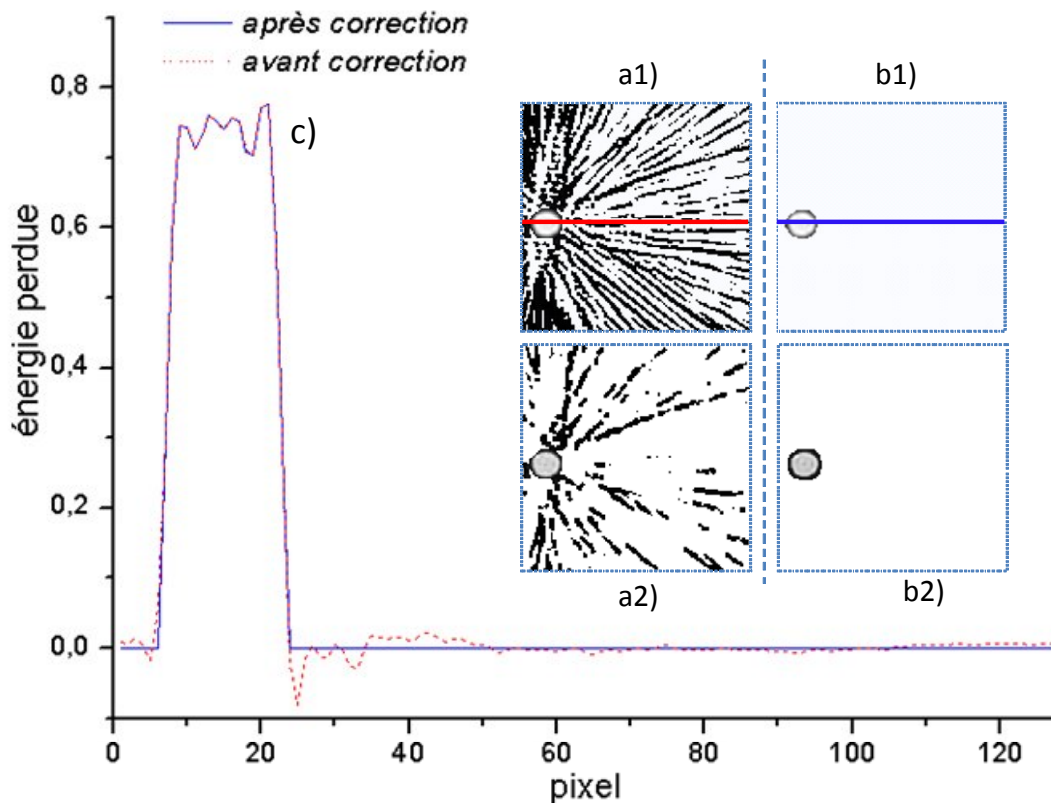


Figure 3.9 : Etude STIMT d'un plan de coupe (128×128 voxels) d'un objet de structure simple (cylindrique) qui est ici une microfibre de SiC d'une quinzaine de μm de diamètre. L'image obtenue directement par rétroprojection filtrée des projections expérimentales présente des artefacts numériques hors de la zone de l'échantillon (a1). La sélection des voxels à l'extérieur de l'échantillon dans Amira permet de les mettre directement à zéro (b1), éliminant ainsi les fluctuations apparaissant à l'extérieur de l'objet. Cette procédure permet d'améliorer les tomogrammes obtenus, sans correction (a2) et avec (b2). La comparaison des profils en densité (c), réalisés ici sur la ligne horizontale tracée sur les images ($y = 64$) montre la réduction des fluctuations dans les images de référence.

Notons que cette méthode de correction est appliquée une seule fois, sur l'image référence STIMT. Les cartographies PIXET seront ensuite modifiées de façon automatique, puisque DISRA met systématiquement à zéro les fractions de masse des voxels identifiés comme « vides », c'est-à-dire pour lesquels la densité de masse est nulle. L'élimination de ces artefacts améliore de plus la convergence de la reconstruction DISRA, comme le montre l'exemple suivant (Fig. 3.10).

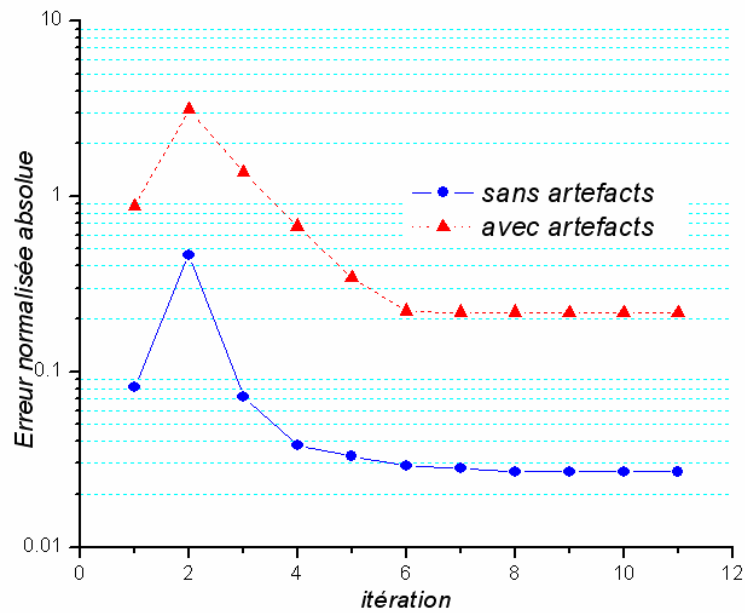


Figure 3.10 : Amélioration de la convergence de la reconstruction de l'objet défini à la figure 3.9 dans le cas où l'image de référence a été corrigée (ronds) par rapport à l'image originelle (triangles).

3.5 Tomographie PIXE de plans de coupe isolés

3.5.1 Problématique de la reconstruction

Le code DISRA a été conçu pour le cas idéal de données STIMT et PIXET collectées tri-dimensionnellement au cours d'une même expérience sur un même volume d'échantillon. De telles conditions seraient rédhibitoires pour des échantillons biologiques, pour deux raisons :

- Les sections efficaces d'émission X et/ou les concentrations des éléments dosés sont généralement faibles, en conséquence la durée de collection des événements PIXET est très supérieure à STIMT. Typiquement, une acquisition STIMT 3D dure environ 2 h (avec une intensité de faisceau < 1 fA) alors qu'il faut environ 1 h pour un seul plan de coupe PIXET (avec une intensité de l'ordre de 100 pA).
- Les dommages sous faisceau peuvent être importants aux intensités employées en PIXET, alors qu'ils sont négligeables en STIMT. Ceci limite fortement la possibilité de réaliser une étude 3D en PIXET (du moins dans la configuration expérimentale habituelle, c'est-à-dire avec un seul détecteur X).

Le cas des échantillons biologiques est en revanche favorable sous d'autres aspects :

- L'échantillon est constitué essentiellement d'éléments légers, et de ce fait une imprécision sur les fractions de masse entrées par l'utilisateur affecte peu le calcul du

pouvoir d'arrêt. La détermination de la densité de masse locale en 3D reste donc relativement précise même si on ne dispose pas d'une information 3D en PIXET.

- La composition de l'échantillon en éléments majeurs est relativement homogène dans le volume analysé. On peut ainsi estimer l'atténuation des rayons X dans le volume de détection en prenant en compte uniquement les variations 3D de densité déterminées par STIMT, et en considérant simplement une composition globale uniforme dans le volume analysé. (On considère ce faisant que les éléments mineurs affectent peu l'atténuation des raies X)

3.5.2 Méthode de résolution

Ces spécificités des échantillons biologiques nous ont conduit à proposer un schéma d'étude par tomographie adapté à ce type d'objet :

- L'étude commence par une expérience STIMT 3D qui révèle la distribution en densité de masse de l'objet et par la même sa structure interne.
- On sonde ensuite l'échantillon par plans de coupe PIXET isolés, choisis dans des régions d'intérêt du volume préalablement caractérisé par STIMT. Ceci permet de collecter des informations pertinentes sur les distributions élémentaires dans les régions souhaitées, tout en minimisant la durée d'acquisition et par la même les dommages sous faisceau.

Du point de vue algorithmique, la reconstruction est alors effectuée de façon différenciée selon que l'on ait ou pas l'information PIXET associée à STIMT.

- Dans les plans de coupe où l'information complète STIMT/PIXET est disponible, la reconstruction dans ce plan est effectuée selon la procédure habituelle de DISRA.
- Partout ailleurs dans le volume considéré, seule la reconstruction STIMT est effectuée, en considérant une composition globale entrée a priori par l'utilisateur.

Le calcul de l'atténuation des raies X sur le trajet entre le point d'émission (dans le plan analysé) et le détecteur (la trajectoire étant généralement hors de ce plan) s'effectue dans une géométrie 3D. On considère alors, pour effectuer ce calcul dans tous les voxels hors du plan considéré, les variations de densité données par l'image STIMT 3D et la composition globale entrée a priori.

Ces compromis nous permettent ainsi de réaliser une reconstruction STIMT/PIXET afin de caractériser un objet biologique en 3D d'une façon expérimentalement réaliste.

3.6 Calculs d'atténuation à partir un objet fantôme

3.6.1 Principe des simulations effectuées

Le calcul de l'atténuation des rayons X repose, dans le code DISRA originel, sur la connaissance des densités et des compositions élémentaires en 3D dans le volume complet analysé. Comme nous l'avons vu, nous avons adapté ce calcul au cas d'échantillons biologiques, pour lesquels seuls quelques plans de coupe isolés sont analysés en PIXET, et l'information en densité STIMT 3D est disponible. Nous avons souhaité tester la pertinence de cette approximation de façon quantitative, en étudiant un objet fantôme modélisant un échantillon biologique. Les conditions expérimentales typiques du CENBG seront utilisées, pour modéliser l'analyse d'un plan de coupe isolé en PIXET. Trois conditions de reconstruction vont être comparées :

- Une reconstruction a minima, sans aucun calcul d'atténuation, que nous noterons « STIMT 2D / PIXET 2D ». Aucune information en volume n'est alors utilisée en dehors du plan considéré.
- La reconstruction d'un plan de coupe PIXET isolé (plan central, n° 32 ici), en utilisant l'approximation retenue au CENBG pour des échantillons de composition relativement homogène, de type biologique : c'est-à-dire prenant en compte l'information de densité donnée par la STIMT 3D et considérant, en-dehors du plan analysé, une composition globale uniforme définie par l'utilisateur. Ce cas sera noté « STIMT 3D / PIXET 2D ».
- Une troisième étude permettra de comparer les calculs précédents au cas « idéal » originellement prévu dans DISRA, où les données STIMT et PIXET sont mesurées en 3D dans l'ensemble du volume analysé, permettant ainsi de faire une reconstruction complète des 64 plans de coupe, et donnant donc un résultat qui est le plus précis possible. C'est ce que nous noterons « STIM 3D / PIXET 3D ».

3.6.2 Morphologie du fantôme

Un fantôme a été défini grâce à une procédure de simulation proposée dans l'un des sous programmes de DISRA (figure 3.11, tableau 3.2). Il est de forme simple cylindrique, de 60 μm de diamètre, de densité et de composition homogènes, représentant les conditions typiques d'un échantillon biologique. A l'intérieur de ce cylindre, on a placé deux petites sphères de 10 μm de diamètre, de densité légèrement différente afin de pouvoir les distinguer du reste de

l'objet, et de composition identique au cylindre, sauf pour ce qui concerne les éléments mineurs. Ces sphères sont diamétralement opposées, et sont placées respectivement au plus proche et au plus loin du détecteur au cours de la rotation simulée. La sphère 1 sera donc ici beaucoup plus atténuée que la sphère 2.

La densité et la composition choisies pour ce fantôme sont celles d'un échantillon cellulaire déshydraté typique. Nous avons pour cela considéré une perte de masse d'environ 70 % par déshydratation, ce qui conduit à une masse volumique moyenne de $0,3 \text{ g.cm}^{-3}$ environ. La composition définie ici reprend les valeurs typiques obtenues par analyses PIXE et RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry) « classiques » (2D) réalisées au CENBG sur des cellules issues de cultures (tableau 3.2).

Du point de vue algorithmique, les fractions de masse des éléments non dosés par PIXET, ici les éléments H, C, N, O, ont été entrées dans la composition globale a priori. Les fractions de masse des éléments mesurés sur le spectre PIXET, c'est-à-dire ici les éléments mineurs P, S, Cl, K, sont définies séparément car elles seront calculées au fil des itérations dans le plan de coupe considéré, alors que la proportion des éléments majeurs de l'échantillon, non dosés par PIXET ici, demeurera inchangée.

La reconstruction STIMT 3D est réalisée sur 64 plans de coupe transverses, le plan « analysé » en PIXET étant au centre de l'objet (n°32).

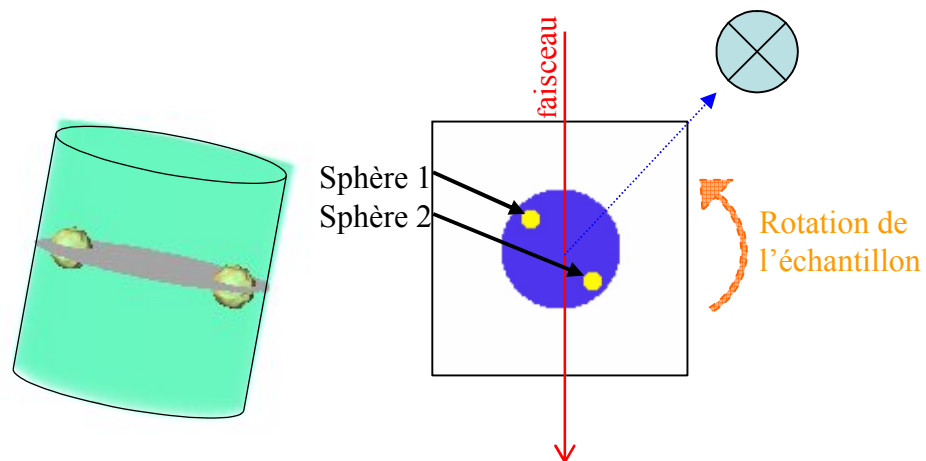


Figure 3.11 : Morphologie du fantôme utilisé (à gauche) : un cylindre de diamètre $60 \mu\text{m}$, de densité et de composition uniformes, incluant deux sphères de diamètre $10 \mu\text{m}$ soumises à des conditions opposées en terme d'atténuation des raies X émises. Le plan de coupe étudié en PIXET est représenté à droite. Le détecteur est ici placé à 45° par rapport au faisceau incident, conformément à la configuration expérimentale typique au CENBG.

Constitution du fantôme	Densité (g.cm⁻³)	Composition en fractions de masse (mg.g⁻¹)
Cylindre	0,3	Composition globale a priori : H : 99 ; C : 712,5 ; N : 98 ; O : 63
Sphères	0,5	Composition globale a priori H, C, N, O dans les mêmes proportions que pour le cylindre, à laquelle s'ajoutent les éléments dosé par PIXET : P : 1,6 ; S : 0,8 ; Cl : 0,1 ; K : 25

Tableau 3.2 : Définition de la densité et de la composition de l'objet fantôme.

3.6.3 Paramètres de simulation

La technique de rétroprojection filtrée, utilisée dans DISRA, exige de collecter un nombre assez important de projections autour de l'échantillon. Lorsque l'échantillon est relativement symétrique et/ou de taille suffisamment petite pour que l'atténuation des rayons X reste faible, il n'est pas nécessaire de réaliser un tour complet de l'échantillon, mais il peut être sondé uniquement sur 180°, par symétrie. Le nombre de projections optimal pour un balayage du faisceau sur 128 pixels et sur un intervalle angulaire de 180°, est donné par la relation $n_p \sim \frac{\pi}{2} \times 128$ soit environ 200 projections. Afin de conserver une durée d'acquisition « raisonnable » ce nombre de projections est souvent inférieur en pratique, tout en permettant de préserver une image reconstruite de bonne qualité. Au CENBG, les conditions d'analyse typiquement retenues sont 100 projections autour d'un angle de 180°.

Pour cette simulation, des paramètres typiques des conditions expérimentales au CENBG ont été utilisés :

- Energie du faisceau de protons : 3,0 MeV
- Energie minimum de raie X considérée : 1,0 keV
- Energie maximum de raie X considérée : 30,0 keV
- Diamètre du détecteur PIXE : 8,74 mm
- Distance entre détecteur et l'échantillon : 20,0 mm

- Angle de vue du détecteur à l'échantillon : -45° (le signe étant défini par rapport au sens de rotation).

La charge déposée par pixel a été supposée de 56 pC. Cette valeur correspond aux conditions typiques : une heure de balayage sur un plan de coupe défini par 128 pixels \times 100 projections, en utilisant un faisceau de protons de 200 pA.

3.6.4 Résultats et discussion

Les images reconstruites de la densité et des fractions de masse élémentaires dans le plan de coupe considéré sont données sur la figure 3.12. Le tableau 3.3 présente les valeurs moyennes calculées sur tous les voxels dans le plan de coupe à l'intérieur des sphères.

Le cas « STIM 2D / PIXE 2D », où aucun calcul d'atténuation n'est effectué, permet de constater l'effet de l'atténuation sur les différents éléments. L'atténuation est particulièrement visible sur les cartographies pour P, S et Cl, ce que confirment les résultats obtenus dans le tableau 3.3, et ce d'autant plus pour la sphère 2 comparée à la sphère 1. Même pour une épaisseur aussi faible que 60 μm , on constate que les raies X émises dans les régions les plus éloignées du détecteur sont fortement atténuées. Les résultats d'une deuxième simulation sont également présentés dans le tableau 3.3, avec un diamètre de cylindre de 100 μm , conduisant à une atténuation encore plus forte. La simulation d'atténuation réalisée avec le code DISRA modifié au CENBG « STIMT 3D / PIXET 2D » corrige efficacement ces valeurs, ce qui permet de valider le calcul effectué. Les concentrations obtenues sont quasiment identiques aux valeurs de référence définies dans le fantôme. Notons ici que la composition du cylindre est parfaitement uniforme, ce qui est particulièrement favorable pour ce calcul.

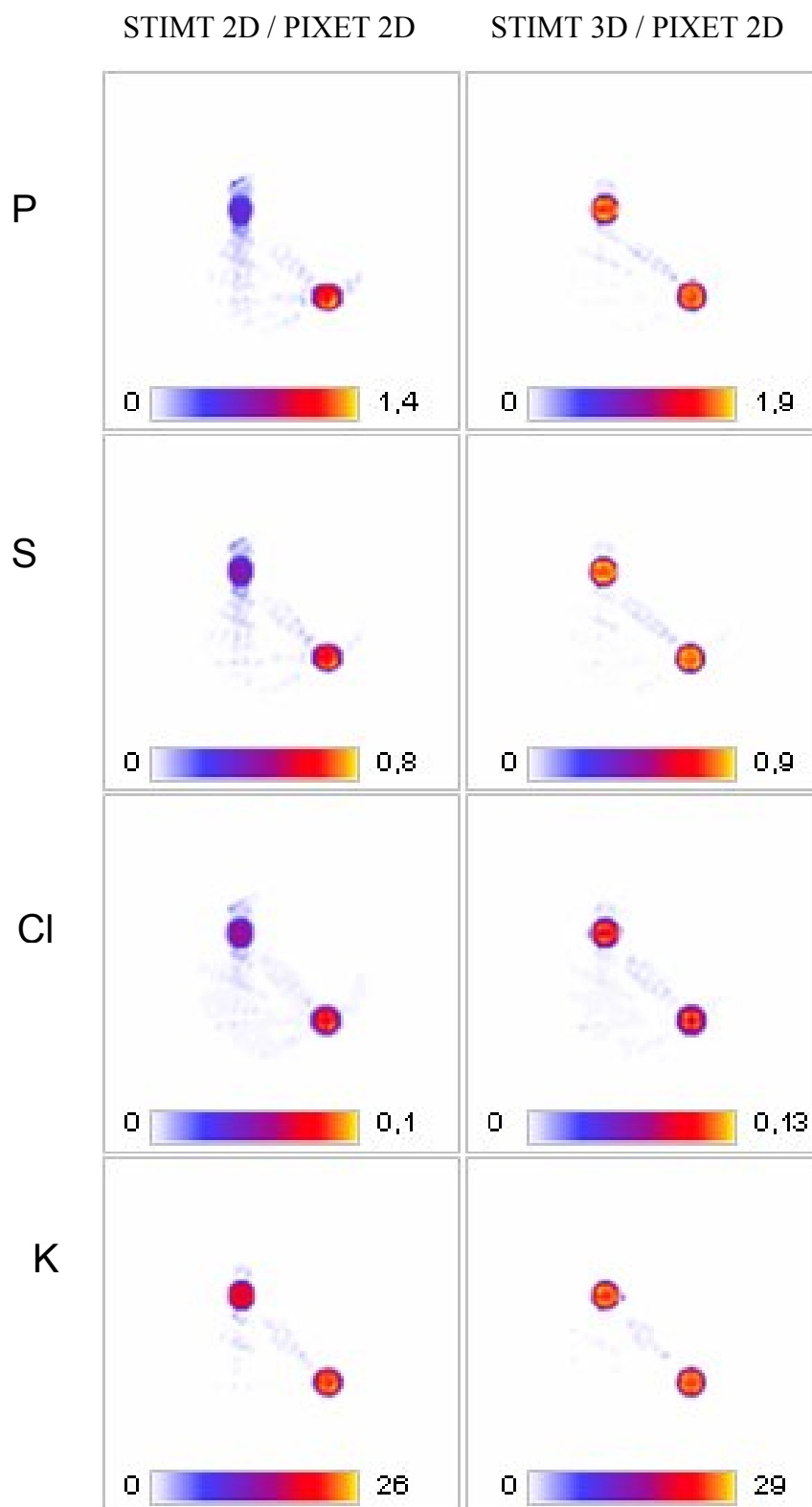


Figure 3.12 : Distributions des fractions de masse de P, S, Cl et K dans le tomogramme reconstruit pour un diamètre d'objet fantôme de 60 μm , obtenues par le code DISRA respectivement sans calcul d'atténuation (1^{ère} colonne) et en considérant un plan de coupe PIXET uniquement dans le volume STIMT (2^e colonne). Les fractions de masse sont codées sur une échelle allant de la valeur minimale (0) à valeur maximale (en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) pour chaque élément.

	Valeur définie	Sans correction d'atténuation		STIMT 3D / PIXET 2D	
		100 μm	60 μm	100 μm	60 μm
Densité	<i>Sphère 1</i> → 0,5 g.cm⁻³	0,491 ± 0,050	0,497 ± 0,032	0,495 ± 0,043	0,496 ± 0,042
	<i>Sphère 2</i> →	0,498 ± 0,023	0,495 ± 0,019	0,498 ± 0,022	0,499 ± 0,029
Phosphore (K $_{\alpha}$ = 2,01 keV)	1,6 mg.g⁻¹	0,22 ± 0,08	0,48 ± 0,08	1,57 ± 0,26	1,59 ± 0,18
		0,91 ± 0,15	1,07 ± 0,16	1,58 ± 0,20	1,60 ± 0,17
Soufre (K $_{\alpha}$ = 2.309 keV)	0,8 mg.g⁻¹	0,21 ± 0,05	0,36 ± 0,01	0,79 ± 0,09	0,78 ± 0,01
		0,54 ± 0,086	0,61 ± 0,01	0,78 ± 0,09	0,79 ± 0,02
Chlore (K $_{\alpha}$ = 2.62 keV)	0,1 mg.g⁻¹	0,038 ± 0,021	0,054 ± 0,008	0,097 ± 0,01	0,097 ± 0,03
		0,074 ± 0,012	0,08 ± 0,015	0,096 ± 0,015	0,098 ± 0,019
Potassium (K $_{\alpha}$ = 3,313 keV)	25 mg.g⁻¹	15,24 ± 1,94	18,83 ± 1,41	24,41 ± 2,36	24,24 ± 2,72
		21,22 ± 2,51	22,03 ± 2,36	23,95 ± 3,01	24,61 ± 2,27

Tableau 3.3 : Valeurs moyennes de densité et de fractions de masse extraites de la reconstruction de l'objet fantôme pour deux épaisseurs de cylindre, 60 μm et 100 μm . Les valeurs sont obtenues sans correction d'atténuation ou bien avec une correction prenant en compte la composition globale de l'échantillon hors du plan de coupe (STIMT 3D / PIXET 2D).

Pour terminer, notons que les calculs de densité restent fiables quelle que soit la méthode utilisée pour la reconstruction STIMT, tant sur l'aspect des images obtenues qu'au niveau quantitatif (fig. 3.13, tableau 3.3). Ceci s'explique d'une part par la relative homogénéité de l'objet, et, d'autre part, par le fait qu'il est composé en totalité d'éléments légers. Il s'agit là du cas le plus favorable pour minimiser l'incertitude sur le calcul du pouvoir d'arrêt.

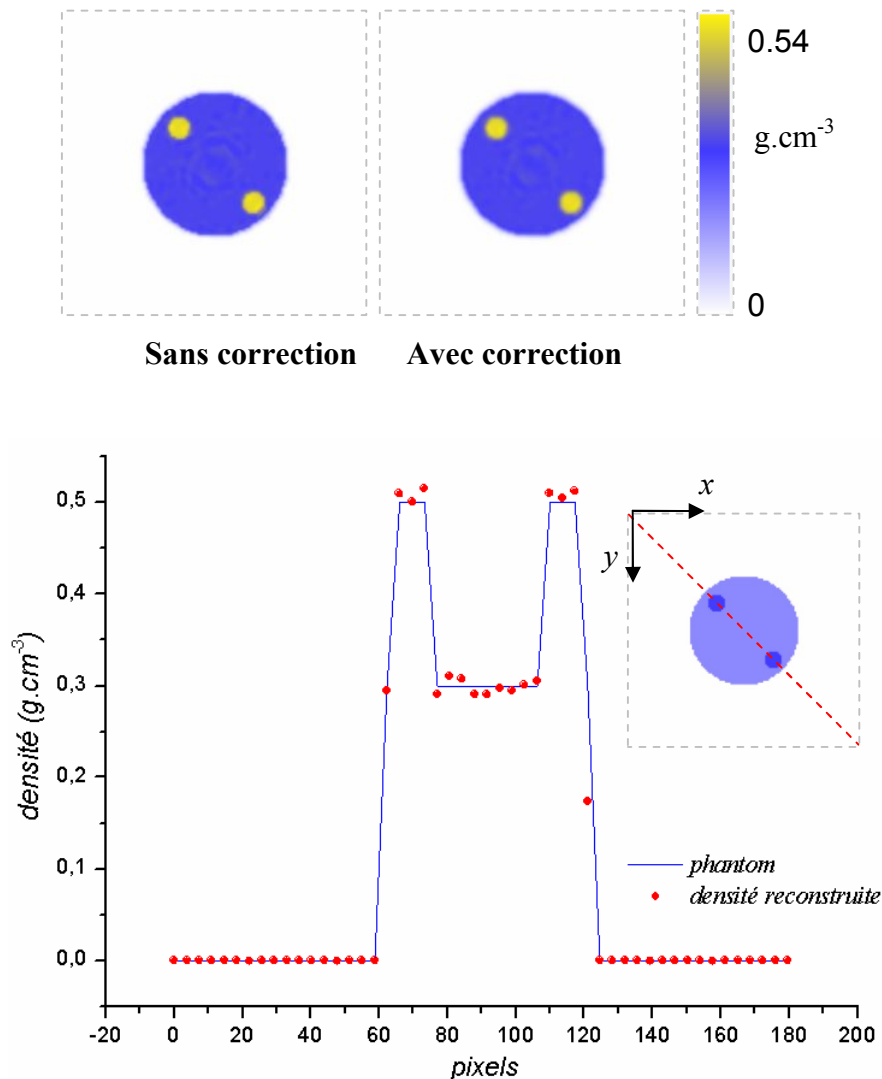


Figure 3.13 : En haut : reconstruction de la densité dans le plan de coupe considéré, montrant un résultat quasi identique avec ou sans prise en compte de l'atténuation dans la simulation. En bas : Profil de la densité le long du diamètre $y = x$ du plan de coupe reconstruit. La reconstruction (points) reproduit correctement la distribution attendue (trait continu).

Ces résultats confirment la validité du calcul d'atténuation effectué. Pour un échantillon de taille plus importante, ce calcul atteindrait toutefois ses limites lorsque l'absorption des raies

X serait quasi-totale. Il serait alors possible de remédier à ce problème et d'augmenter le diamètre des objets étudiés en réalisant une rotation de l'échantillon sur 360° au lieu de 180°. La figure 3.14 montre l'évolution de l'absorption pour P, S, Cl et K en fonction de l'épaisseur traversée, pour un échantillon biologique homogène avec la densité et composition cellulaire typiques définies précédemment. Les épaisseurs maximales obtenues (de l'ordre de 350 μm) sont ici supérieures à la taille des échantillons biologiques que nous souhaitons étudier.

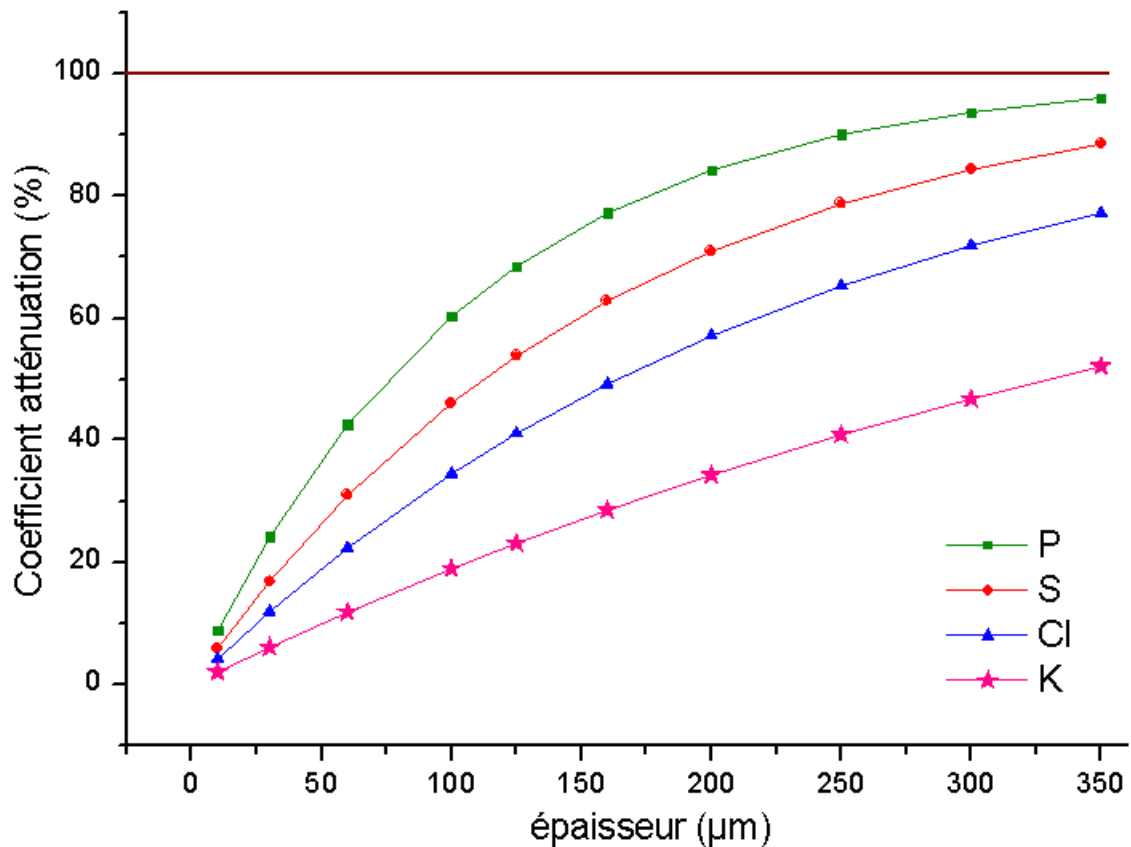


Figure 3.14 : Coefficients d'atténuation (en %) en fonction de l'épaisseur traversée pour les 4 éléments P, S, Cl, K entrant dans la composition des échantillons de cellules étudiés.

3.6.5 Convergence et durée de la reconstruction

La convergence du code DISRA pour la reconstruction d'un objet fantôme est facilitée par le fait que les projections ne sont pas bruitées dans ce cas, contrairement à des données expérimentales réelles. Toutefois, même dans un cas aussi favorable, l'exactitude de la reconstruction n'est jamais parfaite, en effet elle est tributaire des paramètres utilisés. En l'occurrence ici interviennent notamment :

- La discrétisation du volume défini par l'angle solide de détection, c'est-à-dire le nombre de trajectoires de photons X modélisées entre le point d'émission et le détecteur (nous avons choisi 145 trajectoires pour la reconstruction du fantôme présentée ici).
- Le pas d'intégration de la perte d'énergie du faisceau incident, qui conditionne non seulement la qualité des résultats STIMT, mais aussi la fiabilité du calcul de la section efficace d'ionisation pour l'émission X. Le pas choisi est ici de 2 μm .
- Le pas d'intégration de l'atténuation des photons X sur leur trajet vers le détecteur. Ce pas a été fixé à 2 μm ici.

La figure 3.15 permet de visualiser la convergence du code dans ces conditions, en montrant l'évolution de l'erreur normalisée absolue, au fil des itérations, pour les fractions de masse élémentaires calculées. Nous considérons ici l'erreur commise dans le cas de l'approximation effectuée, dans laquelle un seul plan de coupe PIXET est reconstruit, en utilisant l'information STIMT 3D. L'écart entre les valeurs reconstruites et les valeurs attendues est alors d'environ 4 % après 7 itérations.

Les reconstructions ont été réalisées au CENBG sur un PC de 2 Ghz de CPU avec 1,5 GB de RAM. Le tableau ci-après (tableau 3.4) compare les durées requises pour une reconstruction de 32 plans de coupe STIMT/PIXET à partir de 100 projections autour 180°. (Les durées de reconstruction pour un seul plan de coupe PIXET seraient approximativement 1/32^e de ces valeurs). Les paramètres décrits précédemment (a, b, c, dans le tableau suivant), à savoir la discrétisation de l'angle solide et les deux pas d'intégration, influent de façon différente sur la durée de reconstruction. C'est la discrétisation de l'angle solide qui a l'effet le plus drastique. Notons que sa variation n'a pas un effet linéaire : fixer a = 10 revient dans notre cas à diviser en 5 secteurs l'angle solide de détection, alors que a = 2 équivaut à 145 secteurs. L'effet du pas d'intégration est quasiment linéaire sur la durée de reconstruction en revanche.

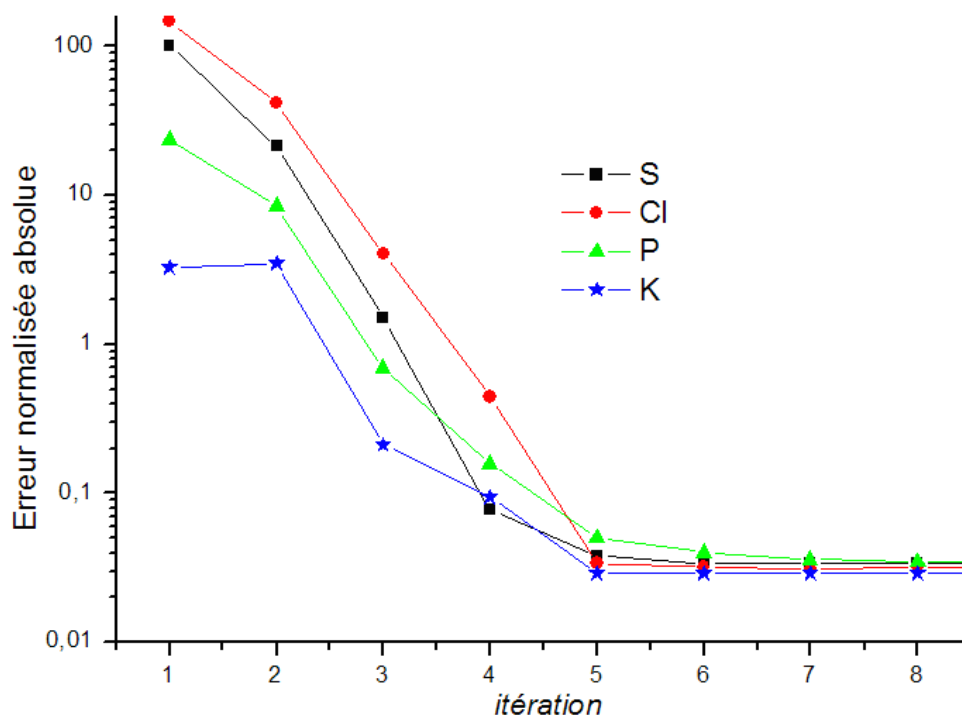


Figure 3.15 : Erreur normalisée absolue entre le tomogramme reconstruit et le fantôme initialement défini, dans le scénario « STIMT 3D/PIXET 2D » où un seul plan de coupe est reconstruit.

A titre indicatif, nous avons également cherché à examiner l'effet du bruit présent dans les données sur la durée de convergence. Pour cela, nous avons utilisé les données de l'objet fantôme mais en supprimant les procédures de correction de bruit de l'image de référence, qui sert de point de départ aux itérations. La convergence est alors fortement ralentie. Dans la configuration retenue précédemment, c'est-à-dire pour le triplet de paramètres (2, 2, 2), la durée requise (pour un même nombre d'itérations et une précision sensiblement identique) est 4,4 fois plus grande. Ceci revient à dire que dans ce cas, plus de 75 % du temps est perdu par la présence de ces artefacts. Ceci accentue encore l'importance des procédures de correction des données expérimentales visant à minimiser le bruit présent dans les sinogrammes et/ou la reconstruction de référence, présentées dans la partie 3.4.

Paramètres de tomographie (a, b, c)	Durée de reconstruction (minutes)	
	Données fantômes avec artefacts dans R_e	Fantôme sans artefacts
10, 2, 2	64	16
10, 1, 2	106	31
10, 2, 1	112	34
5, 2, 2	288	48
2, 2, 2	1760	400
1, 2, 2	6400	1400

Tableau 3.4 : Evolution de la durée requise pour la reconstruction de 32 plans de coupe STIMT/PIXET en fonction des paramètres de reconstruction et de la présence ou non de bruit dans les projections. Les paramètres a, b, c correspondent respectivement à la finesse de segmentation du détecteur, au pas utilisé pour le calcul d'absorption des raies X, et au pas utilisé pour la modélisation du ralentissement du faisceau de protons. L'échantillon est défini sur environ 1720 voxels dans chaque plan de 128×128 voxels (correspond au cas du fantôme de 60 µm de diamètre). Elle est réalisée à partir de 100 projections sur 180°. Les itérations ont été arrêtées au bout de 8 itérations, permettant d'atteindre une erreur normalisée absolue d'environ 3 %. Les résultats présentés précédemment, sur le fantôme étudié, ont été obtenus en utilisant le triplet de paramètres (2, 2, 2), qui correspond à des valeurs usuelles.

Conclusion

Pour résumer, nous avons étendu le code DISRA au cas particulier d'échantillons biologiques, ou plus généralement au cas d'échantillons de composition homogène, afin de permettre la reconstruction de plans de coupes isolés de tomographie PIXE. La simplification introduite porte sur le calcul de l'atténuation des X sur le trajet vers le détecteur. Le point fort de DISRA, qui permet une correction en volume, dans le cône de détection, est conservé. Le calcul prend en compte les variations 3D de la densité de l'échantillon fournies par tomographie STIM. L'approximation effectuée consiste à considérer une composition homogène à l'extérieur du plan de coupe reconstruit. Nous avons ici uniquement considéré les éléments majeurs C, H, O, N dans la composition globale, mais il est important de noter que, si nécessaire, des éléments mineurs pourraient être introduits.

Une seconde approximation pour la correction de l'atténuation – qui existait déjà dans le code originel – réside dans la discrétisation de l'angle solide de détection. Il s'agit du paramètre ayant le plus d'influence sur la durée de reconstruction. Des valeurs usuelles pour les pas de calculs de simulation, notamment pour la segmentation de la surface du détecteur qui définit les trajectoires de raies X qui sont modélisées, ont été données dans le tableau 3.4.

La qualité des résultats obtenus repose enfin sur des procédures de correction efficaces du bruit dans les données expérimentales et sur une détermination robuste de la position de l'axe de rotation, procédures que nous avons introduites dans le code. Ces corrections s'appuient sur l'interface graphique réalisée, qui permet de contrôler les différentes étapes de la reconstruction (sinogrammes, reconstruction de référence, tomogramme).

Chapitre IV

Mise œuvre d'une analyse par tomographie

Durant la première partie de la préparation de cette thèse, nous avons effectué les expériences de tomographie au CENBG sur la ligne microfaisceau implantée auprès de l'ancienne machine, un accélérateur électrostatique de type Van de Graaff. Cette ligne a été transférée sur la nouvelle plate-forme AIFIRA (Applications Interdisciplinaires des Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine) en mars 2006 et a permis de mettre en œuvre les dernières expériences de validation de la technique PIXET présentées dans le chapitre 5. Les performances de l'accélérateur de dernière génération installé sur cette plateforme devraient permettre de gagner un ordre de grandeur sur la résolution spatiale de la technique tout en conservant des intensités de faisceau équivalentes, et ce, dès que la nouvelle ligne dite « nanofaisceau », actuellement en fin de développement, sera mise en œuvre. Dans ce chapitre, seuls sont présentés des résultats obtenus sur l'ancien dispositif par analyse STIMT.

4.1 Les accélérateurs

L'accélérateur Van de Graaff

Dans sa version initiale, la ligne microfaisceau était installée auprès de l'accélérateur électrostatique simple étage de type Van de Graaff 4 MV (KN4000) de la société HVEE (High Voltage Energy Engineering, Pays-Bas). Cette machine délivrait un faisceau vertical (H^+ , D^+ , He^+) avec des propriétés de stabilité en énergie correctes pour une machine classique ($\Delta E/E$ inférieur à 10^{-3}). Associée à cette stabilité en énergie, une bonne brillance de la source d'ions (de type Radio-Fréquence) permettait de délivrer un faisceau primaire en mode continu, suffisamment stable pour permettre la mise en œuvre d'un microfaisceau. Les caractéristiques de ce dispositif sont exposées dans la publication de Llabador et al., 1990.

Le faisceau vertical délivré à la sortie de l'accélérateur était ensuite défléchi par un dipôle magnétique vers la ligne d'intérêt. Lors du passage à travers un tel aimant « d'analyse », les ions sont triés selon leur rapport charge/masse. Le rayon de courbure de leur trajectoire circulaire dépend directement de leur énergie, ce qui permet, en outre, une régulation de la tension d'accélération.

L'accélérateur SINGLETRON de la plateforme AIFIRA

La fin de ce travail de thèse a été réalisée sur la plate-forme AIFIRA. Le nouvel accélérateur implanté est de type SingletronTM in-line 3,5 MV, une machine électrostatique simple étage fournie par le constructeur HVEE. Une vue est présentée sur la figure 4.1. Cette machine a été développée pour des applications nécessitant de très bonnes stabilités en

énergie associées à des brillances de faisceau élevées. En particulier pour l'obtention de micro- et nano-faisceaux, les optiques de focalisation des ions voient leurs performances limitées par des aberrations, au même titre que les systèmes centrés en optique dans le cas des faisceaux de photons. Afin de limiter les aberrations chromatiques, l'une des sources les plus pénalisantes, le faisceau doit être au plus près de la monochromaticité, ce que l'on peut traduire ici par une très bonne résolution en énergie.

L'accélérateur installé est équipé d'un générateur de tension purement électronique (de type Cockroft-Walton) qui permet d'atteindre une résolution $\Delta E/E$ de l'ordre de $2 \cdot 10^{-5}$, ce qui se fait, actuellement, de mieux dans le domaine. Une source d'ions de type RF optimisée en terme de faisceaologie produit les ions H^+ (protons), D^+ (deutons) et He^+ (alphas). Après accélération, la gamme des énergies accessibles s'étend de 0,3 à 3,5 MeV. La machine est horizontale et la ligne primaire, constituée par un aimant d'analyse ainsi que d'un aimant de commutation, permet d'injecter le faisceau de particules dans la ligne de faisceau d'intérêt. La position du faisceau en sortie d'aimant d'analyse est contrôlée grâce à des lèvres de régulation permettant de stabiliser le potentiel de l'accélérateur.



Figure 4.1 : L'accélérateur de la plateforme AIFIRA.

Depuis le transfert de l'activité sur la plateforme AIFIRA, les performances du dispositif ont été améliorées en termes de résolution spatiale, d'intensité de faisceau, de stabilité dans le temps et de fiabilité. Cela est non seulement dû à l'accélérateur lui-même, mais également à la structure du bâtiment spécialement étudiée pour éviter toute perturbation extérieure en termes de vibrations mécaniques ou de contrainte thermique. Les lignes de faisceau focalisées (la microsonde ainsi que la future nanosonde) sont en effet placées sur une dalle très rigide et massive de 200 tonnes, montée sur des pieux ancrés à 18 mètres de profondeur sur le substratum, et mécaniquement isolée du reste du bâtiment. De plus, ces lignes sont montées : i) sur un banc optique en granit pour la partie terminale du microfaisceau ; ii) sur un massif de granit de 10 m de long pour l'ensemble de la ligne nanofaisceau.

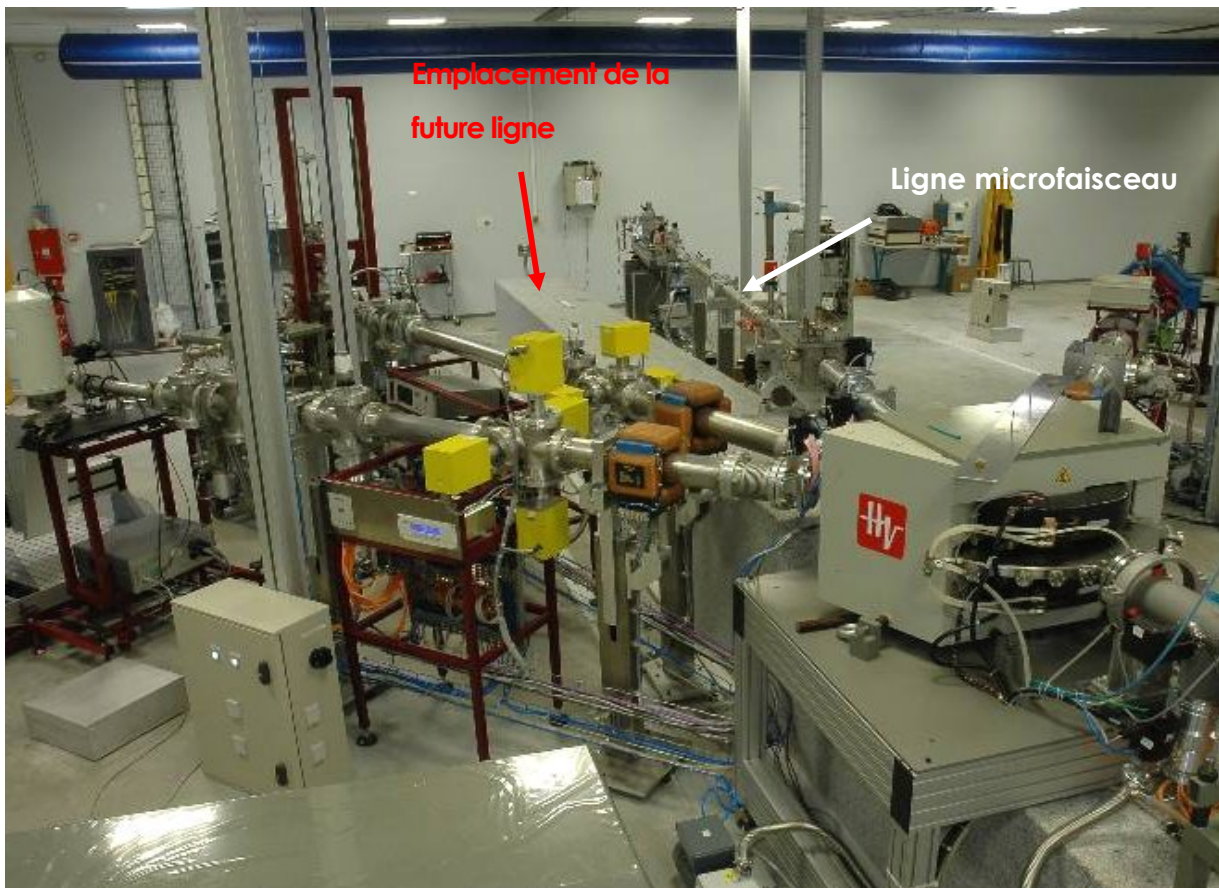


Figure 4.2 : La salle d'expérience avec les différentes lignes de faisceau. La ligne microfaisceau se situe à droite du bloc de granit qui supportera la future nanosonde. Au premier plan, on distingue l'aimant de commutation qui permet d'injecter le faisceau dans les différentes lignes.

4.2 La microsonde nucléaire

4.2.1 Principe

D'une manière générale, la microsonde nucléaire peut être vue comme un outil de microscopie, principalement dédié à l'analyse de matériaux au sens large, que ce soient des matériaux inertes ou de tissus biologiques. Un faisceau d'ions légers de quelques MeV est collimaté puis focalisé jusqu'à une taille de l'ordre de quelques micromètres sur la cible. Le balayage du faisceau par des plaques de déflexion électrostatique permet d'analyser l'échantillon point par point dans la région d'intérêt.

Une représentation schématique de cette ligne est donnée sur la figure 4.3. Pour une description détaillée de cette microsonde, se reporter à la référence (Llabador *et al.*, 1990).

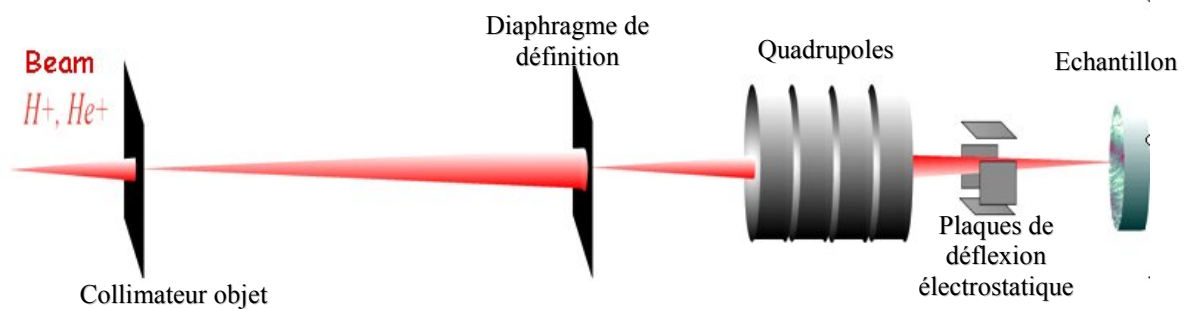


Figure 4.3: Représentation schématique de la ligne microfaisceau du CENBG

4.2.2 Dispositif de focalisation

Par analogie avec un système centré en optique, une ligne de focalisation est composée d'optiques de focalisation organisées en multiplets, d'un objet brillant situé en amont, et de collimateurs d'ouverture permettant de contrôler la divergence du faisceau dans l'espace objet. Les optiques donnent une image de ce point objet dans le plan de la cible avec un facteur de grandissement qui est par exemple de 1/10 sur la ligne du CENBG. En d'autres termes, si on définit un objet brillant en collimatant le faisceau primaire à l'aide d'un collimateur circulaire de 10 μm de diamètre, l'image au premier ordre (sans tenir compte des aberrations) a un diamètre de 1 μm , qui correspond à la résolution du faisceau obtenu.

L'optique de focalisation est constituée de quatre lentilles quadrupolaires magnétiques couplées deux à deux sous la forme d'un quadruplet de type Dymnikov (Dymnikov *et al.*, 1965) (fig. 4.3). Le diamètre des collimateurs objet peut varier de 5 à 50 μm selon le type

d'application recherché, ce qui permet aujourd'hui d'obtenir une taille finale de faisceau mesurées entre 0,8 et 6 μm dans le plan de la cible. L'intérêt majeur de ce type de configuration est de présenter une symétrie cylindrique avec des facteurs de grandissement égaux dans les plans horizontal et vertical. L'utilisation de collimateurs objets circulaires permet donc d'obtenir une forme de faisceau circulaire sur cible.

Le choix du collimateur objet et du collimateur d'ouverture est conditionné par les besoins de l'analyse. La configuration choisie résulte généralement d'un compromis entre la résolution spatiale et l'intensité du faisceau. Par exemple, pour mettre en œuvre la technique STIM, une très faible intensité du faisceau est nécessaire (inférieure au fA). Il est donc nécessaire de réduire le diamètre du collimateur d'ouverture à quelques dizaines de micromètres (typiquement 20 μm) et celle du collimateur objet entre 5 et 20 μm . Compte tenu de la distance séparant ces deux collimateurs (5,4 m), la divergence angulaire du faisceau est quasiment nulle. L'effet des aberrations optiques intrinsèques est alors négligeable et la résolution spatiale obtenue est optimale, en général inférieur au micromètre. Par contre, pour l'analyse de traces par la méthode PIXE, pour une grande efficacité de production des raies X, une intensité de faisceau supérieure à quelques centaines de pA est nécessaire. La résolution optimale dans ces conditions n'est jamais inférieure à 2 μm , voire plus.



Figure 4.4 : La ligne microfaisceau avec : (à gauche) la chambre d'analyse sous vide, (au centre) les 4 quadrupôles permettant la focalisation du faisceau et (à droite) la chambre contenant les collimateurs d'ouverture.

4.2.3 Système de balayage électrostatique

A la sortie des optiques de focalisation, la déflexion du faisceau est assurée par deux paires de plaques électrostatiques : une pour la déflexion dans le plan vertical, l'autre pour la déflexion dans le plan horizontal. Ce dispositif est alimenté par un générateur délivrant des hautes tensions avec une rampe très rapide, un faible ripple et une très bonne stabilité dans le temps (de l'ordre de 10^{-5}). Le tout est contrôlé par un coprocesseur couplé au système d'acquisition. Lors du fonctionnement en analyse, le balayage du faisceau, piloté par le système d'acquisition donne ainsi accès à une cartographie 2D point par point (sur une matrice 128×128 ou 256×256 pixels) de l'échantillon à analyser. Selon l'application et en fonction de l'énergie des ions du faisceau, la taille du balayage sur cible peut aller de quelques dizaines de micromètres à deux millimètres. A titre d'exemple, pour une tension appliquée de 1000 V, une surface de balayage de $1 \times 1 \text{ mm}^2$ est accessible pour des protons de 2 MeV.

En raison de la forte densité d'énergie déposée localement par le faisceau, une élévation thermique locale peut se produire dans la région irradiée. Pour les analyses d'échantillons organiques, de tels effets non maîtrisés pourraient conduire à une modification de la structure et de la composition des échantillons (perte d'espèces volatiles comme H, N, O) et donner des résultats analytiques erronés. Pour limiter cet effet, un dispositif de balayage électrostatique rapide a donc été choisi, autorisant un temps d'analyse court, de quelques millisecondes par point. A cette fréquence, les effets thermiques sont moins importants.

4.3 Dispositif expérimental pour la tomographie

Les échantillons à analyser sont placés dans une chambre d'analyse sous vide (fig. 4.4). Cette enceinte se situe dans la partie terminale de la ligne microfaisceau. Elle est équipée de différents dispositifs permettant de positionner les échantillons, de les visualiser à l'échelle microscopique ainsi que divers détecteurs de particules ou de rayonnement X.

Deux microscopes optiques permettent de contrôler facilement le positionnement de l'échantillon. Le premier, de grossissement faible et réglable (≤ 40), permet de visualiser la face avant de la cible. Le deuxième, de plus fort grossissement ($\times 100$) est employé pour visualiser les cibles minces en transmission ainsi qu'une lame mince luminescente sous faisceau durant la phase de réglage de la focalisation. L'image est affichée directement sur écran vidéo, via une caméra à haute sensibilité.

4.3.1 Positionnement de l'échantillon

Le dispositif de goniométrie utilisé pour fixer et faire tourner l'échantillon dans la chambre d'analyse a été choisi pour sa simplicité mécanique et sa compacité. Pour éviter toute source de jeu mécanique supplémentaire, l'échantillon est monté sur un mandrin fixé directement à l'extrémité de l'axe de rotation d'un moteur pas à pas. L'accent a été mis en particulier sur la reproductibilité en position angulaire. Un dispositif intermédiaire de triangulation permet de positionner très précisément l'échantillon sur l'axe de rotation moteur. Le jeu latéral de cet axe est inférieur à quelques micromètres. L'ensemble est fixé sur le porte-échantillon de la chambre d'analyse comme le montrent les figures 4.5 et 4.6.

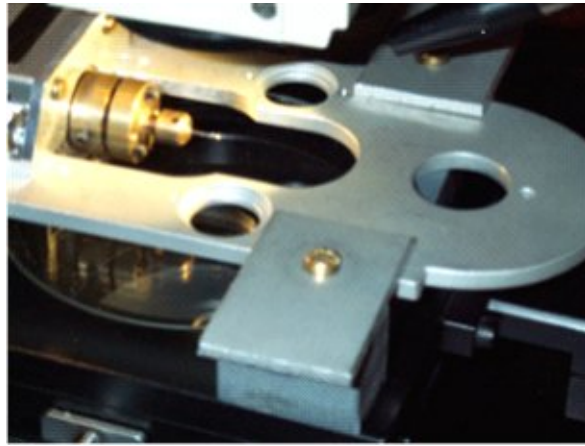


Figure 4.5 : Ajustement de l'axe de rotation d'un échantillon sur le moteur pas à pas sous la lunette binoculaire. Le moteur est fixé via son support sur la platine micrométrique de la loupe binoculaire.

Pour reconstruire l'objet en deux ou trois dimensions à partir des projections expérimentales d'une expérience de tomographie, il est très important que le centre de l'échantillon soit aligné au plus près de l'axe de rotation vertical du moteur pas à pas. Ceci nous a conduit à mettre en place une procédure manuelle d'ajustement de la position du spécimen sur cet axe avec une précision de quelques micromètres. Le tout est réalisé en dehors de la chambre d'analyse sous une loupe binoculaire (figure 4.5). Les systèmes de visualisation et de déplacement micrométrique de la chambre d'analyse permettent ensuite de vérifier que cet alignement est bien conservé après introduction dans la chambre sous vide ainsi que lors de l'analyse (Figure 4.6). Ces ajustements peuvent prendre beaucoup de temps.

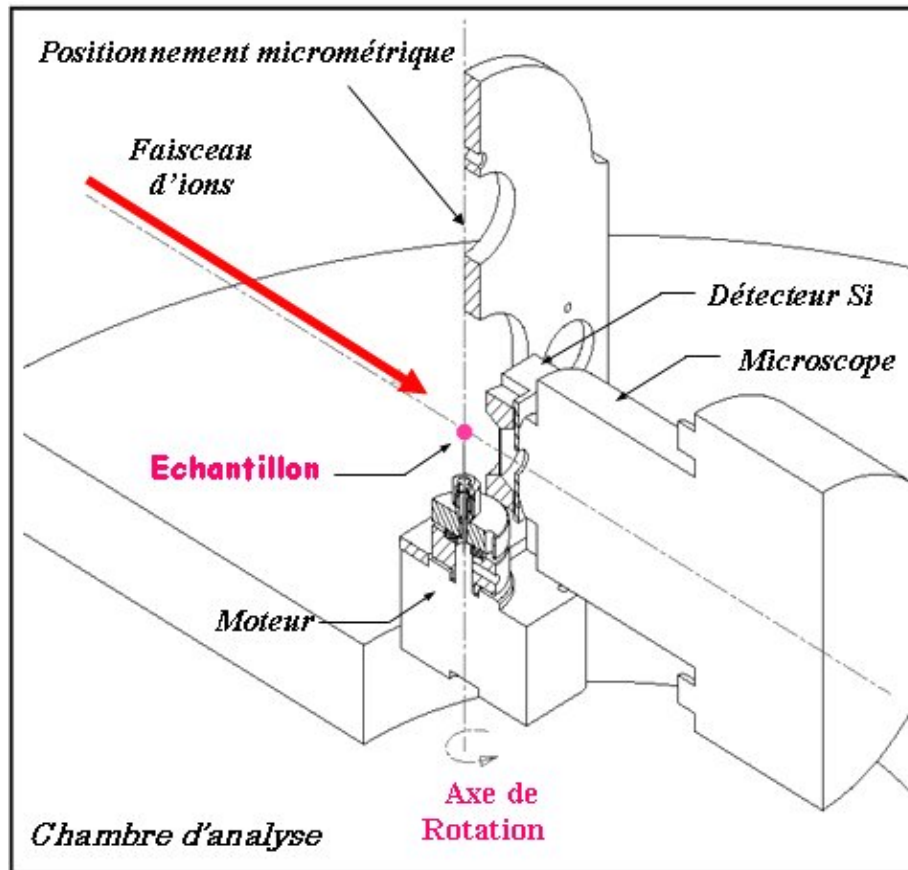


Figure 4.6 : Mise en place du dispositif de goniométrie dans la chambre d'analyse devant l'objectif du microscope arrière.

Le moteur (PortescapTM) est un moteur 400 pas par tour (soit un pas naturel de $0,9^\circ$) avec carte de commande capable de diviser le pas naturel par un facteur dix. La précision sur la position angulaire est alors inférieure à 3 % du pas naturel (soit $0,027^\circ$). Un couple de maintien appliqué entre les rotations assure la stabilité en position de l'objet pendant la mesure d'une projection. Ceci occasionne un léger échauffement du moteur qui a nécessité l'adjonction d'un système de refroidissement afin de minimiser cet effet, et ainsi éviter tout phénomène de dilatation du support en cours d'analyse. Pour cela, la base du moteur est couplée thermiquement à une masse de cuivre traversant la paroi de la chambre et refroidie par une circulation d'eau.

Le mouvement de rotation est commandé automatiquement par le dispositif d'acquisition. Au cours de l'analyse, la rotation de l'échantillon et la mesure des projections angulaires sont entièrement automatisées, ce qui permet d'optimiser le temps d'acquisition.

4.3.2 Détecteurs

Selon la technique utilisée, différentes configurations des détecteurs sont possibles. En microscopie STIM, la détection des particules transmises est assurée par un détecteur silicium implanté (détecteur PIPS de Canberra, 100 mm² de surface active) placé à 0° dans la direction du faisceau. Avec une résolution en énergie d'environ 12 keV, il est parfaitement adapté à la mesure de l'énergie résiduelle des ions. Bien que l'intensité du faisceau d'ions soit extrêmement faible (inférieure au femto-ampère), cette fluence est délivrée de manière très localisée et le détecteur peut subir des dommages appréciables, en particulier lors d'acquisitions longues (plus d'une heure pour une centaine de projections) sur des balayages serrés (typiquement inférieurs à 100 µm de côté). Cela peut altérer la collection des charges dans le détecteur et ainsi modifier les gains en énergie de la chaîne d'acquisition, ce qui se traduit par un déplacement des pics sur les spectres en cours d'analyse et donc une augmentation de l'incertitude sur les mesures d'énergie. Une des solutions consiste à déplacer légèrement le détecteur STIM pendant l'analyse afin d'exposer une autre zone sensible. Pour cela un système de déplacement micrométrique a dû être construit.

La détection du rayonnement X est assurée par un détecteur Si(Li), placé à 135° de l'axe du faisceau et refroidi à l'azote liquide. Il a une résolution d'énergie de 155 eV à 5,9 keV et une surface active de 80 mm², collimatée à 60 mm². Ce détecteur est équipé d'une fenêtre mince en béryllium de 8 µm d'épaisseur.

4.3.3 Acquisition des données

Un programme d'acquisition spécifique a été développé au CENBG pour la tomographie 3D. Des procédures ont été introduites dans le code d'acquisition afin de gérer le mouvement de rotation. La boucle acquisition/rotation est répétée autant de fois que de projections angulaires nécessaires. A chaque angle de vue, le faisceau est balayé pixel par pixel sur l'échantillon alors que l'énergie résiduelle ou les photons X émis sont mesurés. L'ensemble de ces données est enregistré, événement par événement, dans un fichier en mode liste pour traitement ultérieur. Pour chaque photon et chaque particule détectés, la séquence (E, x, y, θ) est codée.

Les paramètres de balayage et de rotation sont définis en début de programme. Deux modes d'analyse sont disponibles, tomographie d'un plan horizontal individuel ou tomographie 3D complète sur 64 plans. Dans le premier cas, le balayage est composé d'un simple scan horizontal sondant un seul plan de coupe. En tomographie 3D, un balayage bidimensionnel complet est effectué pour chaque projection angulaire. La zone carrée balayée est alors définie

par 64 lignes horizontales de 128 points d'analyse chacune. Cela signifie que la structure 3D du spécimen est ensuite reconstruite à l'aide de 64 plans de coupe horizontaux et équidistants. Chacun d'eux est constitué par une matrice de 128×128 voxels (pixels 3D reconstruits).

Pour l'analyse STIMT, le nombre de balayages par projection généralement nécessaire afin d'obtenir une statistique suffisante par pixel se situe entre 2 et 10. Ce nombre est fonction du taux de comptage ainsi que du temps d'analyse par pixel préalablement choisi. Pour l'analyse PIXET, le nombre de balayages nécessaire dépend de la nature de l'échantillon analysé, qui conditionne le taux d'émission X. Les temps d'analyse étant généralement longs, un compromis est souvent nécessaire entre le temps d'acquisition et la sensibilité analytique requise. Typiquement, l'analyse STIMT d'un plan nécessite une durée d'environ 10 minutes, 90 minutes pour une analyse 3D complète, et entre 60 et 120 minutes voire davantage pour l'analyse PIXET d'un plan (selon la sensibilité désirée).

Avant de lancer une analyse STIMT 3D complète, il est nécessaire de vérifier que l'énergie résiduelle du faisceau après traversée de l'échantillon est bien suffisante pour un traitement cohérent et que de plus l'objet reste bien dans le champ de vue défini par l'expérimentateur à chacune des projections angulaires. En général, un balayage STIM 2D rapide est réalisé sur quelques projections angulaires afin de vérifier ces deux conditions.

4.4 Validation STIMT sur fibre micro-composite de référence

Le principe de reconstruction du code DISRA nécessite de connaître la densité locale de l'échantillon pour normaliser les calculs de concentration en chaque pixel d'une tomographie PIXE. Une analyse préalable doit donc être systématiquement effectuée par tomographie STIM. Afin de valider la procédure de reconstruction des données STIMT par le code, nous avons réalisé une expérience de tomographie sur une fibre micro-composite dont la densité est connue. Les résultats obtenus nous ont permis de vérifier que les valeurs de densité fournies par le code DISRA étaient bien comparables aux valeurs réelles et pouvaient servir ainsi de base pour les étapes ultérieures de tomographie PIXE.

4.4.1 Echantillon de référence (SiC/AlN):

La fibre micro-composite utilisée est composée de deux parties distinctes le long de l'axe de la fibre : le centre est une microfibre homogène de carbure de silicium (Hi-Nicalon, Nippon Carbon, Japon) d'environ $14 \mu\text{m}$ de diamètre, sur laquelle une couche mince d'AlN de $7 \mu\text{m}$

d'épaisseur environ est déposée par la méthode de dépôt chimique en phase vapeur (Grente, 2004).

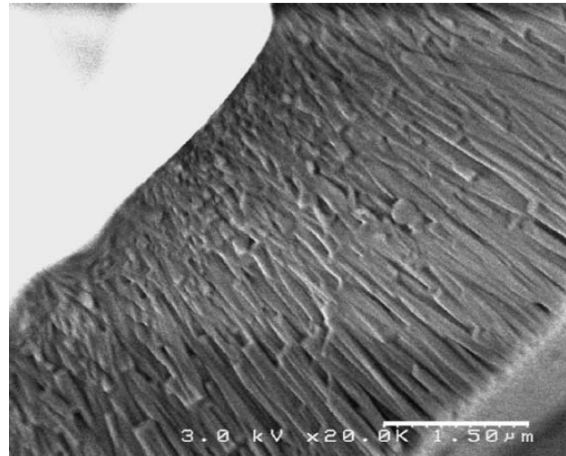


Figure 4.7 : Image de microscopie électronique de la fibre micro-composite composée d'une couche d'AlN déposée sur une fibre cylindrique de SiC d'environ 14 µm de diamètre. La couche d'AlN est constituée par des aiguilles minces de 150 nanomètres de large et orientées radialement.

La masse volumique connue (g.cm^{-3}) pour chaque matériau est donnée dans le tableau 4.1 ci-dessous. Nous avons utilisé dans cette expérience la densité SiC comme référence, afin de valider le calcul de densité par reconstruction STIMT. La densité de la structure « en aiguilles » du dépôt AlN en revanche était inconnue (elle était supposée légèrement inférieure à la valeur de AlN homogène), et nous nous sommes proposés de la déterminer par tomographie STIM.

Partie de l'échantillon	Masse volumique (g.cm^{-3})
SiC	2,73 – 2,77
AlN homogène	3,26

Tableau 4.1 : Densité des différents constituants de l'échantillon de référence.

Connaissant précisément la composition stoechiométrique de la fibre, la distribution en masse volumique est reconstruite en supposant cette composition homogène dans chacune des deux parties de l'échantillon (12 % Si, 38 % C, 33 % Al, 17 % N).

4.4.2 Conditions expérimentales

La fibre micro-composite est fixée à l'extrémité d'un micro-capillaire de verre d'une trentaine de micromètres de diamètre à l'aide d'une colle époxy (Araldite®), ceci pour en faciliter le montage sur le moteur de rotation. Quelques plans de coupes sont analysés sur la fibre puis reconstruits à l'aide du code DISRA. Les conditions expérimentales sont présentées dans le tableau 4.2 ci-dessous.

Paramètre expérimental	Faisceau de protons
Energie	3 MeV
Intensité du faisceau	1500 H ⁺ par seconde (<1 fA)
Diamètre du faisceau	1,0 μm
Dimension du balayage	60 μm
Dimension d'un voxel	0,47 × 0,47 μm
Nombre de projections	100
Nombre de rayons/projection	128
Angle total d'exploration	180°

Tableau 4.2 : Paramètres expérimentaux de l'analyse STIMT

4.4.3 Traitement des données

Le spectre en énergie mesuré par le détecteur Si est traité afin d'obtenir l'ensemble des valeurs des pertes d'énergie pour chaque rayon de projection, qui servent de point de départ à la reconstruction. Pour cela, les étapes suivantes sont réalisées:

- Calcul du numéro de canal médian pour chaque rayon de projection.
- Conversion du numéro de canal en énergie médiane résiduelle, après étalonnage en énergie du spectre.
- Calcul de l'énergie perdue (ralentissement) pour chaque rayon de projection, connaissant l'énergie incidente.
- Observation des sinogrammes obtenus et filtrage des pixels aberrants.
- Détermination du centre de rotation de chaque plan.
- Enfin, reconstruction tomographique.

4.4.4 Reconstruction et analyse quantitative

Les valeurs de masse volumique obtenues à l'issue de la reconstruction (en g.cm^{-3}) sont codées sur une échelle de couleurs et présentées sur des tomogrammes (figure 4.8), ce qui permet de révéler la structure interne des échantillons par contraste en densité. Bien que la différence de densité soit ici faible entre les différentes composantes des fibres, elle est suffisante pour distinguer clairement la couche AlN déposée sur la fibre SiC. Trois craquelures apparaissent dans la couche AlN. Elles ont été vraisemblablement créées par des contraintes mécaniques lors de la manipulation de la fibre. Leur largeur maximale est d'environ $1,5 \mu\text{m}$.

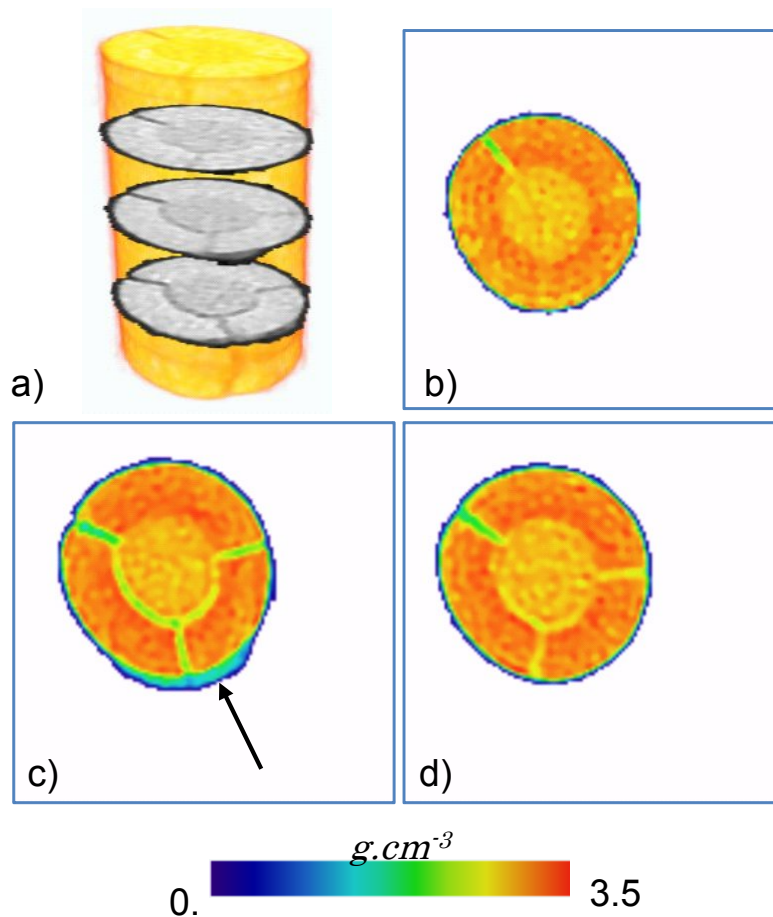


Figure 4.8 : Tomogrammes reconstruits par le code DISRA pour l'échantillon de référence. La structure 3D de la fibre micro-composite est présentée sur la figure a). Les images b), c) et d) correspondent aux trois plans de coupe visibles sur la figure a). Les trois craquelures occasionnées par la manipulation de la fibre sont visibles dans la couche d'AlN. La partie bleu-vert indiquée sur l'image c) par la flèche correspond à la colle utilisée pour fixer la fibre microcomposite.

Deux régions individuelles de SiC et AlN ont été sélectionnées afin de calculer la valeur moyenne de densité. Les zones choisies sont illustrées sur la figure 4.9.

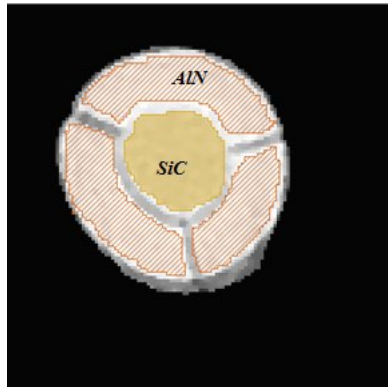


Figure 4.9 : Régions d'intérêt choisies pour calculer la densité moyenne sur un plan de coupe. La densité du SiC est calculée sur 896 pixels et celle de l'AlN sur 2144 pixels.

Les valeurs moyennes obtenues pour chaque région d'intérêt sont données dans le tableau 4.3. Les valeurs SiC sont tout à fait en accord avec la valeur de référence. Nous avons ainsi pu déterminer de façon fiable la densité du dépôt en aiguilles AlN, de $3,02 \pm 0,11 \text{ g.cm}^{-3}$, légèrement inférieure à la valeur attendue. Notons que la densité de la colle, ici de $1,39 \pm 0,29 \text{ g.cm}^{-3}$, permet de la différencier de l'échantillon.

Masse volumique	SiC (g.cm^{-3})	AlN (g.cm^{-3})
plan n°1	$2,72 \pm 0,06$	$2,94 \pm 0,11$
plan n°2	$2,76 \pm 0,08$	$2,95 \pm 0,15$
plan n°3	$2,96 \pm 0,56$	$3,16 \pm 0,10$
Valeur moyenne	$2,81 \pm 0,23$	$3,02 \pm 0,11$
Valeur de référence	de 2,73 à 2,77	3,26 pour AlN homogène

Tableau 4.3 : Densités moyennes déterminées par le code DISRA. La valeur de référence est donnée pour comparaison.

En utilisant un processeur de type Pentium (4,3 GHz, 1500 Mb RAM), le temps requis pour reconstruire un plan de coupe est seulement de quelques secondes. Plusieurs études sur fibres microcomposites de structures et compositions différentes ont conforté la reproductibilité et la fiabilité des résultats obtenus par reconstruction STIMT pour ce type d'échantillons, constitués d'éléments légers. Nous avons cherché dans un deuxième temps à valider les technique STIMT puis PIXET sur des échantillons de référence de structure plus complexe et sur des échantillons biologiques réels.

Chapitre V

Tomographie à l'échelle cellulaire

Nous présenterons dans ce chapitre les résultats de tomographie 3D obtenus sur 3 échantillons :

- une algue marine unicellulaire (diatomée) (Michelet-Habchi *et al.* 2006)
- un échantillon de référence composé d'inclusions métalliques sphériques dans une matrice polymère, la taille de ces structures étant typique d'analyses à l'échelle cellulaire ;
- une cellule humaine isolée, issue d'une lignée tumorale de culture au laboratoire.

Dans un premier temps, nous comparerons la reconstruction effectuée en STIMT 3D par le code itératif DISRA par rapport à la méthode de reconstruction analytique mise en œuvre dans le code TomoRebuild, également développé au CENBG pour la STIMT. Dans un deuxième temps, nous étudierons la reconstruction STIMT/PIXET d'un échantillon de référence, de densité et de composition connues, afin de mettre en évidence les paramètres expérimentaux et numériques importants pour la fiabilité des valeurs calculées. Enfin, nous montrerons les résultats obtenus en STIMT/PIXET sur une cellule cancéreuse humaine isolée, et les perspectives que ce type d'étude nous ouvre.

5.1 Etude comparative de tomographie STIMT 3D d'une algue unicellulaire marine (Diatomée)

5.1.1 Préparation des échantillons

Les diatomées que nous avons étudiées ici sont des algues unicellulaires d'origine marine de l'espèce d'*Odontella Sinensis*. Les diatomées ont la propriété de produire une coque siliceuse, dite frustule, présentant souvent des ornements, dont la structure est caractéristique de l'espèce considérée. Le frustule est constitué de silice hydratée amorphe $\text{SiO}_2-(\text{H}_2\text{O})_n$ produite par la bio-minéralisation de la cellule. Les diatomées étudiées ici sont issues de cultures réalisées au Laboratoire d'Ecophysiologie et d'Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques (LEESA) de la Station Marine d'Arcachon. Elles se présentent sous la forme d'un rectangle de 200 à 300 μm de long et de 40 à 50 μm de large présentant à chaque extrémité des structures en forme « d'antennes » appelées ocelles et processus labiés (fig. 5.1).

Les diatomées ont été rincées dans l'eau pure puis lyophilisées. Le rinçage, même très bref, provoque la fracturation du frustule et la perte du contenu organique interne. Des frustules isolés, sélectionnés pour leur bon état de conservation, ont été montés sur un axe de rotation

fait d'un micro-capillaire de verre, en fixant la base de l'échantillon par une goutte de colle époxy (fig. 5.1).

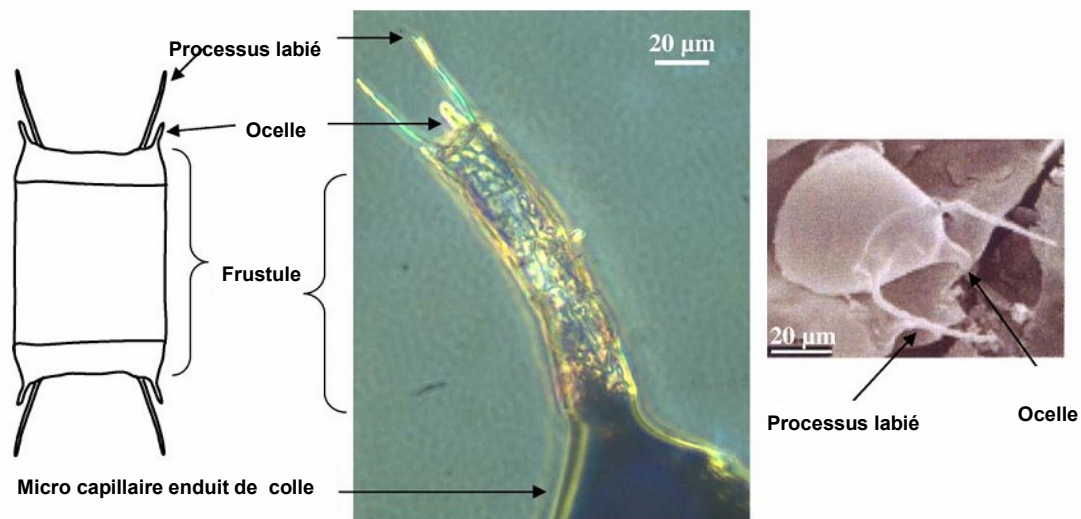


Figure 5.1 : Echantillon de diatomée vu en microscopie optique (au centre) et électronique (à droite). Le schéma montrant la structure externe complète de la diatomée est inspiré de (Tomas 1997).

5.1.2 Conditions expérimentales

Les analyses ont été effectuées sur la ligne microfaisceau du CENBG. La faible épaisseur des diatomées nous a conduit à utiliser un faisceau d'alphas (2,8 MeV) au lieu de protons pour l'étude de ces échantillons en tomographie STIMT 3D, afin d'augmenter la perte d'énergie du faisceau transmis, et par la même d'optimiser le contraste en densité dans l'image reconstruite. Une étude plus « classique » en faisceau de protons (3 MeV) a également été réalisée dans le but de comparer les résultats obtenus.

Comme nous l'avons expliqué au chapitre précédent, la tomographie STIM requiert une intensité de faisceau très faible, de l'ordre du millier d'ions par seconde, soit un courant inférieur au fA. Ces conditions d'analyse ont imposé l'utilisation, en début de ligne, d'un collimateur objet circulaire de diamètre 5 µm. Le diamètre du faisceau au niveau du plan focal de la microsonde, où se trouve l'échantillon, a été mesuré d'environ $(0,9 \pm 0,1)$ µm.

L'échantillon, monté au sommet de l'axe de rotation, préalablement réglé sous loupe binoculaire, est positionné verticalement devant le faisceau. L'échantillon est visualisé grâce aux microscopes avant et arrière de la chambre d'analyse, et sa position est ajustée à l'aide de déplacements micrométriques de façon à positionner la région d'intérêt sous faisceau. La zone choisie est balayée par le faisceau d'ions, sur une surface carrée de 128 pixels de large sur 64 pixels de haut. Le volume sondé lors de la rotation de l'objet sous faisceau est ainsi composé

de 64 plans horizontaux de 128×128 voxels. Un total de 100 projections sur 180°, définissant donc un pas angulaire de 1,8°, est mesuré.

L'ensemble de ces paramètres est résumé dans le tableau 5.1. La durée typique d'une acquisition pour une étude STIMT 3D est d'environ 2 h 30 pour ces échantillons.

Paramètres expérimentaux	Valeur choisie
Volume analysé	64 plans consécutifs
Nombre de projections	100
Nombre de rayons par projection	128
Intervalle angulaire	180°
Taille du balayage	119 × 119 μm ²
Largeur d'un pixel	0.93 μm

Tableau 5.1 : Paramètres utilisés pour l'étude STIMT 3D des diatomées.

5.1.3 Reconstruction tomographique 3D

Les 64 plans de coupe constituant le volume analysé sont reconstruits séparément, puis les résultats obtenus regroupés numériquement pour reformer une image 3D. Une interpolation entre plans adjacents permet d'améliorer la résolution dans la direction verticale - puisqu'un plan sur deux seulement était balayé lors de l'acquisition. Pour ces échantillons, le pouvoir d'arrêt a été calculé en supposant une composition uniforme de silice SiO₂, typique de la composition du frustule. Notons que les codes initiaux DISRA et TomoRebuild ne permettaient de prendre en compte qu'un faisceau de protons. Une procédure de calcul du pouvoir d'arrêt dans le cas d'un faisceau d'alphas a donc été ajoutée dans les deux codes, pour les besoins de ce type d'expériences. Les données de pouvoir d'arrêt élémentaires de Ziegler (Ziegler, Biersack *et al.*, 1985) ont été utilisées.

La reconstruction 3D a été réalisée par deux codes reposant sur des techniques numériques différentes. Le code itératif DISRA a été comparé au code TomoRebuild, développé au CENBG pour la STIMT 3D, qui est basé sur une méthode analytique : il débute par une résolution directe du problème physique, puis se poursuit par la reconstruction par rétroprojection filtrée des projections ainsi interprétées.

Cette différence de principe est visible sur les images reconstruites : la distribution de densité obtenue par TomoRebuild apparaît plus « continue » que celle de DISRA (fig. 5.2 et 5.3). En effet, comme nous l'avons vu au chapitre 2, la méthode analytique repose sur la détermination

numérique d'une fonction mathématique par essence continue, alors que dans DISRA l'image est discrétisée et chaque voxel corrigé séparément des autres au fil des itérations. Notons que l'image 3D obtenue par DISRA pourrait bien entendu être « lissée » par un filtre numérique 3D, afin lui donner un aspect plus continu, et dans ce cas tout à fait comparable à l'image TomoRebuild. Nous n'avons pas effectué de lissage après reconstruction volontairement ici dans un souci de comparaison directe des résultats des deux codes.

D'un point de vue quantitatif, des informations a priori peuvent être incluses dans le code itératif : notamment, les valeurs de densité sont contraintes à être positives, alors que des valeurs négatives, sans signification physique, subsistent toujours dans la reconstruction analytique. De plus, une limite minimale de détection recalculée à chaque voxel dans le code DISRA permet notamment d'enlever la plupart des artefacts à l'extérieur de l'échantillon dans le tomogramme reconstruit, conduisant ainsi à des images plus contrastées.

L'interprétation des images obtenues doit donc prendre en compte la méthode de résolution numérique employée. Les densités obtenues par méthode analytique (TomoRebuild) n'ont de sens qu'en valeur moyenne sur une région donnée : ainsi par exemple la valeur moyenne de la densité en dehors de l'échantillon est égale à zéro bien qu'il y ait des fluctuations locales autour de cette valeur. Dans l'algorithme itératif (DISRA) l'excès est parfois inverse, car la discrétisation peut entraîner des variations très brusques de densité entre deux voxels consécutifs au niveau des bords de l'échantillon. Ceci peut avoir un effet positif, qui est de révéler plus nettement la structure de l'objet, mais parfois dommageable, car l'information de densités très ténues sur les bords de l'échantillon peut parfois être perdue (figure 5.3).

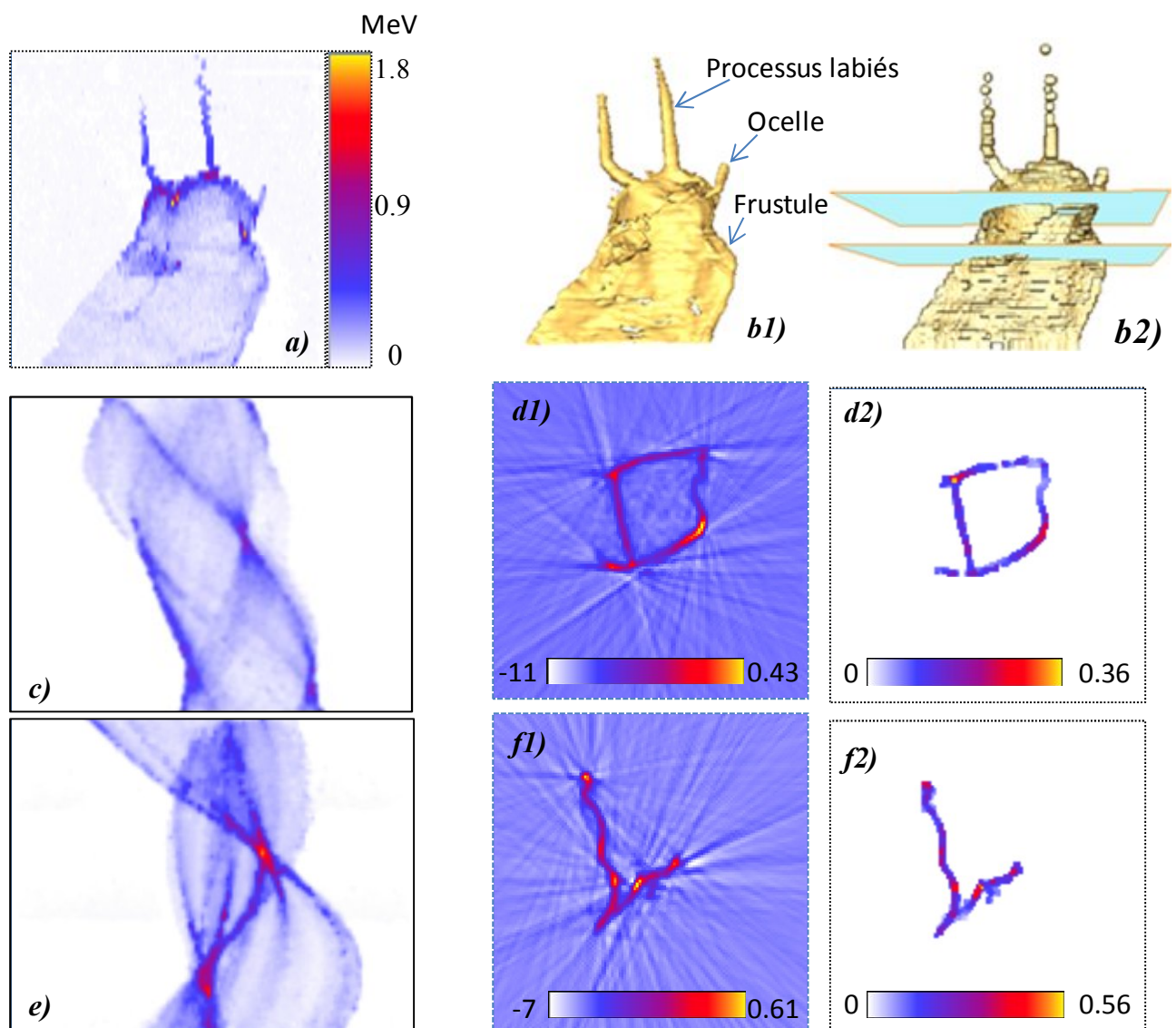


Figure 5.2 : Reconstruction STIMT 3D d'un échantillon de diatomée à partir des deux codes TomoRebuild (noté 1) et DISRA (noté 2). Une vue de la première projection est présentée en a), la perte d'énergie a été ici représentée sur une échelle de couleurs allant de zéro (blanc) à la perte d'énergie maximale 1,8 MeV, correspondant aux régions les plus épaisses traversées à cet angle (en jaune). Le volume reconstruit (b) est constitué de 64 plans de coupe expérimentaux (128×128 voxels). Deux de ces plans de coupe sont ensuite présentés, tels qu'ils ont été obtenus directement après reconstruction. Leur position dans le volume étudié est précisée en (b2). Les projections correspondantes ont été réarrangées sous la forme de sinogrammes (c, e) et ont permis d'obtenir les images reconstruites (d, f). Les échelles de couleurs représentent la densité de masse en $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, et vont de la valeur minimale reconstruite (en blanc) à la valeur maximale (en jaune).

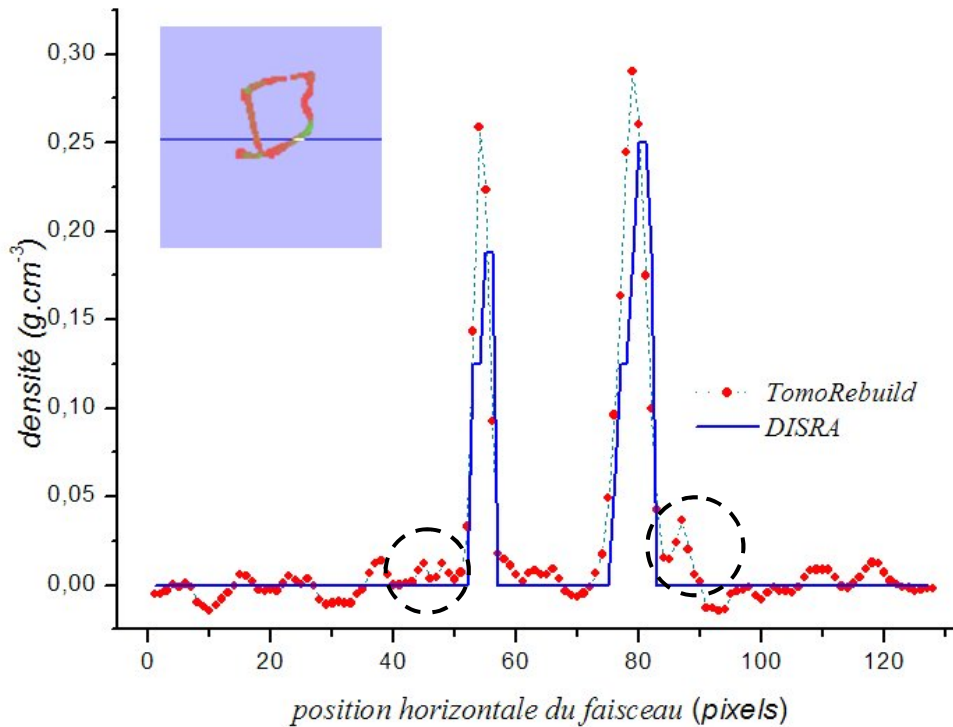


Figure 5.3 : Profils de la densité de masse extraits de la ligne $y = 64$ du plan de coupe présenté dans la figure 5.2d, à partir des codes TomoRebuild (points) et DISRA (trait continu). Les valeurs négatives sont interdites dans DISRA, et les bords de l'échantillon apparaissent plus contrastés, l'image beaucoup moins bruitée que TomoRebuild. En revanche les variations de densité très ténues en bordure d'échantillon ne sont pas toujours reproduites aussi finement qu'avec TomoRebuild (cercles).

5.1.4 Distributions 3D

La distribution 3D des valeurs de densité peut être visualisée selon deux types de représentation :

- En définissant des surfaces d'isodensité (fig. 5.4 a-d): cela permet de révéler des structures de densités voisines de la valeur choisie. Par exemple, la surface externe de la diatomée, en jaune sur la figure 5.4 (a-d) a été obtenue en choisissant des valeurs de densité proches de zéro, correspondant à la limite entre l'échantillon et le vide à l'extérieur. En augmentant la valeur d'isodensité, on peut mettre en évidence les régions de plus forte densité de l'objet (en vert puis en rouge pour les structures les plus denses), en l'occurrence ici notamment les processus labiés. Un paramètre de transparence a été utilisé ici sur les densités les plus faibles (en jaune) afin de superposer sur la même image les 3 surfaces d'isodensité.

- Par la représentation directe du volume voxélisé (fig. 5.4e) : les densités sont alors codées sur une échelle allant ici du rouge et transparent pour les valeurs les plus faibles au jaune et opaque pour les valeurs les plus fortes. Une telle représentation permet de révéler sur une seule image différentes régions d'intérêt par contraste en densité.

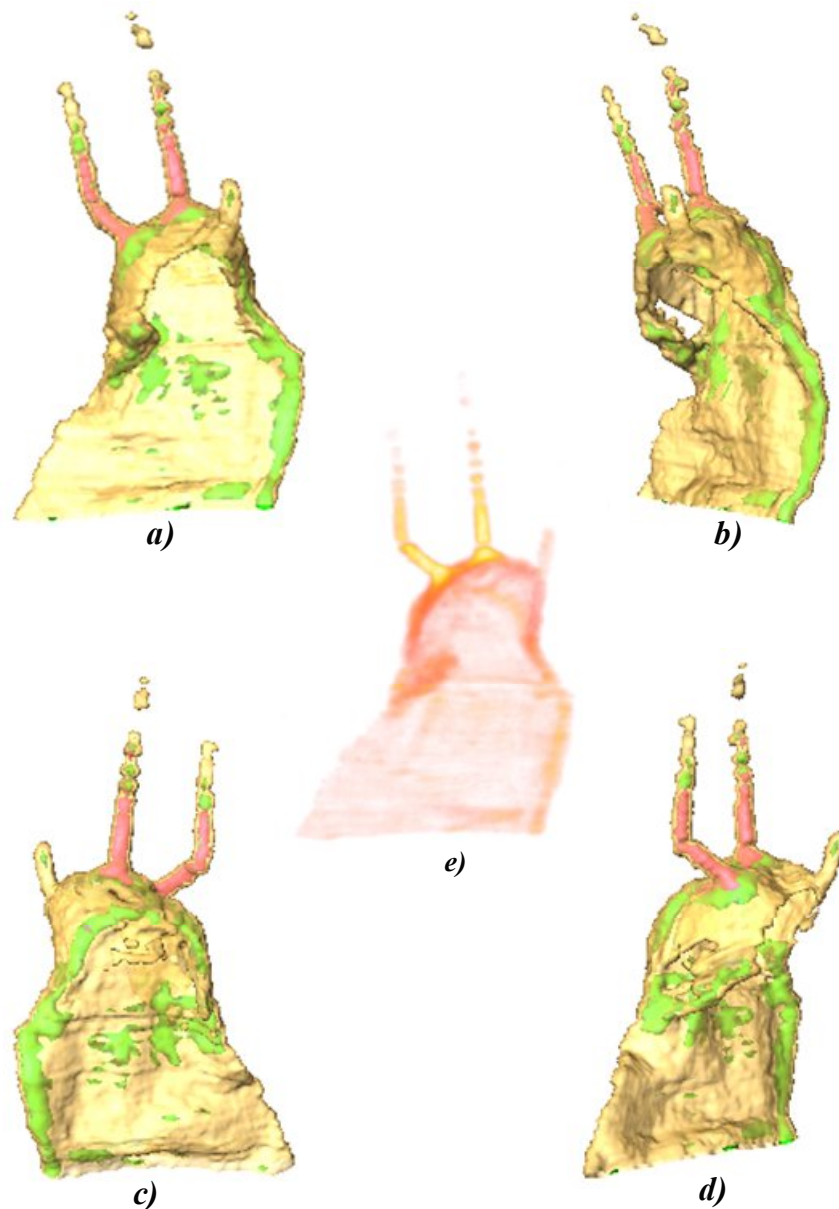


Figure 5.4 : Distribution 3D de la densité (masse volumique) de la diatomée analysée, obtenue par le code DISRA. Différentes orientations de l'objet ont ici été représentées sur les images en isodensités (a-d). Les isodensités employées sont ici voisines de zéro pour le jaune (surface externe de l'échantillon), de $0,16 \text{ g.cm}^{-3}$ pour le vert et de $0,33 \text{ g.cm}^{-3}$ pour le rouge. L'image au centre (e) montre l'ensemble du volume voxellisé, sur une échelle allant de zéro (rouge transparent) jusqu'à la valeur maximale $0,87 \text{ g.cm}^{-3}$ (jaune opaque).

5.1.5 Résultats comparatifs

Les résultats présentés précédemment (5.1.3) montrent que les images reconstruites par les deux codes DISRA et TomoRebuild sont sensiblement identiques, les différences d'aspect étant dues à la nature intrinsèque des méthodes de reconstruction employées. Afin de valider d'un point de vue quantitatif les valeurs de densité reconstruites, nous avons comparé les valeurs moyennes obtenues dans 3 régions d'intérêt : processus labiés, ocelle, frustule, représentées ci-après (fig. 5.5). Cette comparaison a été réalisée avec deux objectifs : vérifier l'équivalence des valeurs de densité données par DISRA et TomoRebuild, et valider les résultats obtenus par microfaisceau de particules alpha, par comparaison aux résultats obtenus par protons dans les mêmes conditions (tableau 5.2).

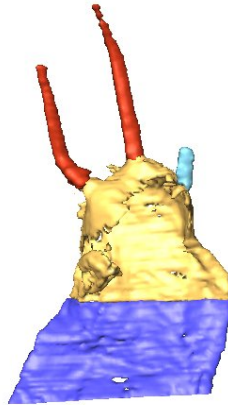


Figure 5.5 : Sélection de trois régions d'intérêt : processus labiés (rouge), ocelle (bleu clair) et portion du frustule (bleu foncé) pour le calcul de densités moyennes dans différentes conditions d'analyse.

Régions	Alphas (2.8 MeV)		Protons (3.0 MeV)	
	TR	DISRA	TR	DISRA
processus labiés	$0,53 \pm 0,23$	$0,61 \pm 0,29$	$0,53 \pm 0,21$	$0,47 \pm 0,25$
ocelle	$0,191 \pm 0,078$	$0,27 \pm 0,15$	$0,193 \pm 0,057$	$0,210 \pm 0,065$
frustule	$0,199 \pm 0,057$	$0,21 \pm 0,11$	$0,214 \pm 0,084$	$0,219 \pm 0,089$

Tableau 5.2: Calculs de densité moyenne dans différentes régions de la diatomée, à partir des tomogrammes reconstruits à l'aide de TomoRebuild (TR) et de DISRA. Les régions sélectionnées sont respectivement composées de 637 voxels pour les processus labiés, 123 voxels pour l'ocelle et 7901 voxels pour le frustule. Les incertitudes indiquées représentent seulement l'écart type calculé.

Conclusion

Le tableau 5.2 confirme que les processus labiés ont une densité plus forte que le reste de l'échantillon (2,5 fois plus environ). Les densités moyennes obtenues à partir des deux codes DISRA et TomoRebuild sont relativement proches et ce, quelles que soient les conditions expérimentales (alphas, protons). Au niveau du temps requis pour la reconstruction en revanche, l'obtention de l'image 3D requiert environ 18 minutes pour DISRA (après 6 itérations) contre 2,5 minutes avec TomoRebuild.

Ces constatations confirment le fait qu'un algorithme analytique conviendrait tout à fait pour la reconstruction d'images de tomographie en transmission STIMT, et serait même préférable du point de vue de la simplicité de mise en œuvre et de la rapidité de la reconstruction. En revanche, l'utilisation de DISRA s'avère indispensable dans les deux exemples que nous allons présenter dans la suite de ce chapitre, pour le traitement des données de tomographie par émission PIXET.

5.2 Analyse STIMT / PIXET d'un échantillon de référence

5.2.1 Caractéristiques des échantillons de référence

Des microbilles de verre borosilicaté fabriquées par Duke Scientific Corporation (Etats-Unis) fournies par Brookhaven Instruments (Royaume-Uni) ont été choisies comme modèle de référence pour l'étude STIMT / PIXET du fait de différentes caractéristiques (fig. 5.6 et table 5.3) :

- leur forme régulière sphérique ;
- leur taille, le diamètre certifié pour ce lot étant de $5,6 \mu\text{m} \pm 0,5 \mu\text{m}$, comparable à la taille de structures cellulaires d'intérêt (cytoplasme / noyau), et proche du diamètre du microfaisceau ;
- leur masse volumique relativement faible ($2,5$ à $2,55 \text{ g.cm}^{-3}$) ;
- leur composition, comportant des éléments détectables par émission X à différentes énergies et différents teneurs, permettant de tester ainsi la sensibilité de la technique et la capacité du code DISRA à corriger l'atténuation des raies X de faible énergie provenant des éléments légers.



Figure 5.6 : Image de microscopie à balayage des microbilles standard de verre borosilicaté utilisées pour l'élaboration d'échantillons de référence en tomographie STIM/PIXE.

Composition	Verre borosilicate (% en masse)		Composition	Fraction de masse (g.g⁻¹)
SiO₂	52.5		O	0.476
Na₂O	0.3		Si	0.245
CaO	22.5		Ca	0.160
MgO	1.2		Al	0.077
Al₂O₃	14.5			
FeO/Fe₂O₃	0.2			
K₂O	0.2			
B₂O₃	8.6			

Tableau 5.3 : Composition indicative des microbilles de verre borosilicaté utilisées pour l'élaboration d'échantillons de référence en tomographie STIM/PIXE .

Des microbilles de verre ont été mélangées à un polymère sous forme liquide (formvar C₃H₈O dilué dans du chloroforme CHCl₃). Des fils ont alors été étirés, puis séchés à l'air. Le diamètre des fils choisis comme échantillons de référence était compris entre 50 et 100 µm, de façon à constituer un test suffisamment drastique pour l'atténuation des raies X. Ces fils ont été montés au sommet d'un axe de rotation constitué d'une fine aiguille métallique recouverte à son extrémité par de la colle époxy (fig. 5.7).

Nous présenterons les résultats obtenus sur l'un de ces échantillons (fig. 5.7.b), qui présentait une fine protubérance sur sa surface externe, que l'on pourra retrouver sur les images de tomographie 3D.

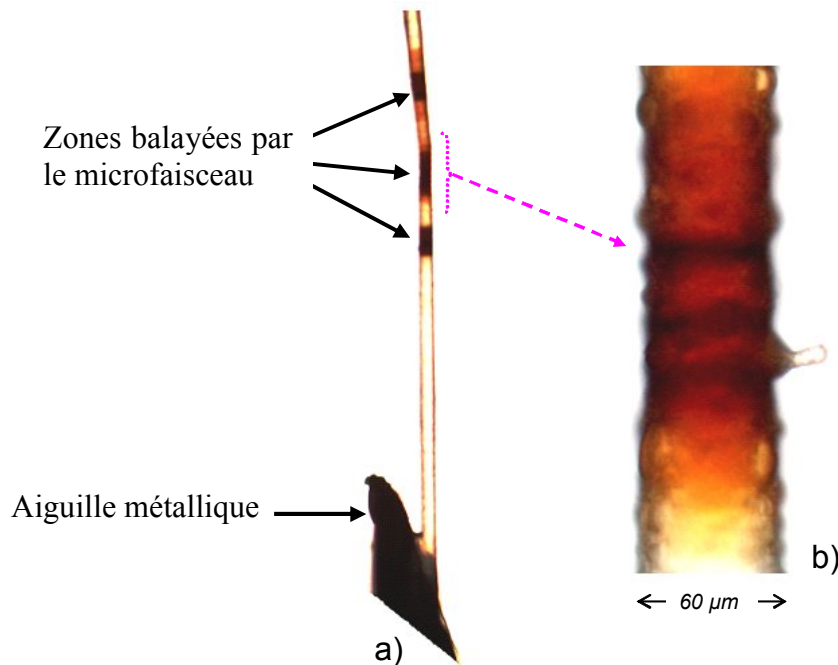


Figure 5.7 : Aspect, en microscopie optique, de l'un des échantillons de référence analysés par tomographie STIM/PIXE. Le fil de polymère contenant des microbilles de verre borosilicaté (non visibles sur ces photos) est monté au sommet d'une aiguille métallique (a). Les dommages sous faisceau conduisent à un brunissement visible a posteriori sur la zone balayée (a et b). Les résultats présentés ci-après correspondent à la zone (b).

5.2.2 Conditions expérimentales

Les échantillons de référence ont été analysés tout d'abord en STIMT 3D dans des conditions expérimentales détaillées dans le tableau 5.4, avec un faisceau de protons de 3 MeV, d'un diamètre de l'ordre de $0,9 \mu\text{m}$ et d'une intensité de l'ordre du millier d'ions par seconde (collimateur objet de $5 \mu\text{m}$ de diamètre). Le volume sondé a été reconstruit par DISRA afin de visualiser la structure interne de l'échantillon. Des plans de coupe isolés ont alors été sélectionnés pour la PIXET, réalisée dans un deuxième temps, après avoir augmenté l'intensité du faisceau jusqu'à quelques centaines de picoampères, en augmentant pour cela la taille des collimateurs (collimateur objet de $20 \mu\text{m}$ de diamètre). La figure 5.8 représente la configuration de la chambre d'analyse pour cette expérience. Le calcul de l'atténuation des rayes X est conditionné, entre autres, par la position du détecteur et le sens de rotation de l'échantillon sous faisceau.

Paramètres expérimentaux	STIMT 3D	PIXET 2D
Volume analysé	64 plans	1 plan
Nombre de projections	100	100
Nombre de rayons par projection	128	128
Intervalle angulaire	180°	180°
Taille du balayage	100 × 100 μm ²	100 μm
Largeur d'un pixel	0.78 μm	0.78 μm
Durée par pixel	1 ms (répété sur 3 balayages)	6,5 ms / pixel (répété sur 20 balayages)
Charge totale déposée au cours de l'acquisition	~ 0,1 nC	45 nC
Charge moyenne déposée par pixel	-----	~1,8 pC
Durée d'acquisition	45 minutes	40 minutes

Tableau 5.4 : Paramètres utilisés pour l'étude STIMT 3D / PIXET 2D de l'échantillon de référence dont les résultats sont présentés ci-après.

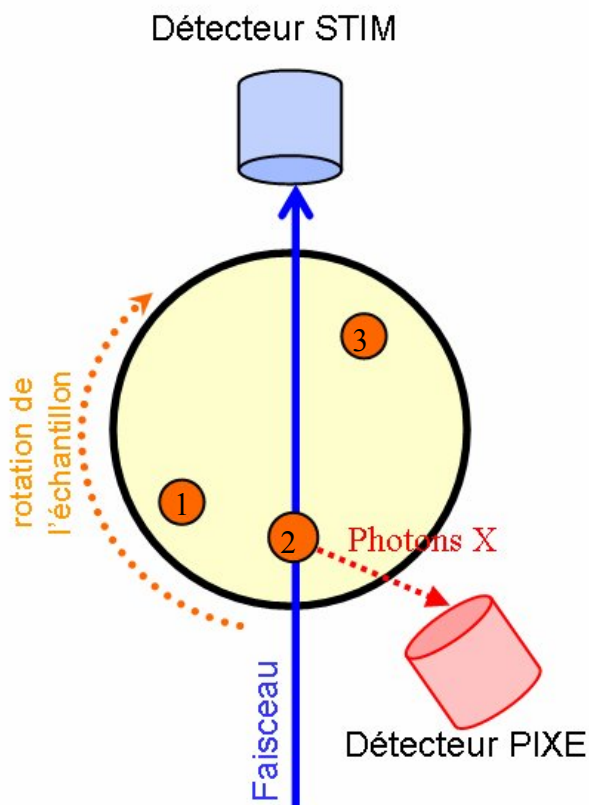


Figure 5.8 : Schéma du dispositif expérimental pour l'analyse de l'échantillon de référence. Le détecteur PIXE se situe vers l'arrière, à -45°. L'angle est orienté en fonction du sens de rotation de l'objet sous faisceau. Rappelons que l'acquisition est effectuée en deux temps, tout d'abord en STIMT, puis en PIXET, avec des intensités de faisceau sur cible différentes. Trois microsphères ont été représentées sur ce schéma, numérotées de 1 à 3 par comparaison avec le tomogramme reconstruit figure 5.16.

5.2.3 Tomographie STIMT 3D

La présence de microbilles de verre à l'intérieur de l'échantillon analysé est visible sur les images STIM et PIXE « classiques » obtenues par un balayage 2D (fig 5.9) de la zone présentée sur la figure 5.7b. Cependant, l'examen de ces seules images ne permet pas de discerner la position des ces microbilles dans le volume sondé. Une étude en tomographie STIM 3D, réalisée ici à partir d'une rotation de l'objet sur 180°, permet de répondre à cette question, en dévoilant la structure interne de l'échantillon (fig. 5.10 et 5.11).

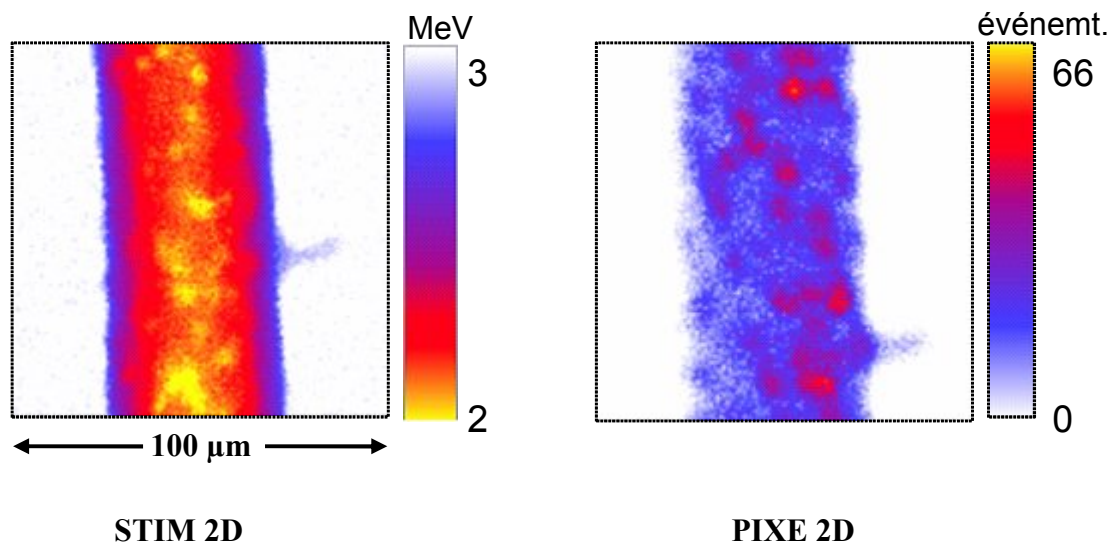


Figure 5.9 : Images STIM et PIXE 2D « classiques » montrant la première projection de l'échantillon analysé (à l'angle $\theta = 0$). Pour le STIM 2D, l'échelle de couleurs représente l'énergie transmise (valeur médiane par pixel), le blanc représentant faisceau (3 MeV), c'est-à-dire l'extérieur de l'échantillon. Pour le PIXE 2D, l'échelle de couleurs indique le nombre d'événements collectés pas pixel pour l'ensemble du spectre.

Comme dans l'exemple précédent, la distribution 3D de la densité a été représentée selon deux procédés différents sur les figures 5.10 et 5.11 :

- Une représentation en isosurfaces pour la figure 5.10 : une première isosurface à une valeur proche de zéro indique le contour de l'échantillon (en jaune). Par transparence, on a représenté les régions de forte densité (en rouge), révélant ainsi les microbilles. Les fluctuations locales de la densité sur le pourtour des billes rendent toutefois difficile de discerner correctement leur forme sphérique, qui apparaît de façon plus claire dans le plan de coupe (fig. 5.10c) ;
- La représentation du volume voxellisé total (fig. 5.11) : bien que plus complexe, elle permet de mieux mettre en évidence la structure réelle des microbilles imagées par le

faisceau (en jaune). Sur cette image en effet, l'ensemble des densités est représenté, sur une échelle allant du rouge transparent pour les densités les plus faibles, jusqu'au jaune opaque pour les plus fortes.

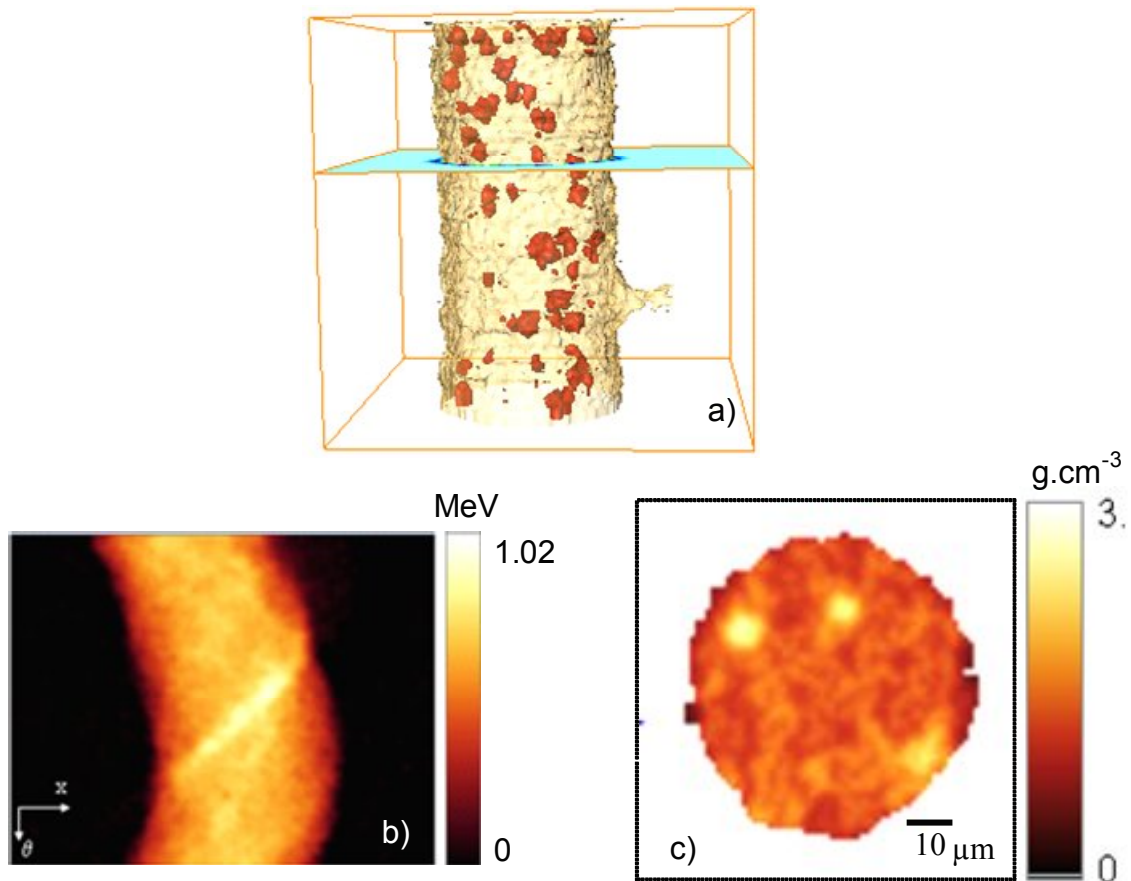


Figure 5.10 : Reconstruction STIMT 3D de l'échantillon de référence précédemment décrit (a). Les deux isosurfaces correspondent respectivement aux densités voisines de zéro (en jaune transparent) et à la valeur $0,78 \text{ g.cm}^{-3}$ (en rouge). Le plan de coupe sélectionné pour l'analyse PIXET est précisé. Le sinogramme STIMT correspondant est représenté (b), l'échelle de couleurs représentant ici le ralentissement des ions en MeV. L'image reconstruite de la densité obtenue par DISRA est présentée en (c).

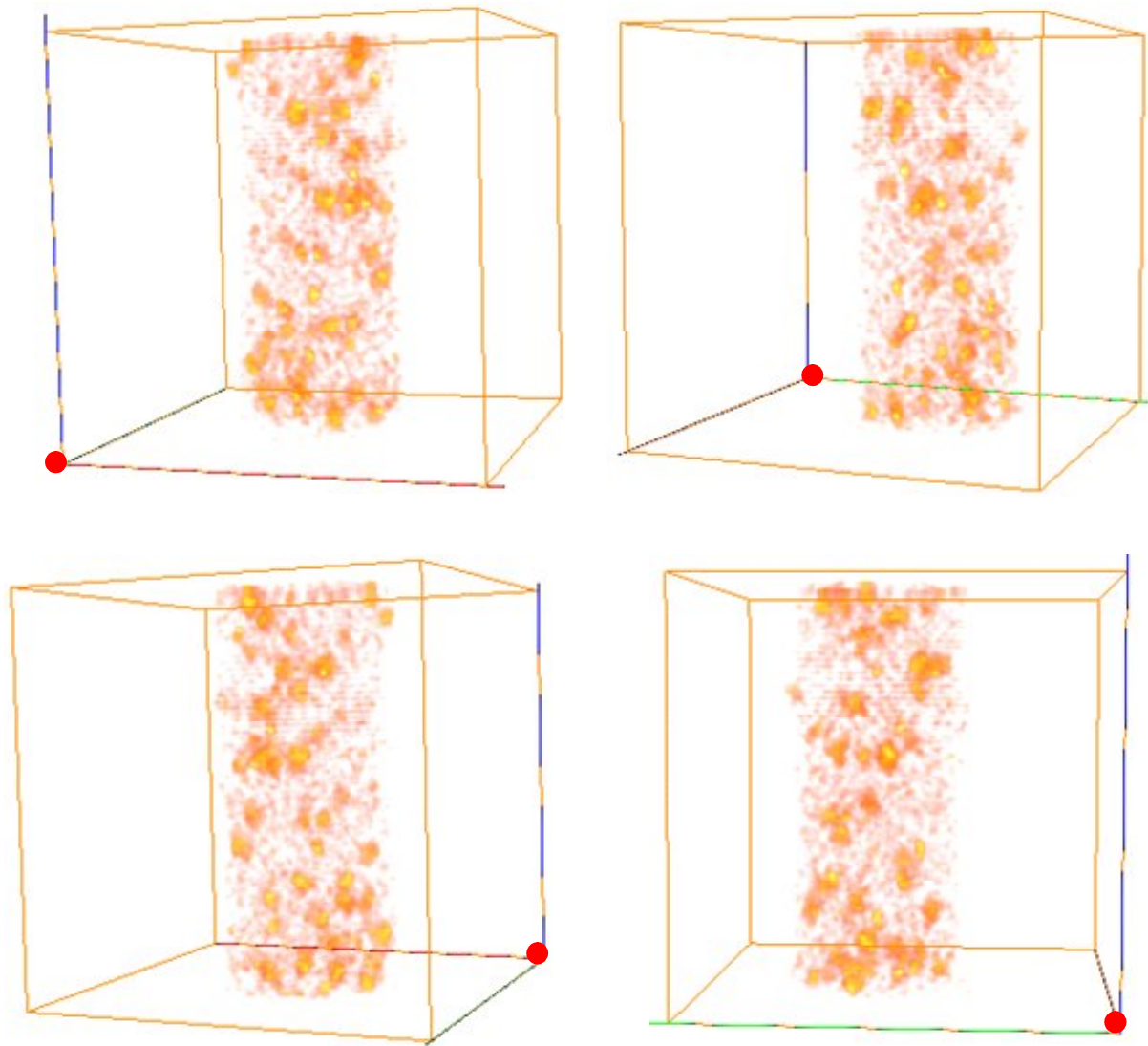


Figure 5.11 : Représentation de la structure interne de l'échantillon de référence analysé en STIMT 3D - le volume de données est identique à la figure 5.10. Quatre orientations différentes sont ici visualisées, en utilisant une échelle allant de la densité $1,56 \text{ g.cm}^{-3}$ pour le rouge transparent à la densité $2,8 \text{ g.cm}^{-3}$ pour le jaune opaque. L'orientation est repérée par le point rouge à l'angle en bas du cube de données.

Du point de vue quantitatif, nous constatons que la résolution spatiale obtenue avec le microfaisceau permet de discerner les microbilles. Le diamètre obtenu est compris entre 5 et 6 μm , ce qui est compatible avec la valeur certifiée de $5,6 \mu\text{m} \pm 0,5 \mu\text{m}$ donnée pour ce lot (fig. 5.10c). La densité obtenue à l'intérieur des microbilles est $(2,50 \pm 0,15) \text{ g.cm}^{-3}$, comprise dans l'intervalle donnée par le fabricant, de 2,5 à $2,55 \text{ g.cm}^{-3}$. Enfin, pour la matrice en formvar, nous avons mesuré une densité d'environ $(1,28 \pm 0,09) \text{ g.cm}^{-3}$. Les incertitudes données ici sont seulement les écarts-types de la variation de densité dans les régions d'intérêt.

5.2.4 Reconstruction de référence et tomogramme à l'ordre zéro

Les raies de 4 éléments d'intérêt ont été définies sur le spectre PIXET : aluminium, silicium, chlore et calcium. Bien que d'autres éléments apparaissent sur le spectre, la statistique de comptage s'est révélée insuffisante pour reconstruire leur distribution, le rapport signal sur bruit étant défavorable.

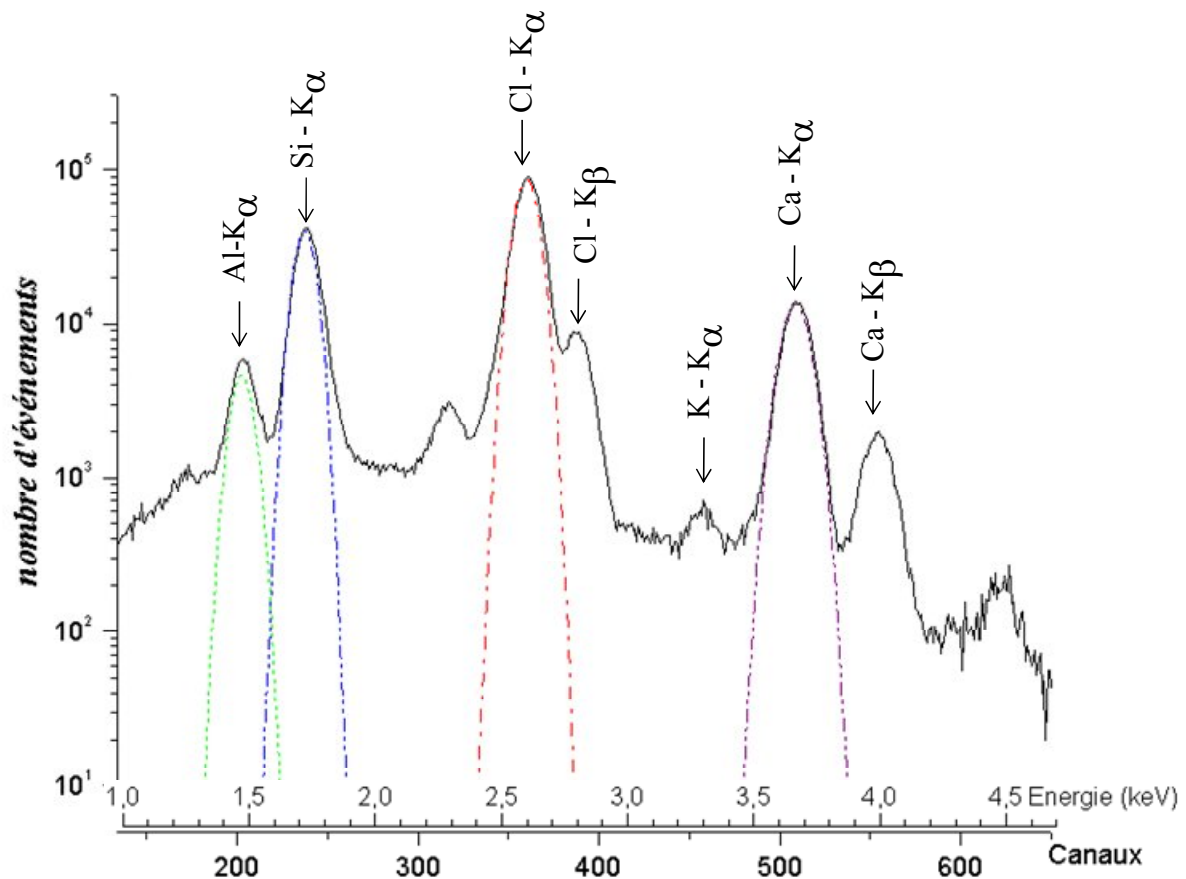


Figure 5.12 : Spectre PIXET collecté sur 100 projections mesurées sur 180°, correspondant à une durée totale d'acquisition de 45 minutes, soit environ 130 ms au total pour chaque pixel (rayon de projection).

Les événements mesurés dans chaque raie sont représentés sous formes des sinogrammes dans la figure 5.13. Les trajectoires sinusoïdales de trois microbilles apparaissent sur les sinogrammes de Al, Si et K. Le chlore en revanche ne provient pas des microbilles mais du chloroforme qui a été utilisé pour dissoudre le formvar. Dans le cas de l'aluminium notamment, on constate une forte atténuation des raies X caractéristiques ($K_{\alpha} = 1,48$ keV), due à la densité, relativement élevée si on la compare à un échantillon biologique réel, de cet échantillon de référence (supérieure à $1,2 \text{ g.cm}^{-3}$). Les valeurs des coefficients d'atténuation sont données à titre indicatif dans le tableau 5.5. Elles ont été calculées à l'aide du logiciel GUPIX (Maxwell et al. 1989) en supposant un trajet des rayons X dans $60 \mu\text{m}$ de matériau

d'une composition homogène de formvar (C_3H_8O). Notons le cas de l'Al, qui est ici particulièrement drastique.

Raie X	Coefficient atténuation (%)
Al ($K_{\alpha} = 1,48$ keV)	99,8
Si ($K_{\alpha} = 1,74$ keV)	98,1
Cl ($K_{\alpha} = 2,62$ keV)	69,9
Ca ($K_{\alpha} = 3,69$ keV)	35,1

Tableau 5.5 : Coefficients d'atténuation (en %) pour les 4 éléments dosés dans l'échantillon de référence, après traversée de 60 μm de formvar.

La rétroprojection filtrée de ces sinogrammes a permis d'obtenir les reconstructions de référence présentées au-dessous (fig. 5.13). La position des trois billes apparaît sur les distributions en Al, Cl et Ca. La très forte atténuation des raies X de l'aluminium est particulièrement visible pour les 2 billes les plus éloignées du détecteur, placé à 45° vers l'arrière dans la chambre d'analyse, ce qui correspond à l'angle en bas à droite de ces images.

La cartographie du chlore, dont une répartition homogène aurait pu être attendue a priori, révèle en réalité des hétérogénéités dans la composition du formvar, puisque les deux zones riches en chlore (flèches figure 5.13) n'apparaissent pas dans la cartographie de la densité (fig. 5.10c).

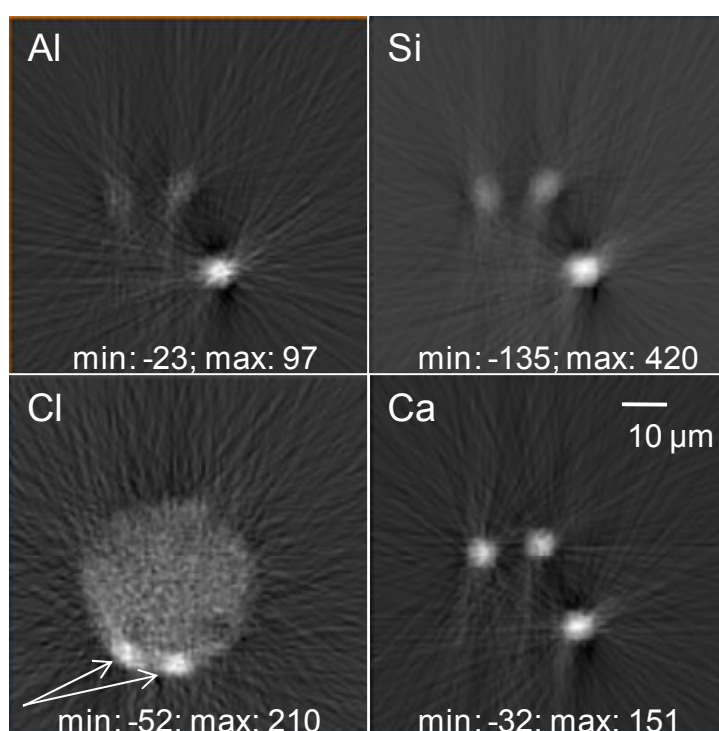
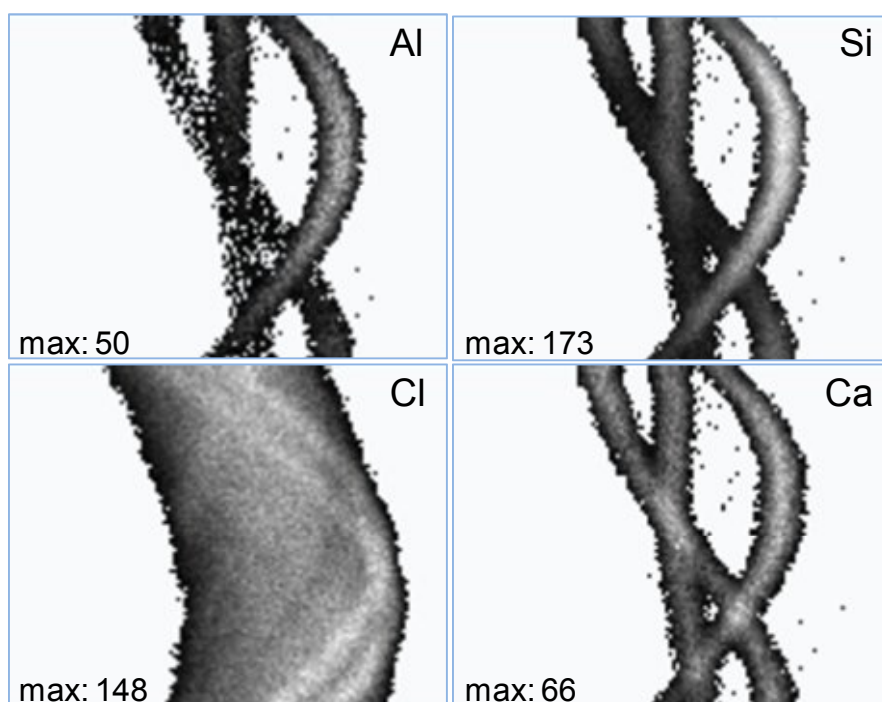


Figure 5.13 : Analyse PIXET du plan de coupe présenté fig. 5.10. Les 4 sinogrammes correspondants aux événements des raies K_{α} de Al, Si, Cl et Ca sont représentés en haut. Au-dessous figurent les 4 distributions obtenues directement par rétroprojection filtrée de ces sinogrammes, appelées « reconstructions de référence » dans le code DISRA. L'ensemble de ces images est codé sur une échelle de gris linéaire allant de la valeur minimale à la valeur maximale indiquée.

Ces reconstructions purement qualitatives sont utilisées comme point de départ des itérations, en construisant le tomogramme à l'ordre zéro (fig. 5.14). Ce dernier est obtenu ici après trois étapes :

- Correction des valeurs négatives et/ou aberrantes présentes dans la reconstruction de référence en utilisant notamment un seuil, recalculé à chaque voxel, sur l'image de la densité.
- Mise à zéro des voxels à l'extérieur de l'échantillon par comparaison des images PIXET et STIMT.
- Normalisation des valeurs par voxel afin de partir de valeurs de densité et de fractions de masse réalistes et telles que la somme des fractions de masse soit égale à 1.

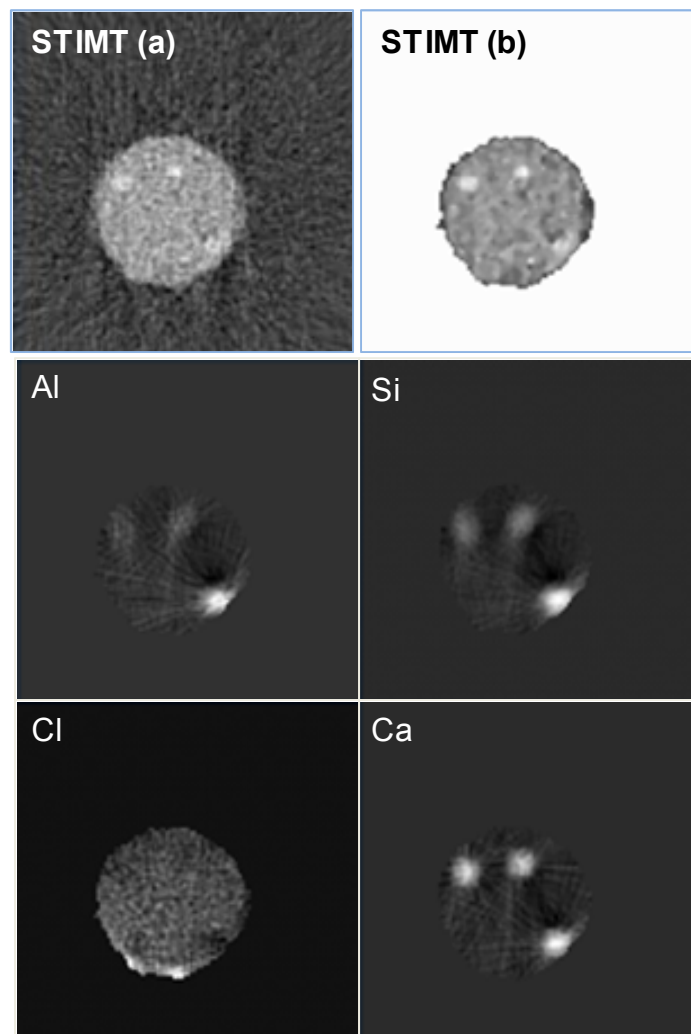


Figure 5.14 : Tomogramme à l'ordre zéro obtenu à partir des reconstructions de référence (a), par seuillage de l'image STIMT originelle (a → b) puis par correction des distributions de référence PIXET (Al, Si, Cl, Ca) à partir de l'image STIMT seuillée.

Le résultat de ces différentes étapes est également illustré sur la figure 5.15, sur un profil réalisé sur une ligne horizontale dans le plan de coupe reconstruit. On vérifie notamment que le tomogramme T_0 obtenu à partir de la reconstruction de référence R_e ne présente plus de fractions de masse négatives et que les valeurs fluctuant autour de zéro à l'extérieur de l'échantillon sont mises strictement à zéro.

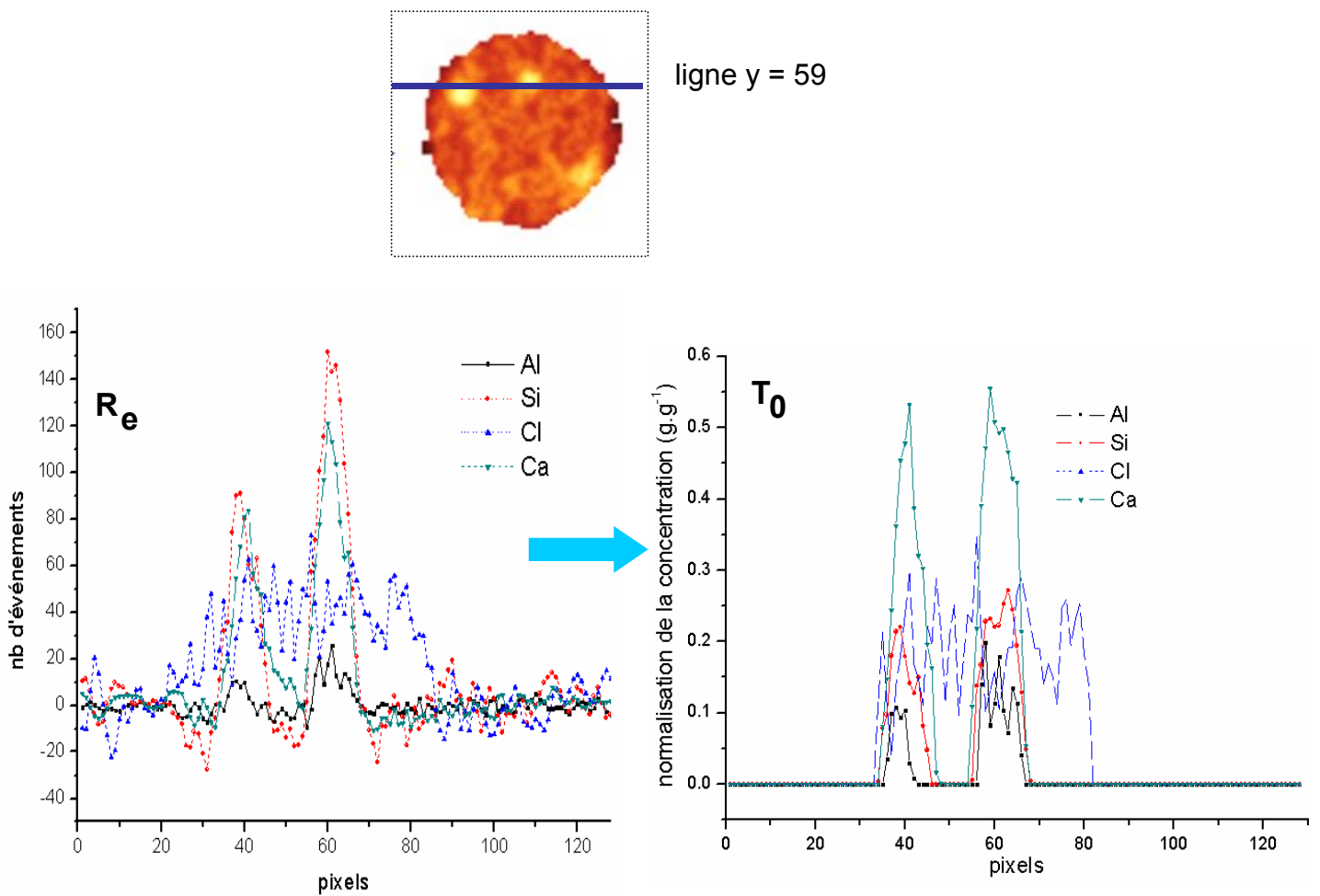


Figure 5.15 : Profils réalisés le long de la ligne $y = 59$ du plan de coupe analysé, faisant apparaître la distribution des éléments mesurés (Al, Si, Cl, Ca) d'une part dans la reconstruction de référence (R_e , à gauche) et d'autre part dans le tomogramme corrigé et normalisé à l'ordre zéro (T_0 , à droite) qui en découle.

5.2.5 Comparaison des résultats obtenus avec et sans correction d'atténuation

La distribution quantitative des éléments dans le plan analysé est représentée figure 5.16. Les images obtenues montrent que le calcul d'atténuation des raies X est indispensable, notamment pour les distributions en Al et Si, les billes numérotées 1 et 2 étant les plus atténuées ici. Les valeurs de concentrations données à titre indicatif pour les trois billes confirment cette constatation. Les concentrations obtenues dans les trois billes sont très proches lorsque l'atténuation des raies X est prise en compte. Notons ici la robustesse du programme de reconstruction, qui parvient à obtenir des valeurs de concentration correctes dans le cas le plus extrême de la bille 1, la plus éloignée du détecteur, dont le signal est quasi totalement atténué pour Al.

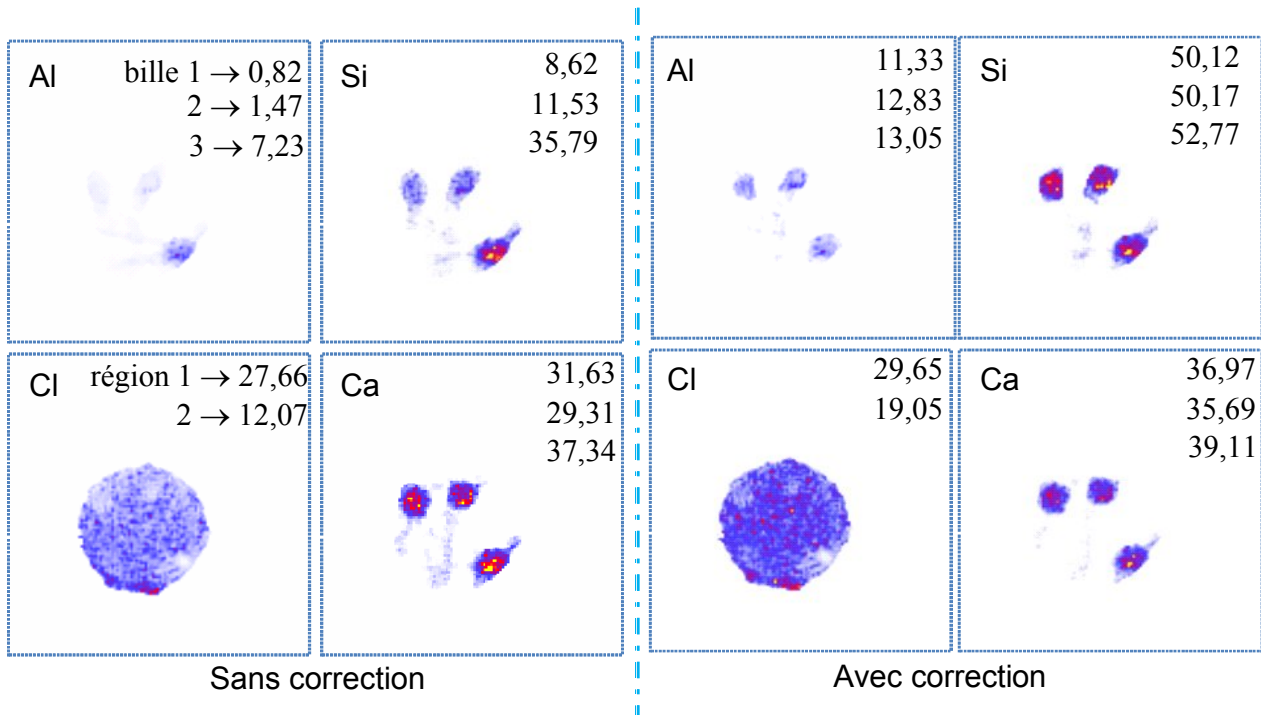


Figure 5.16 : Distribution des concentrations élémentaires dans le plan de coupe analysé. Les concentrations moyennes (en mg/g) sont reportées à titre indicatif pour chaque microsphère (notées bille 1, 2, 3 comme indiqué sur le schéma au-dessus) et pour les deux régions significativement différentes dans la distribution du chlore (notées 1 et 2).

Ces résultats ne correspondent pourtant pas aux concentrations connues pour le matériau de verre borosilicaté utilisé pour la fabrication de ces microbilles. Bien que ces valeurs soient à considérer à titre indicatif, car elles sont susceptibles de variations locales d'une microbille à l'autre, le calcul d'atténuation des raies X ne suffit pas à s'en approcher de façon satisfaisante, comme le montre la figure 5.17.

En valeurs relatives, la comparaison du rapport des concentrations Al/Ca et Si/Ca est plus favorable, comme l'indique la figure 5.18.

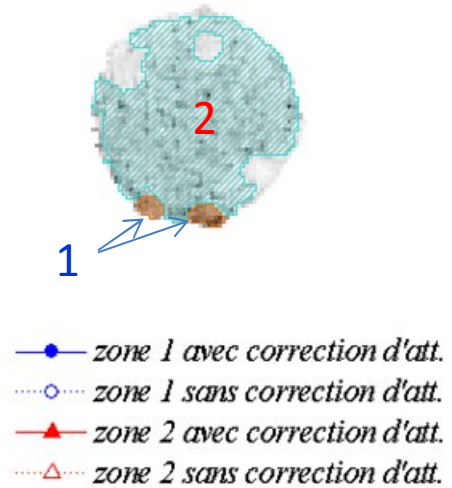
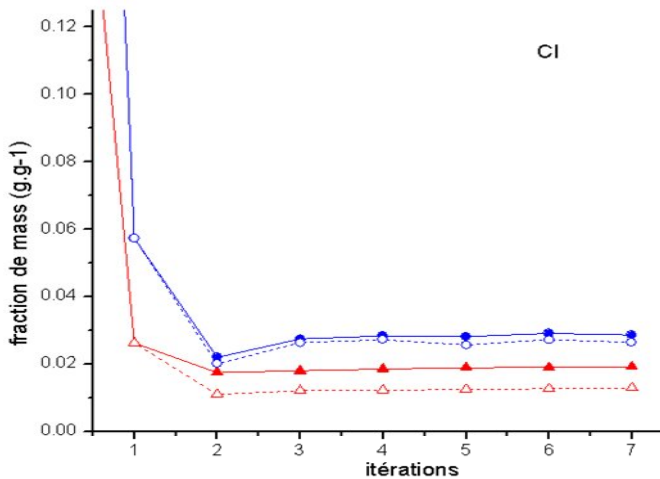
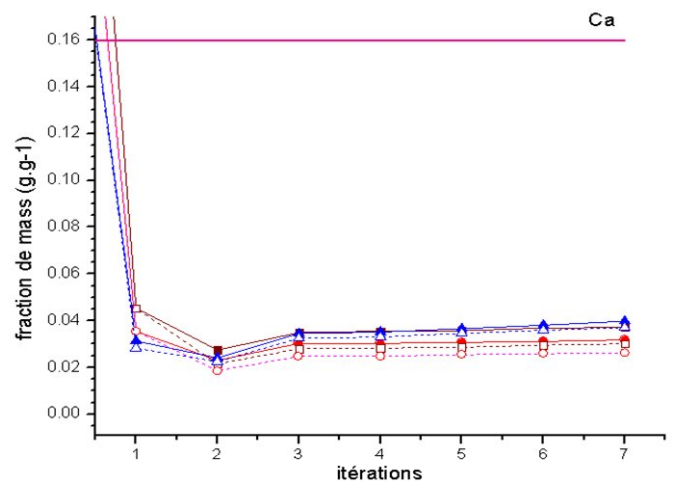
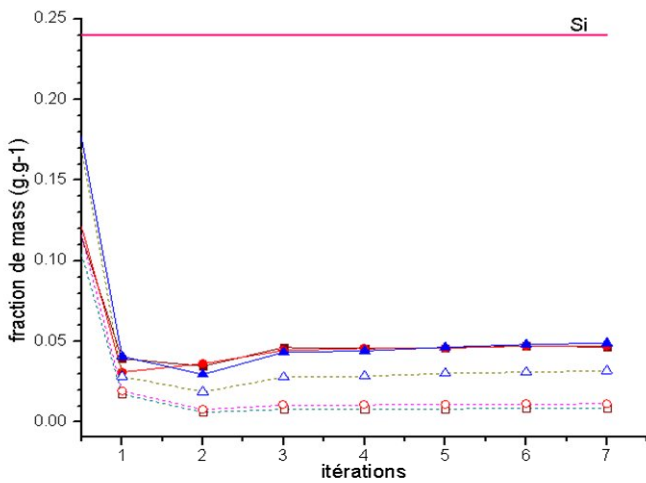
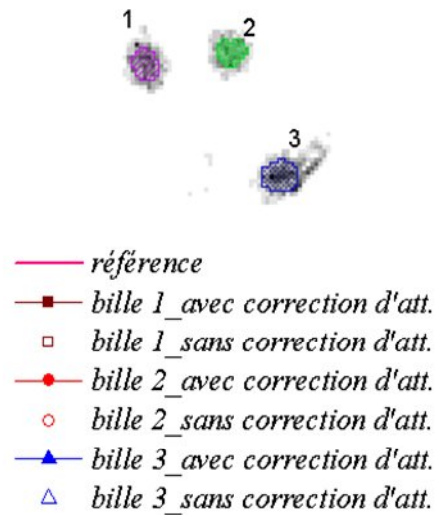
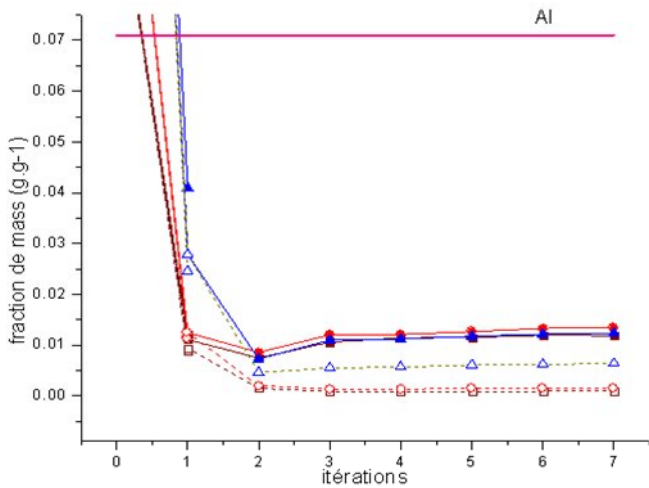


Figure 5.17 : Evolution des concentrations moyennes (g.g^{-1}) à chaque itération dans différentes régions d'intérêt : les trois billes de verre borosilicaté (numérotées de 1 à 3) et les deux régions distinctes par leur concentration en chlore dans la matrice de formvar (notées 1 et 2). La reconstruction a été effectuées dans les deux cas : avec (traits pleins) et sans (pointillés) correction d'atténuation. Les concentrations de référence en Al, Si, Ca données par le fabricant pour le matériau ayant servi à la fabrication des microbilles sont représentées pour comparaison.

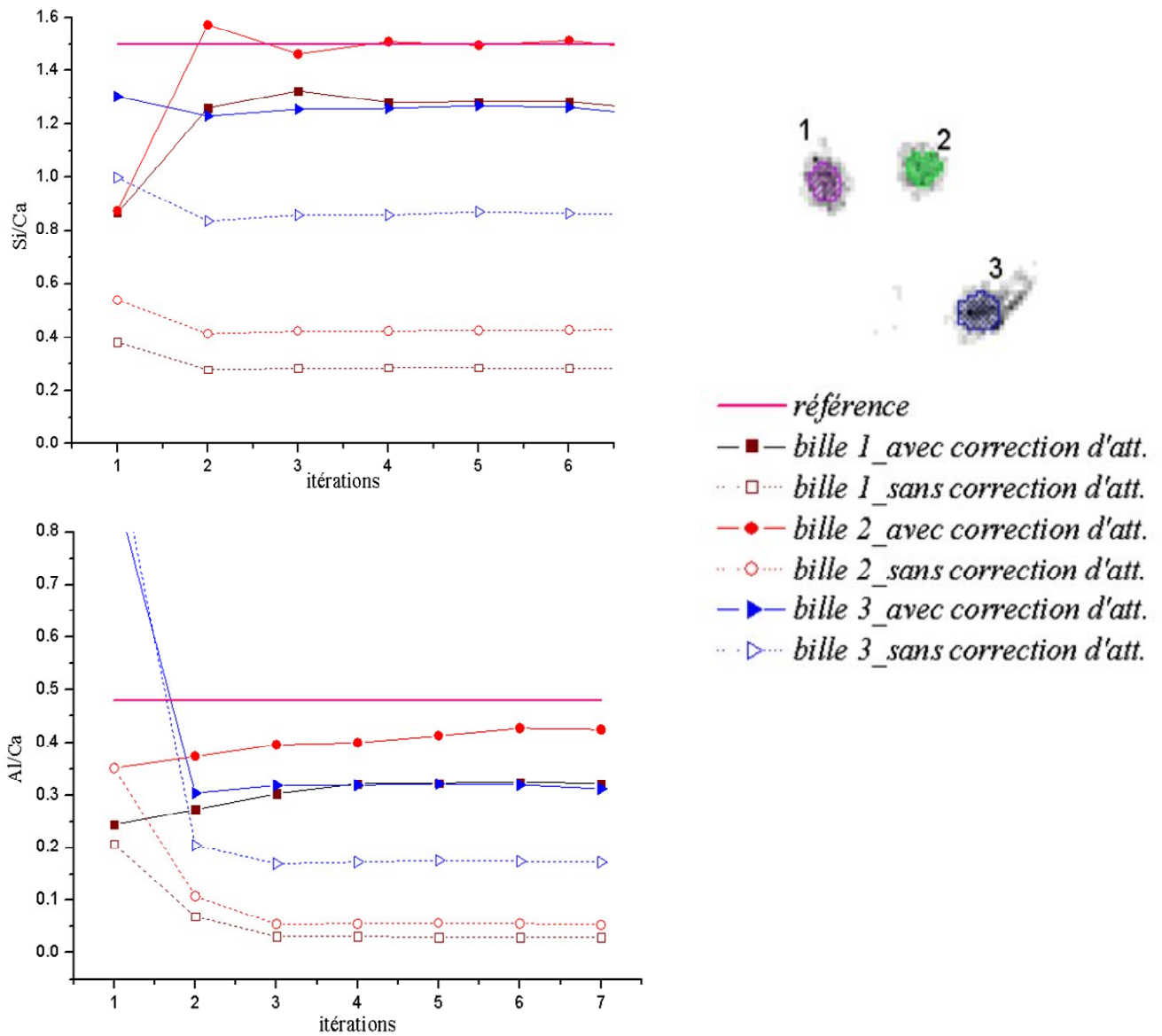


Figure 5.18 : Rapport des concentrations des éléments Al/Ca et Si/Ca dans chaque microbille en fonction du nombre d'itérations. Les résultats de reconstruction avec (trait plein) et sans (pointillés) calcul d'atténuation des raies X sont représentés. La valeur de référence donnée par le fabricant est indiquée par une ligne horizontale pour comparaison.

5.2.6 Discussion sur les paramètres numériques et expérimentaux

Pour résumer, la reconstruction STIMT/PIXET de l'échantillon de référence apparaît satisfaisante, lorsque l'atténuation des raies X est prise en compte, du point de vue de la qualité des images obtenues et de la reproductibilité des concentrations calculées pour les différentes microbilles. Sur l'aspect quantitatif absolu en revanche, seul les rapports de concentrations s'approchent des valeurs attendues. Plusieurs raisons peuvent être évoquées pour expliquer l'écart obtenu par rapport aux teneurs données par le fabricant.

* Charge

Tout d'abord notre dispositif expérimental ne permet qu'une mesure approchée de la charge déposée sur l'échantillon. Au cours de l'expérience PIXET, les ions transmis sont collectés dans une cage de Faraday. La charge collectée au niveau du porte-échantillon est également prise en compte, nos échantillons n'étant pas conducteurs. Des phénomènes de charge d'espace perturbent cependant ces mesures, les rendant peu fiables en réalité. En outre les temps morts de l'acquisition ne sont pas pris en compte dans cette mesure (Nous avons essayé de les estimer pour ces expériences en mesurant les durées réelles de balayage afin d'en déduire la durée d'acquisition réelle). Pour des échantillons similaires, la comparaison de la charge mesurée par cette méthode et de la valeur précise de charge obtenue par traitement de spectres de rétrodiffusion Rutherford (RBS : Rutherford Backscattering Spectrometry) confirme qu'en général la valeur obtenue par mesure directe est peu fiable.

En se basant sur l'élément le moins atténué, ici le Ca, nous avons estimé qu'une charge de 0,4 pC, au lieu de la valeur 1,8 pC précédemment utilisée, permet de s'approcher des valeurs de données par le fabricant pour le Ca (160 mg.g^{-1}) et le Si (245 mg.g^{-1}). La valeur pour Al (77 mg.g^{-1}) présente encore un écart d'environ 30 % (fig. 5.19).

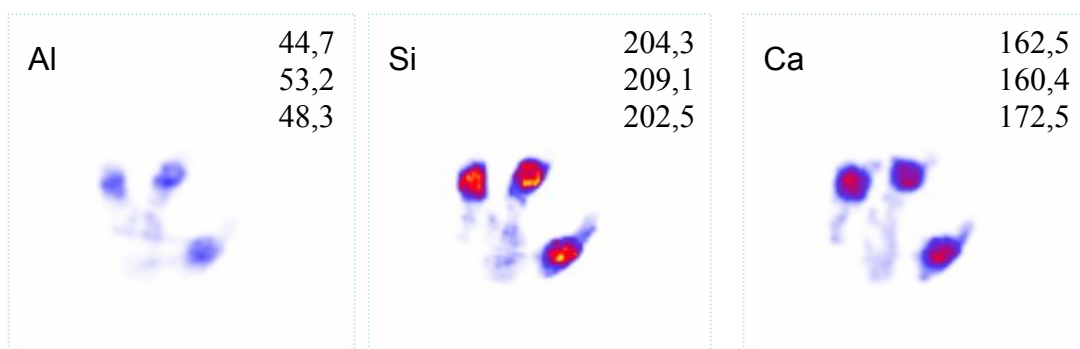


Figure 5.19 : Distribution des concentrations élémentaires en Al, Si et Ca dans le plan de coupe analysé. Les concentrations moyennes (en mg/g) sont reportées pour chaque microsphère, le calcul d'atténuation ayant été ici pris en compte. Une charge de 0,4 pC a été utilisée, au lieu de 1,8 pC comme dans les calculs précédemment présentés.

*** Atténuation**

Le calcul d'atténuation pourrait également être biaisé dans cette expérience sur deux aspects. D'une part, les raies X de l'Al sont quasi totalement atténuées après traversée de l'échantillon. Les conditions sont de ce fait particulièrement drastiques. Nous pourrions imaginer qu'une acquisition sur un intervalle angulaire de 360°, au lieu de 180°, aurait peut être été dans ce cas préférable.

Un autre point nous paraît crucial pour cet échantillon : l'extension du code DISRA développée au CENBG repose sur l'approximation que la composition globale de l'échantillon (ici considérée comme étant du formvar) est homogène en dehors du plan de coupe considéré. Seules les variations 3D de densité, données par STIMT, sont prises en compte dans le calcul de l'atténuation des raies X. Dans le cas présent, cette approximation trouve vraisemblablement ses limites pour l'atténuation, particulièrement sensible, des photons de l'élément Al. Notons que le cas d'un échantillon biologique réel serait plus favorable, car la composition globale serait dans ce cas plus uniforme.

5.3 Analyse STIMT / PIXET d'une cellule humaine isolée

Les premiers tests de microtomographie par faisceau d'ions sur cellules humaines isolées ont été réalisés il y a une dizaine d'années au CENBG (Michelet, 1998). Comme aucun code de reconstruction adapté n'existait auparavant pour traiter ce type de données, une simple rétroprojection filtrée des nombres d'événements mesurés avait été effectuée, afin d'obtenir les distributions élémentaires d'un point de vue purement qualitatif, sans aucune normalisation des résultats ni aucun calcul d'atténuation. Le développement algorithmique réalisé depuis, à partir du code DISRA, permet maintenant de traiter de façon complète ces données expérimentales.

5.3.1 Préparation des échantillons

Des cellules de la lignée cancéreuse ovarienne humaine IGROV1-DDP, cultivées sur support polymère mince, avaient été cryofixées et lyophilisées afin de permettre l'analyse sous vide. Deux morphotypes cellulaires, visibles sur le cliché de microscopie optique suivant (fig. 5.20), coexistent dans cette lignée :

- De « petites » cellules rondes réfringentes d'un diamètre de l'ordre de 10 μm ;

- des cellules de grande taille (plusieurs dizaines de microns de diamètre), de forme plus irrégulière, présentant une structure interne très complexe, avec un noyau constitué de plusieurs lobes nucléaires présentant des nucléoles très denses de taille variable (de 1 à 5 μm généralement).

Des cellules sélectionnées pour leur forme régulière et leur bon état de lyophilisation avaient été fixées au sommet d'un axe de rotation constitué d'une microfibre de verre, à l'aide de colle époxy déposée à l'extrémité de la fibre. L'échantillon étudié ci-après présente une structure très similaire au cliché figure 5.20.

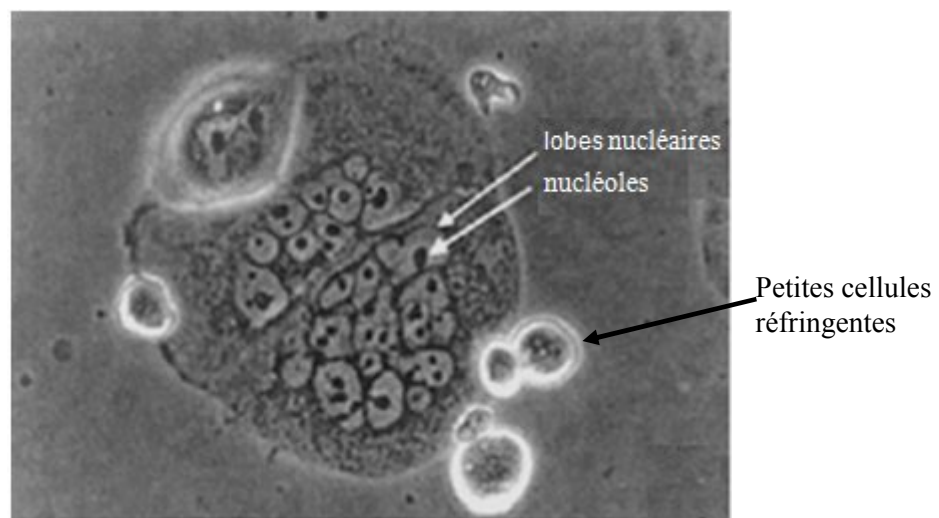


Figure 5.20 : Cellules de la lignée cancéreuse humaine IGROV1-DDP en culture, photographiées en microscopie optique. Les deux types cellulaires coexistant dans cette lignée apparaissent. La structure interne des cellules de plus grande taille présente des éléments caractéristiques (lobes nucléaires, nucléoles) qui sont précisés.

5.3.2 Conditions expérimentales

Un groupe de cellules d'une soixantaine de micromètres de diamètre a été analysé en STIMT/PIXET sur la microsonde du CENBG à l'aide d'un faisceau de protons de 2,8 MeV, dans les conditions suivantes (tableau 5.5). Le détecteur, d'une surface de 60 mm², était placé à un angle de 45° vers l'arrière, à une distance de 2,6 cm du centre de cible, définissant un angle solide de détection de 88,8 msr.

Paramètres expérimentaux	STIMT 3D	PIXET 2D
Volume analysé	64 plans	1 plan
Nombre de projections	100	100
Nombre de rayons par projection	128	128
Intervalle angulaire	180°	180°
Taille du balayage	166 × 166 μm ²	166 μm
Largeur d'un pixel	1,30 μm	1,30 μm
Intensité du faisceau	< 1 fA	~ 200 pA
Charge totale déposée sur l'échantillon	~ 10 ⁻⁴ nC	720 nC
Charge moyenne déposée par pixel à chaque projection		56 pC
Durée d'acquisition	2,5 heures	1 heure

Tableau 5.6: Paramètres utilisés pour l'étude STIMT 3D / PIXET 2D du groupe de cellules dont les résultats sont présentés ci-après.

5.3.3 Paramètres de reconstruction STIMT / PIXET

La reconstruction complète du volume de données a été réalisée à l'aide du code DISRA, dans sa version modifiée au CENBG. La composition globale homogène de la cellule retenue a priori pour les éléments non détectables par PIXE est : C₁₀H₈O_{0,64} N_{1,14}, ce qui correspond aux fractions de masse entrées dans le code : (C) 0,740 ; (H) 0,099 ; (O) 0,063 ; (N) 0,098. Cette composition est dérivée de résultats moyens d'analyse « classique » 2D par Rutherford Backscattering Spectrometry (RBS), obtenus sur un grand nombre de cellules de cette lignée.

Avec la statistique de comptage obtenue, les distributions de 4 éléments ont pu être reconstruites par PIXET : phosphore, soufre, chlore et potassium.

Les calculs de concentration ont été effectués en utilisant pour le calcul d'atténuation une segmentation de l'angle solide de détection en 148 trajectoires modélisées.

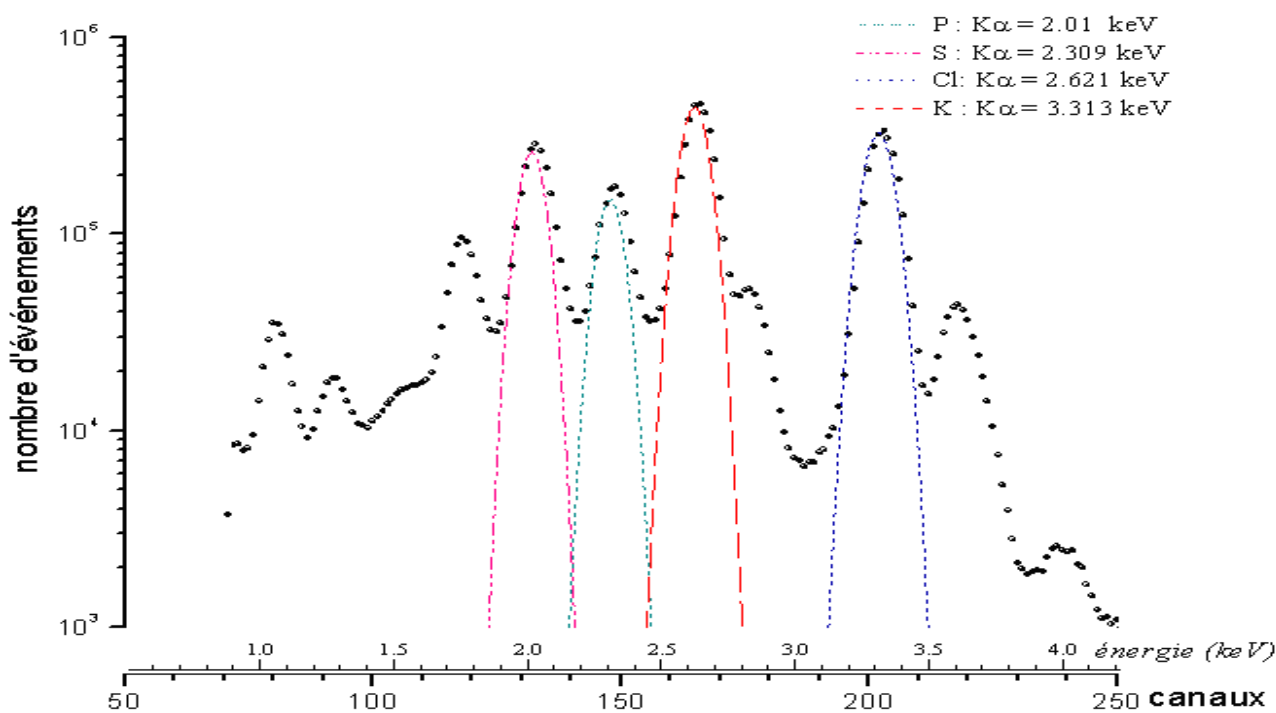


Figure 5.21 : Spectre PIXET collecté pour le plan de coupe considéré, correspondant à une durée totale d'acquisition de 60 minutes.

5.3.4 Imagerie 3D de la cellule

La reconstruction STIMT 3D obtenue montre que l'échantillon analysé est constitué d'une grosse cellule centrale d'environ 60 μm de diamètre et de plusieurs cellules plus petites accolées sur les côtés. Nous avons représenté figure 5.22 le volume analysé sous la forme de plusieurs isosurfaces. La première, en jaune transparent, révèle les régions de densité voisine de zéro, c'est-à-dire notamment la surface externe des cellules (a). L'isosurface externe étant rendue transparente, nous lui avons superposé des isosurfaces à des densités plus fortes afin de révéler la structure de cet échantillon. La pointe de verre utilisée comme axe de rotation, de densité moyenne de $0,59 \pm 0,07 \text{ g.cm}^{-3}$ (l'incertitude indiquée ici représente seulement l'écart-type de la mesure), apparaît ainsi en bleu dans l'image (b). Il s'avère pour cet échantillon difficile de distinguer, par simple contraste en densité, la colle, qui s'est vraisemblablement déposée sur le pourtour en bas de l'échantillon, des structures les plus denses de la cellule, à des densités de l'ordre de $0,32 \pm 0,06 \text{ g.cm}^{-3}$, représentées en vert dans l'image (c). La structure interne du groupe de cellules analysé apparaît en rouge sur les images (d) à (i), correspondant à différentes orientations de l'échantillon, avec une densité moyenne de $0,15 \pm 0,01 \text{ g.cm}^{-3}$. Des structures intracellulaires arrondies de quelques micromètres de diamètre

apparaissent, correspondant vraisemblablement aux noyaux cellulaires dans les petites cellules, et aux nucléoles dans les cellules de grande taille. La face aplatie de l'échantillon, due au fait que les cellules étaient cultivées en monocouche adhérente sur un film polymère, apparaît sur les vues (f) et (i).

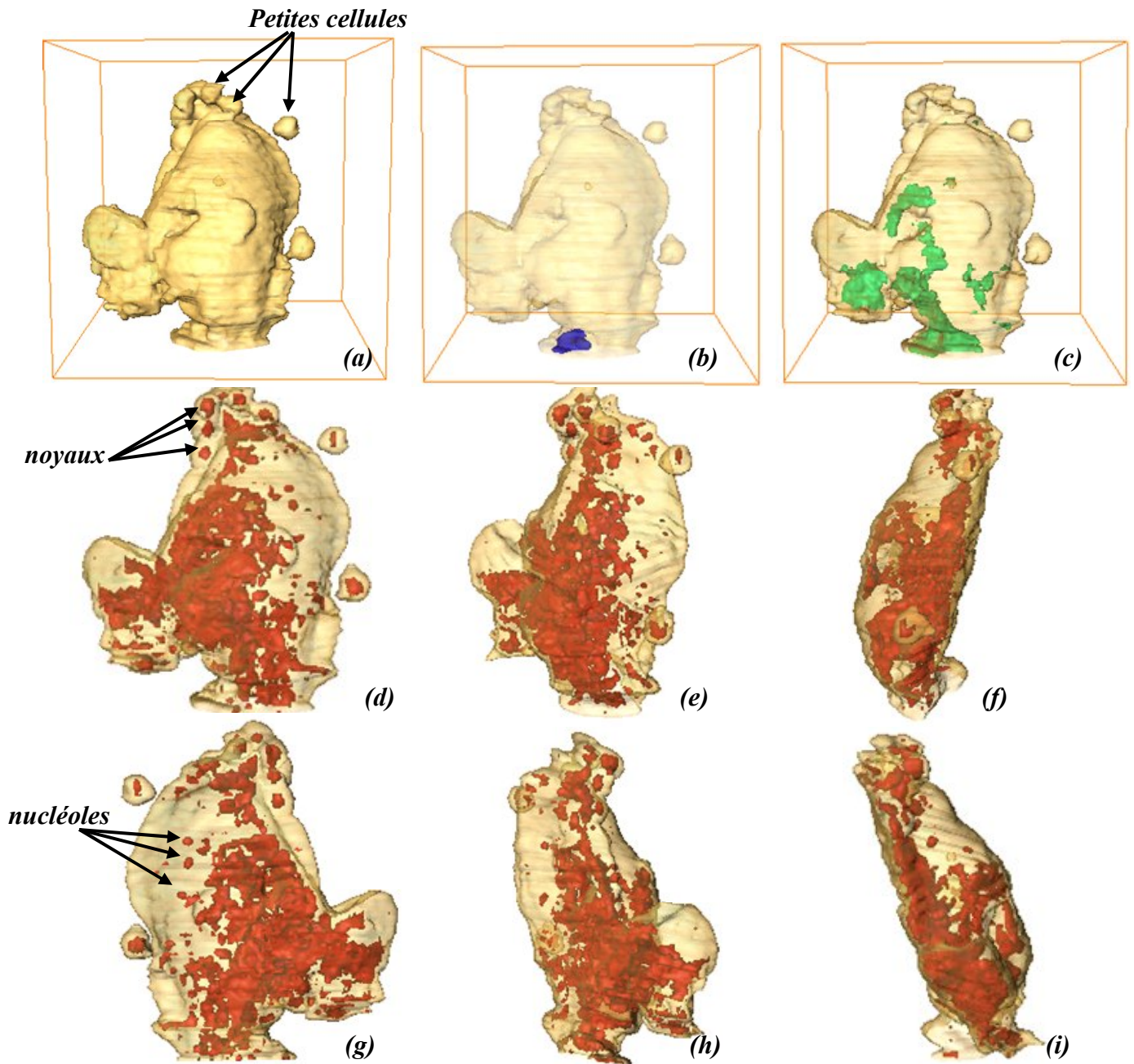


Figure 5.22 : Structure interne 3D de la cellule humaine isolée obtenue à partir de la reconstruction STIMT, selon différentes orientations. Différentes surfaces d'isodensité ont été utilisées pour mettre en évidence les régions d'intérêt : 0.04 g.cm^{-3} pour le jaune, 0.13 g.cm^{-3} pour le rouge, 0.21 g.cm^{-3} pour le vert et 0.45 g.cm^{-3} pour le bleu.

5.3.5 Distributions élémentaires et composition

Un plan de coupe à travers les deux grosses cellules centrales a été sélectionné pour l'analyse de microtomographie STIM/PIXE (fig. 5.23a). Quatre éléments ont été reconstruits, phosphore, soufre, chlore et potassium. De fortes variations de densité avaient été notées dans la distribution STIMT (fig. 5.23b). L'interprétation des images obtenues reste délicate. Cependant, il est intéressant de noter que les distributions de concentrations élémentaires ne sont pas systématiquement corrélées à ces variations de densité (fig. 5.23 c-f). Notons en particulier la distribution en soufre, qui paraît très accentuée en trois points particuliers en surface de l'échantillon.

Les concentrations moyennes calculées dans différentes régions d'intérêt (fig. 5.24) ont été comparées aux valeurs typiquement obtenues par analyse bidimensionnelle classique PIXE/RBS de cellules de cette lignée (tableau 5.7). Le cas du soufre est particulier car il est généralement peu présent dans ces cellules. Les valeurs obtenues dans la zone 3 apparaissent de ce fait anormales. Elles sont en réalité ici la signature de la présence de colle époxy en certains points de la surface de l'échantillon, ce qui est visible sur la figure 5.23d. Nous avons évité ces zones anormalement riches en soufre afin de calculer les valeurs moyennes en P, S, Cl et K dans les deux cellules (zones 1 et 2).

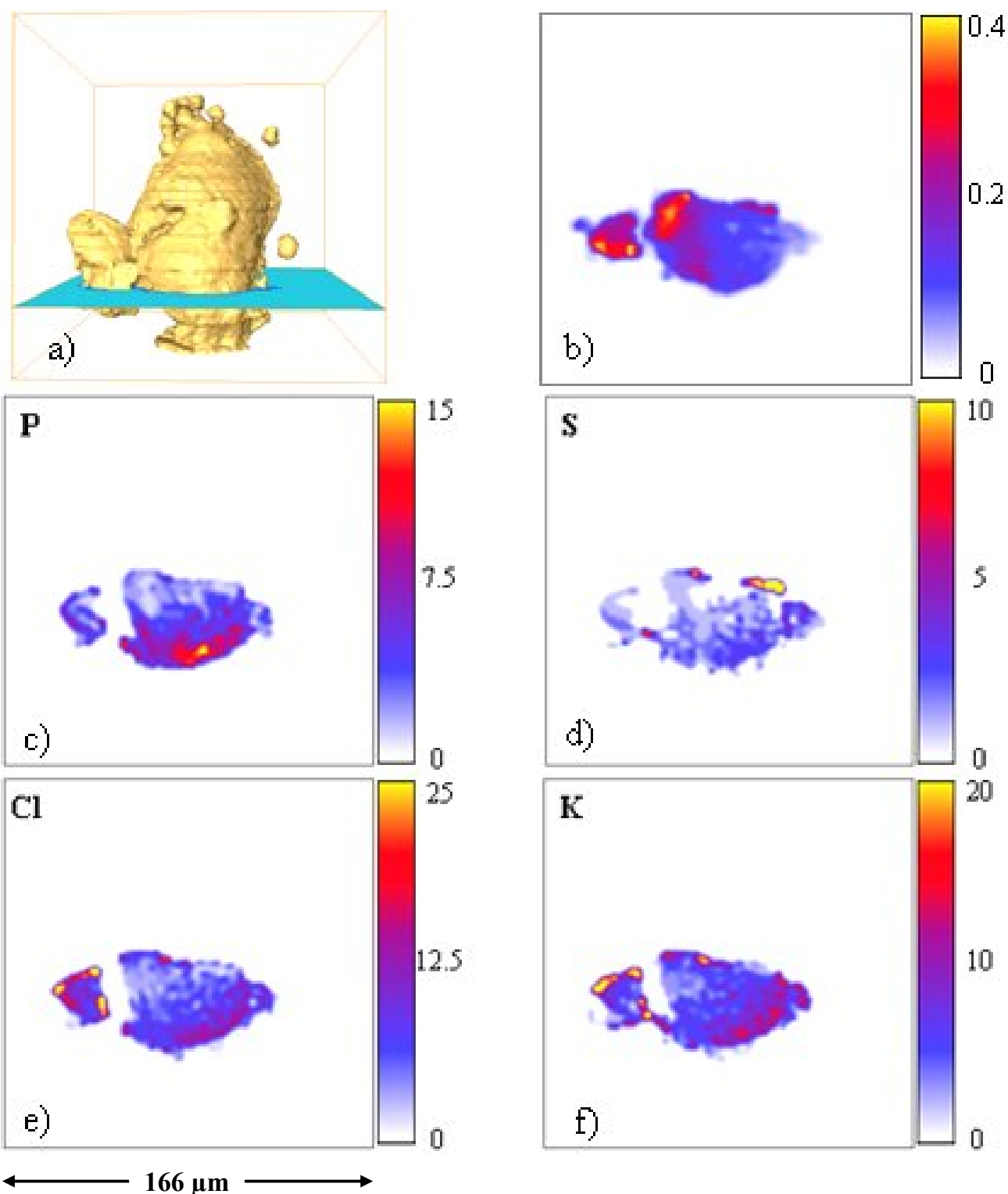


Figure 5.23 : Distributions dans le plan de coupe tomographique analysé en STIMT/PIXET, la position du plan étant indiquée sur l'image 3D (a) : Structure interne dévoilée par l'image en densité de masse STIMT (b) ; fractions de masse des éléments phosphore (c), soufre (d), chlore (e) et potassium (f). L'échelle de couleurs va de zéro à $0,4 \text{ g.cm}^{-3}$ pour (b) et de zéro à la concentration maximale indiquée en mg.g^{-1} pour (c-f).

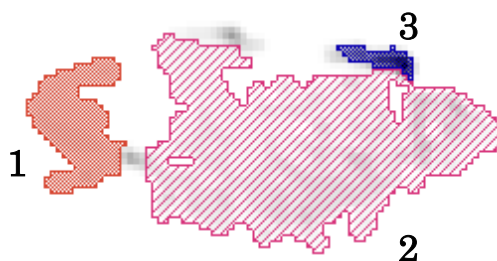


Figure 5.24 : Sélection de différentes régions de l'échantillon : deux cellules (zones 1 et 2) et une trace de colle (zone 3), pour le calcul de concentrations moyennes élémentaires.

Elément	Zone analysée	Concentration obtenue (mg/g)		Valeurs typiques PIXE / RBS (mg/g)
		Sans correction d'atténuation	Avec correction d'atténuation	
P	Zone 1	2,1	3,89	1,6
	Zone 2	2,33	5,32	
	Zone 3	1,4	1,7	
S	Zone 1	0,52	0,93	0,8
	Zone 2	1,07	1,52	
	<u>Zone 3</u>	<u>7,03</u>	<u>12,05</u>	
Cl	Zone 1	7,6	10,07	0,1
	Zone 2	4,02	6,05	
	Zone 3	2,2	3,04	
K	Zone 1	6,35	7,9	25
	Zone 2	4,6	5,8	
	Zone 3	1,86	1,71	

Tableau 5.7 : Concentrations moyennes obtenues dans les deux cellules analysées (zones 1 et 2). La zone 3 a été identifiée comme une trace de colle en surface de l'échantillon. Des valeurs typiquement obtenues par analyse PIXE/RBS bidimensionnelle « classique » pour cette lignée sont données à titre indicatif.

5.3.6 Discussion

De fortes variations interindividuelles rendent difficile une comparaison des concentrations reconstruites par PIXET/STIMT avec les valeurs typiques PIXE/RBS obtenues d'après l'analyse d'un grand nombre de cellules. Mis à part pour le Cl, les ordres de grandeur sont cependant cohérents. On note dans le tableau l'importance du calcul d'atténuation, qui permet des corrections pouvant aller jusqu'à 50 % pour le phosphore, bien que l'échantillon soit ici pourtant très petit – la cellule 2 fait environ 70 μm dans sa plus grande largeur.

Nous pouvons évoquer deux principales limitations pour cette expérience. Tout d'abord, il convient de prendre avec précautions la valeur de charge expérimentale utilisée pour la reconstruction des données. En effet, la mesure a été effectuée, comme dans l'exemple précédent, par la méthode habituelle qui consiste à utiliser une cage de Faraday placée à 0°, ce qui comme nous l'avons vu, se révèle moins fiable qu'il n'y paraît. La deuxième limitation tient à la préparation des échantillons. L'étude est ici biaisée par la présence de colle époxy, qui a diffusé sur la base de l'échantillon. Un protocole de culture permettant, si possible, une fixation directe des cellules sur l'axe de rotation serait idéal pour des applications de microtomographie STIM/PIXE en biologie cellulaire.

Conclusion

Pour résumer, les développements numériques effectués à partir du code DISRA dans le cadre de ce travail de thèse ont permis d'adapter l'algorithme de reconstruction au cas d'échantillons biologiques et, d'une façon plus large, au cas d'échantillons de composition globale homogène. Des conditions expérimentales plus réalistes sont ainsi utilisables, autorisant l'analyse de plans de coupe isolés en PIXET à partir des informations de structure et de densité 3D fournies par STIMT. La réalisation d'une interface graphique, entreprise dans un souci de convivialité et de portabilité du programme, devrait permettre son utilisation par d'autres laboratoires.

Les expériences de tomographie PIXE réalisées au CENBG ont mis en évidence les développements futurs qui seront indispensables pour pérenniser les applications de cette technique. D'un point de vue technique tout d'abord, il sera nécessaire de mettre en oeuvre un dispositif de mesure de charge asservi au système d'acquisition, afin de permettre le dosage quantitatif absolu des éléments. Pour ce qui concerne les applications en biologie cellulaire plus particulièrement, des protocoles de culture adaptés à la microtomographie devront être imaginés, afin de permettre l'adhésion de cellules à l'extrémité d'une microfibre, sans utilisation de colle époxy.

La possibilité de réduire encore les durées d'acquisition apparaît comme un nouveau défi à relever. Bien qu'elle nécessiterait un développement technique et algorithmique particulièrement lourd, l'utilisation simultanée de plusieurs détecteurs X est une solution envisagée à l'heure actuelle.

Enfin, les perspectives offertes en imagerie et analyse 3D à l'échelle cellulaire seront vraisemblablement décuplées par la construction de la ligne nanofaisceau au CENBG, permettant d'atteindre des résolutions spatiales de quelques dizaines de nanomètres. De telles résolutions en terme de microtomographie 3D représenteront toutefois un nouveau défi technique, en terme de contrainte sur les protocoles de préparation d'échantillons d'une part, et surtout en terme de précision et de stabilité mécanique du dispositif de rotation de l'échantillon au cours de l'analyse.

Bibliographie

- Agostinelli S. , Allison J. , Amako K. , Apostolakis J. , Araujo H. , Arce P. , Asai M. , Axen D., Banerjee S. , Barrand G., Behner F. , Bellagamba L., Boudreau J. , Broglia L., Brunengo A., Burkhardt H. , Chauvie S. , Chuma J. et et al. (2003). "GEANT4 – a simulation toolkit." Nucl. Instr. and Meth. A **506**: pp. 250-303. GEANT4 home page available online at: <http://geant4.web.cern.ch/>
- Allison J. et al. et (2006). "GEANT4 developments and applications." IEEE Transactions on Nuclear Science **53**(1): 270-278.
- Antolak A.J. et Bench G.S. (1994). "PIXE tomography of samples with inhomogeneous elemental composition." Nucl. Instr. and Meth **B88**: 297– 307.
- Azevedo S.G. Schneberk D.J., Fitch J.P., Martz H.E., (1990). "Calculation of the rotational centers in computed tomography sinograms." IEEE Transactions on Nuclear Science **37**(4): 1525.
- Bambynek W., Crasemann B., Fink R.W., Freund H-U., Mark H., Swift C.D., Price R.E. et Venugopala Rao P. (1972). "X-ray fluorescence yields, Auger, and Coster-Kronig transition probabilities." Reviews of Modern Physics **44**: 716-717.
- Baumeister W., Grimm R. et Walz J. (1999). "Electron tomography of molecules and cells." Trends in Cell Biology **9**: 81-85.
- Beasley D. (2006). "3D Quantitative Elemental Mapping of Biological Tissues using Proton Induced X-ray Emission Tomography (PIXE-T) and On/Off-axis Scanning Transmission Ion Microscopy Tomography (STIM-T)." United Kingdom, The University of Surrey: 208.
- Beasley D. et Spyrou N.M. (2005). "The University of Surrey's new proton microprobe and the feasibility of PIXE - tomography for trace element analysis of biological tissues." J. Rad. Nucl. Chem **264**(2): 289-294.
- Bench G., Nugent K.A., Cholewa M., Saint A. et Legge G.J. (1991). "Submicron STIM tomography reconstruction techniques." Nucl. Instr. and Meth **B54**: 390-396
- Berger M.J. et Hubbell J.H. (1987). "XCOM: Photon Cross Sections on a Personal Computer." Technical Report NBSIR 87-3579.
- Berger P. and G. Revel (2005). "Microsonde Nucléaire: Principe et appareillage." Technique de l'Ingénieur. **P2563v2**.
- Brandt W. et Lapicki G. (1981). "Energy-loss effect in inner-shell Coulomb ionization by heavy charged particles " Phys. ReV. A **23**: 1717-1729.

- Cohen D.D. et Harrigan M. (1985). "K- and L-shell ionization cross section for proton and helium ions calculated in the ECPSSR theory." Atomic Data and Nuclear Data Tables **33**: 255-343.
- Daube-Witherspoon M.E. et Muehllehner G. (1986). "An iterative image space reconstruction algorithm suitable for volume ECT." IEEE Trans. Med. Imaging. **5**: 61-66.
- Dymnikov A.D., Fishkova T. Ya. et Yavor S.Ya. (1965). Sov. Phys. -Tech. Phys., **10**: 340.
- Fischer B. E. et C. Mühlbauer (1990). "Microtomography by heavy ions." Nucl. Instr. and Meth **B47**(3): 271-282
- Garcia J.D. (1970). "Inner-shell ionisations by proton impact." Phys. Rev. A **1**: 280.
- GEANT4. from <http://geant4.web.cern.ch/geant4/>.
- Golosio B. , Simionovici A. , Somogyi A. , Lemelle L. , Chukalina M. et Brunetti A. (2003). "Internal elemental microanalysis combining x-ray fluorescence, Compton and transmission tomography." J. Appl. Phys **94**(1): 145-156.
- Gordon R. (1974). "A tutorial on ART." IEEE Trans. Nucl. Sci. **21**: 78-93.
- Gordon R., Bender R. et Herman G.T. (1970). "Algebraic Reconstruction Technique for Three-dimensional Electron Microscopy and X-ray photography." J. Theor. Biol. **29**: 471-481.
- Grente K. (2004), " Amélioration de la résistance à la corrosion à haute température de composite à matrice céramique élaborés par voie gazeuse." Thèse no 2784, Université Bordeaux I.
- Hansteen J.M. et Mosebeke O.R. (1973). "Atomic Coulomb excitation by heavy charged particles." Nucl. Phys. A **201**: 541-560.
- Huesman. (1977). "Software Distributed by the Center for Functional Imaging." from http://cfi.lbl.gov/cfi_software.html.
- Ito A. et Koyama-Ito H. (1984). "Possible use of proton CT as a means of density normalization in the PIXE semi-microprobe analysis." Nucl. Instr. and Meth **B3**: 584-588.
- Ivantchenko V. (1999). "GEANT4 Simulation of energy losses of slow hadrons." CERN-99-121 INFN/AE-99/20.
- Johansson S.A.E. et Campbell J.L. (1988). "PIXE : A novel technique for elemental analysis". Hichester, UK, Wiley.

- L'Hoir A. et Schmaus D. (1984). "Stopping power and energy straggling for small and large energy losses of MeV protons transmitted through polyester films." Nucl. Instr. and Meth **B4**: 1-10.
- Lange K. et Carson R. (1984). "EM reconstruction algorithms for emission and transmission tomography." J comput Assist Tomogr. **8**(2): 306-316.
- Leapman R.D. , Kocsis E., Zhang G. , Talbot T. L. et Laquerriere P. (2004). "Three-dimensional distributions of elements in biological samples by energy-filtered electron tomography." Ultramicroscopy **100**: 115-125.
- Lefevre H.W. Schofield R.M.S., Overley J.C., and MacDonald J.D., (1987). "Scanning transmission ion microscopy as it complements particle induced X-ray emission microanalysis." Scanning microscopy **1**: 879–889.
- Leo W. R. (1987). "Techniques for nuclear and particles physics experiments", Springer.
- Liew S.C., Orlic I. et Tang S.M. (1995). "PIXE tomographic reconstruction of elemental distributions using an iterative maximum-likelihood method." Nucl. Instr. and Meth **B104**: 222–227.
- Llabador Y., Bertault D., Gouillaud J. C. et Moretto Ph. (1990). "Advantages of high speed scanning for microprobe analysis of biological samples." Nucl. Instr. and Meth **B49**: 435.
- Maxwell J.A., Campbell J.L. et Teesdale W.J. (1989). "The Guelph PIXE software Package." Nucl. Instr. and Meth **B43**: 218-230.
- Mercury. (2006). "Professional 3D Visualization." from <http://www.amiravis.com/>.
- Merzbacher E. et Lewis H.W. (1958). Handbuch der Physik S. F. editor. Berlin, Springer Verlag. **34**.
- Michelet C. et Moretto Ph. (1999a). "3D mapping of individual cells using a proton microbeam." Nucl. Instr. and Meth **B150**: 173 - 178.
- Michelet C. et Moretto Ph. (1999b). "STIM tomography at the cell level." Nucl. Instr. and Meth **B158**: 361–367
- Michelet-Habchi C., Incerti S., Aguer P., Barberet Ph., Gontier E., Grente K., Moretto Ph., Nguyen D.T., Pouthier A., Pouthier T., Rebillat F. et Smith R.W. (2005a). "TomoRebuild: a new data reduction software package for scanning transmission ion microscopy tomography." Nucl. Instr. and Meth **B231**: 142–148.

- Michelet-Habchi C., Incerti S., Aguer P., Barberet Ph., Gontier E., Guinefolleau T., Moretto Ph., Pouthier A., Pouthier T. et Smith R.W. (2005b). "3D Imaging of Microscopic Structure Using a Proton Beam." IEEE Trans. Nucl. Sci. **52**(3): 612-617.
- Michelet C., "Développement d'une technique de micro-tomographie par faisceau d'ion à l'échelle cellulaire", 138 p. Thèse: Physique: Bordeaux I: 1998.
- Michelet C., Moretto Ph., Laurent G., Przybylowicz W.J., Prozesky V. M., Pineda C. A., Barberet Ph., Lhoste F. et Kennedy J. (2001). "Measurement of lateral straggling using a microbeam." Nucl. Instr. and Meth **B181**: 157-163.
- Michelet-Habchi C., Nguyen D. T., *et al.* (2006). "Three-dimensional densitometry imaging of diatom cells using STIM tomography." Nucl. Instr. and Meth **B249**(1-2): 653-659
- Mitchell I. V. and K. M. Barfoot (1981). "Particle induced X-ray emission analysis, applications to analytical problems." Nuclear Science Applications **11**(2): 101-162.
- Ng Y.K., Orlic I., Liew S.C., Loh K.K., Tang S.M., Osipowicz T. et Watt F. (1997). "A PIXE micro-tomography experiment using MLEM algorithm." Nucl. Instr. and Meth **B130**: 109.
- Overley J.C. Schofield R.M.S., MacDonald J.D., and Lefevre H.W. (1988). "Energy-loss image formation in scanning transmission ion microscopy." Nucl. Instr. and Meth **B30**: 337-341.
- Paul H. et Sacher J. (1989). "Fitted empirical reference cross sections for K-shell ionization by protons" Atomic Data and Nuclear Data Tables **42**: 105-156.
- Pontau A.E., Antolak A.J., Morse D.H., Ver Berkmoes A.A., Brase J.M., Heikkinen D.W., Martz H.E. et Proctor I.D. (1989). "Ion Microbeam Tomography." Nucl. Instr. and Meth **B40/41**: 646-650.
- Radon J. (1917). "Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten." Math. Phys. Kl. **69**: 262-267.
- Rauhala E. et Raisanen J. (1985). "Energy loss of 450 - 2400 keV protons in havar, kapton and aluminized mylar foils." Nucl. Instr. and Meth **B12**: 321-324.
- Reis M.A. et Jesus A.P. (1996). "Semiempirical Approximation to cross sections for L X-ray production by proton impact." Atomic Data and Nuclear Data Tables **63**: 1-55.
- Ryan C.G., Cousens D.R., Sie S.H., Griffin W.L., Suter G.F. et Clayton E. (1990). "Quantitative PIXE microanalysis of geological material using the CSIRO proton microprobe." Nucl. Instr. and Meth **B47**(1): 55-71.

- Sakellariou A., Cholewa M., Saint A. et Legge G.J.F. (1997). "An accurate reconstruction algorithm for tomography experiments that involve complex probe-sample interactions." Measurement Science and Technology **8**: 746–758.
- Sakellariou A. (2002). STIM AND PIXE TOMOGRAPHY. Melbourne, School of Physics, The University of Melbourne: 343.
- Saloman E.B., Hubbell J.H. et Scofield J.H. (1988). "X-ray attenuation cross sections for energies 100 eV to 100 keV and elements Z=1 to Z=92." Atomic Data and Nuclear Data Tables **38**: 1–5.
- Schofield J.H. (1974a). "Exchange corrections of K X-ray emission rates." Physical Review A -General Physics **9**: 1041–1049.
- Schofield J.H. (1974b). "Relativistic Hartree-Slater values for K and L X-ray emission rates." Atomic Data and Nuclear Data Tables, **14**: 121–137.
- Schofield R.M.S. et Lefevre H.W. (1992). "PIXE-STIM microtomography: zinc and manganese concentrations in a scorpion stinger." Nucl. Instr. and Meth **B72**: 104–110.
- Schwertner M., Sakellariou A., Reinert T. et Butz T. (2006). "Scanning transmission ion micro-tomography (STIM-T) of biological specimens." Ultramicroscopy **106**: 574-581.
- Thwaites D.I (1987). "Review of stopping powers in organic materials." Nucl. Instr. and Meth **B27**: 293-300.
- Tomas C. R. (1997). "Identifying Marine Phytoplankton." Academic Press: 385.
- Yarlagadda B.S. et Robinson J.E. (1978). "Effective-charge theory and the electronic stopping power of solid." Phys. Rev. B **17**(9): 3473-3483.
- Ziegler J. F. (2004). "Srim-2003." Nucl. Instr. and Meth **B219**: 1027.
- Ziegler J.F. (1977). "The electronic and nuclear stopping of energetic ions." App. Phys. Rev **31**(8): 544-546.
- Ziegler J.F. (1999). "Stopping of energetic light ions in elemental matter." App. Phys. Rev **85**(3): 1249-1272.
- Ziegler J.F., Biersack J.P. et Littmark U. (1985). "The Stopping and Range of Ions in Solids." **Vol. 1**. New York, Pergamon Press.

Résumé : Le développement des techniques de microscopie 3D offrant une résolution spatiale de l'ordre du micromètre a ouvert un large champ de recherche en biologie cellulaire. Parmi elles, un avantage intéressant de la micro-tomographie par faisceau d'ions est de donner des résultats quantitatifs en termes de concentrations locales d'une manière directe, en utilisant une technique d'émission de rayonnement X (PIXET) combinée à la microscopie ionique en transmission (STIMT). Le traitement des données expérimentales constitue un point délicat. Après une brève introduction aux techniques de reconstruction existantes, nous présentons le principe du code DISRA, le plus complet écrit jusqu'à ce jour, qui nous a servi de base pour ce travail de thèse. Nous avons modifié et étendu le code DISRA en considérant les aspects spécifiques des échantillons biologiques. Un logiciel de traitement de données complet a ainsi été développé, avec une interface utilisateur permettant le contrôle de chaque étape de la reconstruction. Les résultats d'expériences de STIMT et/ou PIXET effectuées au CENBG sur des spécimens de référence et sur des cellules végétales ou humaines isolées sont présentés.

Mots clés : Micro-tomographie par faisceau d'ions, Microscopie ionique en transmission, Particle Induced X-ray Emission (PIXE), imagerie 3D, caractérisation non destructive, microsonde nucléaire.

Abstract: The development of 3D microscopy techniques offering a spatial resolution of 1 μm or less has opened a large field of investigation in Cell Biology. Amongst them, an interesting advantage of ion beam micro-tomography is its ability to give quantitative results in terms of local concentrations in a direct way, using Particle Induced X-ray Emission (PIXET) combined to Scanning Transmission Ion Microscopy (STIMT) Tomography. After a brief introduction of existing reconstruction techniques, we present the principle of the DISRA code, the most complete written so far, which is the basis of the present work. We have modified and extended the DISRA algorithm by considering the specific aspects of biologic specimens. Moreover, correction procedures were added in the code to reduce noise in the tomograms. For portability purpose, a Windows graphic interface was designed to easily enter and modify experimental parameters used in the reconstruction, and control the several steps of data reduction. Results of STIMT and PIXET experiments on reference specimens and on human cancer cells will be also presented.

Keywords: Scanning Transmission Ion Microscopy (STIM), Particle Induced X-ray Emission (PIXE), computed tomography, micro-tomography, 3D imaging, non-destructive characterisation, nuclear microprobe.

Tóm tắt : Sự phát triển kỹ thuật dựng ảnh ba chiều với độ phân giải cỡ phần triệu mét đã tạo ra một lĩnh vực nghiên cứu rộng rãi trong ngành sinh học tế bào. Trong số đó, phương pháp micro-tomography sử dụng các chùm tia ion có một ưu thế rất đáng quan tâm đó là : cho ra những kết quả định lượng về hàm lượng các nguyên tố tại mỗi điểm ảnh một cách trực tiếp bằng cách kết hợp phương pháp phát tia X (PIXET) và quét chùm tia ion (STIMT). Sau phần trình bày tóm tắt những kỹ thuật dựng ảnh đã phát triển, chúng tôi đề cập tới thuật toán DISRA được sử dụng như một nền tảng của những nội dung kế tiếp trong luận án này. Phương pháp DISRA đã được thay đổi và mở rộng khi tính đến những đặc tính của các mẫu sinh học. Một phần mềm chi tiết xử lý dữ liệu đã được phát triển, kèm theo một giao diện cho phép tiến hành một cách thuận tiện tất cả các bước dựng hình. Những kết quả thực nghiệm (STIMT/PIXET) tiến hành ở CENBG trên các mẫu chuẩn và mẫu sinh học đã được trình bày.