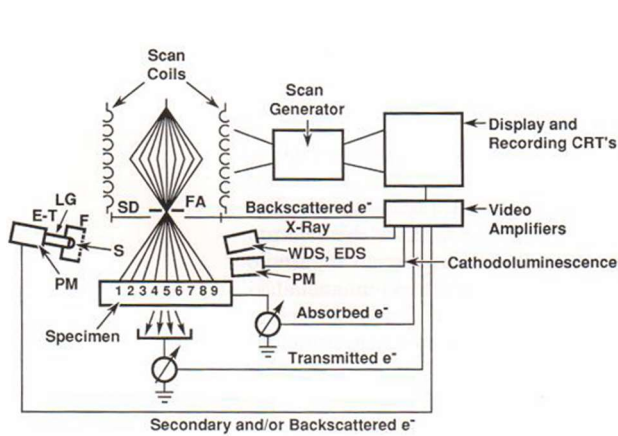
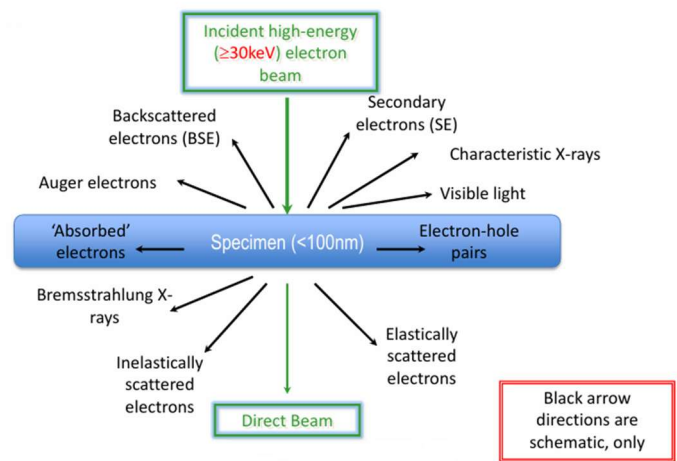


Les graphiques ci-dessous illustrent tous les signaux qui peuvent être détectés avec la microscopie électronique à balayage (SEM) et la microscopie électronique à balayage (TEM).



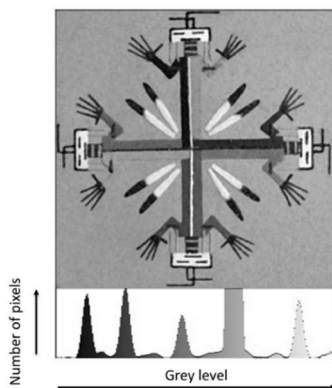
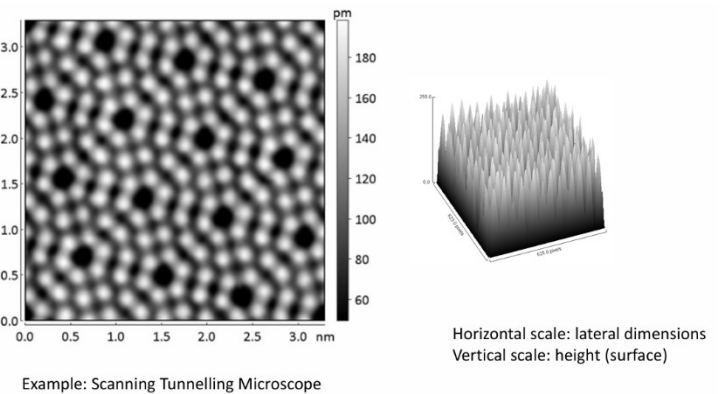
SEM : Detector (BF, DF, HAADF)



TEM: Projected image (BF,DF, HRTEM, Diff)

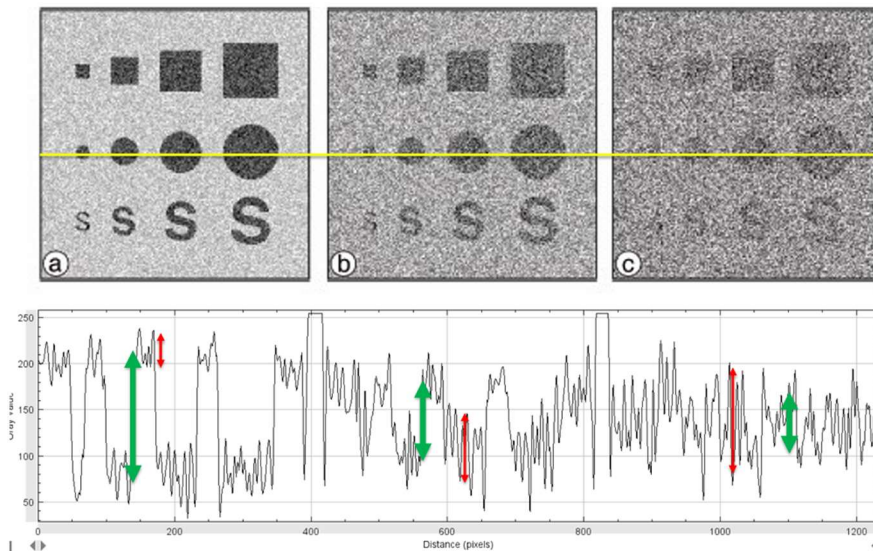
Une image est un ensemble de pixels en 2D auxquels on peut attribuer une nuance de gris ou une couleur. C'est important de connaître la calibration spatiale de l'image et/ou une échelle en fonction du la couleur ou niveau de gris. Sans contexte, l'observateur ne peut pas obtenir aucune information de l'image.

Cette image comporte une échelle qui indique la taille spatiale (en nm) ainsi qu'une échelle qui indique le niveau de gris représenté. La couleur est associée à la hauteur (en pm), le blanc étant le plus élevé et le noir le plus bas. La connaissance de ces informations permet à l'observateur de comprendre ce qui est représenté.



Les images obtenues permettent d'obtenir de nombreuses informations. Par exemple, l'histogramme de luminosité, qui représente le nombre de pixels avec chaque valeur de luminosité. Les nombres dans chaque pic correspondent aux surfaces des régions de l'image.

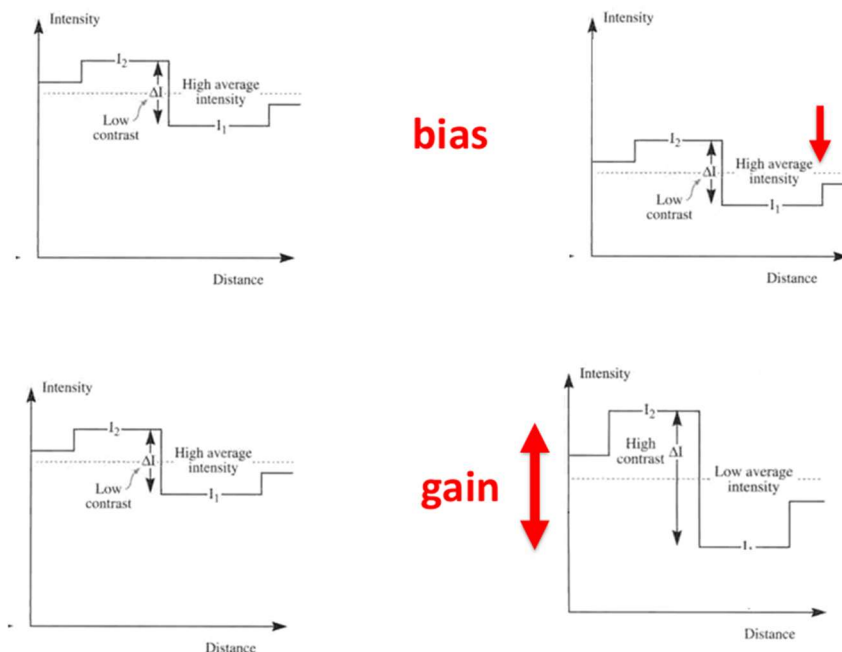
Comme les images de microscopie sont prises électroniquement, il peut y avoir du bruit dans l'image. Dans la figure ci-dessous, les flèches vertes représentent la différence d'intensité entre les objets de l'image et le fond, et les flèches rouges représentent la différence d'intensité à l'intérieur de ces objets ou à l'intérieur du fond causé par le bruit. Pour minimiser ce bruit, il doit y avoir une distinction claire entre l'intensité des formes et celle de leur fond, ainsi qu'une variation minimale de l'intensité au sein de chaque élément. Ainsi, il est préférable que la flèche verte soit plus grande et que la flèche rouge soit plus petite.



Features on a noisy background:
 (a) High **signal** to **noise** (S/N)
 (b) Medium signal to noise ratio
 (c) Low signal to noise ratio

Une image est un groupe de pixels avec intensités différentes. Cette différence d'intensité se traduit par deux propriétés de l'image appelées contraste (ou gain) et luminosité (ou bias). Il est important de faire la distinction entre ces trois :

- **Intensité** = la valeur du pixel. Plus l'intensité est élevée, plus le pixel est lumineux et plus l'intensité est faible, plus le pixel est sombre.
- **Contraste (Gain)** = la différence d'intensité entre deux pixels normalisée par une intensité de référence. Plus le contraste est élevé, plus la différence d'intensité est grande.
- **Luminosité (Bias)** = la valeur moyenne de l'intensité de tous les pixels. Plus la luminosité est élevée, plus l'intensité de chaque pixel est élevée.



En général, il est préférable d'utiliser une intensité globale plus faible afin qu'il soit plus facile de voir les petits changements d'intensité. Le contraste et la luminosité de l'image peuvent être réglés lors de la prise de l'image.

Lors de la création d'une image, il est possible d'effectuer un balayage linéaire, un balayage de zone ou une acquisition d'image en parallèle. Dans un balayage linéaire, le rayon se déplace en ligne droite. Ainsi, les informations sont prises pour chaque point de la ligne, un par un. Pour un balayage de zone, c'est la même méthode, mais au lieu d'une ligne, c'est une zone qui est prise en compte. D'autre part, dans l'acquisition d'images parallèles, les rayons du faisceau ne convergent pas vers l'échantillon, mais sont parallèles les uns aux autres. Par conséquent, le faisceau couvre une large zone de l'échantillon et les informations sont prises à partir de tous les points de cette zone en même temps.

Il est important de ne pas confondre les détecteurs et les caméras.

- **Détecteur** : un dispositif utilisé pour trouver des substances ou des choses particulières, ou pour en mesurer le niveau. (ce qui est détecté équivaut à 1 pixel sur un appareil photo numérique)
- **Caméra** : un dispositif permettant de prendre des photos ou de réaliser des films ou des émissions de télévision
- **Cámara numérique** : un type d'appareil photo qui enregistre des images pouvant être visualisées sur un ordinateur.

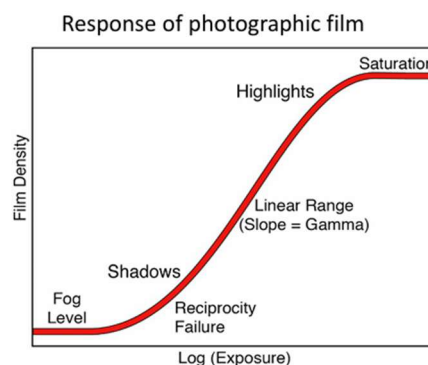
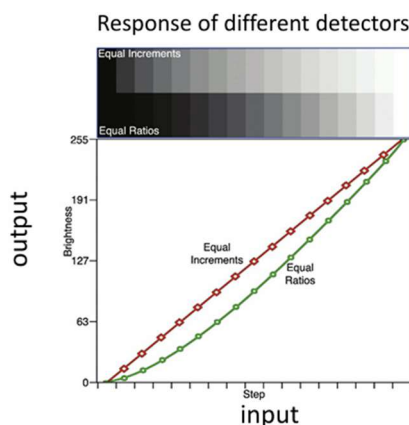
Le signal de tout détecteur électronique doit être numérisé et manipulé électroniquement avant d'être affiché, ce qui est impossible avec les images analogiques (images provenant d'appareils photo ou de négatifs).

Pour comparer les propriétés des dispositifs de détection et d'enregistrement, on utilise le concept de detection quantum efficiency (DQE). Dans l'équation ci-dessous, S/N représente le rapport signal/bruit. Pour les détecteurs à réponse linéaire, un détecteur parfait a une DQE=1, mais un détecteur réel a une DQE<1 car tout détecteur ajoute une certaine quantité de bruit électronique.

$$DQE = \frac{\left(\frac{S_{out}}{N_{out}} \right)^2}{\left(\frac{S_{in}}{N_{in}} \right)^2}$$

En réalité, la réponse d'un détecteur n'est linéaire que pour un intervalle limité. À des niveaux très faibles du signal d'entrée, la réponse du détecteur est principalement dominée par le bruit. Et à des niveaux d'entrée élevés, la réponse n'augmente plus proportionnellement car le détecteur arrive à son niveau de saturation.

Linear response & Dynamic range



Exemples de détecteurs :

- **Détecteurs d'électrons secondaires en SEM :** (image a)

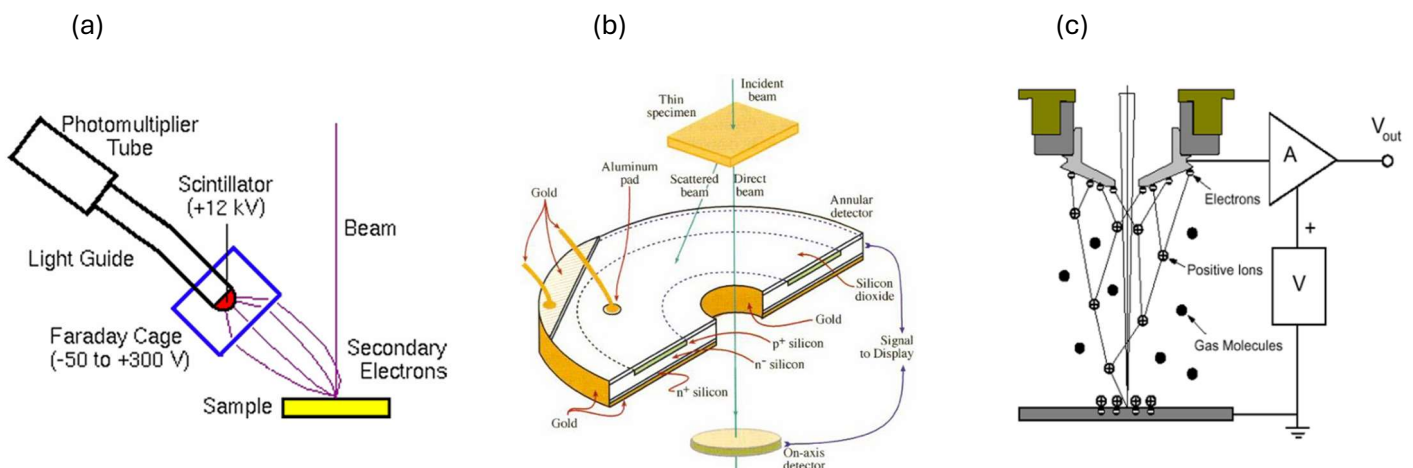
Dans le SEM, il existe plusieurs détecteurs d'électrons secondaires. Il y a le détecteur In-Lens et le détecteur Everhart-Thornley (montré sur l'image). Ce dernier a une réponse linéaire et rapide et un gain élevé. Mais il a une faible DQE à cause de son bruit élevé.

- **Détecteurs à état solide :** (image b)

Ils sont utilisés pour les électrons rétrodiffusés et les rayons X, ainsi que dans le TEM. Les électrons sont amplifiés par une haute tension et une ionisation par impact. Ils ont un DQE élevé. Mais ils sont très lents et ne peuvent donc pas enregistrer trop d'électrons en même temps.

- **Détecteurs d'électrons secondaires en ESEM :** (image c)

Ils incluent l'amplification dans le microscope. L'utilisateur a un contrôle total sur les conditions d'amplification. Mais le bruit est élevé et l'DQE est donc faible.

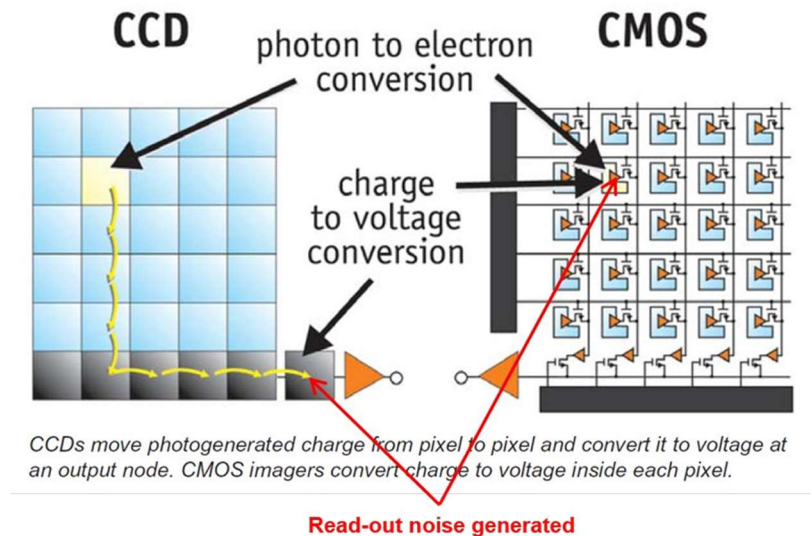


Comme les caméras ne sont pas capables de détecter les électrons, il faut les transformer en photons par un scintillateur. Les deux caméras les plus utilisées en microscopie électronique sont CCD et CMOS.

Les caméras **CCD (Charged Couple Device)** sont des dispositifs métal-isolant-silicium qui stockent les charges électriques générées par la lumière ou les faisceaux d'électrons. Les électrons sont détectés et convertis en photons dans chaque pixel. Ensuite, cette charge photogénique est transportée de pixel en pixel et convertie en tension au niveau d'un point de sortie. Ainsi, elles n'ont qu'un seul amplificateur de lecture, elles sont lentes et ont un rapport signal/bruit élevé.

Les caméras **CMOS (Complimentary Metal-Oxide Semiconductors)** convertissent également les électrons en photons dans chaque pixel. La différence est que chaque pixel dispose d'un amplificateur, et donc que dans chaque pixel, les photons sont transformés en tension. Par conséquent, tout pixel de l'image peut être lu directement, en adressant

un pixel par ligne et par colonne comme dans une puce mémoire. En ayant un amplificateur dans chaque pixel, la caméra CMOS est rapide mais produit beaucoup de bruit.



3. Considérations sur la prise d'images et la résolution

- **Résolution du microscope :** distance minimale entre deux points que l'on peut distinguer. (Déterminée par la longueur d'onde du faisceau, l'ouverture numérique, les aberrations optiques ...)
- **Résolution d'image :** le nombre de pixels par unité de longueur. Normalement mesurée en dpi (dots per inch).
- **Niveaux de gris ou gamme dynamique :** mesure binaire du nombre de valeurs de gris possibles. La plupart des programmes expriment les niveaux de gris au format 8 bits ou 2^8 (256) niveaux de gris. L'œil humaine ne peut distinguer qu'environ 32 niveaux de gris.
- **Résolution de couleurs :** nombre de niveaux de couleurs dans l'image sur l'ordinateur. Généralement une mesure binaire de 256 valeurs de rouge, vert et bleu. En total, plus de 16 millions de couleurs ($256 \times 256 \times 256$), appelé couleur 24 bits.
- **Résolution d'impression :** nombre de pixels sur une image imprimée. Déterminée par la fréquence de trame mesurée en lpi (lines per inch).

Pour pouvoir manipuler des images par ordinateur, nous devons transformer la forme analogique (gradients continus) en une forme numérique (gradients par paliers). Pour ce faire, on échantillonne l'image en enregistrant des instantanés périodiques de l'information analogique. Si le taux d'échantillonnage est suffisamment rapide, l'œil ne peut pas remarquer les espaces entre les étapes. Le théorème de Nyquist stipule que pour reproduire correctement un signal, il faut l'échantillonner périodiquement à une fréquence au moins égale à deux fois la fréquence la plus élevée que l'on souhaite enregistrer. Dans les images, la fréquence est liée à la taille de la structure, les petites

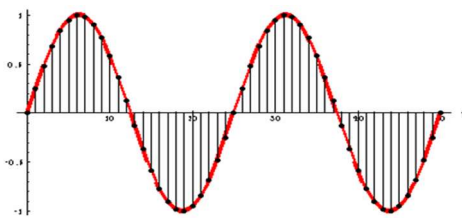
structures ayant une fréquence plus élevée. La fréquence d'échantillonnage doit donc être égale à la moitié de la taille du plus petit objet que l'on souhaite enregistrer.

$$f_N = d/2$$

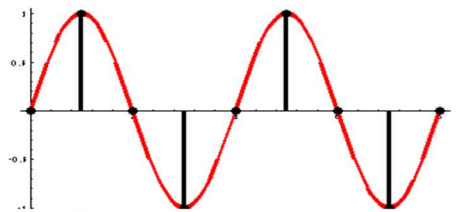
f_N = fréquence de Nyquist

d = taille du plus petit objet

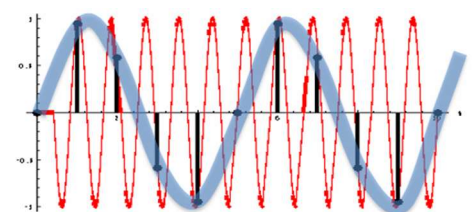
Si une fréquence supérieure à f_N est utilisée, l'image sera **sur-échantillonnée**. Ce n'est pas une mauvaise chose, mais cela prendra plus de temps et le fichier sera plus volumineux. En revanche, si la fréquence est inférieure à f_N , l'image sera **sous-échantillonnée**, ce qui entraînera des informations erronées qui ne représentent pas les données originales. Dans l'image c, on peut voir que la courbe bleue qui est la forme courbe sous-échantillonnée ne correspond pas à la courbe rouge (courbe réelle).



(a) $f > f_N$ (sur-échantillonnée)



(b) f_N



(c) $f < f_N$ (sous-échantillonnée)

Un pixel est ce qui est obtenu à partir de chaque échantillon pris dans l'image analogique originale. La forme typique d'un pixel est un carré. Dans un ordinateur, l'information de chaque pixel est stockée sous forme de bits et de bytes. Chaque bit peut prendre la valeur 0 ou 1. Un byte est la combinaison de 8 bits, il peut donc représenter 2^8 valeurs différentes (de 0 à 255). En plus, 1KB (kilobyte) = 1024 bytes = 2^{10} bits.

Example: Pixel Size



Example: Gray Levels

32 grey levels



16 grey levels

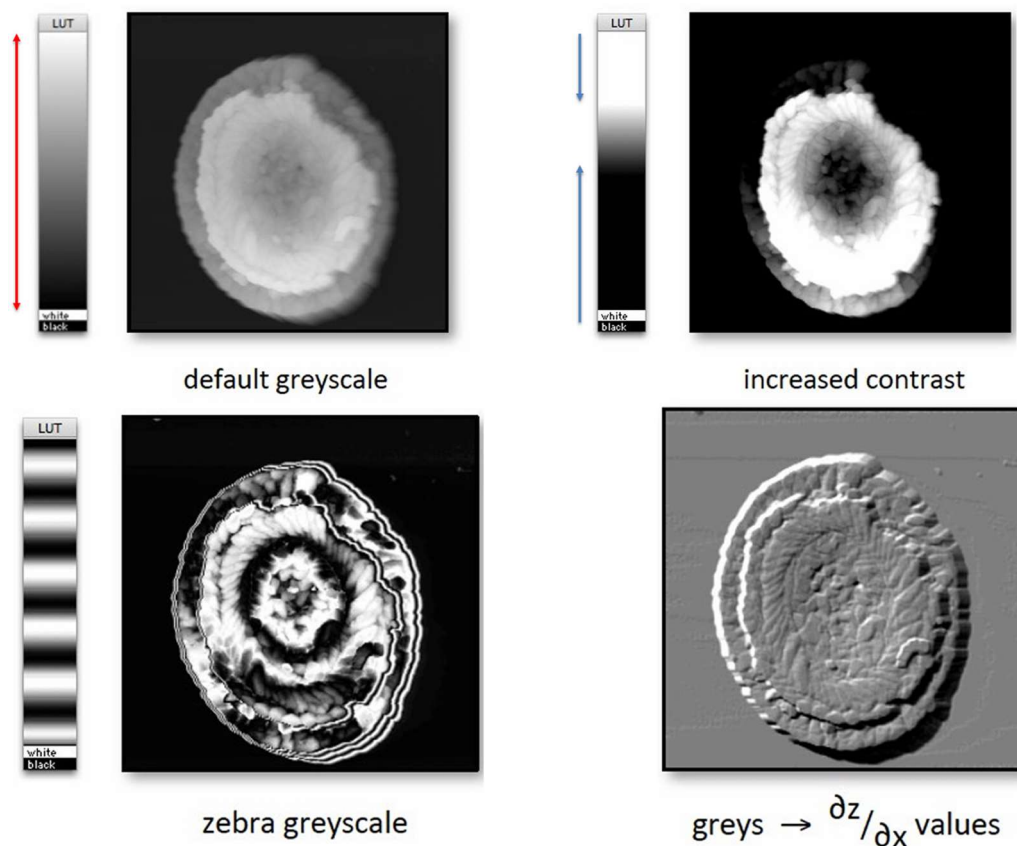
8 grey levels

4 grey levels

4. Correction des défauts (après-traitement)

Après avoir obtenu l'image, celle-ci peut être traitée pour corriger certains défauts causés par des détecteurs imparfaits, des limitations de l'optique, un mauvais éclairage ou un point de vue non désiré. Ces modifications sont effectuées après que l'image a été numérisée et stockée, il est donc impossible d'obtenir la meilleure qualité possible qui serait obtenue en optimisant le processus d'acquisition.

La couleur de l'image peut être facilement modifiée par la Look Up Table (LUT), qui change les niveaux de l'échelle de gris. Ce processus modifie tout ou partie des valeurs des pixels d'une image afin de rendre ses caractéristiques plus visibles. Des modifications linéaires et non linéaires peuvent être effectuées (comme le montrent les images ci-dessous) et il s'agit d'un processus réversible, puisque l'on peut retrouver l'image originale. Toutefois, la modification de la valeur de chaque pixel par la différentielle de cette valeur dans une direction est irréversible.

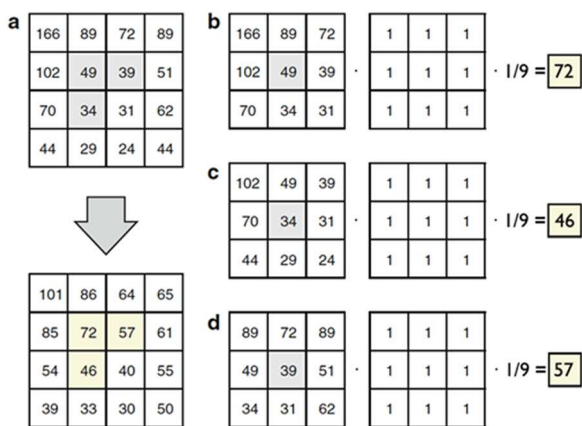


Toutes les images en microscopie sont prises en niveaux de gris. Toutefois, la couleur peut être appliquée en post-traitement. Le système de couleurs le plus utilisé est le Red-Green-Blue (RGB).

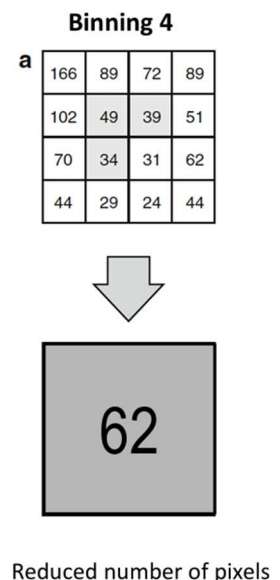
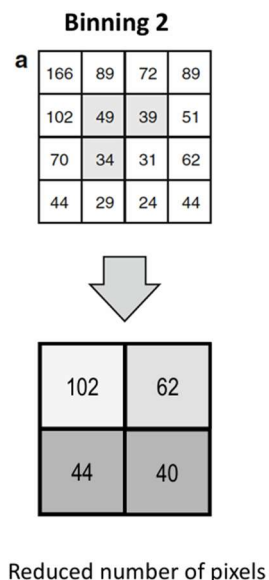
Les images peuvent également être post-traitées pour réduire le bruit. Le terme bruit se réfère aux fluctuations aléatoires des valeurs des pixels causées lors de l'acquisition de l'image. Pour le débruitage, on applique un filtre kernel qui utilise une matrice de dimensions $n \times n$. Il y a plusieurs méthodes et chacune peut utiliser une matrice kernel de la taille souhaitée :

- **Neighborhood Averaging** : La méthode la plus utilisée. La valeur de chaque pixel est remplacée par la moyenne (valeur calculée) de lui-même et de ses voisins.
- **Binning n** : Le nombre de pixels est réduit en prenant des carrés de nxn pixels et en les transformant en un seul pixel. La valeur du nouveau pixel sera la moyenne de tous les pixels qui ont été joints. Cette méthode réduit le nombre de pixels par n^2 , diminuant ainsi la résolution de l'image.
- **Gaussian Smoothing** : Les pixels sont estompés selon une distribution gaussienne.
- **Neighborhood Median** : La valeur de chaque pixel est remplacée par la médiane (valeur existante) de lui-même et de ses voisins. Il est particulièrement efficace pour corriger le salt and pepper noise (pixels noirs et blancs aléatoires). Cette méthode peut être appliquée de manière itérative.

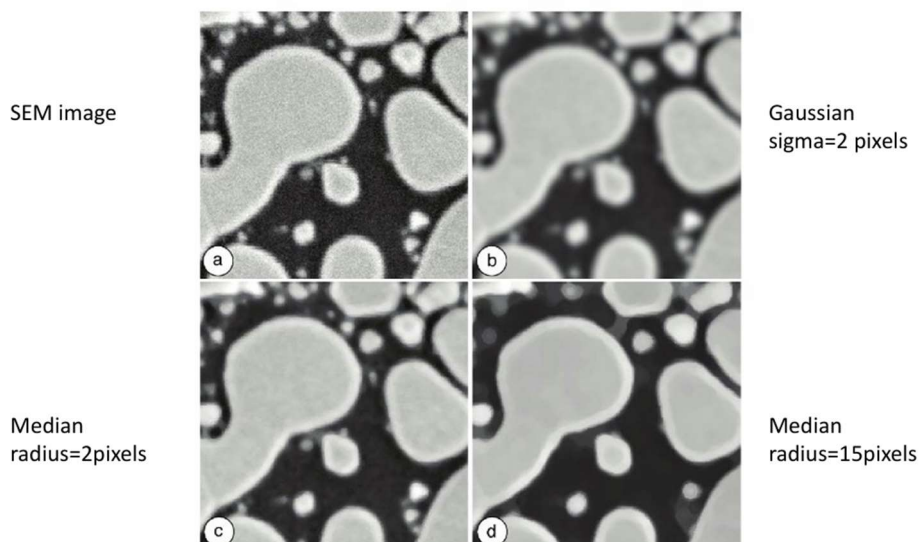
Neighbourhood averaging with 3x3 kernel



number of pixels unchanged



Gaussian Smoothing vs Median Filtering



Median filters preserve **edges** in general better than gaussian or averaging filters!