



HAL
open science

Co-design of imaging systems for depth-of-field extension – Application to single-molecule localization

Olivier Lévêque

► **To cite this version:**

Olivier Lévêque. Co-design of imaging systems for depth-of-field extension – Application to single-molecule localization. Optics [physics.optics]. Université Paris-Saclay, 2022. English. NNT : 2022UP-AST009 . tel-03583892

HAL Id: tel-03583892

<https://pastel.hal.science/tel-03583892>

Submitted on 22 Feb 2022

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.

Co-conception de systèmes d'imagerie pour l'extension de profondeur de champ – Application à la localisation de molécule unique

*Co-design of imaging systems for depth-of-field extension –
Application to single-molecule localization*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°575, electrical, optical, bio: physics and engineering (EOBE)
Spécialité de doctorat : Sciences de l'information et de la communication
Graduate School : Sciences de l'ingénierie et des systèmes. Référent : Institut d'Optique

Thèse préparée au **Laboratoire Charles Fabry** (Université Paris-Saclay, Institut d'Optique Graduate School, CNRS), sous la direction de **François GOUDAIL**, professeur des universités, et la co-direction de **Caroline KULCSÁR**, professeure des universités

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 03 février 2022, par

Olivier LÉVÊQUE

Composition du Jury

Sandrine LÉVÊQUE-FORT Directrice de recherche CNRS, ISMO, Paris-Saclay	Présidente & Examinatrice
Olivier HAEBERLÉ Professeur des universités, Université de Haute-Alsace	Rapporteur & Examineur
Jérôme IDIER Directeur de recherche CNRS, LS2N, Nantes	Rapporteur & Examineur
Laure BLANC-FÉRAUD Directrice de recherche CNRS, I3S, Nice	Examinatrice
Laurent COGNET Directeur de recherche CNRS, LP2N, Bordeaux	Examineur
Daniel SAGE Ingénieur, École polytechnique fédérale de Lausanne	Examineur
François GOUDAIL Professeur des universités, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse
Caroline KULCSÁR Professeure des universités, Université Paris-Saclay	Co-directrice de thèse

Titre : Co-conception de systèmes d'imagerie pour l'extension de profondeur de champ – Application à la localisation de molécule unique

Mots clés : Imagerie ; Co-optimisation ; Masques de phase ; Traitement d'image ; Modélisation ; Microscopie

Résumé : Une grande majorité des systèmes d'imagerie est aujourd'hui constituée à la fois d'un système optique performant et de traitements numériques des images acquises. Concevoir conjointement l'optique avec le traitement est appelé « co-conception. » Bien qu'une telle démarche soit difficile à mettre en œuvre, il existe plusieurs problématiques dans lesquelles son efficacité a été démontrée. L'une d'entre elles, étudiée dans ce manuscrit, est l'extension de la profondeur de champ en utilisant des masques de phase binaires annulaires. On distingue ici deux types d'applications. Pour la première, le produit final est une image restaurée par un algorithme de déconvolution. Nous montrons que les masques optimaux optimisés avec un critère basé sur le filtre de Wiener ou avec un critère basé sur une méthode de déconvolution non linéaire sont pratiquement identiques. La seconde

application est la microscopie par localisation de molécule unique (SMLM), où l'image acquise sert à estimer une autre information : la position ou la présence d'un marqueur fluorescent individuel. Nous proposons un critère d'optimisation des masques non plus basé sur la qualité d'une image restaurée mais sur la précision avec laquelle un marqueur peut être localisé. Avec cette méthodologie (basée sur la borne de Cramér-Rao), nous avons la capacité d'optimiser des masques d'extension de profondeur de champ dans des conditions réalistes, en tenant compte des paramètres clés d'une expérience de SMLM, et de prédire les performances de localisation qu'ils peuvent atteindre. Nous proposons aussi un traitement approprié des images acquises afin de localiser les marqueurs fluorescents avec la précision sous-pixellique prévue par nos modèles.

Title : Co-design of imaging systems for depth-of-field extension – Application to single-molecule localization

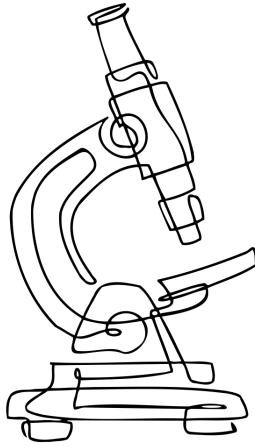
Keywords : Imaging; Co-optimization; Phase masks; Image processing; Modeling; Microscopy

Abstract: Today, a large majority of imaging systems are made up of both a high-performance optical system and digital processing of the acquired images. Designing the optics jointly with the processing is called "co-design." Although such an approach is difficult to implement, there are several problems in which its effectiveness has been demonstrated. One of them, studied in this manuscript, is the extension of the depth of field using annular binary phase masks. Two types of applications can be here distinguished. For the first one, the final product is an image restored by a deconvolution algorithm. We show that the optimal masks optimized with a criterion based on the Wiener filter or with a criterion based on a nonlinear deconvolution method are practically identical. The second application is the single molecule localization

microscopy (SMLM), where the acquired image is used to estimate another information: the position or presence of an individual fluorescent marker. We propose a criterion for mask optimization that is no longer based on the quality of a restored image but on the accuracy with which a marker can be localized. With this methodology (based on the Cramér-Rao bound), we have the ability to optimize depth-of-field extension masks under realistic conditions, taking into account the key parameters of an SMLM experiment, and to predict the localization performance they can achieve. We also propose an appropriate processing of the acquired images in order to localize the fluorescent markers with the sub-pixel accuracy predicted by our models.

CO-CONCEPTION DE SYSTÈMES D'IMAGERIE POUR L'EXTENSION DE PROFONDEUR DE CHAMP

APPLICATION À LA LOCALISATION DE MOLÉCULE UNIQUE



Thèse

présentée à l'Université Paris-Saclay,
pour l'obtention du grade et titre de docteur en sciences,
en public le 03 février 2022 à 10h00

par

Olivier LÉVÊQUE

Enseignant-chercheur doctorant
à l'Institut d'Optique Graduate School

Composition du jury :

Sandrine LÉVÊQUE-FORT,	Présidente & Examinatrice
Olivier HAEBERLÉ,	Rapporteur & Examinateur
Jérôme IDIER,	Rapporteur & Examinateur
Laure BLANC-FÉRAUD,	Examinatrice
Laurent COGNET,	Examinateur
Daniel SAGE,	Examinateur

Direction de la thèse :

François GOUDAIL,	Directeur de thèse
Caroline KULCSÁR,	Co-directrice de thèse

Les professeurs F. GOUDAIL et C. KULCSÁR ont contribué de manière significative aux travaux et à la rédaction de ce manuscrit de thèse.

Ces travaux de recherche ont été soutenus par le GdR 720 ISIS (Information, Signal, Image et ViSion) avec l'appel à projets 2019.



Mots clefs : Imagerie; Co-optimisation; Masques de phase; Traitement d'image; Modélisation; Microscopie

Imprimé par : L'atelier de reprographie de l'Institut d'Optique Graduate School

Copyright © 2022 par O. LÉVÊQUE

NNT : 2022UPAST009

Une version électronique de ce manuscrit de thèse est disponible sur
<http://www.theses.fr/2022UPAST009>

Un exposé vulgarisé de ces travaux est aussi disponible sur
<http://youtu.be/sP8N08JgrYU>

À mes parents

TABLE DES MATIÈRES

Liste des notations	vii
1 Introduction générale	1
1.1 La profondeur de champ (PdC) et son extension	2
1.1.1 Variation de la réponse impulsionnelle en éclairnement avec la dé- focalisation	2
1.1.2 Extension de la PdC à l'aide d'un masque de phase	6
1.2 Plan de la thèse et contributions	9
2 Application à la restauration d'image	13
2.1 Masques de phase pour étendre la PdC	14
2.2 Critère d'optimisation des masques.	15
2.3 Comparaison des masques de phase optimaux	18
2.4 Interprétation et discussion.	24
2.5 Conclusion	26
3 Co-conception pour la localisation de molécules uniques	29
3.1 Modèle d'imagerie pour la microscopie	32
3.1.1 Réponse impulsionnelle spatiale de l'objectif	33
3.1.2 Image d'un marqueur fluorescent	34
3.1.3 Limite théorique de la précision de localisation	35
3.1.4 Simulation d'un système avec un masque de phase	38
3.2 Co-optimisation des masques pour la localisation	39
3.2.1 Critère d'optimisation	39
3.2.2 Performance et limites des masques optimisés	40
3.3 Algorithmes de localisation 2D	43
3.3.1 Estimation basée sur une référence globale	43
3.3.2 Estimation basée sur de multiples références	46
3.4 Comparaison avec un masque de la littérature	48
3.5 Conclusion	50
4 Influence du modèle de bruit	51
4.1 Sources de bruits en microscopie de fluorescence	52
4.1.1 Approximations du critère d'optimisation des masques	53
4.1.2 Masques de phase binaires annulaires optimaux	55
4.2 Efficacité des estimateurs de localisation	58
4.2.1 Cas focalisé	58
4.2.2 Cas non focalisé	60
4.3 Conclusion	67

5	Influence du modèle d'imagerie	69
5.1	Modèles scalaires et vectoriels	70
5.2	Distance de travail optimale	72
5.2.1	Modèle d'approximation quadratique (AQ)	72
5.2.2	Modèle de Gibson & Lanni (GL)	75
5.3	Conditions d'équivalence des modèles GL et AQ	76
5.4	Conditions d'équivalence des deux modèles en présence d'un masque	79
5.5	Comparaisons des masques de phase optimaux	79
5.6	Conclusion	82
6	Co-conception pour la détection de molécules uniques	85
6.1	Détectabilité d'un marqueur fluorescent	86
6.1.1	Test d'hypothèses	86
6.1.2	Distance de Bhattacharyya	87
6.2	Co-optimisation des masques pour la détection	90
6.3	Détection vs. localisation	93
6.4	Conclusion	95
7	Conclusion générale et perspectives	97
A	Comparaison des critères MSE et BCR	101
B	Algorithme de localisation	105
B.1	Expression analytique de la variance d'estimation	105
B.2	Noyau de corrélation optimal	107
C	Modèles d'imagerie	109
C.1	Comparaison des modèles GL et AQ	109
C.2	Paramètre de défocalisation « équivalent »	110
	Bibliographie	113
	Remerciements	125
	Liste des publications et conférences	127

LISTE DES NOTATIONS

ACRONYMES

AQ	approximation quadratique
BCR	borne de Cramér-Rao
CCD	<i>charge coupled device</i>
CNRS	Centre national de la recherche scientifique
DSP	densité spectrale de puissance
FTM	fonction de transfert de modulation
GL	Gibson & Lanni
IPP	<i>Incoherently Partitioned Pupil</i>
LP2N	Laboratoire Photonique, Numérique & Nanosciences
MSE	<i>mean square error</i>
MV	maximum de vraisemblance
NA	<i>numerical aperture</i>
PALM	<i>photo-activated localization microscopy</i>
PdC	profondeur de champ
PSF	<i>point spread function</i>
RBCR	racine carrée de la borne de Cramér-Rao
RMSE	racine carrée de l'erreur quadratique moyenne
RSB	rapport signal sur bruit
SMLM	<i>single-molecule localization microscopy</i>
STED	<i>stimulated emission depletion</i>
TV	<i>total variation</i>

CONVENTIONS

a	scalaire
a^*	complexe conjugué de la variable a
\hat{a}	estimée de la variable aléatoire a
\mathbf{a}	vecteur
\mathbf{a}^t	transposée du vecteur \mathbf{a}
$\underline{\mathbf{A}}; (a_{mn})$	matrice
$[\underline{\mathbf{A}}]_{mn}; a_{mn}$	composante scalaire (m, n) de la matrice $\underline{\mathbf{A}}$
$\tilde{f}(\cdot)$	transformée de Fourier de la fonction $f(\cdot)$

OPÉRATEURS

*	produit de convolution
$\ \cdot\ $	norme euclidienne
$ \cdot $	module ou valeur absolue
$E[\cdot]$	espérance mathématique
$FT_{1D}[\cdot]$	transformée de Fourier 1D
$FT_{2D}[\cdot]$	transformée de Fourier 2D

SYMBOLES

\mathbb{R} / \mathbb{N}	ensemble des réels / des entiers naturels
$\boldsymbol{\theta} = (x_p, y_p)$	position transverse du fluorophore
$z_p \in [z_{\min}, z_{\max}]$	position longitudinale du fluorophore
$z_{\text{focus}} = z_o$	position longitudinale du plan focal
λ	longueur d'onde d'émission du fluorophore
$2P + 1$	largeur de l'imagette contenant une <i>point spread function</i> (PSF)
Δ_{xy}	largeur d'un pixel
M	grandissement
M_ψ	nombre d'intervalles divisant la <i>profondeur de champ</i> (PdC)
N_0	nombre de photo-électrons par <i>point spread function</i> (PSF)
n_s	indice de réfraction du milieu biologique
n_i	indice de réfraction du milieu d'immersion
σ_n^2	variance d'un bruit blanc additif gaussien et de moyenne nulle
b	variance du bruit de fond (distribution de Poisson)
$\psi \in [-\psi_{\max}, \psi_{\max}]$	paramètre de défocalisation
L	nombre d'anneaux du masque
$\boldsymbol{\rho}$	vecteur de paramètres du masque
$J; J_{AQ}; J_{GL}$	critère d'optimisation du masque
$W_{z_p}; W_{AQ}; W_{GL}$	différence de chemin optique
$\sigma^2; \sigma_{AQ}^2; \sigma_{GL}^2$	erreur quadratique moyenne de W_{z_p} , W_{AQ} ou W_{GL}
$\Phi_{\Delta z_i}; \Phi_{z_p}$	fonction de phase de la pupille
Φ_{mask}	fonction de phase du masque
$h_{z_p}; h_{\Delta z_i}; h_\psi$	réponse impulsionnelle du système optique (forme fonctionnelle)
$\mathbf{h}_{\boldsymbol{\rho}, \psi}$	réponse impulsionnelle du système optique (forme vectorielle)
$f_{z_p}; f_\psi$	image d'un fluorophore
f_{Airy}	tache d'Airy
s_{ij}	intensité mesurée au pixel (i, j) de l'image d'un fluorophore
$\mu_{ij}^{\psi, \boldsymbol{\theta}}$	image d'un fluorophore filtrée par la grille de pixels
r_{ij}	noyau de corrélation
r_{ij}^m	noyau de corrélation associé à l'intervalle m
N	taille des images du Chapitre 2
Δz_o	défaut de mise au point dans l'espace objet
Δz_i	défaut de mise au point dans l'espace image
z_i	distance fixe du plan principal image au plan du capteur
f'	distance focale image du système d'imagerie

1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

UNE grande majorité des systèmes d'imagerie — de l'appareil photo de votre téléphone portable aux instruments scientifiques modernes tels que les microscopes pour la biologie ou encore les télescopes pour l'astronomie — est aujourd'hui constituée à la fois d'un système optique très performant et de traitements numériques des images acquises. De par la nature très différente de ces deux domaines d'expertise, ces deux composantes — optique et traitement — sont souvent conçues et optimisées séparément : au meilleur système optique est associé le meilleur traitement numérique, pour une application donnée.

Cependant, rien ne garantit que l'ensemble du système d'imagerie soit le plus performant. Pour garantir la meilleure conception, il est donc nécessaire de le concevoir dans son ensemble. Concevoir conjointement l'optique avec le traitement numérique d'un système d'imagerie est appelé « co-conception ». Cette nouvelle approche, encore peu répandue, est à l'intersection entre deux disciplines phares : la conception optique et le traitement du signal. Les fondements mathématiques et conceptuels de cette approche, pour un système d'imagerie complet, ont été proposés par [Stork et Robinson \[2008\]](#).

* * *

Tout commence à la fin du XXe siècle où les surfaces photosensibles, dont l'image était révélée chimiquement, laissent petit à petit place à une nouvelle technologie : le capteur électronique. Ce dispositif permet de capturer une image dans un format numérique. Les images peuvent alors être traitées par des algorithmes après avoir été obtenues, de manière à améliorer leur rendu : correction des couleurs, filtrage, accentuation pour augmenter la netteté, etc.

Un grand nombre de ces traitements sont aujourd'hui appliqués automatiquement une fois l'image numérique acquise. L'image finale n'est donc plus issue uniquement d'un système optique mais d'une subtile combinaison entre optique et traitement numérique. Afin d'améliorer les performances d'imagerie et / ou de réduire certaines contraintes de conception, co-concevoir le système optique avec le traitement numérique adapté est nécessaire. Bien qu'une telle démarche soit difficile à mettre en œuvre, il

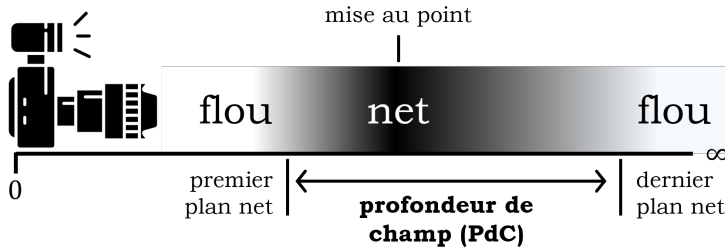


FIGURE 1.1 – Schéma de principe illustrant la PdC d'un système d'imagerie.

existe plusieurs problématiques dans lesquelles son efficacité a été démontrée. L'une d'entre elle, que nous allons étudier dans ce manuscrit, est l'augmentation de la **profondeur de champ**.

1.1.1. LA PROFONDEUR DE CHAMP (PdC) ET SON EXTENSION

Dans l'espace objet d'un système d'imagerie, il n'existe théoriquement qu'un seul plan de netteté que l'on appelle le plan de mise au point (ou plan focal) : l'image d'un objet situé en avant ou en arrière de ce plan est considérée comme floue, on dit que l'objet est « défocalisé ». En pratique, on admet une certaine tolérance de netteté, et donc, comme l'illustre la Figure 1.1, l'existence de deux limites situées de part et d'autre de ce plan. Tout objet se trouvant entre ces deux limites conduit alors à une image considérée comme nette. On appelle « **profondeur de champ (PdC)** » la distance séparant le premier plan net du dernier.

L'étendue de cette zone dépend de plusieurs paramètres, notamment l'ouverture du diaphragme de l'objectif, la distance de mise au point, mais également des conditions d'observation. En pratique, la plupart de ces paramètres sont imposés par le matériel utilisé. L'ouverture est donc le principal réglage qui permet de modifier la PdC du système d'imagerie. Plus la PdC est étendue, plus elle intègre le sujet dans son environnement; pour cela, il convient de fermer le diaphragme. *A contrario*, plus elle est courte, plus elle l'isole; il faut dans ce cas ouvrir le diaphragme. La Figure 1.2, extraite du manuel d'utilisation du Nikkormat FT2, illustre ce principe.

L'objectif de cette thèse est d'étendre la PdC d'un système d'imagerie. Pour y parvenir, il faut nous munir d'un modèle physique de la variation des propriétés du système avec la défocalisation. D'autre part, il nous faut décider quels composants optiques nous allons utiliser pour réaliser cette opération. Ces deux questions font l'objet des sections suivantes.

1.1.1.1. VARIATION DE LA RÉPONSE IMPULSIONNELLE EN ÉCLAIREMENT AVEC LA DÉFOCALISATION

Dans cette section, on définit un modèle de la variation de la réponse impulsionnelle spatiale en éclairement (en anglais *point spread function (PSF)*) d'un système d'imagerie avec la défocalisation. Considérons le système optique complet, supposé idéal, schématisé à la Figure 1.3. L'objet A , situé à une distance z_0 du plan principal objet sur l'axe

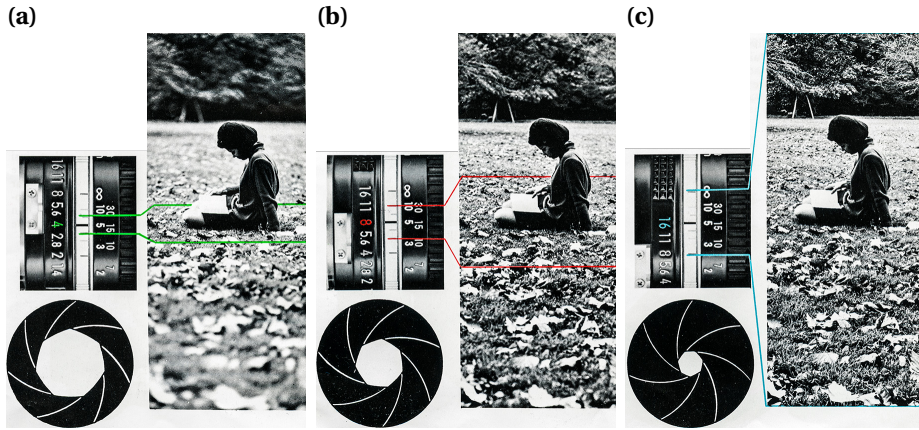


FIGURE 1.2 – Influence de l'ouverture sur la PdC d'un système d'imagerie. (a) Ouverture $f/4$. Faible PdC : seul le sujet principal est net. (b) Diaphragme fermé à $f/8$. La PdC est accrue. (c) Diaphragme fermé au maximum. On obtient une grande PdC avec le premier plan, le sujet et l'arrière plan nets. Source : Mode d'emploi du Nikkormat FT2 (p. 20-21)

optique, est conjugué avec le point A' située à une distance z_i du plan principal image. Supposons que l'on observe un objet ponctuel sur l'axe optique, noté B , situé à une certaine distance $z_o + \Delta z_o$ du plan principal objet sur l'axe optique. Son image se forme au point B' situé à une distance $z_i + \Delta z_i$ du plan principal image. Si l'image est acquise avec un capteur situé à une distance fixe z_i du plan principal image, l'image de l'objet B est alors défocalisée.

L'ouverture numérique image du système, notée NA_i , de l'anglais *numerical aperture* (NA), a pour expression :

$$NA_i = n' \times |\sin \alpha'| \quad (1.1)$$

où α' désigne l'angle orienté entre l'axe optique et le rayon sortant de la pupille qui s'en écarte le plus (voir la Figure 1.3), et n' est l'indice de réfraction du milieu image. Dans ce manuscrit, n' sera supposé égal à 1.

Pour une ouverture numérique image faible (*i.e.*, $NA_i \ll 1$), l'optique de Fourier paraxiale classique peut être appliquée du côté image. L'expression de la PSF dans le plan d'imagerie aux coordonnées (x, y) s'écrit alors [Goodman, 2017] :

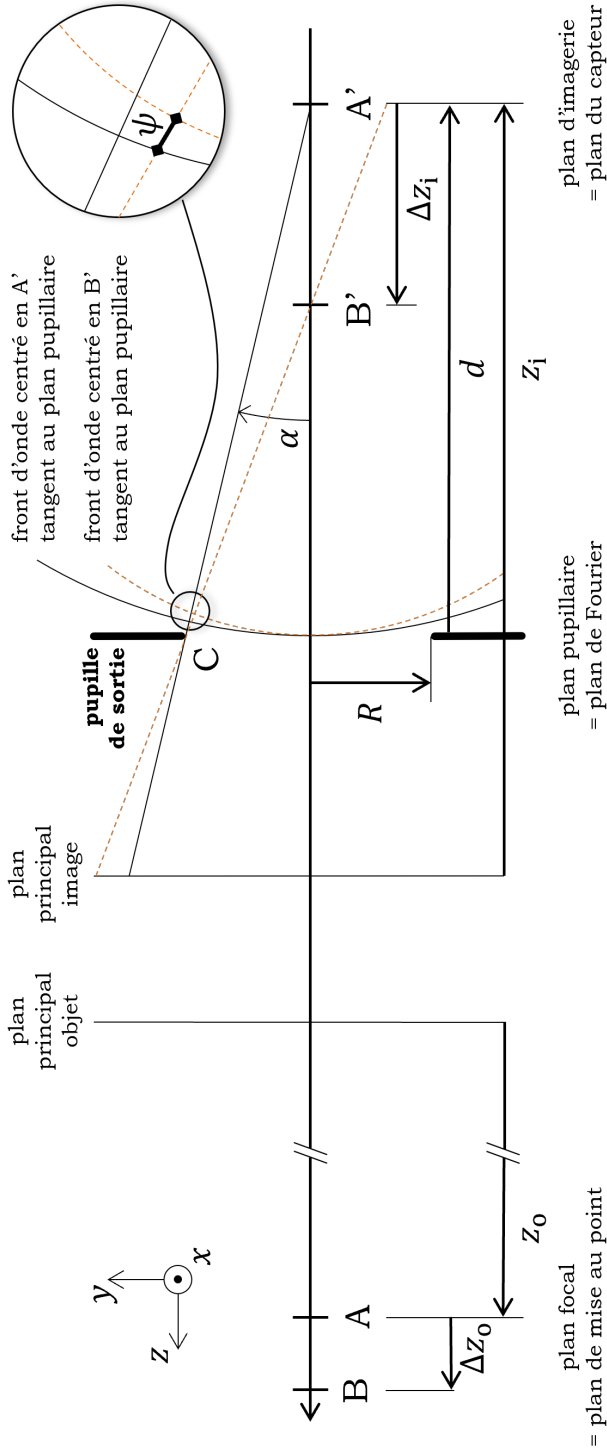
$$h_{\Delta z_i}(x, y) \propto \left| q \left(x \frac{NA_i}{\lambda}, y \frac{NA_i}{\lambda} \right) \right|^2 \quad (1.2)$$

où λ représente la longueur d'onde dans le vide de la lumière incidente, supposée monochromatique, et

$$q(\mu, \nu) = FT_{2D} [\Pi_{\text{Disk}}(a, b) \exp [i \Phi_{\Delta z_i}(a, b)]] (\mu, \nu) . \quad (1.3)$$

Dans cette expression, l'opérateur FT_{2D} désigne la transformée de Fourier 2D et

$$\Pi_{\text{Disk}}(a, b) = \begin{cases} 1 & \text{si } a^2 + b^2 \leq 1 \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} . \quad (1.4)$$

FIGURE 1.3 – Construction associée à la définition du paramètre de défocalisation ψ .

On suppose que $h_{\Delta z_i}$ est normalisée de sorte que

$$\iint_{\mathbb{R}^2} h_{\Delta z_i}(x, y) dx dy = 1. \quad (1.5)$$

La fonction $\Phi_{\Delta z_i}$ qui intervient dans l'Équation (1.3) est appelée « fonction de phase pupillaire ». Elle représente, dans la pupille de sortie du système optique, l'écart de phase entre l'onde sphérique réelle convergeant au point B' et l'onde sphérique de référence qui converge en A' . Elle permet de caractériser l'effet optique d'un défaut de mise au point (*i.e.*, Δz_i dans l'espace image ou Δz_o dans l'espace objet). Un modèle couramment utilisé décrit ce défaut par une variation quadratique de l'écart de phase dans la pupille [Born et Wolf, 1999] :

$$\Phi_{\Delta z_i}(r) \simeq \frac{2\pi}{\lambda} \psi r^2 \quad (1.6)$$

où $r = \sqrt{a^2 + b^2}$ est la coordonnée pupillaire radiale réduite. Le paramètre ψ est l'écart normal. Il caractérise l'écart de phase $2\pi\psi/\lambda$ en bord de pupille (*i.e.*, $r = 1$). Pour calculer son expression en fonction des paramètres du système optique, considérons deux fronts d'onde sphériques tangents au plan pupillaire et centrés respectivement en A' et B' . Leur écart est donc nul au centre de la pupille. On montre alors géométriquement à l'aide de la Figure 1.3 — pour des avances de phase comptées positivement — que le paramètre ψ peut s'exprimer de la manière suivante :

$$\psi \simeq -\sqrt{(d + \Delta z_i)^2 + R^2} + \sqrt{d^2 + R^2} + \Delta z_i \quad \text{avec} \quad R = \frac{\text{NA}_i \times |d|}{\sqrt{1 - \text{NA}_i^2}}. \quad (1.7)$$

En supposant que $|\Delta z_i| \ll |d|$, on obtient :

$$\psi \simeq \left(1 - \frac{|d|}{\sqrt{d^2 + R^2}}\right) \Delta z_i \quad \text{avec} \quad \frac{|d|}{\sqrt{d^2 + R^2}} = \sqrt{1 - \text{NA}_i^2} \quad (1.8)$$

Comme l'ouverture image est faible (*i.e.*, $\text{NA}_i \ll 1$), le paramètre ψ a donc l'expression approchée suivante :

$$\psi \simeq \frac{1}{2} \text{NA}_i^2 \Delta z_i. \quad (1.9)$$

Cette expression dépend de l'ouverture numérique image et du déplacement Δz_i du plan image. Or, dans la plupart des applications, on préfère caractériser la défocalisation par le déplacement Δz_o de l'objet imagé. Puisque les points B et B' sont conjugués par le système optique, on a la relation suivante :

$$-\frac{n_s}{z_o + \Delta z_o} + \frac{n'}{z_i + \Delta z_i} = \frac{n'}{f'} \quad (1.10)$$

où f' est la distance focale image du système optique¹, n_s l'indice de réfraction du milieu objet, et n' celui du milieu image (supposé égal à 1). En supposant que $|\Delta z_i| \ll |z_i|$, cette relation devient :

$$\frac{\Delta z_i}{z_i} \simeq 1 - z_i \left(\frac{n_s}{z_o + \Delta z_o} + \frac{1}{f'} \right). \quad (1.11)$$

1. Avec la convention de signe adoptée à la Figure 1.3, f' est négatif (le système optique est convergent).

Ainsi, en substituant l'expression approchée de Δz_i dans l'Équation (1.9), on obtient une autre expression du paramètre ψ :

$$\psi \simeq \frac{(z_i \times \text{NA}_i)^2}{2} \left(\frac{1}{z_i} - \frac{n_s}{z_o + \Delta z_o} - \frac{1}{f'} \right) \quad (1.12)$$

Cette expression dépend maintenant de Δz_o , mais toujours de NA_i , l'ouverture numérique dans l'espace image. Or, l'une des applications à laquelle nous nous intéresserons à partir du Chapitre 3 est la microscopie par localisation. Ce mode d'imagerie est souvent caractérisé par des paramètres optiques exprimés dans l'espace objet. Par commodité, on souhaite alors exprimer le paramètre ψ en fonction de paramètres optiques définis dans l'espace objet. Comme les objectifs de microscopes sont télécentriques côté objet, le grandissement transversal de l'ensemble objectif de microscope et lentille du tube, noté M , ne dépend pas de la position longitudinale de l'objet observé. De plus, comme les objectifs de microscope sont aplanétiques (*i.e.*, corrigés à minima de l'aberration sphérique et de la coma), ils vérifient la condition des sinus d'Abbe. On peut alors relier l'ouverture numérique image (NA_i) à l'ouverture numérique objet, notée NA , par la relation suivante [Born et Wolf, 1999] : $\text{NA}_i = \text{NA} / |M|$. Par ailleurs, le défaut de mise au point côté image Δz_i est lié à celui côté objet Δz_o par le grandissement longitudinal :

$$\Delta z_i \simeq \frac{M^2}{n_s} \Delta z_o \quad (1.13)$$

avec n_s l'indice de réfraction du milieu objet — ce qui correspond, pour la microscopie, à l'indice de réfraction du milieu biologique. Le paramètre de défocalisation ψ de l'Équation (1.9) s'exprime donc dans l'espace objet :

$$\psi \simeq \frac{\text{NA}^2}{2n_s} \Delta z_o \quad (1.14)$$

Lorsque le système optique est parfaitement focalisé sur l'objet que l'on cherche à imager, la valeur du paramètre de défocalisation ψ est égale à 0. Si $\psi \in [-\lambda/4, \lambda/4]$ alors l'image est considérée comme nette (critère de Rayleigh²). Cet intervalle correspond à la PdC naturelle du système optique que nous avons définie qualitativement à la Figure 1.1.

1.1.2. EXTENSION DE LA PdC À L'AIDE D'UN MASQUE DE PHASE

L'objectif de cette thèse est d'étendre la PdC. La manière la plus simple d'y parvenir est de réduire le nombre d'ouverture du système. En effet, comme le montre l'Équation (1.14), si l'on souhaite atteindre une certaine PdC — définie par un déplacement Δz_o par rapport au plan de mise au point —, il suffit d'ajuster la valeur de NA pour que $|\psi|$ soit inférieur à $\lambda/4$. Cependant, diminuer l'ouverture numérique fait baisser l'éclairement dans le plan image et diminue la résolution transverse. Cette méthode est donc

2. John William Strutt Rayleigh établit en 1879 qu'un écart aberrant de $\lambda/4$ en différence de marche au bord de la pupille provoque une baisse d'éclairement de 20% au centre de la réponse impulsionnelle spatiale du système d'imagerie (*i.e.*, un rapport de Strehl de 0,8) et une déformation pratiquement négligeable de la tache de diffraction d'Airy. Il adopte alors arbitrairement cette valeur comme le minimum admissible pour qu'une image soit déclarée pratiquement limitée par la diffraction (*i.e.*, pratiquement dénuée d'aberration).

rapidement limitée par les conditions réelles de la prise de vue : luminosité, vitesse d'obturation, etc. Dans certaines applications, comme par exemple la microscopie de fluorescence, ces conditions sont si contraignantes que diminuer l'ouverture est impossible.

Une nouvelle approche a donc été proposée par [Dowski et Cathey \[1995\]](#) pour étendre la PdC d'un système d'imagerie sans en modifier l'ouverture. Elle consiste à placer, dans la pupille de sortie de ce dernier, une lame de verre dont l'épaisseur varie spatialement. Cette lame, aussi appelée « masque de phase », introduit une modulation de phase dans la pupille qui modifie la PSF pour la rendre invariante à la défocalisation. Cependant, bien que la PSF soit rendue invariante, elle est aussi plus large que celle d'un système optique sans masque et correctement focalisé. Les images obtenues sont donc floues. Il est alors nécessaire de leur appliquer un traitement numérique de déconvolution pour améliorer leur qualité.

Dans ce contexte, on appelle « optimisation » la recherche de la fonction de modulation de phase optimale du masque. Le critère d'optimalité est la qualité de l'image déconvoluée. Il dépend donc des propriétés optiques à l'origine de la formation de l'image mais aussi de l'algorithme de déconvolution : ces deux éléments sont donc optimisés simultanément.

Cette approche de co-conception a d'abord été utilisée par [Diaz et al. \[2009\]](#) pour optimiser les paramètres d'un masque de phase cubique, puis généralisée à un grand nombre de fonctions de phase [[Diaz et al., 2010](#)], comme par exemple, les masques dont la phase est logarithmique [[Sherif et al., 2004](#)], exponentielle [[Yang et al., 2007](#)], ou s'exprime sous la forme de fonctions rationnelles [[Zhou et al., 2009](#)]. En particulier, elle a été utilisée pour optimiser des masques de phase binaires annulaires [[Diaz et al., 2010](#), [Falcón et al., 2017](#)], qui présentent l'intérêt d'être simples à fabriquer³ tout en ayant une capacité d'extension de PdC équivalente à celle des masques dont la phase varie continûment⁴. Ces masques sont composés d'anneaux concentriques, comme l'illustre la Figure 1.4. Un masque à L anneaux, de rayon d'ouverture unitaire, est défini par l'ensemble de ses $L - 1$ rayons, tel que $\boldsymbol{\rho} = (\rho_1; \dots; \rho_{L-1})$. Chaque anneau ajoute au front d'onde incident une phase de 0 ou π radians calculée à partir de la longueur d'onde nominale λ de lumière incidente.

Ainsi, en présence d'un front d'onde aberrant défocalisé, la fonction de phase pupillaire définie à l'Équation (1.6) devient :

$$\Phi_{\Delta z_1}(r, \boldsymbol{\rho}) \simeq \frac{2\pi}{\lambda} \psi r^2 + \Phi_{\text{mask}}(r, \boldsymbol{\rho}) \quad (1.15)$$

où Φ_{mask} désigne la fonction de phase du masque et $\boldsymbol{\rho}$ son vecteur de paramètres illustré à la Figure 1.4(b). Nous avons supposé dans l'Équation (1.15) que la fonction Φ_{mask} a la symétrie de révolution — elle ne dépend que de la coordonnée radiale r — car tous les

3. Ils sont obtenus au moyen d'un procédé classique de lithographie UV / gravure ICP (gravure ionique réactive assistée par couplage inductif) sur un substrat de silice fondue, au sein des installations de la Plateforme de Technologie Commune à Thales, l'Institut Optique Graduate School et l'École Polytechnique.

4. En illumination monochromatique, une simple gravure binaire dans un substrat diélectrique suffit pour garantir une modulation de phase de π radians à la longueur d'onde λ . Ce n'est pas forcément le cas en illumination polychromatique. Cependant, [Fontbonne et al. \[2021\]](#) ont montré expérimentalement qu'en imagerie les masques de phase optimisés sous l'hypothèse d'une illumination monochromatique sont robustes et peuvent être utilisés avec un éclairage à large spectre.

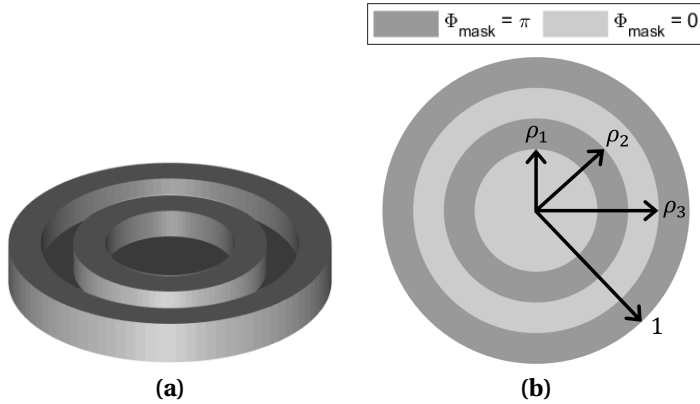


FIGURE 1.4 – Exemple d'un masque de phase binaire à $L = 4$ anneaux représenté (a) en 3D et (b) en 2D.

masques utilisés dans cette thèse possèdent cette symétrie. Cependant, les méthodologies développées peuvent facilement s'étendre à des masques sans symétrie particulière.

L'efficacité de ces masques binaires annulaires a été démontrée expérimentalement sur des systèmes optiques pour la Défense et la Surveillance, dans le domaine infrarouge [Diaz *et al.*, 2011] et visible [Burcklen *et al.*, 2015]. Dans l'ensemble de ces travaux, les masques ont été optimisés pour améliorer la qualité d'image sur une PdC étendue en supposant que le traitement numérique appliqué aux images est un algorithme de déconvolution linéaire. Cette hypothèse conduit à un critère dont l'expression est analytique, ce qui accélère l'étape d'optimisation. Cependant, les algorithmes de déconvolution non linéaires restaurent mieux les images que les algorithmes linéaires. La question a souvent été posée de connaître l'influence de l'algorithme de déconvolution (linéaire ou non) sur l'optimisation des masques. Une première partie de mes travaux se concentre donc sur cette question et s'efforce d'y apporter une réponse. Cette étude amène un éclairage sur la robustesse des masques vis-à-vis de l'algorithme de déconvolution utilisé.

Par ailleurs, en co-conception, le traitement à appliquer aux images n'est pas nécessairement une déconvolution mais un autre traitement plus adapté permettant d'extraire une information particulière. C'est par exemple le cas de la microscopie par localisation, en anglais *single-molecule localization microscopy (SMLM)*, où les images acquises permettent d'estimer la position de marqueurs fluorescents. L'équipe de Laurent COGNET, basée au Laboratoire Photonique, Numérique & Nanosciences (LP2N) à Bordeaux, est spécialiste de ce mode d'imagerie et s'est intéressée à l'utilisation de la co-conception pour étendre la PdC en SMLM. Elle a donc contacté notre équipe pour mettre à profit notre expertise. Dans cette application, le critère d'optimisation des masques est différent car les objectifs finaux sont différents (qualité d'image *vs.* précision de localisation). La suite de mes travaux, menée en collaboration avec l'équipe de Laurent COGNET, concerne donc l'extension de la PdC pour ces systèmes d'imagerie. La question de la sensibilité des masques co-conçus aux paramètres expérimentaux sera également abordée.

1.2. PLAN DE LA THÈSE ET CONTRIBUTIONS

Dans le Chapitre 2 de ce manuscrit, on considère que le produit final délivré par le système d'imagerie est une image restaurée par un algorithme de déconvolution. L'approche de co-optimisation peut être formulée de manière rigoureuse en définissant le critère d'optimisation de la fonction de phase du masque comme la différence quadratique entre une image idéalement nette et l'image délivrée par le système après déconvolution (voir par exemple les travaux de [Stork et Robinson \[2008\]](#), [Diaz *et al.* \[2009\]](#)). Pour accélérer l'étape d'optimisation, les masques sont en général optimisés à l'aide d'un critère dont l'expression est analytique. Cela n'est possible que si on suppose que la déconvolution est réalisée à l'aide d'un filtre linéaire. [Diaz *et al.* \[2009\]](#) ont montré que le filtre optimal est alors le filtre de Wiener moyen. Or, les algorithmes de déconvolution non linéaires sont connus pour avoir de meilleures performances. Nous cherchons donc dans ce chapitre à répondre à la question suivante : est-ce que de meilleures performances d'imagerie peuvent être obtenues avec un masque optimisé en prenant en compte un algorithme de déconvolution non linéaire dans le critère de co-conception ?

La suite du manuscrit est consacrée à l'optimisation de masques lorsque le traitement appliqué à l'image n'est pas une déconvolution. Ce cas de figure se rencontre en [SMLM](#). Cette technique d'imagerie de molécule unique utilise l'image acquise pour estimer, avec une résolution sous-pixellique, la position de marqueurs fluorescents. La concaténation de ces positions permet d'obtenir une image finale dont la résolution est dix fois supérieure à celle imposée par la limite de diffraction (*i.e.*, quelques dizaines de nanomètres au lieu de plusieurs centaines). Aujourd'hui, avec ce mode d'imagerie, on cherche à observer le comportement dynamique de molécules (ou de leurs ensembles) dans des environnements biologiques complexes et de plus en plus épais. Ces comportements ne sont donc pas confinés dans les deux dimensions du plan focal : la localisation doit se faire en trois dimensions.

Plusieurs approches reposant sur l'utilisation d'un masque de phase ont été proposées dans la littérature pour généraliser le concept de super-localisation à la troisième dimension. Ces masques sont conçus pour modifier la forme la [PSF](#) et la faire varier avec la profondeur. Ainsi, l'estimation de cette forme permet d'estimer la profondeur à laquelle se situe le marqueur. Bien entendu, il faut aussi veiller à ce qu'à chaque profondeur, la forme de la [PSF](#) conduise également à une estimation précise de la position latérale du fluorophore. Par exemple, [Pavani et Piestun \[2008a\]](#) ont proposé un masque de phase dont la [PSF](#) — dite à « double hélice » — est de forme allongée et « tourne » d'un angle proportionnel à la profondeur. Le critère d'optimisation de ce masque est basé sur des considérations heuristiques. [Shechtman *et al.* \[2014\]](#) ont été les premiers à optimiser des masques de phase à l'aide d'un critère explicite et général issu de la théorie de l'information : la [borne de Cramér-Rao](#). Cette quantité permet de caractériser la précision de localisation théorique avec laquelle un marqueur fluorescent peut être localisé. Leur masque — appelé « tétrapode » en raison de sa forme — conduit à un allongement progressif de la [PSF](#) lorsque la défocalisation augmente. [Zhou et Carles \[2020\]](#) ont ensuite simplifié ce masque en décrivant sa fonction de phase par un nombre limité de polynômes de Zernike⁵ et ont fourni une interprétation optique de ses propriétés. L'en-

5. Base de polynômes orthonormés définis sur le disque unité (voir par exemple [\[Born et Wolf, 1999\]](#)).

semble de ces masques permettant d'estimer la profondeur ont des variations de phase continues, et présentent donc des difficultés de fabrication. De plus, leur PSF a une extension spatiale importante, ce qui peut être problématique lorsque les marqueurs à localiser sont proches les uns des autres.

D'autre part, des discussions avec l'équipe de Laurent COGNET nous ont permis de comprendre que dans certaines applications, il n'est pas nécessaire d'estimer les profondeurs auxquelles se situent les marqueurs, mais simplement de rendre la précision d'estimation de leur position latérale insensible à la profondeur. Cela revient à réaliser une projection axiale des positions des fluorophores sur la plus grande épaisseur d'échantillon possible. En d'autres termes, il s'agit d'« augmenter la PdC » de la microscopie par localisation. C'est à cet objectif qu'est consacrée la seconde partie de ce manuscrit.

Dans le Chapitre 3, je développe une méthode d'optimisation des masques binaires annulaires pour atteindre une PdC désirée en SMLM. Le critère d'optimisation est la borne de Cramér-Rao de l'estimation de la position latérale d'un marqueur. Les performances des masques obtenus sont caractérisées et comparées à celles d'autres masques de la littérature. Cependant, la borne de Cramér-Rao ne constitue qu'une borne (inférieure) de la variance d'estimation de la position d'un fluorophore : il reste donc à vérifier qu'elle peut être atteinte en pratique. Dans la troisième section du chapitre, je propose un algorithme de localisation basé sur le maximum de vraisemblance qui permet d'atteindre la borne de Cramér-Rao dans des conditions où le rapport signal sur bruit est favorable.

Les résultats obtenus dans le Chapitre 3 reposent sur des hypothèses qu'il est nécessaire de vérifier et de discuter pour mieux cerner la généralité de la méthode proposée. Ce travail est réalisé dans les deux chapitres suivants. Dans le Chapitre 4, je me concentre sur les hypothèses liées aux traitements numériques. Tout d'abord, j'étudie l'influence des deux sources de bruit principales en microscopie optique : le bruit de grenaille lié au signal de fluorescence émis par les marqueurs, et le bruit de fond lié à la fluorescence endogène non désirée provenant de composés naturels, tels que le tissu biologique. J'étudie les conditions expérimentales dans lesquelles chacune de ces deux sources de bruit domine, et l'influence qu'exerce un changement de la source dominante de bruit sur l'optimisation des masques. D'autre part, comme le critère d'optimisation est la borne de Cramér-Rao, il est important de déterminer dans quelles conditions cette borne est un bon indicateur de la performance réelle de localisation. Je cherche donc à spécifier de manière précise les conditions expérimentales dans lesquelles la borne de Cramér-Rao peut être effectivement atteinte par un algorithme de localisation basé sur le maximum de vraisemblance.

Dans le Chapitre 5, je revisite les hypothèses liées à la modélisation de l'aberration optique provoquée par la défocalisation. Je montre que lorsque l'ouverture numérique de l'objectif de microscope est très grande — ce qui est en général le cas pour obtenir une bonne précision de localisation — il faut mettre en œuvre un modèle d'imagerie plus réaliste que le modèle quadratique introduit à la Section 1.1.1. Cependant, je montre aussi qu'il est possible d'établir une relation simple entre les masques optimaux obtenus dans le cadre de ces deux modèles.

Afin de préparer la mise en œuvre pratique de cette méthode d'extension de la PdC, je m'intéresse dans le Chapitre 6 à la chaîne complète du traitement numérique d'une

image acquise. En effet, ce traitement se compose de deux étapes successives : la « pré-localisation » (aussi appelée « détection »), où l'on détermine les régions de l'image dans lesquelles se trouvent des marqueurs, puis la « localisation » sous-pixellique des marqueurs dans chacune de ces régions. Les masques optimisés jusqu'à maintenant l'ont été seulement pour l'étape de localisation. Cependant, la présence d'un masque de phase dans la pupille de l'objectif affecte également l'étape de pré-localisation. Il convient donc d'étudier l'influence que peuvent avoir ces masques sur cette étape. C'est l'objet de ce dernier chapitre où un critère basé sur la distance de Bhattacharyya est utilisé pour concevoir des masques de phase optimisant la probabilité de détection de marqueurs fluorescents sur une PdC étendue. En comparant ces masques avec ceux optimisés pour l'étape de localisation, le compromis obtenu entre probabilité de détection et précision de localisation est étudié et évalué.

2

APPLICATION À LA RESTAURATION D'IMAGE

La profondeur de champ des systèmes d'imagerie peut être étendue en plaçant un masque de phase dans la pupille de leur optique et en déconvoluant l'image acquise. Ces masques permettent de produire une image intermédiaire floue, mais dont la qualité est indépendante de la position axiale de l'objet observé. Il est alors possible en appliquant une déconvolution unique de reconstruire l'objet, quelle que soit la profondeur à laquelle il se situe. Cette approche de co-optimisation peut être formulée de manière rigoureuse, en définissant le critère d'optimisation de la fonction de phase du masque comme la différence quadratique entre une image idéalement nette et l'image délivrée par le système après déconvolution. En général, on préfère optimiser les masques à l'aide d'un critère dont l'expression est analytique, ce qui accélère considérablement l'étape d'optimisation. Un grand nombre de travaux supposent donc que la déconvolution est réalisée à l'aide d'un filtre de Wiener pour définir un critère analytique. Or, les algorithmes de déconvolution non linéaires sont connus pour avoir de meilleures performances. La question se pose donc de savoir si de meilleures performances d'imagerie peuvent être obtenues avec un système optique optimisé à l'aide d'un algorithme de déconvolution non linéaire (pris en compte directement dans le critère d'optimisation), au lieu d'un algorithme linéaire.

OPTIMISER conjointement le système optique et les algorithmes de traitement associés fait partie du domaine de l'imagerie computationnelle [Mirani *et al.*, 2008, Mait *et al.*, 2018]. Cette approche peut être formulée de manière rigoureuse en définissant le critère d'optimisation à partir de l'erreur quadratique moyenne, aussi appelée *mean square error* (MSE), entre l'image idéalement nette de la scène et celle délivrée par le système après déconvolution [Mirani *et al.*, 2005, Robinson et Stork, 2006].

Différents types de systèmes d'imagerie, fonctionnant dans le visible et l'infrarouge, ont ainsi été co-optimisés (voir par exemple les travaux de Harvey *et al.* [2008], Stork et Robinson [2008], Ashok et Neifeld [2010], Trouvé *et al.* [2013], Zammit *et al.* [2014]). En particulier, les masques de phase co-conçus, visant à étendre la PdC des objectifs de caméra [Cathey et Dowski, 2002, Ben-Eliezer *et al.*, 2008, Falcón *et al.*, 2017], ont été implémentés avec succès dans plusieurs applications concrètes [Diaz *et al.*, 2011, Burcklen *et al.*, 2015].

La plupart de ces travaux utilisent le filtre Wiener comme algorithme de déconvolution. Avec ce traitement, le critère d'optimisation est analytique [Robinson et Stork, 2006, Diaz *et al.*, 2009, Sitzmann *et al.*, 2018], ce qui accélère considérablement l'étape d'optimisation. Bien sûr, il est possible d'utiliser des algorithmes non linéaires pour restaurer les images acquises, avec un système optimisé à l'aide d'un critère basé sur le filtre de Wiener [Portilla et Barbero, 2018]. C'est d'ailleurs souvent le cas en pratique, car les algorithmes de déconvolution non linéaire restaurent mieux les images que le filtre de Wiener. Mais il est aussi possible de prendre en compte un algorithme de déconvolution non linéaire directement dans le critère d'optimisation. Par exemple, cette approche a récemment été proposée par Elmalem *et al.* [2018] pour optimiser conjointement des masques de phase binaires destinés à étendre la PdC avec un algorithme de déconvolution basé sur un réseau neuronal artificiel. Cependant, elle se fait au prix d'une étape d'optimisation plus complexe et plus longue.

La question est de savoir si cela en vaut la peine. En d'autres termes, il est important de déterminer si de meilleures performances d'imagerie peuvent être obtenues avec un système optique optimisé en supposant que la déconvolution est réalisée à l'aide d'un algorithme non linéaire au lieu du filtre de Wiener.

Une difficulté majeure, pour répondre à cette question, est qu'il existe un très grand nombre d'algorithmes de déconvolution non linéaires différents et qu'il est impossible d'être exhaustif. Par conséquent, nous avons choisi de nous concentrer sur un seul d'entre eux : la régularisation par variation totale. Cette approche variationnelle pour la restauration d'image est bien connue, bien documentée, efficace et largement utilisée pour préserver les contours des objets dans l'image restaurée [Titterton, 1985].

De plus, nous limitons notre attention à un problème précis de co-optimisation, à savoir la conception de masques de phase binaires annulaires pour l'extension de PdC. Ce type de masques est plus facile à produire que ceux dont la phase varie continûment, comme par exemple le masque cubique [Dowski et Cathey, 1995], et il a été démontré par Falcón [2017] qu'ils ont une capacité d'amélioration de la PdC similaire.

2.1. MASQUES DE PHASE POUR ÉTENDRE LA PDC

Il existe plusieurs raisons pour lesquelles un système optique peut être défocalisé. Par exemple, les objets de la scène peuvent être situés à différentes distances, de sorte

que le système ne peut être focalisé pour voir net l'ensemble de la scène. La distance focale de l'objectif du système optique peut aussi varier avec la température [Perry, 1943] ou le chromatisme [Trouvé *et al.*, 2013]. Dans ces deux situations, le plan où se forme l'image n'est plus celui du capteur, ce qui conduit à un défaut de mise au point. Pour obtenir une image nette dans ces conditions, la PdC du système d'imagerie doit être étendue.

Comme nous l'avons évoqué au chapitre précédent, une technique bien connue consiste à placer un masque de phase dans le diaphragme d'ouverture du système optique pour augmenter sa PdC.

Supposons que l'on observe un objet, à travers un système optique idéal (comme illustré à la Figure 1.3), situé à une certaine distance $z_o + \Delta z_o$ du plan principal objet, et que l'on acquiert son image à l'aide d'un capteur situé à une distance fixe z_i du plan principal image. Le défaut de mise au point, notée Δz_o dans l'espace objet ou Δz_i dans l'espace image, est classiquement caractérisé par le paramètre de défocalisation ψ défini par l'Équation (1.12). Pour rappel, la PdC naturelle du système optique, *i.e.*, la profondeur pour laquelle l'image est considérée comme nette, correspond à l'intervalle : $\psi \in [-\lambda/4; \lambda/4]$ (critère de Rayleigh).

Notre objectif est d'obtenir un système d'imagerie offrant une bonne qualité image sur une plus grande plage de PdC, notée $[-\psi_{\max}; \psi_{\max}]$. En utilisant des masques binaires avec une symétrie de révolution et une modulation de phase égale à π radians, cette plage est toujours symétrique puisque la PSF du système d'imagerie est identique pour ψ et $-\psi$ [Falcón *et al.*, 2017]. On peut donc restreindre l'optimisation des masques à l'intervalle $[0; \psi_{\max}]$.

Une image acquise par un système optique équipé d'un masque de phase binaire annulaire de paramètre ρ , et défocalisé d'une valeur ψ , peut être modélisée par :

$$\mathbf{y} = \mathbf{h}_{\rho, \psi} * \mathbf{x}_0 + \mathbf{n} \quad (2.1)$$

où le symbole $*$ désigne le produit de convolution, \mathbf{y} l'image observée, \mathbf{x}_0 l'image numérique idéalement nette inconnue, \mathbf{n} un bruit additif blanc de moyen nulle, et $\mathbf{h}_{\rho, \psi}$ la PSF du système optique définie à l'Équation (1.2), qui dépend de ρ et ψ . L'estimation de l'image \mathbf{x}_0 , notée $\hat{\mathbf{x}}$, est réalisée à partir de l'image \mathbf{y} , en utilisant un algorithme de déconvolution.

2.2. CRITÈRE D'OPTIMISATION DES MASQUES

De nombreux critères ont été proposés pour optimiser le vecteur ρ de paramètres du masque. Beaucoup d'entre eux sont basés sur les propriétés de la **fonction de transfert de modulation (FTM)**, *i.e.*, la transformée de Fourier de $\mathbf{h}_{\rho, \psi}$. Par exemple, dans les travaux de Ben-Eliezer *et al.* [2008], le critère consiste à maximiser la fréquence de coupure effective, définie comme la plus grande fréquence pour laquelle la valeur de la FTM est supérieure à un certain seuil. Dans ce chapitre, nous utilisons une approche alternative proposée par Mirani *et al.* [2005], Robinson et Stork [2006] et repris dans les travaux de Stork et Robinson [2008], Diaz *et al.* [2009] qui consiste à prendre directement en compte la qualité de l'image restaurée dans le critère d'optimisation. Cette qualité est définie

comme la **MSE** entre l'image estimée $\hat{\mathbf{x}}$ et l'image idéalement nette \mathbf{x}_0 :

$$\text{MSE}(\psi, \boldsymbol{\rho}) = \frac{1}{N} \|\hat{\mathbf{x}}(\psi, \boldsymbol{\rho}) - \mathbf{x}_0\|^2 \quad (2.2)$$

où le symbole $\|\cdot\|$ désigne la norme euclidienne et N la taille des images.

Notons que ce critère est largement utilisé dans les travaux portant sur la restauration d'image, y compris pour les approches les plus récentes basées sur l'apprentissage statistique (*i.e.*, en *machine learning*). Puisqu'il prend en compte la qualité de l'image restaurée, ce critère trouve un compromis entre restauration des composantes de haute fréquence spatiale de l'image et **rappor signal sur bruit (RSB)**. Le résultat de ce compromis est étudié en détail dans les travaux de Fontbonne *et al.* [2019], à travers le concept de « **FTM effective** » après déconvolution.

Le critère **MSE**, défini à l'Équation (2.2), dépend des paramètres du masque $\boldsymbol{\rho}$ et du paramètre de défocalisation ψ . Nous définissons la qualité image globale comme la valeur maximale de la **MSE** sur l'ensemble de la plage de défocalisation :

$$\text{MMSE}(\boldsymbol{\rho}) = \max_{\psi \in [0; \psi_{\max}]} \text{MSE}(\psi, \boldsymbol{\rho}) . \quad (2.3)$$

En pratique, nous maximisons la **MSE** sur un ensemble fini de K valeurs de défocalisation, notées $\{\psi_k\}_{k=1,2,\dots,K}$, uniformément réparties dans l'intervalle $[0; \psi_{\max}]$. Les paramètres optimaux du masque, notés $\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}$, sont déterminés en minimisant la **MMSE** :

$$\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}} = \underset{\boldsymbol{\rho}}{\text{argmin}} \text{MMSE}(\boldsymbol{\rho}) . \quad (2.4)$$

Pour un algorithme de déconvolution linéaire, l'image estimée a pour expression :

$$\hat{\mathbf{x}} = \mathbf{d} * \mathbf{y} \quad (2.5)$$

où \mathbf{d} est la réponse impulsionnelle du filtre de déconvolution. Dans la suite, nous utiliserons le filtre qui minimise la moyenne de la **MSE** sur l'ensemble de la plage de défocalisation, *i.e.*, $\sum_{k=1}^K \text{MSE}(\psi_k, \boldsymbol{\rho})$. Diaz *et al.* [2009] ont montré que ce filtre a pour expression dans le domaine de Fourier :

$$\tilde{\mathbf{d}}(\nu) = \frac{S_{xx}(\nu) \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K \tilde{\mathbf{h}}_{\boldsymbol{\rho}, \psi_k}^*(\nu)}{S_{xx}(\nu) \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K |\tilde{\mathbf{h}}_{\boldsymbol{\rho}, \psi_k}(\nu)|^2 + S_{nn}(\nu)} \quad (2.6)$$

où le symbole \sim désigne la transformée de Fourier, l'exposant $*$ le complexe conjugué, $|\cdot|$ le module, S_{xx} la **densité spectrale de puissance (DSP)** de l'image idéalement nette \mathbf{x}_0 , et S_{nn} la **DSP** du bruit \mathbf{n} . On approxime la DSP de l'image idéalement nette S_{xx} par le module carré de sa transformée de Fourier, *i.e.*, $|\tilde{\mathbf{x}}_0|^2$ et S_{nn} sera une valeur constante déterminée par le **RSB**. Pour un bruit blanc additif gaussien, de moyenne nulle et de variance constante σ_n^2 telle que :

$$\sigma_n^2 = \int_{\mathbb{R}} S_{nn}(\nu) d\nu , \quad (2.7)$$

le RSB exprimé en décibel a pour expression :

$$\text{RSB} = 10 \log \left(\frac{\int_{\mathbb{R}} S_{xx}(v) dv}{\sigma_n^2} \right). \quad (2.8)$$

L'avantage des filtres de déconvolution linéaire est de conduire à une expression analytique de la MSE, définie à l'Équation (2.2) [Robinson et Stork, 2006, Diaz *et al.*, 2009, Vettenburg *et al.*, 2010] :

$$\text{MSE}(\psi, \boldsymbol{\rho}) = \int_{\mathbb{R}} |\tilde{d}(v) \tilde{h}_{\boldsymbol{\rho}, \psi}(v) - 1|^2 S_{xx}(v) dv + \int_{\mathbb{R}} |\tilde{d}(v)|^2 S_{nn}(v) dv. \quad (2.9)$$

Cette expression de qualité image permet de résoudre très efficacement le problème d'optimisation défini à l'Équation (2.4). Par exemple, cette approche fut utilisée avec succès par Diaz *et al.* [2009], Burcklen *et al.* [2015], Falcón *et al.* [2017] pour co-optimiser des masques dans plusieurs applications concrètes mises en œuvre expérimentalement.

Cependant, les algorithmes non linéaires sont connus pour mieux restaurer les images que le filtre de Wiener. Les systèmes d'imagerie co-optimisés sur la base de ces algorithmes sont donc susceptibles de conduire à de meilleures performances. Afin de vérifier cette hypothèse, nous considérons, dans la suite de ce chapitre, l'approche variationnelle suivante. La déconvolution est réalisée à l'aide d'un algorithme non linéaire avec un terme de régularisation par variation totale, de l'anglais *total variation* (TV) :

$$\hat{\mathbf{x}} = \arg \min_{\mathbf{x}} \left\{ \frac{1}{2} \left\| \mathbf{y} - \left(\frac{1}{K} \sum_{k=1}^K \mathbf{h}_{\boldsymbol{\rho}, \psi_k} \right) * \mathbf{x} \right\|^2 + \mu \sum_{i=1}^N \|D_i \mathbf{x}\| \right\} \quad (2.10)$$

où D_i est un opérateur linéaire qui estime la valeur du gradient spatial de l'image \mathbf{x} au pixel indexé par i . Cette méthode de régularisation a été introduite par Rudin, Osher, et Fatemi [1992] pour mieux préserver les contours de l'image par rapport à la régularisation quadratique implicitement utilisée par le filtre de Wiener. De nombreuses méthodes existent dans la littérature pour résoudre l'Équation (2.10). Nous utilisons ici l'algorithme primal-dual du premier ordre, développé par Chambolle et Pock [2011], et disponible dans la boîte à outils MATLAB® GlobalBioIm¹ réalisée par Unser *et al.* [2017]. Cet algorithme étant itératif, nous ne pouvons trouver d'expression analytique du critère MSE comme c'était le cas précédemment à l'Équation (2.9). Le processus d'optimisation est donc beaucoup plus long. Par ailleurs, cet algorithme nécessite de régler le paramètre de régularisation μ . Ce paramètre est estimé de la manière suivante :

$$\hat{\mu}(\psi, \boldsymbol{\rho}) = \arg \min_{\mu} \text{MSE}(\psi, \boldsymbol{\rho}, \mu) \quad (2.11)$$

où la dépendance en μ de la MSE définie à l'Équation (2.2) a été explicitée. Ainsi, le masque optimal est obtenu par :

$$\begin{aligned} \boldsymbol{\rho}_{\text{opt}} &= \arg \min_{\boldsymbol{\rho}} \left\{ \max_{\psi} \text{MSE}(\psi, \boldsymbol{\rho}, \hat{\mu}) \right\} \\ &= \arg \min_{\boldsymbol{\rho}} \left\{ \max_{\psi} \min_{\mu} \text{MSE}(\psi, \boldsymbol{\rho}, \mu) \right\}. \end{aligned} \quad (2.12)$$

1. Le code source est publié sur <https://github.com/Biomedical-Imaging-Group/GlobalBioIm>

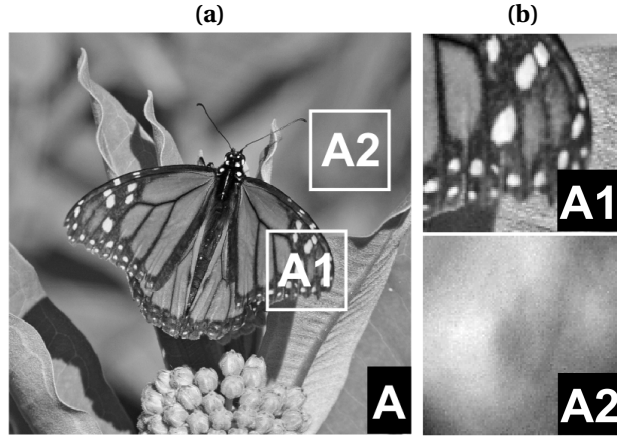


FIGURE 2.1 – (a) Image originale \mathbf{x}_0 en niveaux de gris utilisée dans nos simulations, que nous nommerons « Image A ». (b) Deux imageries avec des variations spatiales très différentes : des détails haute fréquence (A1) et des variations spatiales lisses (A2).

Notons que d'après l'Équation (2.11), $\hat{\mu}$ dépend de ψ qui est inconnu dans la pratique. On ne peut donc pas déconvoluer les images acquises à l'aide de l'Équation (2.10). Cependant, nous considérons dans la suite détenir les valeurs de $\hat{\mu}$ en fonction de ψ . Les résultats obtenus majoreront donc les performances d'une mise en œuvre réelle de l'algorithme de déconvolution TV.

2.3. COMPARAISON DES MASQUES DE PHASE OPTIMAUX

Dans cette section, nous optimisons des masques de phase avec un critère construit soit à partir du filtre de Wiener moyenné, soit à partir de l'algorithme de déconvolution TV. Nous comparons ensuite les paramètres et les performances des masques obtenus en optimisant chacun de ces deux critères.

On considère trois valeurs différentes de PdC souhaitée, à savoir $\psi_{\max} = \{1\lambda; 1, 5\lambda; 2\lambda\}$. Il a été montré par Falcón *et al.* [2017] que ces PdC peuvent être atteintes en utilisant des masques de phase binaires annulaires composés de 2 à 4 anneaux. De plus, il est évident que l'optimisation des masques dépend de l'image idéalement nette \mathbf{x}_0 utilisée. Nous avons donc effectué plusieurs optimisations sur un ensemble d'images \mathbf{x}_0 de caractéristiques différentes. Nous présenterons et analyserons d'abord les résultats d'optimisation obtenus lorsque l'image \mathbf{x}_0 est celle du *Papillon* illustrée à la Figure 2.1(a). On considérera une valeur de RSB égale à 34 dB, ce qui correspond à un écart-type de bruit égal à $\sigma = 2,4 \cdot 10^{-3}$ sur l'image *Papillon* (la valeur des pixels de l'image \mathbf{x}_0 est comprise entre 0 et 1).

Pour déterminer les paramètres optimaux ρ_{opt} du masque de phase, nous effectuons une recherche exhaustive dans l'espace des paramètres. Cette approche, déterministe, assure de trouver le minimum global, ce qui pourrait ne pas être le cas avec un algorithme d'optimisation itératif. Nous explorons l'espace des paramètres ρ_n , où $n \in [1, L - 1]$, avec un pas tel que $\Delta\rho_n = 5 \cdot 10^{-2}$. Nous affinons ensuite cette recherche,

avec un pas plus petit $\Delta\rho_n = 5 \cdot 10^{-3}$, autour de la position du minimum global pour l'estimer avec une meilleure précision. De plus, dans le cas du critère basé sur l'algorithme de déconvolution **TV**, la valeur du paramètre de régularisation $\hat{\mu}$, telle que définie à l'Équation (2.11), est estimée pour chaque valeur de ρ et de ψ avec la méthode de Nelder-Mead [Lagarias *et al.*, 1998]. Étant donné que le processus d'optimisation exhaustif est chronophage, nous utilisons des méthodes de calcul parallèles pour accélérer cette étape.

Considérons, pour commencer, l'optimisation d'un masque à $L = 2$ anneaux défini par le rayon interne ρ_1 . La Figure 2.2(a) représente la valeur du critère MMSE, défini à l'Équation (2.3), en fonction du rayon ρ_1 lorsque le filtre de Wiener est utilisé. Les trois courbes correspondent aux trois valeurs considérées de **PdC**, à savoir $\psi_{\max} = \{1\lambda; 1,5\lambda; 2\lambda\}$. La Figure 2.2(b) représente les résultats obtenus avec l'algorithme de déconvolution **TV**. En comparant ces deux graphes, on observe que quelle que soit la valeur ψ_{\max} considérée, les courbes obtenues avec les deux critères ont des allures similaires et atteignent leurs minima pour les mêmes valeurs ρ_1 : les masques optimaux sont donc identiques.

À présent, considérons l'optimisation d'un masque à $L = 3$ anneaux, défini par le couple de paramètres $(\rho_1; \rho_2)$. Les Figures 2.2(c-d) représentent respectivement l'évolution du critère de Wiener et de **TV** en fonction de ces deux paramètres pour $\psi_{\max} = 2\lambda$. Nous remarquons que le paysage d'optimisation de ces deux critères est de nouveau très similaire et que leur minimum global correspond aux mêmes valeurs de paramètres, *i.e.*, $(\rho_1; \rho_2) = (0,55; 0,75)$. Les masques optimaux sont donc identiques. Nous avons également optimisé des masques à $L = 4$ anneaux², définis par les 3 paramètres $(\rho_1; \rho_2; \rho_3)$. Une fois encore, nous avons constaté que les masques optimaux, pour les deux critères, sont identiques.

Ces résultats ont été obtenus avec l'image *Papillon* (voir Figure 2.1(a)), comme image idéalement nette x_0 . Afin de confirmer ce résultat, nous avons effectué les mêmes optimisations sur de nombreuses autres images de scènes différentes. Nous avons observé, pour chacune d'entre elles, que les masques optimaux sont identiques quel que soit le critère d'optimisation utilisé. Par exemple, nous avons illustré, aux Figures 2.3 et 2.4, les résultats d'optimisation réalisés avec deux autres images x_0 de caractéristiques différentes. On constate que les masques optimaux à 2 et 3 anneaux obtenus avec les deux critères sont identiques.

Notons qu'en pratique, il serait préférable d'optimiser un unique masque de phase sur un grand nombre d'images correspondant à l'application souhaitée. Si on utilise le filtre de Wiener, cela revient à considérer une densité spectrale de puissance S_{xx} , dans son expression définie à l'Équation (2.6) et dans celle de la **MSE** définie à l'Équation (2.9), caractérisant l'ensemble des images. En revanche, si on utilise un algorithme de déconvolution **TV**, chaque image doit être déconvoluée pour calculer une **MSE** moyenne. Cette opération est très chronophage et demande une grande puissance de calcul. Comme cette étape doit être réalisée à chaque itération de l'algorithme d'optimisation du masque, le temps d'optimisation est proportionnel à la taille de l'ensemble des images utilisées.

Afin de résumer les résultats obtenus, nous avons représenté, à la Figure 2.5(a), le

2. Ces résultats ne sont pas illustrés dans ce chapitre.

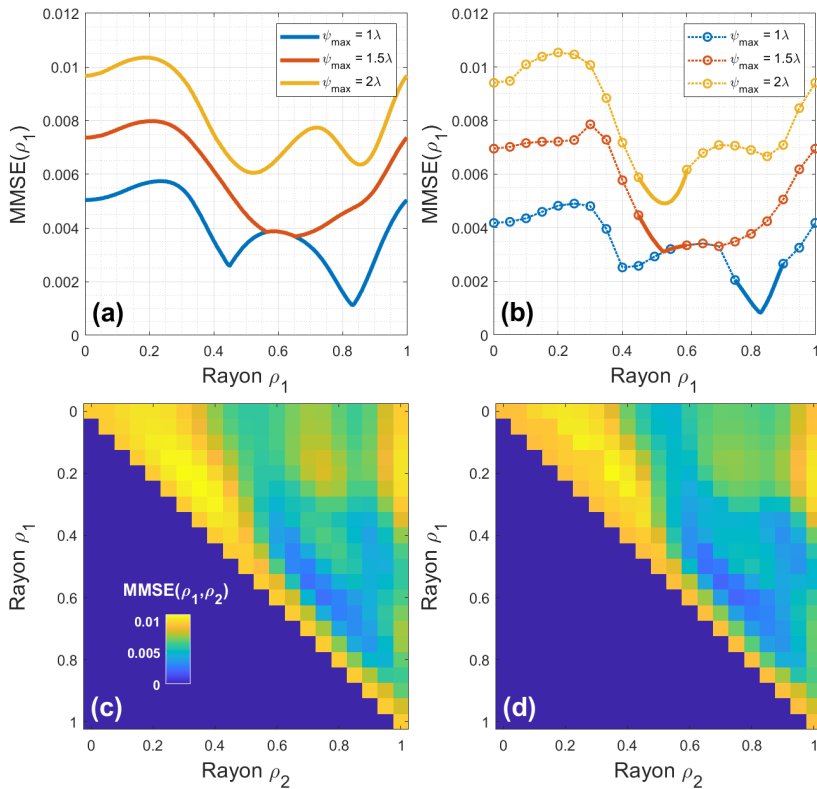


FIGURE 2.2 – Valeur de la qualité image globale, notée MMSE, en fonction du rayon ρ_1 d'un masque à 2 anneaux pour 3 valeurs de PdC : $\psi_{\max} \in \{1\lambda; 1.5\lambda; 2\lambda\}$. L'image y est restaurée soit (a) avec le filtre de Wiener, (b) soit avec l'algorithme de déconvolution TV. Valeur de la MMSE en fonction des deux rayons ($\rho_1; \rho_2$) d'un masque à 3 anneaux pour $\psi_{\max} = 2\lambda$. L'algorithme utilisé est soit (c) le filtre de Wiener, soit (d) la déconvolution TV.

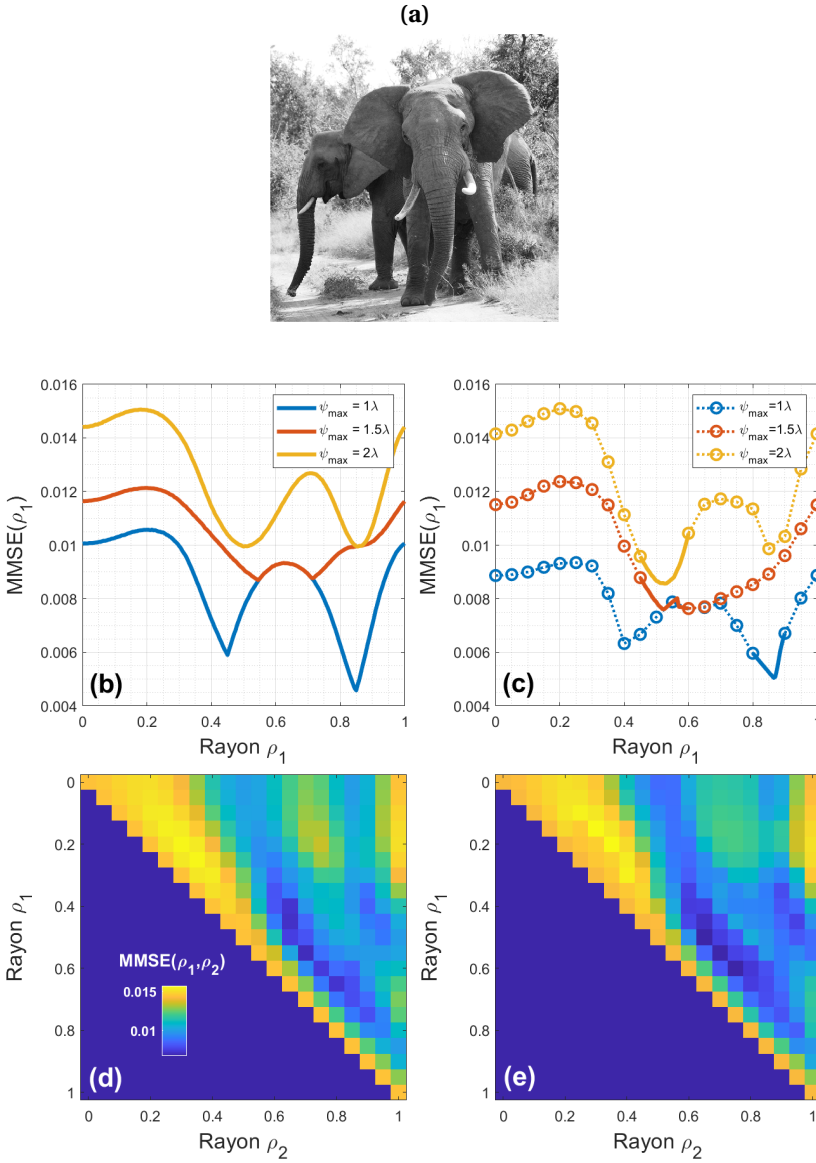


FIGURE 2.3 – (a) Image originale x_0 en niveaux de gris utilisée dans cette simulation. Valeur de la qualité image globale, notée MMSE, en fonction du rayon ρ_1 d'un masque à 2 anneaux pour 3 valeurs de PdC : $\psi_{\max} \in \{1\lambda; 1.5\lambda; 2\lambda\}$. L'image y est restaurée soit (b) avec le filtre de Wiener, (c) soit avec l'algorithme de déconvolution TV. Valeur de la MMSE en fonction des deux rayons $(\rho_1; \rho_2)$ d'un masque à 3 anneaux pour $\psi_{\max} = 2\lambda$. L'algorithme utilisé est soit (d) le filtre de Wiener, soit (e) la déconvolution TV.

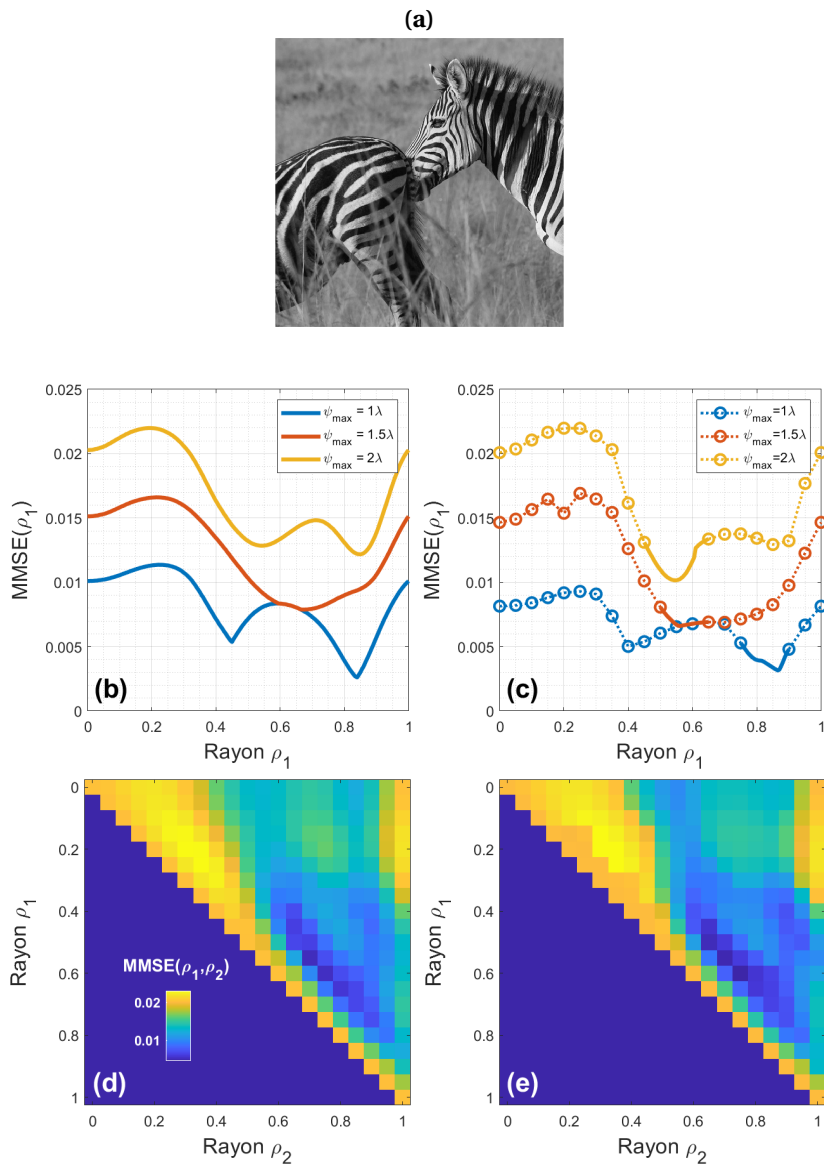


FIGURE 2.4 – Mêmes résultats que ceux présentés à la Figure 2.3, cependant la simulation est réalisée avec l'image \mathbf{x}_0 illustrée en (a).

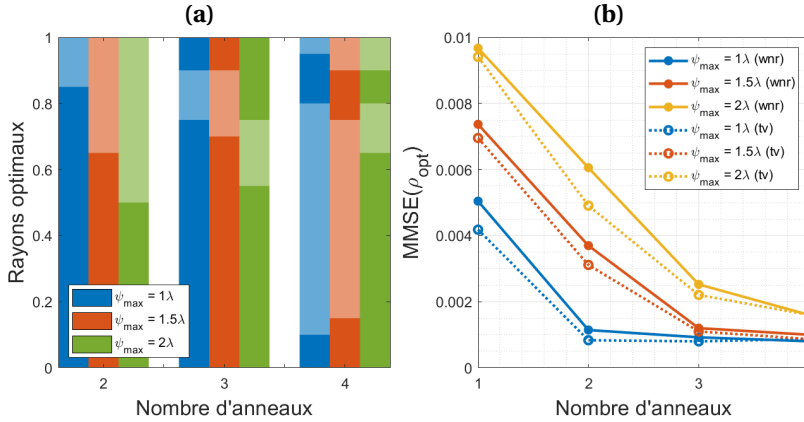


FIGURE 2.5 – (a) Profils des masques optimaux à 2, 3 et 4 anneaux pour 3 valeurs différentes de PdC ψ_{\max} . Les masques sont très similaires quel que soit l’algorithme de déconvolution (Wiener / TV) utilisé pour leur optimisation. (b) Évolution du maximum de l’erreur quadratique moyenne (MMSE) en fonction du nombre d’anneaux pour différentes valeurs de PdC ψ_{\max} .

profil des masques optimaux (qui sont, pour rappel, identiques pour les deux critères) en fonction du nombre d’anneaux et de la PdC ψ_{\max} souhaitée. De plus, les valeurs de la qualité image globale MMSE, définies à l’Équation (2.3), et obtenues avec ces masques optimaux, sont tracées à la Figure 2.5(b). Chaque courbe correspond à l’un des deux algorithmes de déconvolution (*i.e.*, Wiener ou TV) et à l’une des trois PdC souhaitées, à savoir $\psi_{\max} = \{1\lambda; 1.5\lambda; 2\lambda\}$. On remarque que l’algorithme de déconvolution TV conduit toujours à des valeurs de la MMSE plus faibles que celles obtenues avec le filtre de Wiener. Ce constat corrobore un résultat bien connu : les algorithmes de déconvolution basés sur la régularisation TV restaurent mieux les images de scènes naturelles que le filtre de Wiener. En conclusion, nous avons montré que les critères d’optimisation basés sur le filtre de Wiener et sur la déconvolution TV conduisent aux mêmes masques optimaux d’extension de la PdC, même si lors de leur utilisation, la qualité finale de l’image restaurée dépend de l’algorithme de déconvolution utilisé. Ce résultat est important car l’optimisation du critère basée sur le filtre de Wiener, dont la forme est analytique (voir l’Équation (2.9)), est bien plus rapide que celle basée sur la déconvolution TV.

Pour généraliser cette conclusion, nous avons optimisé un masque de phase à $L = 2$ anneaux pour une PdC telle que $\psi_{\max} = 1\lambda$ et deux niveaux de bruit supplémentaires. D’après la Figure 2.5(b), les masques à 2 anneaux sont suffisants pour atteindre la plus petite valeur possible de la MMSE lorsque $\psi_{\max} = 1\lambda$. Les deux niveaux de bruit supplémentaires sélectionnés, 24 dB et 9 dB, correspondent respectivement à des écarts-types de bruit $\sigma = 8,0 \cdot 10^{-3}$ et $\sigma = 4,3 \cdot 10^{-2}$ sur l’image *Papillon*. Les résultats, synthétisés dans le Tableau 2.1, montrent que les critères d’optimisation basés sur le filtre de Wiener et l’algorithme de déconvolution TV mènent à des masques optimaux similaires quel que soit le niveau de bruit considéré.

RSB	Image x_0	Filtre de Wiener		Déconvolution TV	
		ρ_1^{opt}	MMSE(ρ_1^{opt})	ρ_1^{opt}	MMSE(ρ_1^{opt})
34 dB	<i>Papillon</i>	0,830	$1,12 \cdot 10^{-3}$	0,830	$8,34 \cdot 10^{-4}$
	<i>Éléphants</i>	0,850	$4,58 \cdot 10^{-3}$	0,865	$5,04 \cdot 10^{-3}$
	<i>Zèbres</i>	0,840	$2,61 \cdot 10^{-3}$	0,865	$3,14 \cdot 10^{-3}$
24 dB	<i>Papillon</i>	0,825	$1,38 \cdot 10^{-3}$	0,840	$1,59 \cdot 10^{-3}$
	<i>Éléphants</i>	0,855	$4,35 \cdot 10^{-3}$	0,880	$4,87 \cdot 10^{-3}$
	<i>Zèbres</i>	0,830	$3,00 \cdot 10^{-3}$	0,855	$3,45 \cdot 10^{-3}$
9 dB	<i>Papillon</i>	0,825	$2,58 \cdot 10^{-3}$	0,835	$2,39 \cdot 10^{-3}$
	<i>Éléphants</i>	0,825	$7,76 \cdot 10^{-3}$	0,830	$7,71 \cdot 10^{-3}$
	<i>Zèbres</i>	0,825	$4,82 \cdot 10^{-3}$	0,835	$4,67 \cdot 10^{-3}$

TABLEAU 2.1 – Résultats d'optimisation d'un masque de phase binaire à 2 anneaux pour une PdC de $\psi_{\text{max}} = 1\lambda$. Les simulations sont réalisées pour 3 images x_0 différentes et 3 niveaux de bruit (RSB) différents : 34 dB (faible niveau de bruit), 24 dB (niveau de bruit moyen) et 9 dB (niveau de bruit élevé).

2.4. INTERPRÉTATION ET DISCUSSION

Comment expliquer cette similitude des masques optimisés sur des critères différents? Une première interprétation peut être trouvée à l'aide de la Figure 2.6, où le profil de la PSF est représenté en fonction du paramètre de défocalisation ψ . Notons que puisque la PSF est de symétrie circulaire, une coupe transversale le long d'un axe passant par son centre est suffisante pour représenter l'ensemble de ses propriétés. La Figure 2.6(a) représente les profils des PSF obtenues sans masque de phase, sur la plage de défocalisation $\psi \in [0, 1\lambda]$, tandis que la Figure 2.6(b) correspond aux profils obtenus avec le masque optimal à $L = 3$ anneaux pour $\psi_{\text{max}} = 1\lambda$. Nous remarquons que la PSF 3D obtenue avec le masque de phase optimal est moins sensible au défaut de mise au point que celle obtenue sans masque. L'invariance de la PSF en fonction de ψ est une propriété essentielle pour assurer une bonne restauration de l'image acquise par le système co-conçu. En effet, nous pouvons remarquer que l'expression du filtre de Wiener (voir l'Équation (2.6)) et de l'algorithme de déconvolution TV (voir l'Équation (2.10)) dépendent tous deux de la PSF (ou de la FTM) moyennée sur les valeurs de ψ appartenant à la PdC ciblée, *i.e.*, $1/K \sum_{k=1}^K \mathbf{h}_{\rho, \psi_k}$. Pour que la restauration par déconvolution d'une image acquise soit efficace, cette PSF moyenne doit être représentative de toutes les PSF comprises dans la PdC ciblée. Autrement dit, ces PSF doivent être similaires. Il a été montré par Diaz *et al.* [2009] que l'optimisation des masques d'extension de la PdC conduit à un compromis entre maximiser la similarité des PSF (aux différentes valeurs de ψ) et minimiser leur largeur (*i.e.*, maximiser le niveau de la FTM correspondante) pour limiter le rehaussement du bruit par déconvolution.

Pour mieux comprendre le comportement des algorithmes de déconvolution en fonc-

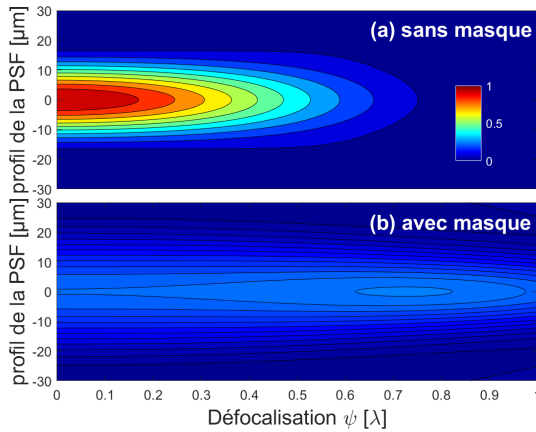


FIGURE 2.6 – Évolution du profil de la PSF en fonction du paramètre de défocalisation ψ pour (a) un système optique standard sans masque ou (b) un système optique co-conçu utilisant un masque de phase binaire à 3 anneaux optimisé pour une PdC de $\psi_{\max} = 1\lambda$.

tion du contenu fréquentiel de l'image, nous avons effectué une comparaison quantitative entre les résultats obtenus avec le filtre de Wiener et l'algorithme de déconvolution TV sur deux régions de l'image *Papillon* ayant des variations spatiales très différentes. Ces régions sont représentées à la Figure 2.1(b) : l'imagette A1 contient de nombreux détails (fortes variations spatiales) tels que des bords très contrastés, tandis que l'imagette A2 présente des variations plus douces (faibles variations spatiales). On suppose que le système optique est équipé d'un masque de phase binaire à $L = 3$ anneaux optimisé pour $\psi_{\max} = 1\lambda$ et que l'image est acquise avec un défaut de mise au point tel que $\psi = 0,75\lambda$. Le diagramme de la Figure 2.7(a) affiche la **racine carrée de l'erreur quadratique moyenne (RMSE)**, définie comme $\text{RMSE} = [\text{MSE}(\psi, \rho_{\text{opt}})]^{1/2}$ (voir l'Équation (2.2)), obtenue avec le filtre de Wiener, ou avec la déconvolution TV, sur l'ensemble de l'image A et sur les deux imagettes A1 et A2. Nous remarquons que la valeur de la RMSE obtenue sur l'ensemble de l'image A et sur la région « lisse » de l'image (*i.e.*, l'imagette A2) est plus faible lorsque l'image est restaurée avec l'algorithme de déconvolution TV. En revanche, sur l'imagette A1, la valeur de la RMSE est à peu près égale pour les deux algorithmes de déconvolution. Elle est même légèrement plus petite avec le filtre Wiener.

Afin de généraliser ces résultats, nous avons également évalué la qualité de l'image restaurée avec deux autres métriques proposées par Zhao *et al.* [2017] : la norme L1 (voir la Figure 2.7(b)), et la différence de similarité structurelle (voir la Figure 2.7(c)), notée DSSIM de l'anglais *structural dissimilarity* et définie comme $\text{DSSIM} = (1 - \text{SSIM})/2$, où la définition de la similarité structurelle (SSIM) est détaillée dans les travaux de Wang *et al.* [2003]. Ces deux métriques conduisent à des conclusions équivalentes à celles obtenues avec la RMSE : sur l'ensemble de l'image A et l'imagette A2, la qualité de l'image est meilleure en utilisant l'algorithme de déconvolution TV, alors que sur l'imagette A1, la qualité d'image est à peu près égale pour les deux algorithmes de déconvolution.

Ces résultats sont illustrés visuellement en Figure 2.8. La première colonne représente l'image idéalement nette x_0 du *Papillon* et les deux imagettes associées A1 et A2.

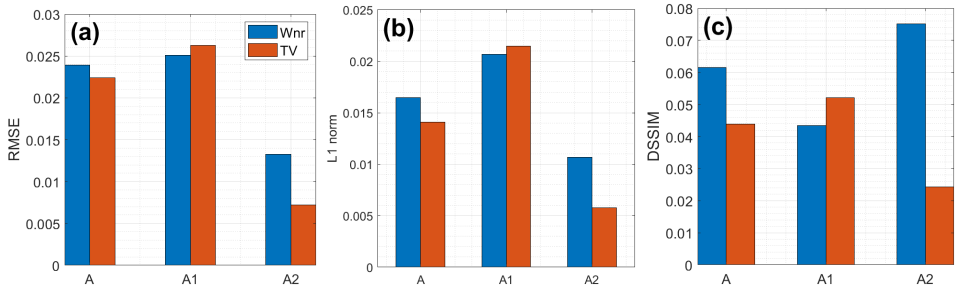


FIGURE 2.7 – Valeurs de la (a) RMSE, de (b) la norme L1, et de (c) DSSIM calculée sur l'image A, A1, A2 de la Figure 2.1, où l'image A est restaurée avec le filtre de Wiener ou la déconvolution TV. Paramètres de simulation : RSB = 34 dB, $\psi = 0,75\lambda$, $\psi_{\max} = 1\lambda$, $\mu = 8,5625 \cdot 10^{-5}$ et $\rho = (0,75; 0,9)$ (masque à 3 anneaux optimal)

La deuxième colonne représente les images floues acquises avec un défaut de mise au point, tel que $\psi = 0,75\lambda$, et le masque optimal à 3 anneaux pour une PdC telle que $\psi_{\max} = 1\lambda$. La troisième colonne représente les images déconvoluées avec le filtre de Wiener, et la quatrième colonne celles restaurées avec l'algorithme de déconvolution TV. Ces résultats montrent qualitativement que l'imagette A1 est restaurée avec une qualité similaire par les deux algorithmes de déconvolution. Les contours semblent légèrement « plus nets » dans la dernière colonne, en raison de l'effet « cartoon » bien connu de la régularisation TV. Cependant comme nous l'avons fait remarquer à la Figure 2.7, ils ne sont pas mieux restaurés. Globalement, cet algorithme atteint un meilleur compromis entre la restauration des contours vifs (où ses performances sont proches de celles du filtre de Wiener) et la restauration des régions lisses (où ses performances le surpassent de loin). Étant donné que ce type de régions, à faibles variations spatiales, est majoritaire dans l'image A, l'algorithme de déconvolution TV mène à une valeur de la RMSE plus petite que celle du filtre de Wiener sur l'ensemble de l'image.

Sur la base de ces observations, nous pouvons proposer la conjecture suivante. Quelle que soit la méthode de déconvolution utilisée, les mêmes caractéristiques du système optique sont nécessaires pour restaurer les détails de l'image acquise. Dans le cadre de la co-conception pour l'extension de la PdC, cette caractéristique est l'invariance de la PSF dans la PdC souhaitée. Par conséquent, les paramètres optimaux du masque de phase, qui régissent les caractéristiques de la PSF sont communs aux deux algorithmes de déconvolution. D'autre part, comme la déconvolution TV est plus adaptée aux images de scènes naturelles que le filtre de Wiener, elle offre une meilleure restauration des images acquises par le système co-conçu.

2.5. CONCLUSION

Considérant le problème d'optimisation des masques de phase binaires annulaires améliorant la PdC, nous avons montré que les approches de co-conception basées sur des méthodes de déconvolution linéaires et non linéaires produisent des masques optimaux similaires. Ce résultat a été démontré pour des masques de phase binaires annulaires avec différents nombres d'anneaux, pour différentes PdC et différentes scènes. Nous avons proposé une conjecture pour expliquer ce résultat : les mêmes caractéris-

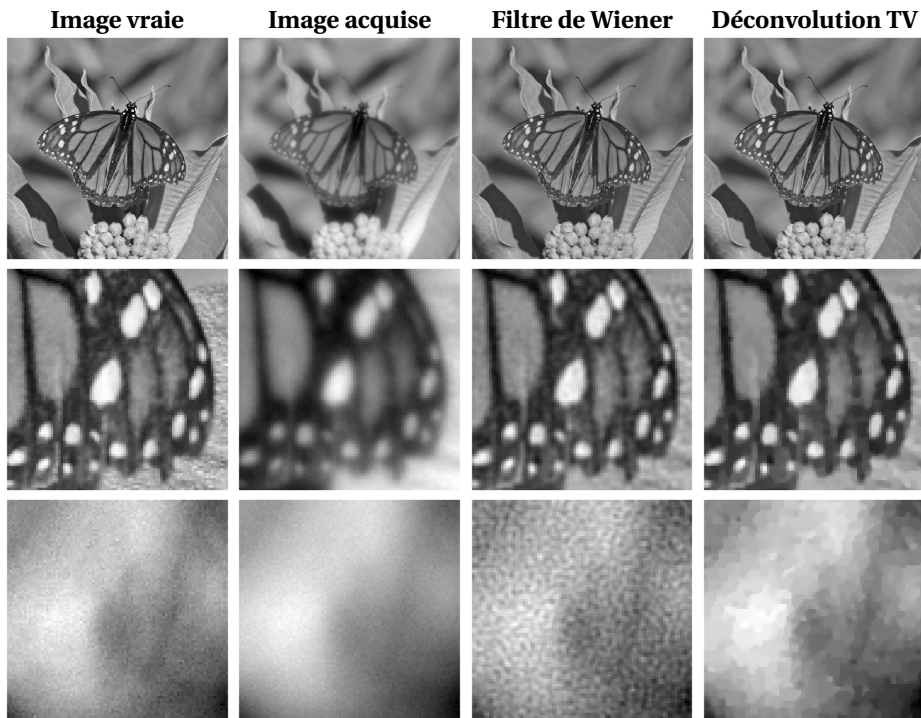


FIGURE 2.8 – Première rangée, de gauche à droite : image A idéalement nette du *Papillon*, image acquise convoluée et bruitée, image déconvoluée avec filtre de Wiener, image restaurée avec l'algorithme de déconvolution TV. Deuxième rangée : même description pour l'imagette A1 de la Figure 2.1. Troisième rangée : même description pour l'imagette A2. La valeur de la RMSE est affichée sur les images déconvoluées. Paramètres de simulation : RSB = 34 dB, $\psi = 0,75\lambda$, $\psi_{\max} = 1\lambda$, $\mu = 8,5625 \cdot 10^{-5}$ et $\rho = (0,75; 0,9)$ (masque à 3 anneaux optimal).

tiques de la **PSF** sont nécessaires pour restaurer les détails d'une image quelle que soit la méthode de déconvolution utilisée. Bien entendu, l'algorithme de déconvolution basé sur la régularisation **TV** offre de meilleures performances de reconstruction d'image que le filtre de Wiener, en particulier dans les régions lisses.

Ce résultat est important car il justifie une pratique fréquente de co-conception qui consiste à optimiser un système d'imagerie avec un critère analytique simple, basé sur une déconvolution linéaire, et à restaurer les images acquises avec un algorithme non linéaire, pour obtenir une meilleure qualité d'image. Il sera intéressant de vérifier ce résultat sur d'autres applications et d'autres familles d'algorithmes de restauration, en particulier les méthodes à réseaux de neurones.

* * *

Afin de généraliser l'approche de co-conception présenté dans ce chapitre, je vais dans la suite du manuscrit m'intéresser à une autre application : l'extension de **PdC** pour la microscopie par localisation. Le traitement numérique appliqué aux images n'est pas une déconvolution mais un autre traitement : la localisation sous-pixélique de marqueurs fluorescents. Le critère de co-conception ne repose donc plus sur la qualité d'une image restaurée mais sur la précision avec laquelle la position d'un marqueur fluorescent peut être estimée.

3

CO-CONCEPTION POUR LA LOCALISATION DE MOLÉCULES UNIQUES

*La microscopie par super-localisation de molécules uniques est devenue un outil incontournable pour étudier les structures et dynamiques d'échantillons biologiques avec une résolution nanométrique, bien au-delà de la limite de diffraction. Pour maximiser la précision de localisation, les objectifs de microscope utilisés doivent avoir une ouverture numérique élevée; cependant, cette caractéristique limite fortement la **profondeur de champ (PdC)** des images acquises.*

*Dans ce chapitre et les suivants, nous utilisons l'approche de « co-conception optique – traitement », présentée aux chapitres précédents, pour optimiser et comparer des masques de phase, qui, lorsqu'ils sont placés dans la pupille de sortie de l'objectif du système d'imagerie, peuvent augmenter la **PdC** des techniques de microscopie par localisation. En utilisant un critère basé non plus sur la qualité d'image mais sur la précision de localisation, construit à l'aide de la **borne de Cramér-Rao (BCR)**, nous optimisons des masques de phase binaires annulaires pour imager des échantillons biologiques épais. Nous caractérisons leurs performances et les comparons à celles présentées dans la littérature. Nous proposons ensuite un algorithme de localisation basé sur le **maximum de vraisemblance**, facile à mettre en œuvre, et pouvant atteindre la précision de localisation prédite par la **BCR**.*

Au cours des dernières décennies, diverses techniques de microscopie super-résolue ont permis d'obtenir des images de cellules vivantes (*i.e.*, sans la détruire, ni la figer) avec une résolution plus élevée que celle imposée par la limite de diffraction (voir la synthèse de Huang *et al.* [2009]). Comme l'illustre la Figure 3.1, cette limite, située aux alentours de 200 nm, empêchait de visualiser l'architecture intra-cellulaire à une échelle moléculaire.

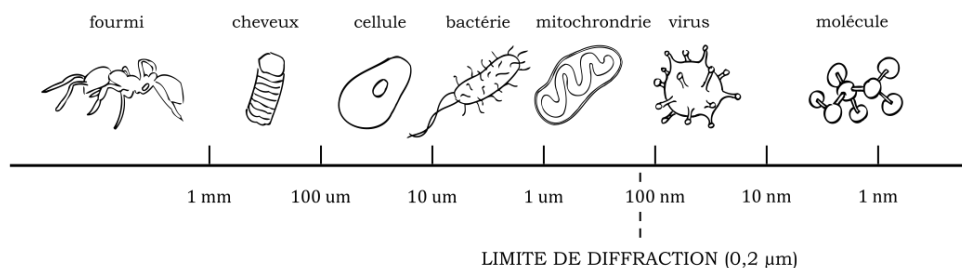


FIGURE 3.1 – L'échelle du vivant. La diffraction limite le pouvoir de résolution des microscopes optiques. C'est pourquoi les virus, les macro-molécules et autres composants nanométriques ne sont pas directement observables avec cette technique d'imagerie. Vers la fin du XIXe siècle, Abbe [1873] et Rayleigh [1896] formulent ce que l'on appelle communément aujourd'hui la « limite de diffraction » pour la microscopie.

Avec le développement de marqueurs fluorescents photo-activables, la microscopie par localisation (SMLM) consiste à imager individuellement des marqueurs fluorescents fixés sur l'objet d'intérêt puis à estimer avec une très grande précision — de l'ordre du nanomètre — leur position. Deux principes distincts de cette technique d'imagerie ont été récompensés par le prix Nobel de Chimie en 2014¹.

- ▶ Le premier, développé par Hell et Wichmann [1994], consiste à balayer l'échantillon avec deux faisceaux laser : l'un pour stimuler les marqueurs, et un second pour annuler toute fluorescence sauf celle située dans un volume nanométrique. Ce mode d'imagerie est appelé microscopie STED pour *stimulated emission depletion*.
- ▶ Le deuxième, développé par Eric Betzig et William Moerner, est appelé imagerie PALM pour *photo-activated localization microscopy*. Cette approche consiste à imager plusieurs fois la même zone dans laquelle des marqueurs fluorescents individuels sont activés puis désactivés. Nous nous concentrerons dans la suite du manuscrit sur ce mode d'imagerie, dont le schéma de principe est décrit en Figure 3.2. Betzig *et al.* [2006], Hess *et al.* [2006], Rust *et al.* [2006], Sharonov et Hochstrasser [2006] ont été les premières équipes à utiliser cette méthode.

Une précision de localisation de l'ordre du nanomètre permet d'observer le comportement dynamique et précis de molécules, ou de leurs ensembles, dans des environnements biologiques complexes tels que des cellules vivantes (voir par exemple les travaux de Cognet *et al.* [2014]) ou des matériaux structurés (voir par exemple les travaux de Kirstein *et al.* [2007], Lasne *et al.* [2008], Godin *et al.* [2017]).

Cependant, les ensembles moléculaires et la diffusion de molécules ne sont généra-

1. Source : <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2014/>

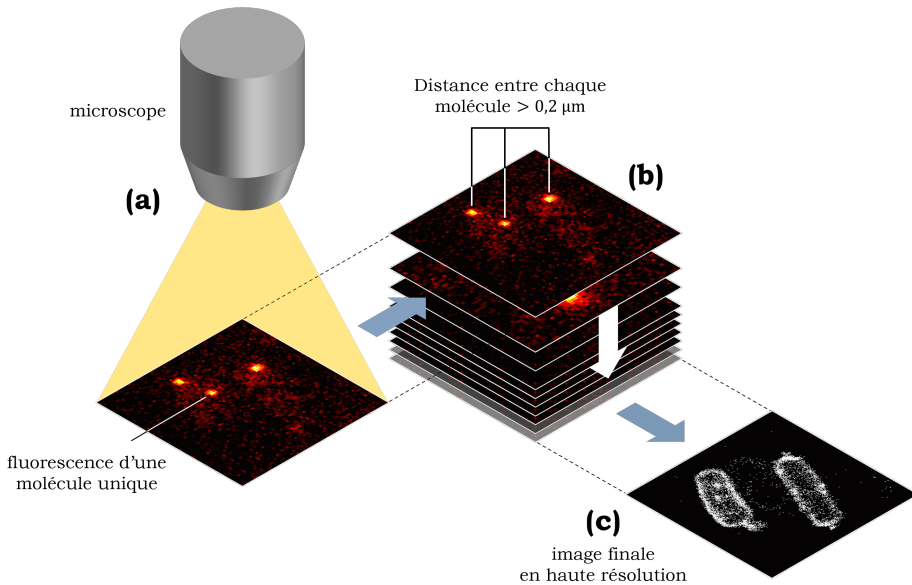


FIGURE 3.2 – Schéma de principe de la microscope PALM. (a) Une impulsion lumineuse active aléatoirement une partie des marqueurs fluorescents fixés à l'objet d'intérêt (ici la membrane d'une bactérie). La distance entre les marqueurs activés est supérieure (en moyenne) à la limite de diffraction. (b) L'image de chaque marqueur est une tache dont on estime la position avec une très grande précision. (c) L'ensemble des positions estimées est concaténé pour obtenir une image en haute résolution de l'objet d'intérêt. Source des images PALM : Antony Lee, University of California, Berkeley.

lement pas confinés dans les deux dimensions du plan focal. Plusieurs approches ont donc été développées pour étendre le concept de super-localisation à la troisième dimension (voir par exemple les travaux de [Hajj *et al.* \[2014\]](#)). Elles reposent sur l'utilisation d'un masque de phase pour modifier la PSF. On peut citer deux exemples connus : les PSF à double hélice [[Pavani et Piestun, 2008b](#)] et les tétrapodes [[Shechtman *et al.*, 2014](#)]. La localisation 3D de marqueurs fluorescents s'est avérée très efficace sur la plage de PdC naturelle des microscopes, et dans des échantillons biologiques épais [[Bon *et al.*, 2018](#), [Xu *et al.*, 2020](#)]. Mais ces techniques nécessitent des dispositifs, un étalonnage, et des traitements numériques sophistiqués.

Étendre la PdC sans chercher à localiser les marqueurs le long de l'axe optique est utile dans certaines applications comme l'imagerie à haute vitesse (avec un faible nombre de photons) ou lorsque la super-localisation dans la troisième dimension est réalisée autrement, par exemple, par modulation du signal de fluorescence [[Jouchet *et al.*, 2019](#)] ou par interférométrie [[Bon *et al.*, 2018](#)]. L'extension de la PdC en imagerie 2D peut permettre de diminuer la complexité instrumentale et le traitement numérique associé. Plusieurs travaux ont été proposés pour rendre invariante la PSF du microscope le long de l'axe optique, et ainsi générer des images volumétriques par projection 2D d'un volume imagé [[Abrahamsson *et al.*, 2006](#), [Zahreddine et Cogswell, 2015](#), [Ren et Han, 2021](#)]. Ce concept a également été utilisé en microscopie par excitation à deux photons pour

l'imagerie volumétrique rapide de structures cérébrales [Lu *et al.*, 2017].

Dans ce chapitre, nous proposons une méthodologie alternative pour optimiser les masques de phase permettant d'étendre la PdC des microscopes par localisation. Cette approche s'inspire de la « co-conception optique – traitement », introduite au Chapitre 2, qui prend en compte à la fois le modèle d'imagerie, les propriétés du système optique et le traitement numérique appliqué aux images acquises, pour optimiser la qualité des informations finales délivrées par le système (*i.e.*, la position des fluorophores). Nous proposons ainsi un cadre rigoureux (basé sur l'information de Fisher) pour optimiser et comparer les masques de phase améliorant la précision de localisation 2D sur une plus grande PdC. Le potentiel de cette approche est illustré, en fin de chapitre, en co-optimisant et en comparant les performances des masques de phase binaires annulaires avec ceux proposés par Abrahamsson *et al.* [2006].

Le critère d'optimisation des masques présenté dans ce chapitre est basé sur la borne de Cramér-Rao (BCR). Cette grandeur, couramment utilisée en théorie de l'estimation, représente la limite de précision théorique qu'un estimateur de localisation, non biaisé, peut atteindre [Kay, 1993]. La BCR a déjà été utilisée dans la littérature pour évaluer les capacités de localisation 2D ou 3D en microscopie par localisation et pour comparer les performances de différentes stratégies [Ober *et al.*, 2004, von Diezmann *et al.*, 2017, Badieirostami *et al.*, 2010]. Elle fut aussi utilisée par [Shechtman *et al.*, 2014] pour optimiser un masque de phase destiné à l'imagerie 3D et défini sur la base des polynômes de Zernike. Cependant, à notre connaissance, elle n'a jamais été utilisée pour concevoir des masques de phase optimisés en imagerie 2D pour étendre la PdC des microscopes par localisation. Afin de localiser efficacement² les marqueurs fluorescents à partir des images acquises, nous proposons également, dans ce chapitre, un algorithme de localisation basé sur l'estimateur du maximum de vraisemblance (MV) et adapté aux caractéristiques optiques des masques optimaux. Nous montrons que, contrairement aux méthodes standard basées sur le MV (voir par exemple les travaux de Ober *et al.* [2004]) et utilisées en SMLM sans masque (*i.e.*, sans extension de la PdC : les marqueurs sont considérés dans le plan d'imagerie), cet algorithme nécessite, pour atteindre la BCR, de segmenter la PdC en un nombre suffisant de zones dans lesquelles la PSF varie peu.

Ce chapitre contraste avec l'étude présentée au Chapitre 2 où le problème d'extension de la PdC était étudié en imagerie classique. Le critère d'optimisation n'était donc pas une performance de localisation exprimée à l'aide de la BCR ou de l'information de Fisher. Il s'agissait de la qualité d'image obtenue après déconvolution avec un filtre de Wiener moyenné. Cette qualité s'exprimait en termes d'erreur quadratique moyenne (MSE), entre la scène idéalement nette et son image déconvoluée. Nous montrons que l'optimisation basée sur la BCR conduit à des masques optimaux différents, en structure et en performance de localisation, de ceux obtenus avec le critère MSE.

3.1. MODÈLE D'IMAGERIE POUR LA MICROSCOPIE

Utiliser la BCR comme critère d'optimisation des masques de phase nécessite de définir préalablement le modèle d'imagerie et la distribution du bruit utilisés pour simuler des images acquises en SMLM. Ce modèle décrit l'image formée sur le capteur par un

2. Au sens d'un estimateur efficace (*i.e.*, non biaisé et caractérisé par une faible variance).

marqueur fluorescent situé en-dehors du plan focal. L'aberration optique introduite par le défaut de mise au point est modélisée par un simple terme de phase quadratique dans le plan pupillaire. Un modèle plus réaliste sera proposé dans le Chapitre 5, où l'influence du choix du modèle d'imagerie sur l'optimisation des masques sera discutée. On décrit également dans cette section le critère de précision de localisation des marqueurs et la structure des masques de phase que nous optimiserons pour étendre la PdC. On y illustrera leur capacité à rendre la précision de localisation presque invariante à la défocalisation.

3.1.1. RÉPONSE IMPULSIONNELLE SPATIALE DE L'OBJECTIF

Un marqueur fluorescent, aussi appelé émetteur, est de taille nanométrique. Comme sa dimension est bien inférieure à sa longueur d'onde d'émission, il n'est pas résolu par l'objectif du microscope, et peut donc être considéré comme une source lumineuse ponctuelle. Notons sa position transverse dans l'échantillon biologique par les coordonnées $\theta = (x_p, y_p)$, sa position longitudinale par la coordonnée z_p , et la position d'un point d'observation dans le plan d'imagerie (*i.e.*, sur le capteur) par les coordonnées (x, y) . Pour rappel, on suppose que le grandissement transversal de l'objectif du microscope, noté M , ne dépend pas de la coordonnée z_p (puisque l'objectif est télécentrique objet). De plus, en supposant que les aberrations de champ sont négligeables, l'image d'un marqueur fluorescent est spatialement invariante et son éclairage dans le plan image, aux coordonnées (x, y) , peut s'écrire :

$$f_{z_p}(x, y, \theta) = h_{z_p}(x - Mx_p, y - My_p) \quad (3.1)$$

où h_{z_p} est la PSF de l'objectif du microscope définie à l'Équation (1.2), *i.e.*, l'éclairage dans le plan image d'un émetteur centré sur l'axe, *i.e.*, $(x_p, y_p) = (0, 0)$, et situé à une profondeur $z_p = z_0 + \Delta z_0$.

Le paramètre de défocalisation ψ , défini à l'Équation (1.14), est couramment utilisé en microscopie pour décrire le défaut de mise au point Δz_0 [Aguet, 2009, Born et Wolf, 1999], bien qu'il ne soit valide que pour des systèmes optiques à faible ouverture ou à ouverture modérée³ :

$$\psi \simeq \frac{NA^2}{2n_s} (z_p - z_{\text{focus}}) \quad (3.2)$$

avec z_p la position longitudinale du marqueur fluorescent et $z_{\text{focus}} = z_0$ la position longitudinale nominale pour laquelle le système d'imagerie est focalisé.

Si l'émetteur est dans le plan d'imagerie, alors $z_p = z_{\text{focus}}$ et $\psi = 0$. L'erreur de front d'onde définie à l'Équation (1.6) disparaît et la PSF est décrite par la tache d'Airy :

$$f_{\text{Airy}}(x, y, \theta) \propto \left| \frac{J_1 \left(\frac{2\pi NA}{|M|\lambda} \sqrt{(x - |M|x_p)^2 + (y - |M|y_p)^2} \right)}{\frac{2\pi NA}{|M|\lambda} \sqrt{(x - |M|x_p)^2 + (y - |M|y_p)^2}} \right|^2 \quad (3.3)$$

où J_1 désigne la fonction de Bessel du premier ordre. Pour rappel, il est admis qu'une image est dénuée d'aberration lorsque $|\psi| < \lambda/4$ (critère de Rayleigh).

3. Je reviendrai en détails sur ce point au Chapitre 5.

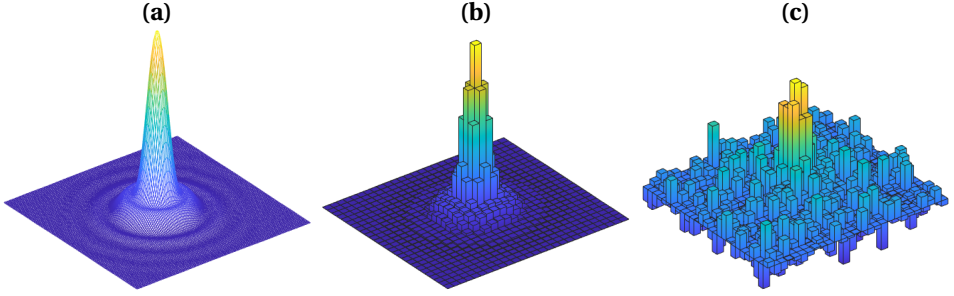


FIGURE 3.3 – PSF de l'objectif du microscope simulée, telle que : $\psi = \pm 0,4\lambda$, $N_0 = 500$ photo-électrons (ph.), et $\sigma_n^2 = 6 \text{ ph.}^2/\text{pixel}$. Les autres paramètres de simulation sont définis dans le Tableau 3.1. (a) Éclairement dans le plan image d'un émetteur centré sur la position θ_0 (voir Équation (3.1)). (b) Nombre de photo-électrons attendus sur la grille de pixels du capteur (voir Équation (3.5)). (c) Nombre s_{ij} de photo-électrons mesurés sur la grille de pixels du capteur.

3.1.2. IMAGE D'UN MARQUEUR FLUORESCENT

Considérons une région de l'image numérique délivrée par le capteur, de largeur $2P + 1$ pixels avec $P \in \mathbb{N}^+$, et contenant l'image d'un seul émetteur. Cette imagerie est une version de l'Équation (3.1) bruitée et pixélisée (donc filtrée et échantillonnée par une grille de pixels de taille finie). On note s_{ij} le nombre de photo-électrons mesurés au pixel $(i, j) \in \mathbb{N}^2$ avec $|i|$ et $|j| \leq P$. En supposant que le bruit de mesure soit additif gaussien spatialement blanc de moyenne nulle et de variance σ_n^2 , le nombre s_{ij} de photo-électrons mesurés est une variable aléatoire dont la densité de probabilité a pour expression :

$$\Pr \left[s_{ij} \mid \mu_{ij}^{\psi, \theta} \right] = \frac{1}{\sigma_n \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{\left(s_{ij} - N_0 \mu_{ij}^{\psi, \theta} \right)^2}{2\sigma_n^2} \right] \quad (3.4)$$

avec N_0 le nombre total de photo-électrons attendus dans l'imagerie et $\mu_{ij}^{\psi, \theta}$ la moyenne :

$$\mu_{ij}^{\psi, \theta} = \int_{(i-\frac{1}{2})\Delta_{xy}}^{(i+\frac{1}{2})\Delta_{xy}} \int_{(j-\frac{1}{2})\Delta_{xy}}^{(j+\frac{1}{2})\Delta_{xy}} f_{\psi}(x, y, \theta) \, dx \, dy \quad (3.5)$$

où Δ_{xy} correspond à la largeur d'un pixel. Nous avons remplacé la dépendance de la PSF en la coordonnée z_p , définie à l'Équation (3.1), par le paramètre de défocalisation ψ . Dans toute la suite, on supposera que le facteur de remplissage des pixels est de 100%.

Afin d'illustrer l'image d'un fluorophore — situé en dehors du plan focal — formée par un microscope optique tel que $\psi = \pm 0,4\lambda$, nous avons représenté : à la Figure 3.3(a), la PSF continue $f_{\psi}(x, y, \theta)$ de l'objectif du microscope décrite par l'Équation (3.1) ; à la Figure 3.3(b), sa version pixélisée $\mu_{ij}^{\psi, \theta}$ décrite par l'Équation (3.5) ; et à la Figure 3.3(c) sa version pixélisée et bruitée s_{ij} où la distribution statistique est définie à l'Équation (3.4). Les paramètres de simulations sont définis dans le Tableau 3.1.

À cette étape du manuscrit et pour des raisons de simplicité, nous ne prenons pas en compte un bruit de grenaille lié au caractère aléatoire d'une émission de photons

provenant du marqueur fluorescent et / ou de l'autofluorescence du fond. Un modèle plus réaliste de la distribution du bruit sera proposé dans le chapitre suivant.

3.1.3. LIMITE THÉORIQUE DE LA PRÉCISION DE LOCALISATION

Localiser un marqueur fluorescent consiste à estimer précisément sa position transverse θ , à partir des mesures s_{ij} . Il est bien connu que la plus petite variance de l'erreur d'estimation avec laquelle ce paramètre peut être estimé sans biais s'obtient à l'aide de la matrice d'information de Fisher [1925] (voir par exemple les travaux d'Ober *et al.* [2004] pour une application à la localisation de molécules uniques). Cette matrice, notée \underline{I} , quantifie l'information relative au vecteur de paramètres $\theta = (x_p, y_p)$ contenue dans la distribution des mesures s_{ij} . Elle est définie par :

$$\underline{I} = \sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \mathbb{E} \left[\left(\frac{\partial}{\partial \theta} \ln \Pr [s_{ij} | \mu_{ij}^{\psi, \theta}] \right)^t \left(\frac{\partial}{\partial \theta} \ln \Pr [s_{ij} | \mu_{ij}^{\psi, \theta}] \right) \right] \quad (3.6)$$

où $\Pr [s_{ij} | \mu_{ij}^{\psi, \theta}]$ correspond à la vraisemblance des données, définie à l'Équation (3.4), et le symbole $\mathbb{E}[\cdot]$ désigne l'espérance mathématique.

Le paramètre de défocalisation ψ est supposé connu pour définir la métrique d'information de Fisher à l'Équation (3.6). En pratique, nous ne disposons d'aucune information *a priori* sur ce paramètre. Il faudra donc l'estimer conjointement avec le vecteur de paramètres θ . Je discuterai ce point à la Section 3.3.

Les BCR associées à l'estimation de x_p et de y_p sont par définition égales aux valeurs diagonales de l'inverse de la matrice de Fisher. Elles représentent une borne inférieure sur la variance d'estimation de ces paramètres (pour un estimateur de localisation sans biais). Elles permettent ainsi de caractériser la difficulté intrinsèque du problème d'estimation du vecteur θ , indépendamment de la méthode (non biaisée) utilisée pour le résoudre. On considère ici, de manière équivalente, la **racine carrée de la borne de Cramér-Rao (RBCR)** — homogène à une distance — comme limite théorique de la précision de localisation d'un marqueur fluorescent.

Notons que les termes non diagonaux de la matrice d'information de Fisher sont très faibles, car la PSF pixélisée est quasiment à symétrie de révolution. On peut alors considérer que les RBCR sont égales à la racine carrée de l'inverse des termes diagonaux de la matrice \underline{I} :

$$\begin{cases} \text{RBCR}_x(\psi) = \frac{\sigma_n}{N_0} \left[\sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \left(\int_{(j-\frac{1}{2})\Delta_{xy}}^{(j+\frac{1}{2})\Delta_{xy}} \Delta_x f_i^{\psi, \theta}(y) dy \right)^2 \right]^{-\frac{1}{2}} \\ \text{RBCR}_y(\psi) = \frac{\sigma_n}{N_0} \left[\sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \left(\int_{(i-\frac{1}{2})\Delta_{xy}}^{(i+\frac{1}{2})\Delta_{xy}} \Delta_y f_j^{\psi, \theta}(x) dx \right)^2 \right]^{-\frac{1}{2}} \end{cases} \quad (3.7)$$

On rappelle que N_0 désigne le nombre total de photo-électrons attendus dans l'imagerie de taille $(2P+1) \times (2P+1)$ pixels, σ_n l'écart-type du bruit de mesure, Δ_{xy} le pas de la grille de pixels et $\Delta_x f_i^{\psi, \theta}$ (respectivement $\Delta_y f_j^{\psi, \theta}$) la différence entre les valeurs de la

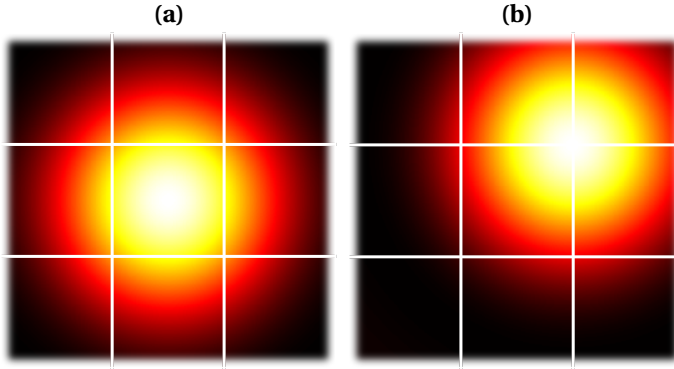


FIGURE 3.4 – Positions particulières de la PSF pour lesquelles $RBCR_x = RBCR_y$: (a) le centre d'un pixel ou (b) l'un des coins. La simulation est réalisée avec une tache d'Airy et les paramètres définis dans le Tableau 3.1

PSF évaluée aux bords des pixels adjacents de la ligne i (de la colonne j) :

$$\begin{cases} \Delta_x f_i^{\psi, \boldsymbol{\theta}}(y) = f_{\psi} \left(\left(i - \frac{1}{2} \right) \Delta_{xy}, y, \boldsymbol{\theta} \right) - f_{\psi} \left(\left(i + \frac{1}{2} \right) \Delta_{xy}, y, \boldsymbol{\theta} \right) \\ \Delta_y f_j^{\psi, \boldsymbol{\theta}}(x) = f_{\psi} \left(x, \left(j - \frac{1}{2} \right) \Delta_{xy}, \boldsymbol{\theta} \right) - f_{\psi} \left(x, \left(j + \frac{1}{2} \right) \Delta_{xy}, \boldsymbol{\theta} \right) \end{cases} \quad (3.8)$$

On remarque à l'aide de l'Équation (3.7) que la limite fondamentale de la précision de localisation est inversement proportionnelle au RSB, défini comme :

$$RSB = \frac{N_0}{\sigma_n} \quad (3.9)$$

On voit à l'aide de l'Équation (3.8) qu'elle dépend aussi de l'échantillonnage spatial de la PSF par la grille de pixels. Les bornes en x et en y sont donc généralement de valeurs différentes. Cependant, il existe des positions particulières illustrées à la Figure 3.4 pour lesquelles $RBCR_x = RBCR_y$: lorsque la PSF est centrée sur un pixel, par exemple, $\boldsymbol{\theta}_0 = (0, 0)$; ou lorsqu'elle est située sur l'un des coins, par exemple, $\boldsymbol{\theta}_0 = (\Delta_{xy}/2, \Delta_{xy}/2)$. Ces positions mènent respectivement à la plus grande valeur possible de la BCR et à la plus petite. Nous considérons, dans ce chapitre, la situation la plus défavorable pour la localisation, telle que $\boldsymbol{\theta}_0 = (0, 0)$, et nous noterons $RBCR = RBCR_x = RBCR_y$. De plus, nous utiliserons la RBCR normalisée afin de caractériser l'influence de la défocalisation pour n'importe quelle valeur du RSB. La RBCR normalisée est obtenue en divisant l'Équation (3.7) par sa valeur évaluée en $\psi = 0$ (*i.e.*, lorsque l'émetteur est dans le plan focal). Cette grandeur normalisée est donc indépendante de la valeur du RSB.

À titre d'illustration, nous avons représenté, en Figure 3.5(a) la variation du profil de la PSF en fonction du paramètre de défocalisation ψ (exprimé en fraction de la longueur d'onde d'émission λ), pour la configuration de microscope décrite dans le Tableau 3.1. Puisque la PSF est à symétrie de révolution, une section transversale le long d'un axe passant par son centre est suffisante pour représenter l'ensemble de ses propriétés. Nous remarquons que plus le paramètre de défocalisation ψ est grand, plus la PSF s'étale et son

Paramètres de simulation	Symboles	Valeurs
Position transverse du fluorophore	θ_0	(0, 0) μm
Longueur d'onde d'émission du fluorophore	λ	520 nm
Largeur de l'imagette contenant une PSF	$2P + 1$	27 pixels
Largeur d'un pixel	Δ_{xy}	6,45 μm
Ouverture numérique objet	NA	1,4
Grandissement transversal	M	100

TABLEAU 3.1 – Configuration du microscope et paramètres de simulation utilisés dans ce chapitre.

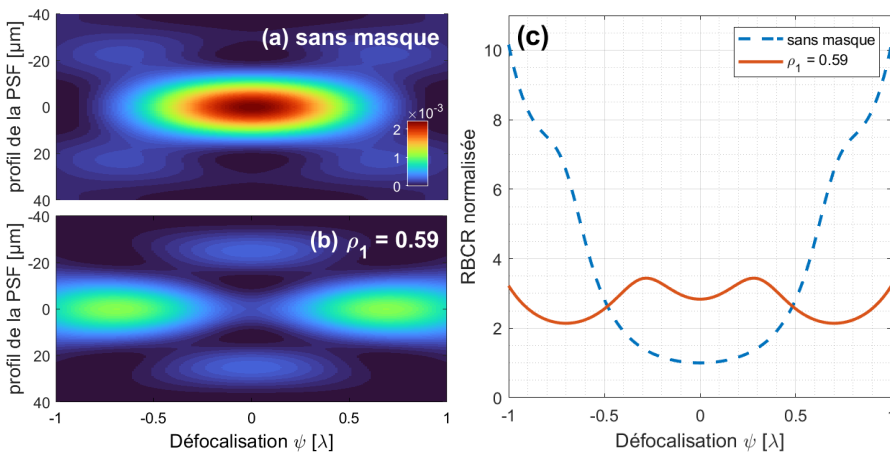


FIGURE 3.5 – Variation du profil de la PSF en fonction du paramètre de défocalisation ψ (exprimé en fraction de la longueur d'onde λ d'émission), pour la configuration décrite dans le Tableau 3.1. (a) Système optique limité par la diffraction et muni d'une ouverture circulaire. (b) Même système optique doté d'un masque de phase binaire annulaire, tel que $\rho_1 = 0,59$. (c) Variation de la RBCR normalisée de ces deux systèmes optiques en fonction du paramètre de défocalisation ψ .

lobe central s'atténue. Ces résultats ont déjà été mis en évidence par Hopkins et Burch [1955], Tao et Nicholson [1995]. Nous avons représenté, à la Figure 3.5(c), la variation de la RBCR normalisée de ce système optique en fonction de ψ (en pointillés bleus). On observe que la RBCR augmente lentement jusqu'à $\psi \approx \pm\lambda/4$ (critère de Rayleigh), puis plus rapidement lorsque $|\psi| > \lambda/4$. Par exemple, pour $\psi = \pm 1\lambda$, la RBCR est dix fois plus grande que pour $\psi = 0$. Si $N_0 = 500$ photo-électrons (ph.) et $\sigma_n^2 = 6 \text{ ph.}^2/\text{pixel}$, la valeur de la RBCR pour $\psi = 0$ est égale à 0,04 pixel, ce qui correspond à une précision de localisation de 2,7 nm dans l'espace objet. Simuler un système avec un masque de phase, comme illustrée en Figure 3.5(b) pour un masque à $L = 2$ anneaux est discuté dans la section suivante.

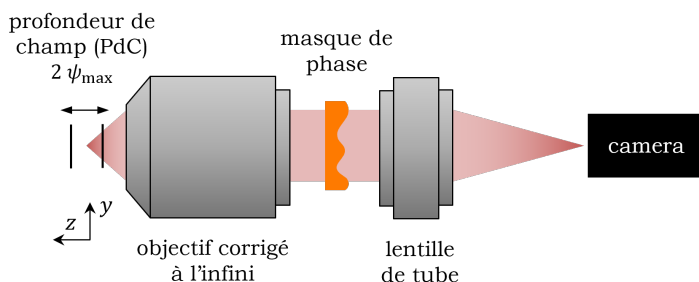


FIGURE 3.6 – Schéma de principe d'un microscope dont la PdC a été étendue en plaçant un masque de phase optimisé dans le diaphragme d'ouverture de son objectif. Nous optimiserons, dans ce manuscrit, des masques de phase binaires annulaires.

3.1.4. SIMULATION D'UN SYSTÈME AVEC UN MASQUE DE PHASE

Notre objectif est d'étendre la PdC en SMLM, en améliorant la précision de localisation 2D des marqueurs fluorescents défocalisés. Pour y parvenir, nous plaçons un masque de phase optimisé dans la pupille de sortie de l'objectif du microscope et adaptons le traitement numérique appliqué aux images acquises, comme illustré à la Figure 3.6. Il existe de nombreuses structures de masques permettant d'étendre la PdC d'un système optique. Nous considérons ici les masques de phase binaires annulaires de modulation π radians introduits précédemment, pour leur facilité de fabrication et leur efficacité à étendre la PdC [Diaz *et al.*, 2009]. Une illustration d'un masque à 4 anneaux se trouve en Figure 1.4. La fonction de phase du masque est notée $\Phi_{\text{mask}}(r, \boldsymbol{\rho})$ avec $\boldsymbol{\rho}$ le vecteur de paramètres du masque. Il est placé dans la pupille du système optique afin de modifier la fonction de phase pupillaire comme définie à l'Équation (1.15).

La Figure 3.5(b) représente la variation du profil de la PSF en fonction du paramètre de défocalisation ψ pour un masque à $L = 2$ anneaux défini par le paramètre $\rho_1 = 0,59$ et placé dans la pupille de sortie de l'objectif du microscope (le choix de ce paramètre sera discuté dans la section suivante). On remarque que la présence du masque modifie considérablement le profil de la PSF (voir la Figure 3.5(b)) si on le compare au profil obtenu sans masque (voir la Figure 3.5(a)). L'étalement minimum de la PSF n'est plus obtenu dans le plan focal (*i.e.*, pour $\psi = 0$), mais pour $\psi \approx \pm 0,7\lambda$. Par ailleurs, pour $\psi = 0$, le profil de la PSF n'est pas concentré mais divisé en trois lobes principaux. On remarque également à l'aide des Figures 3.5(a-b) qu'indépendamment de la présence ou non d'un masque, la PSF est identique pour ψ et $-\psi$ (*i.e.*, de chaque côté du point focal). Cette propriété, déjà introduite au Chapitre 2, n'est pas vérifiée pour la plupart des masques de phase à symétrie de révolution. Il s'agit d'une propriété spécifique des masques binaires dont la modulation de phase est de π radians.

La Figure 3.5(c) (en trait plein rouge) représente la valeur de la RBCR normalisée en fonction du paramètre ψ lorsqu'on utilise ce masque. Par comparaison avec la courbe obtenue sans masque (en pointillés bleus), on constate que le masque de phase binaire annulaire permet d'obtenir des valeurs de la RBCR beaucoup plus faibles sur l'ensemble de la plage de défocalisation : la plus grande valeur est trois fois plus petite que celle obtenue sans masque. Cependant, cette valeur est aussi trois fois plus grande que celle

obtenue sans masque et pour $\psi = 0$. Le prix à payer pour étendre la PdC est donc de dégrader légèrement la précision de localisation autour du plan focal. Il est intéressant de noter que la valeur de la RBCR pour $\psi = 0$ reste faible bien que la PSF soit étalée en plusieurs lobes (voir Figure 3.5(b)). Cela implique que cette forme de PSF, bien que non concentrée en un seul lobe, contient toujours suffisamment d'information pour assurer une localisation précise.

Dans la suite de ce chapitre, l'objectif sera de déterminer les paramètres du masque de phase binaire annulaire qui optimisent la RBCR, et ce pour différents nombres d'anneaux et différentes PdC désirées. On proposera aussi un traitement numérique adapté permettant d'atteindre, en pratique, la précision théorique de localisation prédite par la BCR.

3.2. CO-OPTIMISATION DES MASQUES POUR LA LOCALISATION

Dans cette section, on propose un critère d'optimisation des masques de phase pour étendre la PdC en microscopie par localisation et une méthode pour l'optimiser lorsque le masque est de structure binaire annulaire. Nous déterminons ensuite les masques de phase binaire de $L = 2$ à 5 anneaux optimaux pour atteindre différentes PdC souhaitées. Pour chaque masque optimisé, on évalue le compromis obtenu entre la précision de la localisation et l'extension de la PdC.

3.2.1. CRITÈRE D'OPTIMISATION

L'Équation (3.7) donne la précision théorique de localisation 2D d'un marqueur fluorescent défocalisé dans un volume imagé par un microscope équipé d'un masque de phase. En considérant le scénario le plus défavorable pour la localisation, tel que $\theta_0 = (0, 0)$, nous obtenons que $RBCR = RBCR_x = RBCR_y$. Un critère raisonnable pour l'optimisation du masque est donc de minimiser la plus grande valeur possible de la RBCR évaluée dans la plage de PdC souhaitée. Les paramètres optimaux du masque, désignés par le vecteur ρ_{opt} , sont donc obtenus en résolvant le problème d'optimisation suivant :

$$\rho_{opt} = \underset{\rho}{\operatorname{argmin}} J(\rho) \quad \text{avec} \quad J(\rho) = \max_{\psi \in [0, \psi_{max}]} RBCR(\rho, \psi). \quad (3.10)$$

Comme nous l'avons fait remarquer, la forme de la PSF est identique pour ψ et $-\psi$, lorsque le masque est à symétrie de révolution et de phase binaire avec une modulation de π radians. La PdC désirée, pour laquelle nous souhaitons une localisation 2D précise des fluorophores, est donc caractérisée dans l'Équation (3.10) par l'intervalle $[0, \psi_{max}]$, avec ψ_{max} la PdC désirée.

La résolution de ce problème d'optimisation, de type *minimax*, n'est pas simple car le critère que l'on cherche à minimiser est non convexe. Dans la Figure 3.7(a), le paysage d'optimisation (*i.e.*, les valeurs du critère $J(\rho_1)$) est représenté pour un masque à $L = 2$ anneaux défini par son rayon ρ_1 et pour différentes PdC ψ_{max} désirées. Nous remarquons qu'il existe plusieurs minima locaux. À la Figure 3.7(b), le paysage d'optimisation (*i.e.*, les valeurs du critère $J(\rho_1, \rho_2)$) pour un masque à $L = 3$ anneaux (défini par ses rayons ρ_1 et ρ_2) et $\psi_{max} = 2,5\lambda$ présente aussi plusieurs minima locaux dont la plus petite valeur est signalée d'une croix blanche.

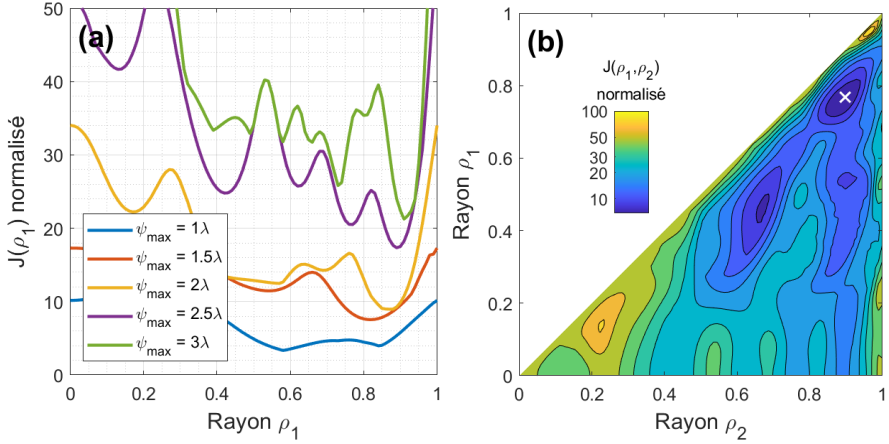


FIGURE 3.7 – Paysage d’optimisation (*i.e.*, valeurs du critère $J(\boldsymbol{\rho})$) pour (a) un masque à 2 anneaux tel que $\psi_{\max} = \{1\lambda, 2\lambda, 3\lambda\}$ ou (b) un masque à 3 anneaux tel que $\psi_{\max} = 2, 5\lambda$. La croix blanche correspond au minimum global du critère. Les paramètres de simulation sont définis dans le Tableau 3.1.

Pour 2 ou 3 anneaux, l’optimisation des masques de phase binaires annulaires peut être réalisée par une recherche exhaustive. Cependant, pour un plus grand nombre d’anneaux, il est nécessaire d’utiliser une tout autre approche. Ainsi pour résoudre l’Équation (3.10), nous utiliserons l’algorithme d’optimisation par essaim de particules (*particle swarm*). Cette approche, développée par Kennedy et Eberhart [1995], repose sur la collaboration entre individus. Basé sur des règles de déplacement simples, un ensemble de particules explore le paysage d’optimisation — ici, les paramètres du masque à optimiser — et converge progressivement vers un minimum local. Étant donné qu’il n’y a aucune garantie de trouver le minimum global, un grand nombre de cycles d’optimisation doit être effectué avec des valeurs initiales choisies aléatoirement. C’est ainsi qu’est déterminé de façon fiable un vecteur de paramètres $\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}$ proche de l’optimum global. Cet algorithme a été utilisé par Falcón *et al.* [2017] pour optimiser des masques de phase binaire annulaire avec le critère MSE présenté au Chapitre 2.

3.2.2. PERFORMANCE ET LIMITES DES MASQUES OPTIMISÉS

En appliquant la méthode d’optimisation décrite dans la section précédente, on optimise des masques de phase binaires annulaires pour différentes PdC désirées. La performance des masques est représentée en Figure 3.8(a), où la plus grande valeur possible de la RBCR (évaluée dans l’ensemble de la PdC souhaitée) est tracée en fonction du nombre d’anneaux. Cette valeur, notée $J(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}})$, est définie par :

$$J(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}) = \max_{\psi \in [0, \psi_{\max}]} \text{RBCR}(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}, \psi). \quad (3.11)$$

Chaque courbe correspond à une PdC différente désignée par le paramètre ψ_{\max} . Les points les plus à gauche correspondent à un système optique sans masque (*i.e.*, $L = 1$). Pour ces configurations, on constate que $J(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}})$ augmente à mesure que la plage de PdC

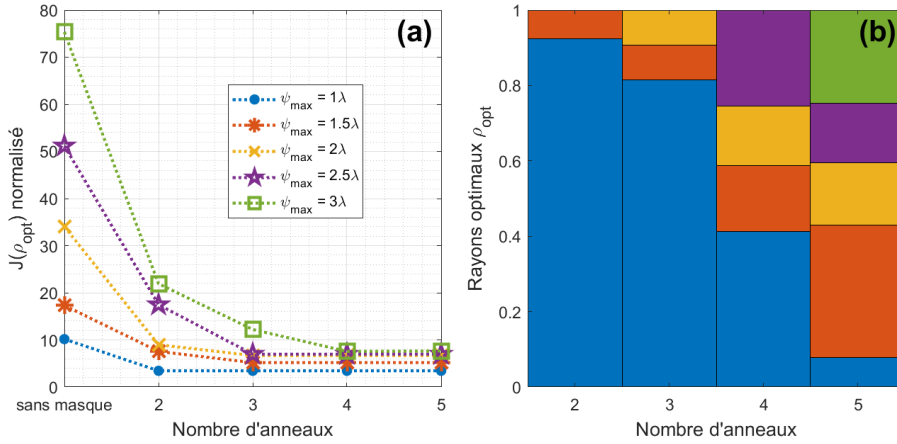


FIGURE 3.8 – (a) Performance de localisation des masques de phase binaire annulaires optimaux (définie à l'Équation (3.11)) en fonction du nombre d'anneaux pour différentes PdC telle que $\psi_{\text{max}} \in \{1\lambda; 1.5\lambda; 2\lambda; 2.5\lambda; 3\lambda\}$. (b) Profils des masques optimaux pour $\psi_{\text{max}} = 3\lambda$ et différents nombres d'anneaux. Les paramètres de simulation sont définis dans le Tableau 3.1.

souhaitée s'étend. Par ailleurs, lorsqu'un masque de phase optimisé est utilisé, $J(\rho_{\text{opt}})$ diminue fortement à mesure que le nombre d'anneaux augmente, avant de se stabiliser.

Prenons l'exemple de la courbe bleue (avec les marqueurs ronds), correspondant à une PdC telle que $\psi_{\text{max}} = 1\lambda$: $J(\rho_{\text{opt}})$ diminue d'un facteur trois en utilisant un masque optimisé constitué de seulement $L = 2$ anneaux. Si le masque optimal est constitué d'un plus grand nombre d'anneaux, sa performance n'en est pas améliorée de manière significative : elle stagne. Cela signifie que pour atteindre une PdC telle que $\psi_{\text{max}} = 1\lambda$, un masque de phase binaire optimisé à $L = 2$ anneaux est suffisant. Ce masque, défini par le rayon optimal $\rho_1 = 0,59$, est celui qui a été utilisé pour tracer la Figure 3.5(b).

Considérons à présent la courbe orange (avec les astérisques), correspondant à une PdC telle que $\psi_{\text{max}} = 1,5\lambda$: elle est toujours supérieure à celle obtenue pour $\psi_{\text{max}} = 1\lambda$, puisque la PdC à atteindre est plus étendue et donc plus difficile à couvrir. Pour cette PdC, l'utilisation d'un masque optimisé à $L = 3$ anneaux (au lieu de 2) permet d'atteindre les meilleures performances de localisation. Nous observons qu'en général plus la PdC visée est grande, plus le nombre d'anneaux nécessaires pour atteindre les meilleures performances croît. Par exemple pour $\psi_{\text{max}} = 3\lambda$, $L = 4$ anneaux au moins sont nécessaires pour atteindre la plus petite valeur de $J(\rho_{\text{opt}})$. La Figure 3.8(b) représente les profils des masques optimaux de $L = 2$ à 5 anneaux obtenus pour $\psi_{\text{max}} = 3\lambda$. Nous constatons que le masque optimal à $L = 5$ anneaux est très similaire à celui à $L = 4$ anneaux, ce qui explique leurs performances de localisation très proches.

Les deux principales conclusions que l'on peut tirer de ces résultats sont :

- ▶ que les masques binaires optimaux améliorent significativement la précision de localisation quelle que soit la plage de PdC considérée (supérieure à $\psi_{\text{max}} = 1\lambda$),
- ▶ et qu'un nombre limité d'anneaux est suffisant pour atteindre les performances optimales.

Ces conclusions sont très similaires à celles obtenues par Falcón *et al.* [2017] en imagerie

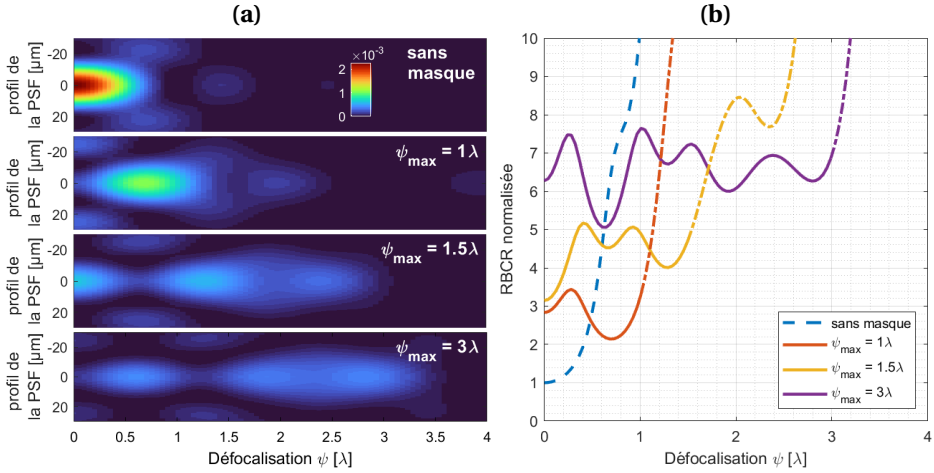


FIGURE 3.9 – Variation (a) du profil de la PSF, et (b) de la limite de la précision de localisation (la RBCR) en fonction du paramètre de défocalisation ψ pour un système optique utilisant un masque de phase binaire optimisé pour $\psi_{\text{max}} = \{1\lambda; 1,5\lambda; 3\lambda\}$. Les courbes en trait mixte correspondent à la précision de localisation en dehors de la plage de PdC ψ_{max} désirée et ne sont pas à considérer pour l’analyse des performances. Les paramètres de simulation sont définis dans le Tableau 3.1.

classique, où le critère d’optimisation des masques permettant l’extension de la PdC est la qualité de l’image déconvoluée (voir le Chapitre 2). Cependant, comme illustré dans l’annexe A, les masques optimaux sont différents.

Afin d’approfondir les résultats obtenus, analysons comment ces masques optimaux modifient la PSF du système optique et comment ces modifications permettent d’étendre la PdC. La Figure 3.9(a) représente la variation du profil de la PSF en fonction du paramètre de défocalisation ψ pour quatre configurations différentes : sans masque et avec des masques respectivement optimisés pour $\psi_{\text{max}} = \{1\lambda; 1,5\lambda; 3\lambda\}$. On constate que l’utilisation d’un masque de phase optimisé réduit considérablement l’étalement de la PSF pour des défocalisations importantes. La Figure 3.9(b) illustre la variation de la RBCR en fonction du paramètre ψ pour ces quatre configurations. Comparer les Figures 3.9(a-b) est très instructif. On observe que les minima locaux des RBCR de la Figure 3.9(b) correspondent, quelle que soit la PdC pour laquelle le masque a été optimisé, à deux formes différentes de PSF qui permettent d’assurer une bonne précision de localisation, comme illustré en Figure 3.9(a). La première forme est caractérisée par un lobe central important. Elle se produit par exemple lorsque $\psi \approx 0,7\lambda$ pour $\psi_{\text{max}} = 1\lambda$ ou lorsque $\psi = 0$ pour $\psi_{\text{max}} = 1,5\lambda$. La deuxième forme est caractérisée par des lobes secondaires importants. Elle se produit par exemple lorsque $\psi \approx 0$ pour $\psi_{\text{max}} = 1\lambda$ ou lorsque $\psi \approx 0,7\lambda$ pour $\psi_{\text{max}} = 1,5\lambda$. Les profils de la PSF correspondant à la transition entre ces deux formes conduisent à des valeurs plus élevées de la RBCR. Par exemple, pour $\psi_{\text{max}} = 1,5\lambda$, la plus mauvaise précision de localisation est obtenue lorsque $\psi \approx 0,4\lambda$. Nous constatons, dans la Figure 3.9(a), que le profil de la PSF, pour ce défaut de mise au point, est très peu contrasté, avec un lobe central très atténué et des lobes secondaires quasi inexistant.

3.3. ALGORITHMES DE LOCALISATION 2D

Une fois les masques optimisés et leurs performances de localisation caractérisées, il est alors nécessaire de spécifier, en pratique, un estimateur capable d'atteindre ces performances. L'objectif de cette section est donc de définir un estimateur sans biais de localisation 2D permettant d'atteindre les performances décrites par la **RBCR**, pour un système d'imagerie équipé d'un masque de phase optimisé.

Lorsqu'un fluorophore est situé dans le plan focal et que son image par l'objectif du microscope est décrite par la tache d'Airy (*i.e.*, que le système optique sans masque n'est limité que par la diffraction), **Ober *et al.* [2004]** ont montré que pour une valeur de **RSB** suffisante, les algorithmes du **MV** sont capables d'atteindre la **BCR**. Cependant, lorsque les fluorophores ne sont plus confinés dans les deux dimensions du plan focal et que le système optique est équipé d'un masque de phase pour étendre sa **PdC**, le problème d'estimation est plus complexe. Il dépend d'un paramètre inconnu : le paramètre de défocalisation ψ . Cette grandeur peut donc être considérée comme un paramètre de nuisance. Si nous n'avons à notre disposition pas suffisamment d'information *a priori* sur la valeur vraie de ce paramètre — notée par la suite ψ_0 —, il est alors nécessaire de l'estimer conjointement au sens du **MV** [**Aguet, 2009**] ou de l'intégrer au problème. L'estimation conjointe revient à chercher les coordonnées θ et le paramètre de défocalisation ψ qui maximisent la log-vraisemblance, définie telle que :

$$\ell(\theta, \psi) = \sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \ln \Pr \left[s_{ij} \mid \mu_{ij}^{\psi, \theta} \right] \quad (3.12)$$

où les variables s_{ij} et $\mu_{ij}^{\psi, \theta}$ sont définies à l'Équation (3.5), et la probabilité $\Pr \left[s_{ij} \mid \mu_{ij}^{\psi, \theta} \right]$ à l'Équation (3.4). On peut aussi intégrer le paramètre ψ au problème. Ce qui revient à chercher les coordonnées θ qui maximisent l'intégrale de la log-vraisemblance définie à l'Équation (3.12) sur l'intervalle $[-\psi_{\max}, \psi_{\max}]$.

Je rappelle que notre objectif est d'estimer la position 2D d'un fluorophore (*i.e.*, sa position transverse θ_0) dans une **PdC** étendue, et non sa position 3D (*i.e.*, θ_0 et son défaut de mise au point ψ_0). Je montre cependant dans la suite que pour atteindre cet objectif une estimation grossière du paramètre de défocalisation ψ est nécessaire.

3.3.1. ESTIMATION BASÉE SUR UNE RÉFÉRENCE GLOBALE

Notons ψ_0 le défaut de mise au point de l'image acquise (s_{ij}) d'un fluorophore défocalisé par l'objectif du microscope. Lorsque ce paramètre est connu, l'estimateur du **MV**

peut être approximé par un produit de corrélation :

$$\hat{\theta}_{\text{ml}} = \arg \max_{\theta} \left\{ \sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \ln \Pr \left[s_{ij} \mid \mu_{ij}^{\psi_0, \theta} \right] \right\} \quad (3.13)$$

$$= \arg \min_{\theta} \left\{ \sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \left(s_{ij} - N_0 \mu_{ij}^{\psi_0, \theta} \right)^2 \right\} \quad (3.14)$$

$$= \arg \min_{\theta} \left\{ -2N_0 \sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P s_{ij} \mu_{ij}^{\psi_0, \theta} + \underbrace{\sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P s_{ij}^2 + N_0^2 \sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \left(\mu_{ij}^{\psi_0, \theta} \right)^2}_{\text{quasi-constant}} \right\} \quad (3.15)$$

$$\approx \arg \max_{\theta} \left\{ \sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P s_{ij} \mu_{ij}^{\psi_0, \theta} \right\}. \quad (3.16)$$

La connaissance du paramètre vrai ψ_0 est nécessaire pour calculer le nombre de photo-électrons $\mu_{ij}^{\psi_0, \theta}$ attendu au pixel (i, j) . En pratique, nous ne connaissons pas la valeur vraie de ce paramètre. Une solution simple est d'estimer conjointement θ et ψ . Cette approche est cependant très coûteuse d'un point de vue calculatoire et seule l'estimation des coordonnées θ nous intéresse. Un moyen de contourner cette difficulté est donc d'intégrer le paramètre ψ au problème. Cela revient à remplacer la variable $\mu_{ij}^{\psi_0, \theta}$ dans l'Équation (3.16) par une référence invariante à la défocalisation, et donc indépendante du paramètre ψ_0 . Cette référence, appelée noyau de corrélation et notée $r_{ij}(\theta)$, permet de définir l'estimateur de la position transverse suivant :

$$\hat{\theta} = \arg \max_{\theta} \left\{ \sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P s_{ij} r_{ij}(\theta) \right\}. \quad (3.17)$$

La question est de savoir comment construire la « meilleure » référence. Dans la mesure où les observations s_{ij} dépendent du défaut de mise au point du fluorophore, avec $\psi_0 \in [0, \psi_{\text{max}}]$, une manière intuitive est de choisir la référence $r_{ij}(\theta)$ qui minimise la moyenne des variances d'estimation évaluées sur un ensemble de valeurs $\psi_{k=1,2,\dots,K}$ de ψ régulièrement réparties sur la PdC souhaitée, avec $\psi_K = \psi_{\text{max}}$. Nous montrons, dans l'Annexe B.1, qu'il est possible (moyennant quelques approximations) d'obtenir une expression analytique de la variance de l'estimateur défini à l'Équation (3.17). Rappelons que cette variance, notée $\text{var}_{\psi}[\hat{\theta}]$, dépend du paramètre de défocalisation ψ puisque les mesures s_{ij} en dépendent. Afin de faciliter les calculs, nous choisissons de maximiser la moyenne de l'inverse des variances évaluées sur l'ensemble des ψ_k , avec $k \in \{1, 2, \dots, K\}$, *i.e.*, $\sum_k (\text{var}_{\psi_k}[\hat{\theta}])^{-1} / K$. Nous montrons ainsi, dans l'Annexe B.2, que le noyau de corrélation approprié est une moyenne pondérée des PSF du système optique :

$$r_{ij}(\theta) = \sum_{k=1}^K \alpha_k \mu_{ij}^{\psi_k, \theta} \quad (3.18)$$

où les coefficients α_k sont les composantes du vecteur propre associé à la plus grande valeur propre de la matrice \mathbf{W} :

$$[\mathbf{W}]_{mn} = \iint_{\mathbb{R}^2} v_x v_y \tilde{h}_{\psi_m}^*(v_x, v_y) \tilde{h}_{\psi_n}(v_x, v_y) dv_x dv_y, \quad (3.19)$$

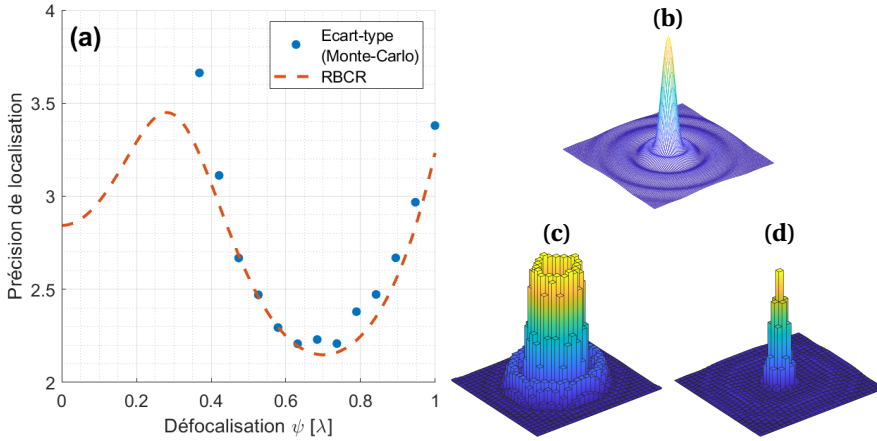


FIGURE 3.10 – (a) Comparaison entre l'écart-type empirique de l'estimateur, défini à l'Équation (3.17), avec la RBCR en fonction du paramètre de défocalisation ψ . (b) Noyau de corrélation optimal qui maximise $\sum_k (\text{var}_{\psi_k}[\hat{\theta}])^{-1}$ pour $\psi_k \in [0; 1\lambda]$ avec un pas de $0,2\lambda$. Le nombre attendu de photo-électrons, sur la grille de pixels du capteur, est représenté pour (c) $\psi = 0\lambda$ et (d) $\psi = 0,7\lambda$. Le système optique est simulé avec les paramètres suivants : $N_0 = 500$ photo-électrons (ph.), $\sigma_n^2 = 6 \text{ ph.}^2/\text{pixel}$ et $\rho_1 = 0,59$. Les autres paramètres de simulation sont définis dans le Tableau 3.1.

avec $\tilde{h}_\psi(v_x, v_y)$ la transformée de Fourier de $h_\psi(x, y)$ définie dans l'Équation (1.2) (la dépendance à la distance Δz_i est remplacée par le paramètre de défocalisation ψ) et où l'exposant * désigne son complexe conjugué. Notons que cette approche est similaire à celle utilisée dans le Chapitre 2 pour l'extension de la PdC en imagerie classique, où un filtre de Wiener moyenné est utilisé pour déconvoluer l'image acquise [Diaz *et al.*, 2009].

La Figure 3.10(a) compare l'écart-type empirique de l'estimateur $\hat{\theta}$ défini à l'Équation (3.17) avec la RBCR en fonction du paramètre de défocalisation ψ . Cette grandeur est estimée à l'aide de simulations de Monte-Carlo sur 4000 réalisations. Nous avons vérifié que ce nombre est suffisant : utiliser plus de réalisations ne change pas les résultats. Le système optique simulé est équipé d'un masque de phase binaire à $L = 2$ anneaux optimisés pour une PdC telle que $\psi_{\max} = 1\lambda$. L'écart-type et la RBCR sont normalisés en divisant leur valeur par celle de la RBCR obtenue sans masque et pour $\psi = 0$. On constate que la RBCR n'est atteinte que si $\psi > 0,4\lambda$. Pour des valeurs de paramètre de défocalisation inférieures à cette limite, l'écart-type empirique est beaucoup plus grand que la RBCR. Ses valeurs sont en dehors des limites du graphe de la Figure 3.10(a).

L'estimateur spécifié à l'Équation (3.17) avec le noyau de corrélation adapté de l'Équation (3.18) ne permet donc pas, en pratique, d'atteindre les performances de localisation théoriques décrites par la BCR. En effet, la forme de la PSF varie trop fortement avec la défocalisation et ce malgré l'utilisation d'un masque de phase optimisé (voir Figure 3.9(a)). Une seule référence globale n'est donc pas suffisante pour caractériser l'ensemble des PSF dans la PdC étendue souhaitée. Par exemple, pour une PdC telle que $\psi_{\max} = 1\lambda$, j'ai montré à la Section 3.2 que deux régimes peuvent être distingués : le premier (illustré Figure 3.10(c)) où le profil de la PSF est étalé avec des lobes secondaires importants; un second (illustré Figure 3.10(d)) où le profil de la PSF est concentré au-

tour d'un lobe principal. Le noyau de corrélation $r_{ij}(\boldsymbol{\theta})$, représenté à la Figure 3.10(b), semble avoir une forme plus proche de celle d'une PSF obtenue pour $\psi \approx 0,7\lambda$ (voir Figure 3.10(d)) que pour $\psi = 0$ (voir Figure 3.10(c)). C'est pourquoi la précision d'estimation, représentée à la Figure 3.10(a), est meilleure lorsque $\psi > 0,4\lambda$ mais se dégrade considérablement pour des valeurs de ψ plus petites.

En conclusion, dans cet exemple, utiliser une référence globale (même optimale) ne permet pas de caractériser l'ensemble des PSF sur l'intervalle $\psi \in [0; 1\lambda]$. Il faut donc diviser cette plage en plusieurs intervalles, sur lesquels la forme de la PSF est invariante, pour pouvoir appliquer l'estimateur de la position transverse défini à l'Équation (3.17).

3

3.3.2. ESTIMATION BASÉE SUR DE MULTIPLES RÉFÉRENCES

Dans la mesure où l'estimateur $\hat{\boldsymbol{\theta}}$ défini à l'Équation (3.17), basé sur une référence globale, n'atteint pas les performances théoriques de localisation décrites par la BCR, nous proposons une autre approche similaire mais construite à l'aide de plusieurs références. Supposons que la PdC, définie telle que $\psi \in [0, \psi_{\max}]$, soit divisée en un nombre fini, noté M_ψ , d'intervalles distincts. En utilisant la méthode décrite ci-dessus, nous définissons M_ψ noyaux de corrélation adaptés à chaque intervalle. Ces noyaux sont notés $r_{ij}^m(\boldsymbol{\theta})$ avec l'index $m \in \{1, \dots, M_\psi\}$. Nous proposons d'estimer conjointement la position transversale $\boldsymbol{\theta}$ du fluorophore imagé et l'index m du noyau de corrélation adapté au sens du MV en reprenant l'expression obtenue à l'Équation (3.14) :

$$(\hat{\boldsymbol{\theta}}, \hat{m}) = \arg \min_{\boldsymbol{\theta}, m, \beta} \left\{ \sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P (s_{ij} - \beta r_{ij}^m(\boldsymbol{\theta}))^2 \right\} \quad (3.20)$$

où le paramètre β est un facteur d'échelle permettant d'adapter l'amplitude du noyau à celle des données mesurées s_{ij} . La valeur de ce paramètre — qui minimise l'Équation (3.20) à $\hat{\boldsymbol{\theta}}$ et m fixés — a une expression analytique :

$$\beta = \frac{\sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P s_{ij} r_{ij}^m(\boldsymbol{\theta})}{\sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P (r_{ij}^m(\boldsymbol{\theta}))^2}. \quad (3.21)$$

Considérons à nouveau l'exemple étudié à la Figure 3.10 où le système optique est équipé d'un masque de phase binaire à $L = 2$ anneaux, tel que $\rho_1 = 0,59$. Nous divisons la plage de PdC $[0, 1\lambda]$ en $M_\psi = 4$ intervalles dans lesquels la forme de la PSF varie peu : le premier intervalle $m = 1$ est défini tel que $\psi \in [0; 0,2\lambda]$, le deuxième $m = 2$ tel que $\psi \in [0,2\lambda; 0,35\lambda]$, le troisième $m = 3$ tel que $\psi \in [0,35\lambda; 0,5\lambda]$, et le dernier $m = 4$ tel que $\psi \in [0,5\lambda; 1\lambda]$. Pour chacun de ces intervalles, nous calculons le noyau de corrélation adapté $r_{ij}^m(\boldsymbol{\theta})$ tel que défini à l'Équation (3.18). Dans cet exemple, les quatre noyaux sont construits en discrétisant chacun des intervalles sur $K = 6$ valeurs de ψ_k régulièrement espacées. Ils sont illustrés de $m = 1$ à 4 dans les Figures 3.11(b) à (e) respectivement. Nous remarquons à présent que le nombre attendu de photo-électrons sur la grille de pixels du capteur, représenté aux Figures 3.10(c-d) pour $\psi = \{0; 0,7\lambda\}$, est correctement caractérisé par ces nouvelles références. Dans la Figure 3.11(a), nous avons représenté l'écart-type

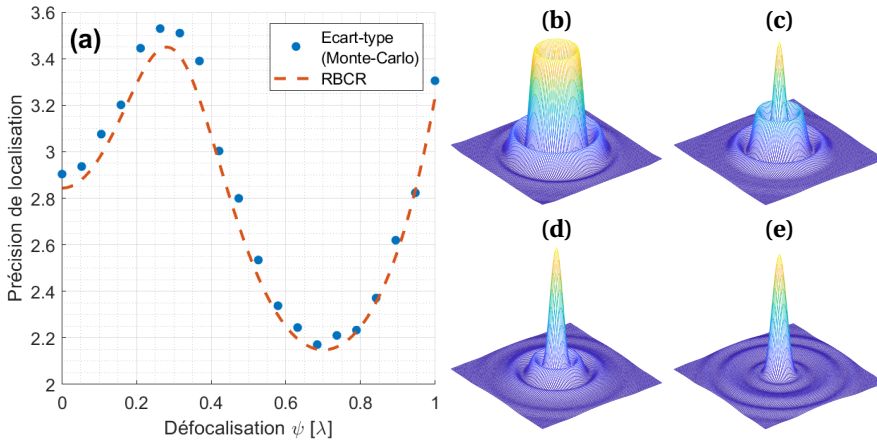


FIGURE 3.11 – (a) Comparaison entre l'écart-type empirique de l'estimateur, défini à l'Équation (3.17), avec la RBCR en fonction du paramètre de défocalisation ψ . Sur la partie droite sont illustrés les noyaux de corrélation optimaux qui maximisent $\sum_k (\text{var}_{\psi_k}(\hat{\theta}))^{-1}$ pour (b) $\psi_k \in [0; 0, 2\lambda]$, (c) $\psi_k \in [0, 2\lambda; 0, 35\lambda]$, (d) $\psi_k \in [0, 35\lambda; 0, 5\lambda]$, (e) $\psi_k \in [0, 5\lambda; 1\lambda]$. Pour chacun de ces intervalles, $K = 6$. Le système optique est simulé avec les paramètres suivants : $N_0 = 500$ photo-électrons (ph.), $\sigma_n^2 = 6 \text{ ph.}^2/\text{pixel}$ et $\rho_1 = 0,59$. Les autres paramètres de simulation sont définis dans le Tableau 3.1.

empirique (points bleus) de l'estimateur défini à l'Équation (3.20), que nous comparons à la RBCR (en tirés rouges). Cette grandeur empirique est de nouveau estimée à l'aide de simulations de Monte-Carlo sur 4000 réalisations. Nous notons, contrairement à la Figure 3.10(a), que l'écart-type empirique est très proche de la RBCR quel que soit le défaut de mise au point. Diviser la plage de PdC $[0, 1\lambda]$ en $M_\psi = 4$ intervalles permet donc ici de caractériser correctement la variabilité de la PSF.

Cependant, lorsque la plage de PdC souhaitée s'élargit, la variabilité de la PSF à l'intérieur de cette plage augmente également (voir Figure 3.9(a)). Il est donc nécessaire d'utiliser un plus grand nombre d'intervalles pour caractériser l'ensemble des PSF. Par exemple, pour une PdC telle que $\psi_{\max} = 1,5\lambda$, nous avons utilisé $M_\psi = 5$ intervalles. La Figure 3.12(a) compare l'écart-type empirique de l'estimateur, défini à l'Équation (3.17) et estimé avec des simulations de Monte-Carlo, avec la RBCR en fonction du paramètre de défocalisation ψ pour $\psi_{\max} = 1,5\lambda$. On constate que l'estimateur est très proche de la RBCR. La Figure 3.12(b) représente les mêmes valeurs pour $\psi_{\max} = 2\lambda$. Dans ce cas, il faut utiliser $M_\psi = 6$ intervalles pour atteindre la RBCR.

Nous reviendrons en détails dans le Chapitre 4 sur le léger écart qu'on peut encore observer entre les performances théoriques prédites par la BCR et les performances estimées de manière empiriques.

En résumé, si ψ_0 est inconnu, la RBCR des systèmes dotés d'une PdC étendue ne peut pas être atteinte avec un estimateur constitué d'un seul noyau de corrélation. Cela est dû au fait que même avec les masques optimaux, la PSF varie dans la plage de défocalisation. Il y a donc un prix à payer en matière de complexité calculatoire pour localiser la position transverse d'un fluorophore dans un volume imagé. Nous avons proposé une méthode basée sur la subdivision de la plage de défocalisation en un nombre suffisant

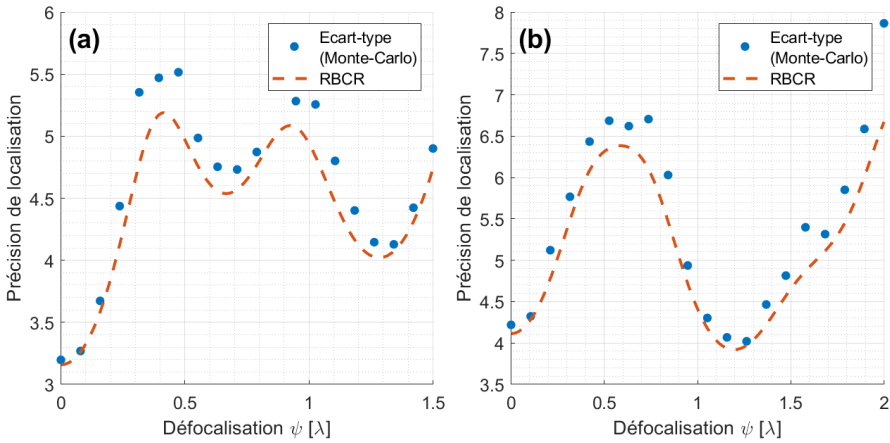


FIGURE 3.12 – Comparaison entre l'écart-type empirique de l'estimateur, défini à l'Équation (3.17), avec la RBCR en fonction du paramètre de défocalisation ψ pour (a) $\psi_{\max} = 1,5\lambda$ avec $\rho = (0,4709;0,6782)$ et pour (b) $\psi_{\max} = 2\lambda$ avec $\rho = (0,7436;0,8974)$. Le système optique est simulé avec les paramètres suivants : $N_0 = 500$ photo-électrons (ph.) et $\sigma_n^2 = 6 \text{ ph.}^2/\text{pixel}$. Les autres paramètres de simulation sont définis dans le Tableau 3.1.

d'intervalle, chacun étant associé à un seul noyau de corrélation. Nous avons montré que cette méthode permet d'atteindre la RBCR ou d'en être très proche. Sa complexité de calcul est proportionnelle au nombre M_ψ d'intervalles nécessaires, qui augmente avec la largeur de la plage de défocalisation. En effet, pour M_ψ intervalles, la localisation nécessite M_ψ corrélations au lieu d'une seule dans le cas où ψ_0 est connu.

3.4. COMPARAISON AVEC UN MASQUE DE LA LITTÉRATURE

La méthodologie pour optimiser des masques de phase, présentée dans ce chapitre, est basée sur un critère explicite et général, issu de la théorie de l'information : la BCR. Elle permet donc de comparer (quantitativement) tout type de masque d'extension de la PdC en microscopie par localisation. Afin d'illustrer le potentiel de cette approche, nous comparons dans cette section les masques de phase proposé par Abrahamsson *et al.* [2006] avec ceux co-optimisés précédemment. Ces masques sont constitués de régions annulaires concentriques introduisant une différence de chemin optique bien supérieure à la longueur de cohérence du faisceau d'illumination (voir Figure 3.13(a)). Ainsi, les rayons lumineux traversant chaque région sont mutuellement incohérents. La PSF d'un système optique équipé de ce type de masque est donc obtenue par l'addition incohérente des PSF produites par chaque région annulaire. Nous désignons ces masques par l'acronyme IPP, de l'anglais *Incoherently Partitioned Pupil* (IPP). Leurs paramètres ρ , que nous chercherons à optimiser, correspondent aux rayons des régions annulaires.

Pour comparer les performances de ces deux types de masques, nous optimisons le critère *minimax* introduit à l'Équation (3.10) avec chacun des masques pour différentes PdC désirées, à savoir $\psi_{\max} \in [0,1\lambda]$. La Figure 3.13(c) représente la valeur du

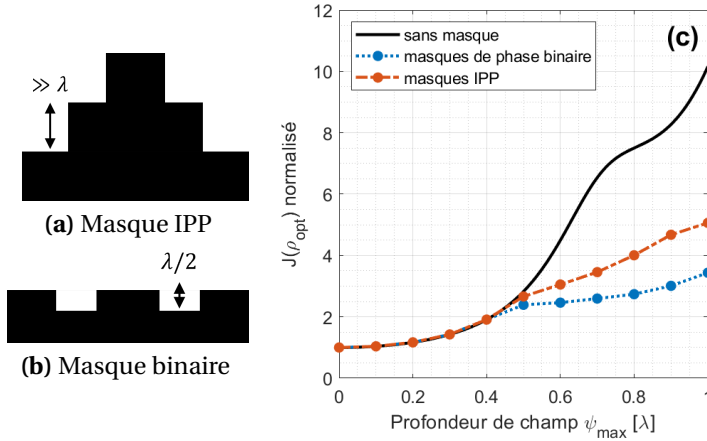


FIGURE 3.13 – Profil générique (a) du masque de phase binaire annulaire et (b) du masque IPP (proposé par Abrahamsson *et al.* [2006]). (c) Performance de localisation des masques $J(\rho_{opt})$ en fonction de la PdC ψ_{max} désirée. Les paramètres de simulation sont définis dans le Tableau 3.1.

critère $J(\rho_{opt})$, définie à l'Équation (3.11), en fonction de ψ_{max} (avec un pas de $0,1\lambda$). La courbe en trait plein noir correspond à $J(\rho)$ avec $\rho = 0$ (sans masque) où le système optique est uniquement limité par la diffraction. Cette courbe servira de référence pour la comparaison. La courbe en pointillés bleus est obtenue avec les masques de phase binaires annulaires optimisés pour chaque valeur de ψ_{max} . Celle en tirets rouges est obtenue avec les masques IPP optimaux pour ces mêmes PdC. Pour chaque PdC (*i.e.*, valeur de ψ_{max}), les masques binaires et IPP sont ré-optimisés et peuvent donc être différents. On remarque que si les fluorophores sont faiblement défocalisés, *i.e.*, $\psi_{max} < 0,4\lambda$, les masques de phase n'améliorent pas les performances de localisation, et ce quel que soit le type de masque utilisé (les courbes du graphe se superposent). Cependant, lorsque les fluorophores sont davantage défocalisés, les masques de phase améliorent significativement les performances de localisation. On remarque d'ailleurs que cette amélioration est plus importante avec les masques de phase binaires annulaires qu'avec les masques IPP, quelle que soit la profondeur ψ_{max} . Par exemple, lorsque la PdC est telle que $\psi_{max} = 1\lambda$, le masque de phase binaire annulaire optimal mène à une valeur de $J(\rho_{opt})$ trois fois plus petite que celle obtenue sans masque, tandis que le masque IPP optimal ne réduit $J(\rho_{opt})$ que d'un facteur 2.

Ce résultat illustre une manière de comparer les stratégies d'extension de PdC en s'appuyant sur les outils développés dans ce chapitre. Bien entendu, la précision de la localisation peut ne pas être le seul critère pour choisir (ou optimiser) ces stratégies. Par exemple, la facilité avec laquelle les masques peuvent être fabriqués est également un critère important. À ce sujet, les masques de phase binaires annulaires peuvent être plus faciles à fabriquer avec les techniques de photolithographie car ils ne nécessitent qu'un seul niveau de gravure peu profond alors que les masques IPP nécessitent des niveaux différents et profonds entre chaque région annulaire.

3.5. CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons formalisé le problème de co-conception lié à l'extension de la PdC en microscopie par localisation de molécule unique. Nous avons montré que placer un masque de phase optimisé dans la pupille de sortie du microscope, et utiliser un algorithme de traitement numérique adapté, permet d'améliorer significativement les performances de localisation sur une profondeur d'imagerie étendue. Nous avons ainsi optimisé la fonction de modulation de phase des masques binaires annulaires pour atteindre les PdC désirées. Cela se fait au prix d'une précision de la localisation dégradée pour les marqueurs situés dans le plan de focal ($\psi = 0$) par rapport à celle obtenue avec un système optique sans aberration de défocalisation et uniquement limité par la diffraction.

L'un des avantages de la méthode d'optimisation proposée est qu'elle s'appuie sur un critère fondé sur la BCR. Il s'agit donc d'un critère explicite et général qui permet de comparer quantitativement tout type de masque permettant d'étendre la PdC. Nous l'avons illustré en comparant nos masques de phase binaires annulaires optimisés avec ceux proposés par Abrahamsson *et al.* [2006].

* * *

Notre étude est basée sur un modèle d'imagerie simplifié : l'aberration optique introduite par le défaut de mise au point est modélisée par un simple terme quadratique dans le plan pupillaire et le bruit de grenaille lié au caractère aléatoire d'émission des photons (venant du fluorophore et / ou du fond autofluorescent) n'est pas pris en compte. Ces hypothèses vont être discutées dans les deux chapitres suivants. Dans le Chapitre 4, nous étudierons l'influence de la prise en compte d'un modèle de bruit plus complet. Dans le Chapitre 5, nous considérerons un modèle d'imagerie optique plus réaliste dans le contexte de la microscopie à forte ouverture numérique.

4

INFLUENCE DU MODÈLE DE BRUIT

*Nous venons de montrer que la **profondeur de champ** des microscopes par localisation peut être étendue en plaçant un masque de phase dans la pupille de leur objectif et en appliquant un traitement numérique approprié aux images acquises. Pour optimiser ces masques et caractériser leurs performances, nous avons fait deux hypothèses importantes. La première porte sur le modèle de bruit utilisé. Nous avons supposé que les images acquises en **single-molecule localization microscopy (SMLM)** étaient perturbées par un bruit additif de distribution gaussienne. Cependant, il existe en microscopie de fluorescence d'autres types de bruits qui peuvent être dominants dans certaines situations. Nous proposons dans ce chapitre d'évaluer l'influence de ces différents modèles sur l'optimisation des masques de phase. Conduisent-ils tous aux mêmes masques optimaux ou à des masques différents ?*

*La seconde hypothèse porte sur l'utilisation de la **borne de Cramér-Rao (BCR)** comme critère pour évaluer la précision de localisation. Il est admis en pratique que l'estimateur du **maximum de vraisemblance** peut atteindre la **BCR**, mais il s'agit en réalité d'une approximation dont on souhaite déterminer ici précisément le domaine de validité. Nous cherchons donc à savoir dans quelles conditions la **BCR** reflète fidèlement la précision d'estimation en **SMLM**.*

J'AI formalisé, au Chapitre 3, le problème de co-conception lié à l'extension de la PdC en microscopie par localisation de molécule unique : un masque de phase, placé dans la pupille du microscope et optimisé conjointement avec le traitement numérique, permet d'améliorer significativement les performances de localisation sur une profondeur d'imagerie étendue. La méthode d'optimisation proposée s'appuie sur la BCR.

Cependant, ces travaux reposent sur deux hypothèses qui n'ont pas été vérifiées. La première concerne le modèle de bruit utilisé : il existe, en fonction des situations, différentes sources de bruit dominantes en microscopie de fluorescence. La prise en compte de ces bruits dans la modélisation stochastique des données acquises modifie l'expression de la BCR, et donc aussi celle du critère d'optimisation des masques de phase. Je propose, dans la première partie de ce chapitre, d'évaluer l'influence qu'a cette modélisation sur l'optimisation des masques.

4

La seconde hypothèse porte sur l'utilisation de la BCR comme critère pour évaluer la précision de localisation. Bien qu'il soit admis qu'elle peut être atteinte dans la pratique en utilisant l'estimateur du MV (voir par exemple les travaux d'Ober *et al.* [2004]), il s'agit en réalité d'une approximation dont nous proposons d'établir précisément le domaine de validité. Nous chercherons donc, dans la seconde moitié de ce chapitre, à répondre à la question suivante : dans quelles conditions la BCR reflète-t-elle fidèlement la précision de localisation en SMLM? Nous pourrions ainsi définir les conditions expérimentales pour lesquelles un microscope équipé d'un masque de phase optimal et d'un traitement numérique adapté peut imager dans une plage de PdC étendue.

4.1. SOURCES DE BRUITS EN MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE

Depuis leur invention en 1969, les capteurs photographiques CCD ont été utilisés pour détecter la faible fluorescence de marqueurs en microscopie optique. Au cours des quatre dernières décennies, ces dispositifs à transfert de charge, ou en anglais *charge coupled device* (CCD), ont été améliorés pour faciliter l'acquisition d'images à faible luminosité. Les principales caractéristiques qui ont contribué à ce progrès sont une efficacité quantique supérieure à 90%, un bruit de lecture avec un faible écart-type, un facteur de remplissage au voisinage de 100% et une excellente efficacité de transfert de charge [Waltham, 2013].

Cependant, les images numériques acquises à l'aide de ces détecteurs restent bruitées. Ces bruits viennent de différentes sources dont certaines sont liées au signal d'intérêt que l'on cherche à mesurer, d'autres n'en dépendent pas. Il est difficile de dresser une liste exhaustive des sources de bruits qui altèrent les images numériques acquises en microscopie optique. Cependant, les sources de bruits les plus courantes sont les suivantes.

Le bruit de photons (aussi appelé bruit de grenaille) est une source de bruit inhérente à toute source lumineuse. Le signal de fluorescence mesuré, émis par un fluorophore après excitation, est une grandeur physique composée d'événements discrets : les détectons de photons. Par sa nature, ce signal est donc aléatoire et peut être caractérisé par une loi de Poisson dont l'espérance mathématique et la variance sont proportionnelles à l'intensité du signal de fluorescence.

Le bruit de fond est un signal de fluorescence endogène non désiré provenant de composés naturels, tels que le tissu biologique. Cette autofluorescence se caractérise par un spectre d'émission large par rapport à ceux des fluorophores généralement étroits. Il est donc difficile, par des filtrages traditionnels, de la séparer du signal de fluorescence. Le bruit de fond se caractérise aussi par une loi de Poisson mais dont l'espérance mathématique et la variance ne dépendent pas du signal utile émis par le fluorophore.

Le courant d'obscurité correspond au signal mesuré alors qu'aucune source n'éclaire le détecteur. Pendant la mesure, des porteurs de charges se créent par simple agitation thermique. Le signal à temps discret résultant de cette agitation est aléatoire et perturbe la mesure. Il peut être caractérisé par une loi de Poisson dont l'espérance mathématique et la variance ne dépendent pas du signal utile.

Le bruit de lecture est une incertitude sur la mesure du courant électrique (image du flux lumineux). Il intervient lors de la conversion des électrons en une tension mesurable. Il est souvent modélisé par un bruit additif gaussien dont les paramètres sont indépendants du signal utile. De plus, pour une caméra **CCD**, ses caractéristiques sont identiques en chaque pixel.

Le bruit de quantification intervient lors de la conversion analogique – numérique que subit le signal mesuré. On passe d'une tension analogique continue à un signal numérique avec un nombre fini de valeurs. Cette quantification introduit une erreur (ou un bruit) entre le signal quantifié et le signal source. Cette erreur est modélisée par une distribution uniforme qui dépend de la taille du buffer de quantification.

Avec l'émergence de nouveaux détecteurs capables de réduire considérablement le courant d'obscurité, le bruit de lecture et le bruit de quantification, les sources de bruits dominantes en **SMLM** proviennent principalement du bruit de photons et du fond.

4.1.1. APPROXIMATIONS DU CRITÈRE D'OPTIMISATION DES MASQUES

Les images acquises sont ainsi décrites par un bruit de grenaille provenant du signal utile (*i.e.*, la fluorescence de l'émetteur) et d'un fond constant de niveau moyen b (*i.e.*, l'autofluorescence du milieu biologique). Le bruit total résultant est alors modélisé par une loi de Poisson dont la moyenne est la somme des moyennes de ces deux bruits :

$$\Pr \left[s_{ij} \mid \mu_{ij}^{\psi, \theta} \right] = \frac{\left(N_0 \mu_{ij}^{\psi, \theta} + b \right)^{s_{ij}}}{s_{ij}!} \exp \left[- \left(N_0 \mu_{ij}^{\psi, \theta} + b \right) \right] \quad (4.1)$$

où b désigne la valeur moyenne spatialement constante du fond par pixel. On rappelle que $N_0 \mu_{ij}^{\psi, \theta}$ désigne la valeur moyenne du signal de fluorescence attendu au pixel (i, j) (voir l'Équation (3.5)) et que s_{ij} correspond au nombre de photo-électrons mesurés au pixel (i, j) .

Ce modèle conduit à une matrice d'information de Fisher, définie à l'Équation (3.6), dont le développement est différent du Chapitre 3. L'expression de la **BCR** qui en dérive

est donc tout aussi différente. Son expression est la suivante :

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{RBCR}_x(\psi) = \frac{\sqrt{b}}{N_0} \left[\sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \frac{\left(\int_{(j-\frac{1}{2})\Delta_{xy}}^{(j+\frac{1}{2})\Delta_{xy}} \Delta_x f_i^{\psi, \theta}(y) dy \right)^2}{\frac{N_0}{b} \mu_{ij}^{\psi, \theta} + 1} \right]^{-\frac{1}{2}} \\ \text{RBCR}_y(\psi) = \frac{\sqrt{b}}{N_0} \left[\sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \frac{\left(\int_{(i-\frac{1}{2})\Delta_{xy}}^{(i+\frac{1}{2})\Delta_{xy}} \Delta_y f_j^{\psi, \theta}(x) dx \right)^2}{\frac{N_0}{b} \mu_{ij}^{\psi, \theta} + 1} \right]^{-\frac{1}{2}} \end{array} \right. \quad (4.2)$$

où l'on rappelle que Δ_{xy} désigne le pas de la grille de pixels de taille $(2P+1) \times (2P+1)$ et que $\Delta_x f_i^{\psi, \theta}$ (respectivement $\Delta_y f_j^{\psi, \theta}$) est la différence entre les valeurs de la **PSF** évaluée aux bords des pixels adjacents de la ligne i (de la colonne j) comme définie à l'Équation (3.8). Nous reproduisons ci-dessous leur expression :

$$\left\{ \begin{array}{l} \Delta_x f_i^{\psi, \theta}(y) = f_\psi \left(\left(i - \frac{1}{2} \right) \Delta_{xy}, y, \theta \right) - f_\psi \left(\left(i + \frac{1}{2} \right) \Delta_{xy}, y, \theta \right) \\ \Delta_y f_j^{\psi, \theta}(x) = f_\psi \left(x, \left(j - \frac{1}{2} \right) \Delta_{xy}, \theta \right) - f_\psi \left(x, \left(j + \frac{1}{2} \right) \Delta_{xy}, \theta \right) \end{array} \right. \quad (4.3)$$

Notons que contrairement au chapitre précédent, il est difficile de définir à partir de l'Équation (4.2) un **RSB** puisque le bruit provient de deux sources distinctes.

Considérons, comme au Chapitre 3, la position $\theta_0 = (0, 0)$. On a alors $\text{RBCR} = \text{RBCR}_x = \text{RBCR}_y$. La valeur moyenne b du fond qui intervient dans l'Équation (4.2) dépend de l'application. On considère alors dans ce chapitre les deux scénarios suivants. Dans le *Scénario A*, le bruit de photons provenant de la fluorescence de l'émetteur est la source dominante de bruit, ce qui conduit à supposer que $b = 0$. L'expression de la **RBCR** dans ce scénario devient :

$$\text{RBCR}_A = \frac{1}{\sqrt{N_0}} \left[\sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \frac{\left(\int_{(j-\frac{1}{2})\Delta_{xy}}^{(j+\frac{1}{2})\Delta_{xy}} \Delta f_i^{\psi, \theta_0}(y) dy \right)^2}{\mu_{ij}^{\psi, \theta_0}} \right]^{-\frac{1}{2}} \quad (4.4)$$

On peut alors définir un **RSB** égal à $\sqrt{N_0}$.

Dans le *Scénario B*, le fond est la source dominante de bruit, donc on néglige les fluctuations dues au signal utile de fluorescence. Ceci conduit à supposer que $N_0 \mu_{ij}^{\psi, \theta_0} \ll b$, ce qui donne pour l'expression de la **RBCR** :

$$\text{RBCR}_B = \frac{\sqrt{b}}{N_0} \left[\sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \left(\int_{(j-\frac{1}{2})\Delta_{xy}}^{(j+\frac{1}{2})\Delta_{xy}} \Delta f_i^{\psi, \theta_0}(y) dy \right)^2 \right]^{-\frac{1}{2}} \quad (4.5)$$

On peut alors définir une autre expression du **RSB** égale à N_0/\sqrt{b} . L'expression du **RSB** est différente puisque le bruit provient d'une source différente. On note que l'expression de la $RBCR_B$ est la même qu'à l'Équation (3.7) avec $\sigma_n = \sqrt{b}$. Le *Scénario B* correspond alors à celui utilisé au Chapitre 3.

L'ensemble des niveaux de bruit de fond possibles se situent donc entre ces deux scénarios. Les paramètres optimaux du masque, désignés par le vecteur de paramètres ρ_{opt} , sont obtenus en résolvant le problème d'optimisation de l'Équation (3.10). Puisque l'expression de la $RBCR$, définie à l'Équation (4.2), dépend de N_0 et b , les paramètres optimaux du masque en dépendent aussi. Compte tenu de l'expression de la $RBCR$ dans l'Équation (4.2), le vecteur ρ_{opt} ne dépend de N_0 que par le rapport N_0/b . Ce rapport est appelé le « bilan photonique ».

A contrario, pour les deux *Scénarios A* et *B*, on peut factoriser la $RBCR$ pour que les paramètres optimaux du masque ne dépendent plus de N_0 et b . C'est une propriété intéressante pour concevoir des masques de phase génériques indépendants de l'intensité des marqueurs fluorescents et du fond. La question est donc de savoir si en pratique ces scénarios sont réalistes et peuvent être utilisés pour l'optimisation des masques.

4.1.2. MASQUES DE PHASE BINAIRES ANNULAIRES OPTIMAUX

Considérons pour commencer, une plage de **PdC** telle que $\psi_{\text{max}} = 1\lambda$. Nous optimisons par une recherche exhaustive des masques de phase binaires à $L = 2$ anneaux — caractérisés par un seul paramètre ρ_1 — en fonction du rapport $N_0/b \in [8, 33; 400]$. La Figure 4.1(a) représente le paysage d'optimisation des masques, *i.e.*, les valeurs du critère $J(\rho_1)$ normalisé, en fonction du rayon ρ_1 et du bilan photonique. Pour rappel, le critère est normalisé en divisant $J(\rho_1)$ par la valeur de la $RBCR$ évaluée en $\psi = 0$ et $\rho = 0$. Sur ce paysage, nous remarquons qu'il existe, pour toutes les valeurs de N_0/b , deux minima locaux qui évoluent respectivement autour de $\rho_1 = 0,6$ et $0,8$. La ligne blanche sur la Figure 4.1(a) représente le rayon ρ_{opt} du masque optimal en fonction du bilan photonique. On distingue clairement deux régimes différents. Le premier correspond aux valeurs de $N_0/b < 85$, où la valeur optimale est $\rho_1 \approx 0,56$. Cette valeur est très similaire à celle obtenue avec le *Scénario B* : $\rho_{\text{opt}} = 0,55$ (*i.e.*, lorsque $N_0/b \ll 1$: tout à gauche du graphe). Le second régime correspond aux valeurs de $N_0/b > 85$: la valeur optimale y évolue entre $\rho_1 = 0,81$ et $0,78$. Ces valeurs sont similaires à celle obtenue dans le *Scénario A* : $\rho_{\text{opt}} = 0,76$ (*i.e.*, lorsque $b = 0$, pour de très grandes valeurs de N_0/b sur la Figure 4.1(a)).

Afin de mieux visualiser le paysage d'optimisation et son évolution en fonction du bilan photonique, la Figure 4.1(b) représente le critère $J(\rho_1)$ normalisé en fonction de ρ_1 pour les *Scénarios A, B* (en trait plein) et différentes valeurs de N_0/b (en pointillés). On remarque que ce paysage évolue continûment du *Scénario B* vers le *Scénario A* à mesure que le bilan photonique augmente. Notons par ailleurs que plus N_0/b est grand, plus le paysage d'optimisation est plat, et les minima locaux principaux proches des uns des autres. L'effet de cet aplatissement sera discuté ultérieurement.

Les premières conclusions liées à ces résultats sont que le *Scénario B* est suffisant pour caractériser les applications où le bilan photonique est faible : dans cet exemple N_0/b doit être inférieur à 85. À l'inverse le *Scénario A* caractérise les applications où le bilan photonique est grand : N_0/b doit être supérieur à 85. Notons cependant que la convergence du paysage d'optimisation $J(\rho_1)$ (en pointillés) vers celui du *Scénario A* (en

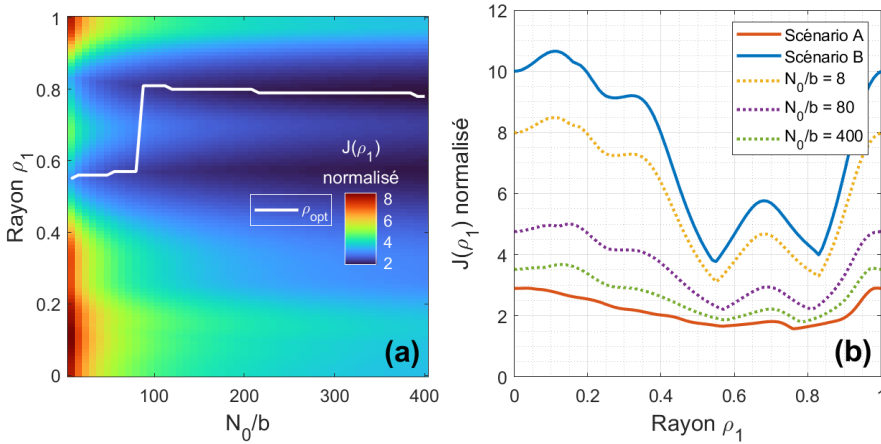


FIGURE 4.1 – Paysage d’optimisation (*i.e.*, valeurs du critère $J(\rho_1)$ normalisé) pour un masque à 2 anneaux tel que $\psi_{\max} = 1\lambda$ (a) tracé en fonction de ρ_1 et du bilan photonique N_0/b et (b) tracé en fonction de ρ_1 pour quelques valeurs de N_0/b . La ligne blanche représente le rayon du masque optimal ρ_{opt} en fonction du bilan photonique (elle correspond donc au minimum global du critère). Les paramètres de simulations utilisés sont : $\theta_0 = (0;0)$ μm $\Delta_{xy} = 10$ μm , $2P + 1 = 21$ pixels, $\text{NA} = 1,3$, $\lambda = 700$ nm, $M = 60$ (grandissement).

trait plein rouge) est lente.

Afin de généraliser ces résultats, considérons des masques de phase binaires composés d’un grand nombre d’anneaux. La Figure 4.2(a) illustre les paramètres optimaux des masques optimisés pour une plage de PdC telle que $\psi_{\max} = 1\lambda$ en fonction du bilan photonique. L’optimisation est réalisée avec des structures annulaires composées au maximum de $L = 5$ anneaux. Pour résoudre le problème d’optimisation non convexe défini à l’Équation (3.10) avec un grand nombre d’anneaux, nous utilisons l’algorithme d’optimisation par essaim de particules (*particle swarm*) [Kennedy et Eberhart, 1995] présenté au Chapitre 3. Comme je l’ai mis en évidence au chapitre précédent, les performances des masques optimaux peuvent se stabiliser pour une valeur plus petite de L , auquel cas le masque optimal a moins de 5 anneaux. Sur la Figure 4.2(a), chaque rayon est représenté par un point. Ainsi, un ensemble vertical de points correspond aux rayons des anneaux du masque optimal pour une valeur de N_0/b . Les performances des masques, *i.e.* la valeur du critère $J(\rho_{opt})$ normalisé, sont reportées à la Figure 4.2(c).

On remarque que pour $N_0/b < 85$ et $\psi_{\max} = 1\lambda$, les masques optimaux sont inchangés et correspondent à ceux de la Figure 4.1(a) : ils n’ont que 2 anneaux, ce qui signifie que même si on autorise un nombre d’anneaux supérieur, l’optimum reste un masque à 2 anneaux. À l’inverse, pour $N_0/b > 85$, les masques optimaux sont différents : on constate que l’optimisation converge vers des structures annulaires différentes composées de $L = 3$ ou 4 anneaux. Sur la Figure 4.2(c), on a représenté les performances de ces masques (points bleus) ainsi que celles des masques à $L = 2$ anneaux (en trait plein noir) : on constate qu’elles sont légèrement supérieures.

Considérons à présent une plus grande plage de PdC. Les performances des masques sont illustrées à la Figure 4.2(c) (croix rouges). La Figure 4.2(b) représente les paramètres optimaux des masques optimisés pour une plage de PdC telle que $\psi_{\max} = 1,5\lambda$ en fonc-

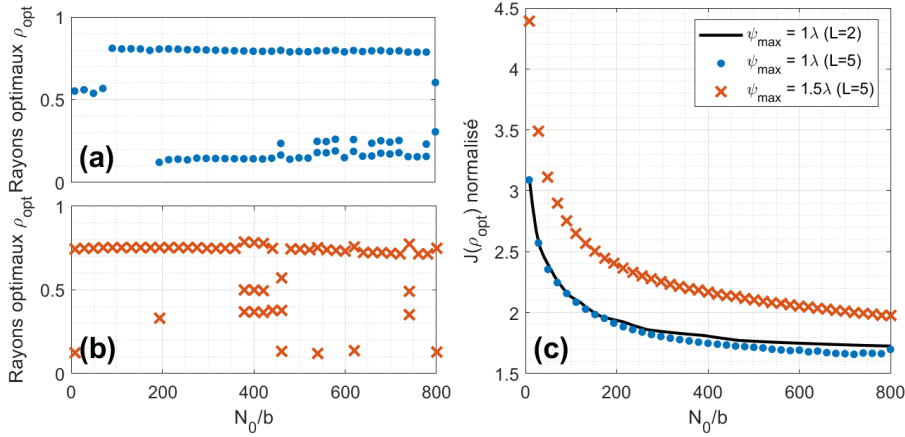


FIGURE 4.2 – Rayons optimaux des masques de phase binaires optimisés sur une plage de PdC telle que (a) $\psi_{\text{max}} = 1\lambda$ et (b) $\psi_{\text{max}} = 1,5\lambda$ en fonction du bilan photonique N_0/b . (c) Performances de ces masques. Les paramètres de simulation sont ceux de la Figure 4.1.

tion du bilan photonique. Selon la valeur de N_0/b , on distingue à nouveau deux régimes. Lorsque $N_0/b < 380$, le masque optimal est composé d'un seul anneau $\rho_1 \approx 0,75$. Lorsque $N_0/b > 380$, la structure du masque optimal fluctue, bien que l'anneau $\rho \approx 0,75$ soit toujours présent. L'optimisation ne converge pas vers une unique solution. En effet, nous avons remarqué que pour $L = 2$ le paysage d'optimisation des masques s'aplatissait à mesure que N_0/b augmentait. Les différents minima locaux étant de plus en plus proches les uns des autres, l'optimisation saute d'un minimum à l'autre plus facilement.

En conclusion, les masques de phase optimisés avec le critère *minimax* de l'Équation (3.10) et la *RBCR* définie à l'Équation (4.2) dépendent du bilan photonique. Cependant, on peut définir deux scénarios pour lesquels la *RBCR* a une expression indépendante de N_0 et b . Dans le *Scénario A*, on considère uniquement le bruit de photons provenant de la fluorescence de l'émetteur, et dans le *Scénario B*, on considère que le fond est la source dominante de bruit. Ainsi pour ces deux scénarios, les paramètres optimaux du masque ne dépendent plus que de l'échantillonnage de la *PSF* par la grille de pixels. Cette propriété permet de concevoir des masques de phase génériques indépendants de l'intensité des marqueurs fluorescents et du bruit de fond. En pratique, nous montrons que le *Scénario B* correspond à des applications pour lesquelles $N_0/b < 85$ pour $\psi_{\text{max}} = 1\lambda$ et $N_0/b < 380$ pour $\psi_{\text{max}} = 1,5\lambda$. Comme nous l'avons mis en évidence au Chapitre 3, plus la plage de PdC est grande, plus la *PSF* s'étale le long de l'axe optique. Ainsi pour une même valeur de *RSB*, la *PSF* se « noie » dans le bruit de fond à mesure que ψ_{max} augmente. Cela explique pourquoi le *Scénario B* est valide pour de plus grandes valeurs de N_0/b à mesure que ψ_{max} augmente.

Par ailleurs, rappelons qu'au Chapitre 3, nous avons considéré $N_0 = 500$ et $b = \sigma_n^2 = 6$, ce qui correspond à $N_0/b \approx 14$. D'après les résultats que nous venons d'établir, il était donc légitime d'utiliser, comme nous l'avons fait, un modèle de bruit additif gaussien. En effet, ce modèle conduit à une *RBCR* proportionnelle à celle du *Scénario B* et donc à

des masques optimaux identiques.

4.2. EFFICACITÉ DES ESTIMATEURS DE LOCALISATION

Les résultats obtenus jusqu'à présent reposent sur l'hypothèse que la BCR est un indicateur fidèle de la précision de localisation obtenue en pratique. Autrement dit, que nous sommes en mesure de spécifier un estimateur dit « efficace » — sans biais et dont la variance atteint la BCR. Un tel estimateur est donc caractérisé par la plus petite variance (ou erreur quadratique moyenne) possible, indiquant une faible déviation entre la valeur estimée et la valeur réelle. Il est largement admis qu'en SMLM la BCR peut être atteinte dans la pratique en utilisant l'estimateur du MV. Nous avons montré dans le Chapitre 3 que c'est le cas dans une configuration donnée. Cependant, il s'agit d'une approximation dont nous établissons précisément dans cette section le domaine de validité.

4

4.2.1. CAS FOCALISÉ

Considérons pour commencer des émetteurs situés dans le plan de mise au point, *i.e.*, dont la position longitudinale z_p est confondue avec celle du plan focal z_{focus} . On a alors $\Delta z_0 = z_p - z_{\text{focus}} = 0$ ou encore $\psi = 0$.

ESTIMATEUR DU MAXIMUM DE VRAISEMBLANCE (MV)

Pour estimer la position d'un émetteur avec une précision sous-pixellique, un algorithme de localisation doit être mis en œuvre. Différentes méthodes basées sur l'estimation du centre de masse, l'ajustement de gabarit ou la déconvolution avec des contraintes de parcimonie sont proposées dans la littérature (voir la synthèse de Sage *et al.* [2019]). Cependant, l'algorithme le plus couramment utilisé est celui du MV, que nous avons utilisé dans le Chapitre 3 et qui tire parti des connaissances *a priori* sur la nature des sources de bruit qui corrompent les images observées (voir par exemple les travaux d'Ober *et al.* [2004]). Cet algorithme estime le vecteur de coordonnées θ en maximisant la log-vraisemblance définie à l'Équation (3.12). On a montré à la Section 3.3 que pour un modèle de bruit additif gaussien, cet estimateur peut s'écrire sous la forme d'un produit de corrélation. Ce résultat se généralise facilement pour un modèle de bruit de Poisson avec fond tel qu'étudié dans la section 4.1. Dans ce cas, l'estimateur du MV s'écrit :

$$\hat{\theta} = \arg \max_{\theta} \left\{ \sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P s_{ij} q_{ij}(\theta) \right\} \quad (4.6)$$

avec

$$q_{ij}(\theta) = \log \left[N_0 \mu_{ij}^{\psi, \theta} + b \right]. \quad (4.7)$$

Il s'agit aussi d'une corrélation, mais dont le noyau est différent.

Il est intéressant de noter que dans le *Scénario A*, q_{ij} est proportionnel à $\log[\mu_{ij}^{\psi, \theta}]$, et que dans le *Scénario B*, il est quasi-proportionnel à $\mu_{ij}^{\psi, \theta}$ puisque $\log[1 + N_0 \mu_{ij}^{\psi, \theta} / b] \approx N_0 \mu_{ij}^{\psi, \theta} / b$. Ainsi dans le *Scénario B*, bien que le bruit suive une distribution de Poisson, l'estimateur du MV peut être approché par le filtre adapté. Ce filtrage est aussi optimal en présence de bruit additif gaussien [Kay, 1993] et a été utilisé dans le Chapitre 3 à l'Équation (3.16).

DOMAINE DE VALIDITÉ

Ober *et al.* [2004] ont montré que pour un bon RSB et pour des émetteurs situés dans le plan focal (*i.e.*, tel que $\psi = 0$), l'estimateur du MV est efficace. Pour délimiter le domaine de validité de cet estimateur — *i.e.*, le domaine sur lequel il est efficace — avec plus de précision, je vais supposer tout d'abord que l'émetteur observé est centré sur un pixel de sorte que, par exemple, $\theta_0 = (0; 0)$. Dans cette configuration, la valeur de la RBCR est égale dans les deux directions du plan d'imagerie. On note alors $RBCR = RBCR_x = RBCR_y$. Bien entendu, le biais $E[\hat{\theta}] - \theta_0$ de l'estimateur du MV (où $E[\cdot]$ désigne l'espérance mathématique et θ_0 est la position réelle de l'émetteur) et son écart-type $\sigma[\hat{\theta}]$ sont aussi égaux dans les deux directions x et y . Pour délimiter le domaine de validité de l'estimateur, nous les normalisons :

$$\text{nBias} = \frac{E[\hat{\theta}] - \theta_0}{RBCR} \quad \text{et} \quad \text{nSTD} = \frac{\sigma[\hat{\theta}]}{RBCR}. \quad (4.8)$$

Ces deux grandeurs sont estimées à partir de simulations de Monte Carlo comprenant 4000 réalisations de bruit. J'ai vérifié qu'utiliser plus de réalisations ne change pas les résultats.

Les valeurs de nBias et de nSTD sont illustrées respectivement dans les Figures 4.3(a) et (b), pour le *Scénario A* (ronds noirs) et le *Scénario B* (croix rouges). Ces valeurs sont tracées en fonction de la RBCR. La RBCR des Équations (4.4) et (4.5) est inversement proportionnelle au RSB, les valeurs du RSB sont donc grandes lorsque celles de la RBCR sont petites et décroissent à mesure que la RBCR augmente. Les paramètres optiques pris en compte dans cette simulation sont typiques des configurations de SMLM standard : $\Delta_{xy} = 10 \mu\text{m}$; $NA = 1,3$; $\lambda = 700 \text{ nm}$ et $M = 60$ (grandissement).

En pratique, les valeurs croissantes de la RBCR sont obtenues en réduisant le RSB dont l'expression dépend du scénario. Dans le *Scénario A*, le RSB est défini comme étant $\sqrt{N_0}$ (voir l'Équation (4.4)) et varie de 75,9 à 1,1 quand la RBCR va de 1,7 à 166,7 nm. Dans le *Scénario B*, il est défini comme étant N_0/\sqrt{b} (voir l'Équation (4.5)) et varie de 303 à 4,4. Représenter le biais et l'écart-type en fonction de la RBCR au lieu du RSB permet de visualiser les deux scénarios sur le même graphe.

Avec cette représentation, si l'estimateur du MV est efficace, son biais normalisé est proche de 0 et son écart-type normalisé proche de 1. On remarque sur la Figure 4.3(a) que, pour les deux *Scénarios A* et *B*, le biais est proche de 0 et l'écart-type normalisé proche de 1 tant que $RBCR \leq 20 \text{ nm}$. Pour ces valeurs de RBCR, l'estimateur du MV est donc efficace. Lorsque $RBCR > 20 \text{ nm}$, l'écart-type commence à diverger tandis que le biais reste proche de 0 avant de diverger à son tour lorsque $RBCR > 40 \text{ nm}$. Pour ces valeurs de RBCR, l'estimateur du MV n'est donc pas efficace.

Afin de vérifier que ces conclusions restent identiques si θ_0 n'est pas centré sur un pixel, considérons également la situation où la position réelle θ_0 de la PSF est située sur le coin d'un pixel, par exemple, $\theta_0 = (\Delta_{xy}/2; \Delta_{xy}/2)$. Une fois encore, la symétrie du problème est telle que le biais, l'écart-type et la RBCR ont la même valeur dans les deux directions du plan d'imagerie x et y . J'ai représenté en Figure 4.4 les valeurs de nBias et nSTD pour cette configuration. Les réalisations de bruit ne sont pas les mêmes que celles utilisées à la Figure 4.3. On remarque que les graphes sont très similaires à ceux présentés à la Figure 4.3. En particulier, l'estimateur du MV est efficace lorsque $RBCR < 20 \text{ nm}$.

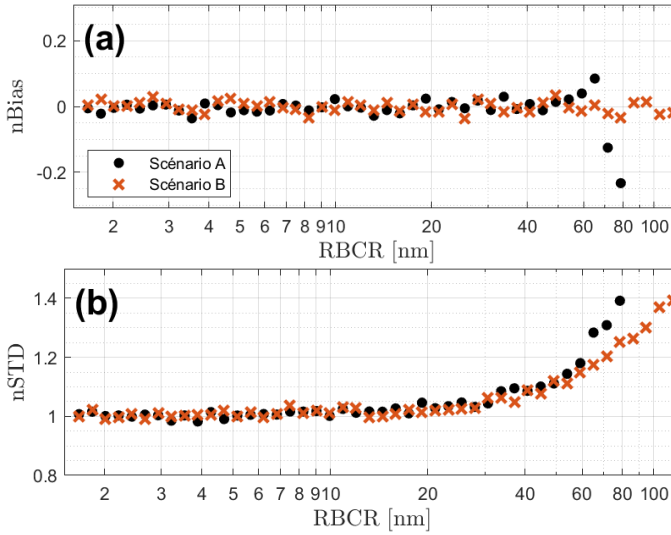


FIGURE 4.3 – Caractérisation de l'estimateur du MV lorsque l'émetteur fluorescent est focalisé et situé au centre d'un pixel. (a) Biais normalisé (nBias) et (b) écart-type normalisé (nSTD) sont tracés en fonction de la RBCR pour les Scénarios A (en points noirs) et B (en croix rouges). Les paramètres de simulation sont ceux de la Figure 4.1.

Cette conclusion est donc indépendante de la position de la PSF par rapport à la grille de pixels.

En résumé, dans des conditions de faible RSB, la précision de localisation réelle est moins bonne que celle prédite par la BCR. Heureusement, ce problème n'affecte pas les situations où le RSB est suffisamment élevé : pour les paramètres expérimentaux standards que nous avons considérés, l'estimateur du MV reste efficace tant que la RBCR reste inférieure à 20 nm. Des précautions doivent donc être prises lorsque les expériences sont menées dans des conditions de faible RSB — ou plutôt de forte RBCR — car dans ce cas l'écart-type de l'estimateur du MV n'atteint pas la RBCR.

Pour quantifier l'écart entre l'erreur d'estimation réelle et la BCR, les Figures 4.3 et 4.4 peuvent être utilisées comme des abaques. En effet, pour une application donnée, quel que soit le type de bruit, la valeur du RSB et des autres paramètres optiques, la RBCR peut être calculée en utilisant l'Équation (4.2). Si elle est inférieure à 20 nm, elle peut être considérée comme une évaluation correcte de la précision de localisation pouvant être atteinte en pratique avec l'estimateur du MV. Si elle est plus grande, ce n'est plus le cas et l'erreur d'estimation réelle est fournie par les Figures 4.3 et 4.4.

4.2.2. CAS NON FOCALISÉ

Considérons maintenant des émetteurs situés en-dehors du plan de mise au point, *i.e.*, dont la position longitudinale z_p est éloignée de celle du plan focal z_{focus} . On dit alors que le marqueur fluorescent est défocalisé. Le paramètre ψ , défini à l'Équation (3.2), quantifie cette défocalisation : l'expression de la PSF, et donc de la RBCR, dépend de ce paramètre.

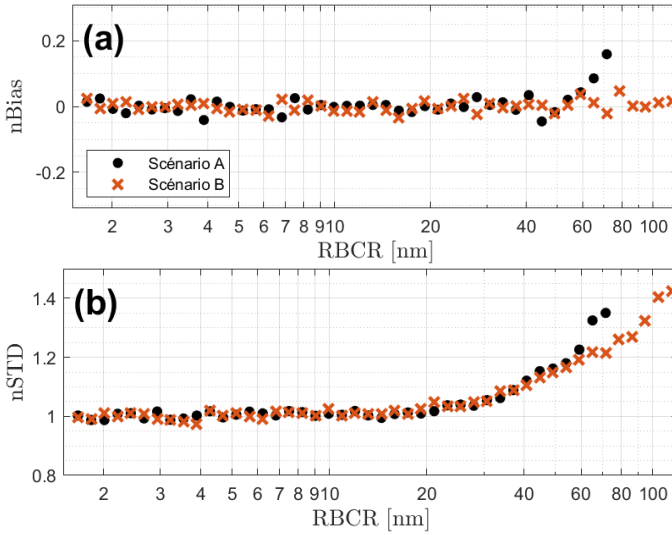


FIGURE 4.4 – Caractérisation de l'estimateur du MV lorsque l'émetteur fluorescent est focalisé et situé sur l'un des coins d'un pixel. **(a)** Biase normalisé (nBias) et **(b)** écart-type normalisé (nSTD) sont tracés en fonction de la RBCR pour les Scénarios A (en points noirs) et B (en croix rouges). Les paramètres de simulation sont ceux de la Figure 4.1 excepté $\theta_0 = (5;5) \mu\text{m}$.

ESTIMATEUR BASÉ SUR DES MULTIPLES RÉFÉRENCES

J'ai montré au Chapitre 3 qu'en plaçant un masque de phase optimisé dans la pupille de l'objectif du microscope et en adaptant l'algorithme de traitement, les performances de localisation pouvaient être améliorées sur une PdC étendue. Cette approche a été présentée en détail pour un modèle de bruit additif gaussien (équivalent au Scénario B) et elle peut être généralisée sans difficulté au Scénario A. Comme je l'ai mis en évidence, même en utilisant un masque optimal, la forme de la PSF varie significativement avec la défocalisation. Pour atteindre en pratique les performances de localisation prédites par la RBCR, on doit donc utiliser un estimateur du MV approché (*i.e.*, adapté à l'utilisation d'un masque de phase) consistant à diviser la PdC en un nombre fini d'intervalles distincts dans chacun desquels est défini un noyau de corrélation adapté à cet intervalle.

Supposons que la plage de PdC $[0; \psi_{\max}]$ que l'on cherche à atteindre soit divisée en M_ψ intervalles distincts. Rappelons que cet intervalle équivaut à $[-\psi_{\max}; \psi_{\max}]$ puisque, indépendamment de la présence ou non d'un masque de phase binaire annulaire de modulation π radians, la PSF est identique pour ψ et $-\psi$ (*i.e.*, de chaque côté du plan focal). À chaque intervalle $m \in \{1; \dots; M_\psi\}$, on associe un noyau de corrélation adapté, noté $r_{ij}^m(\theta)$ et défini à l'Équation (3.18), correspondant à une somme pondérée des PSF du système optique. Par exemple, supposons que la PdC désirée soit $\psi_{\max} = 1\lambda$ avec le Scénario A. Dans ce cas, nous avons montré dans le Chapitre 3 que pour mettre en œuvre l'estimateur du MV approché, il est nécessaire de partager la PdC en $M_\psi = 4$ intervalles : $[0; 0,2\lambda]$ ($m = 1$), $[0,2\lambda; 0,35\lambda]$ ($m = 2$), $[0,35\lambda; 0,5\lambda]$ ($m = 3$), et $[0,5\lambda; 1\lambda]$ ($m = 4$). Les noyaux associés $r_{ij}^m(\theta)$, avec $m \in \{1; \dots; 4\}$, sont illustrés à la Figure 4.5(a). Le nombre M_ψ d'intervalles dépend du scénario et de la plage de PdC désirée. Les cinq noyaux de

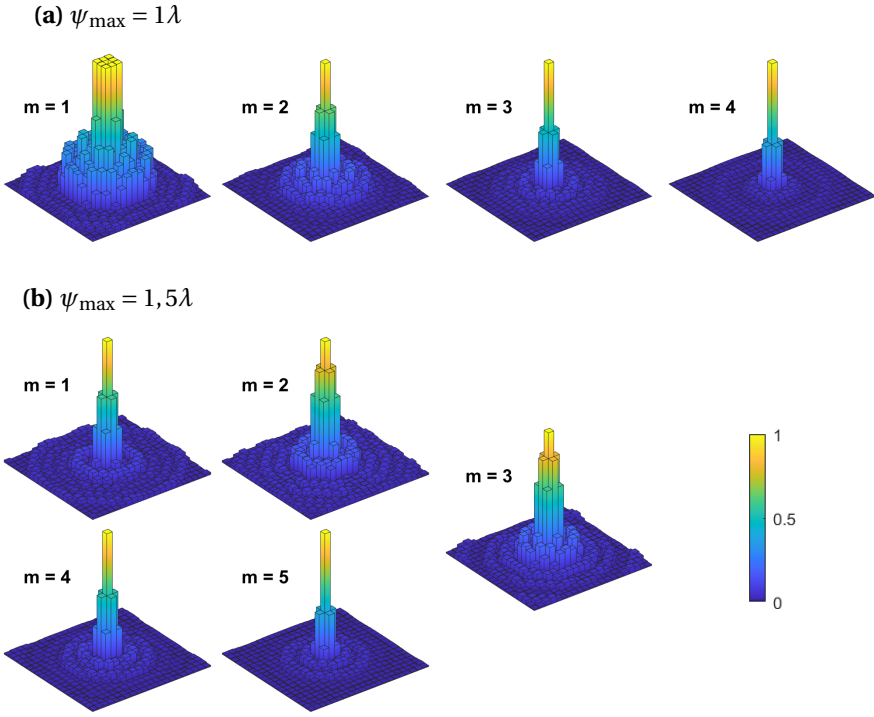


FIGURE 4.5 – Noyaux de corrélation utilisés dans l’estimateur du **MV** de l’Équation (4.9) à la Figure 4.6 pour *Scénario A* lorsque (a) $M_\psi = 4$ et $\psi_{\max} = 1\lambda$ ou (b) $M_\psi = 5$ et $1,5\lambda$. Ces noyaux sont différents de ceux illustrés aux Figures 3.11(b-e) pour le *Scénario B* lorsque $\psi_{\max} = 1\lambda$.

corrélation $r_{ij}^m(\boldsymbol{\theta})$ nécessaires pour mettre en œuvre l’estimateur du **MV** approché du *Scénario A* lorsque $\psi_{\max} = 1,5\lambda$ sont illustrés à la Figure 4.5(b). Cet estimateur nécessite donc une estimation conjointe de la position transverse $\boldsymbol{\theta}$ de l’émetteur et de l’intervalle de défocalisation m dans laquelle il se situe :

$$(\hat{\boldsymbol{\theta}}, \hat{m}) = \arg\max_{\boldsymbol{\theta}, m} \left\{ \sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P s_{ij} q_{ij}^m(\boldsymbol{\theta}) \right\} \quad (4.9)$$

où $q_{ij}^m(\boldsymbol{\theta}) = \log[r_{ij}^m(\boldsymbol{\theta})]$ dans le *Scénario A* et $q_{ij}^m(\boldsymbol{\theta}) = r_{ij}^m(\boldsymbol{\theta})$ dans le *Scénario B*.

On rappelle que notre objectif est l’estimation de la localisation 2D sur une plage de **PdC** étendue et que les masques ne sont donc pas optimisés pour estimer la position des émetteurs dans la profondeur. Notre seul paramètre d’intérêt reste donc la position transverse $\boldsymbol{\theta}$. Cependant, pour l’estimer correctement, il est nécessaire d’estimer le paramètre de nuisance m . Nous avons montré dans le Chapitre 3 qu’un nombre limité de M_ψ noyaux était suffisant pour donner des résultats acceptables en pratique. Le prix (modeste) à payer sur les performances de localisation pour cette approximation sera discuté à la fin de la section.

De plus, puisque les noyaux $r_{ij}^m(\boldsymbol{\theta})$ ne correspondent pas aux « véritables » **PSF**, no-

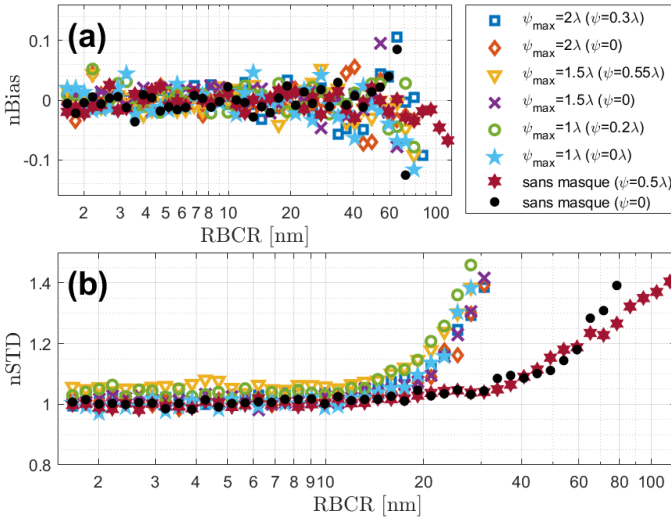


FIGURE 4.6 – Caractérisation de l'estimateur du MV défini à l'Équation (4.9). (a) Biais (nBias) et (b) écart-type (nSTD) sont tracés en fonction de la RBCR pour le *Scénario A* avec $\psi_{\max} = \{1\lambda; 1,5\lambda; 2\lambda\}$. Les émetteurs sont soit dans le plan d'imagerie (*i.e.*, $\psi = 0$), soit en dehors (*i.e.*, $\psi \neq 0$). Les paramètres de simulation sont ceux de la Figure 4.1.

tées $\mu_{ij}^{\psi, \theta}$, l'estimateur défini à l'Équation (4.9) n'est pas à proprement parler un estimateur du MV. Cependant, j'utiliserai ce terme dans la suite du manuscrit par souci de simplicité. Comme je l'ai montré au Chapitre 3, les performances de cet algorithme atteignent la BCR en présence de bruit gaussien additif pur et pour un RSB suffisamment élevé. L'objectif de cette section est de caractériser complètement son domaine de validité, *i.e.*, la plage de valeurs de la RBCR pour laquelle cet estimateur est efficace.

DOMAINE DE VALIDITÉ

Considérons les six masques de phase binaires annulaires (de modulation π radians) qui optimisent le RCRB sur les plages de PdC $\psi_{\max} = \{1\lambda; 1,5\lambda; 2\lambda\}$ dans les *Scénarios A* et *B*. Ces masques sont représentés dans le Tableau 4.1. Pour chacun d'eux, le biais de l'estimateur du MV et son écart-type sont respectivement illustrés en fonction de la RBCR pour deux valeurs différentes du paramètre de défocalisation ψ aux Figures 4.6(a-b) pour le *Scénario A* et 4.7(a-b) pour le *Scénario B*. Les courbes obtenues sans masque de phase pour un émetteur situé dans le plan focal (*i.e.*, $\psi = 0$) ont été ajoutées comme références. Elles correspondent à celles illustrées en Figure 4.3. Les courbes obtenues sans masque pour un émetteur défocalisé — tel que $\psi = 0,5\lambda$ lorsque θ_0 est estimé avec l'estimateur du MV de l'Équation (4.6) — ont aussi été ajoutées. On observe que quels que soient le masque et la PdC considérés, l'estimateur du MV est sans biais et son écart-type atteint la RBCR lorsque $RBCR \leq 20$ nm. Le domaine dans lequel l'estimateur du MV atteint la RBCR est donc comparable pour les configurations sans et avec masque, bien que dans ce dernier cas, la mise en œuvre de l'estimateur est plus complexe car elle nécessite l'estimation conjointe de la position transverse θ et de l'intervalle m (voir l'Équation (4.9)).

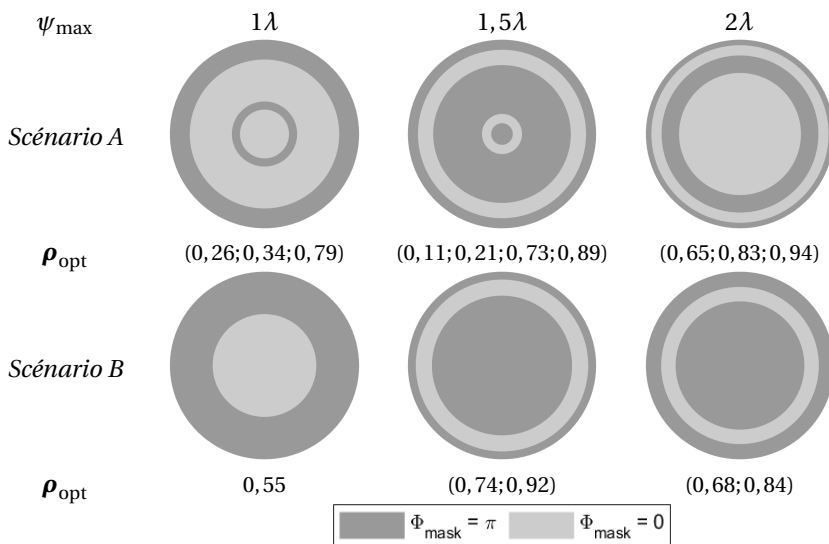


TABLEAU 4.1 – Masques de phase binaires annulaires de modulation π radians qui optimisent la RBCR dans le Scénario A ou le Scénario B sur une plage de PdC telle que $\psi_{\max} = \{1\lambda; 1,5\lambda; 2\lambda\}$. Les paramètres de simulation sont ceux de la Figure 4.1.

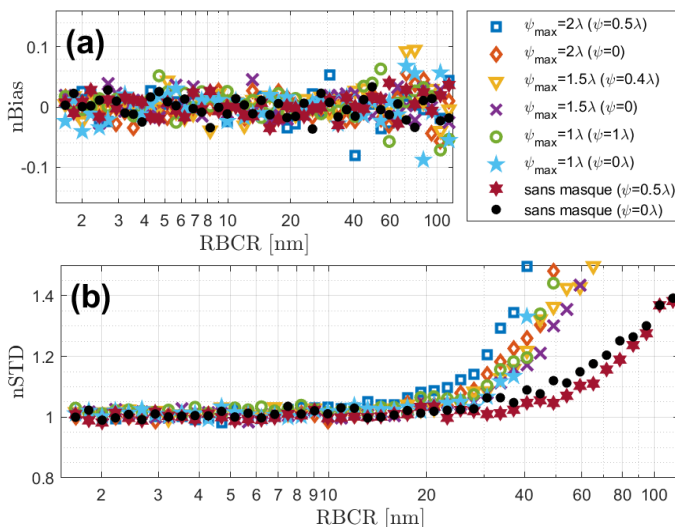


FIGURE 4.7 – Caractérisation de l'estimateur du MV défini à l'Équation (4.9). (a) Biais (nBias) et (b) écart-type (nSTD) sont tracés en fonction de la RBCR pour le Scénario B avec $\psi_{\max} = \{1\lambda; 1,5\lambda; 2\lambda\}$. Les émetteurs sont soit dans le plan d'imagerie (i.e., $\psi = 0$), soit en dehors (i.e., $\psi \neq 0$). Les paramètres de simulation sont ceux de la Figure 4.1.

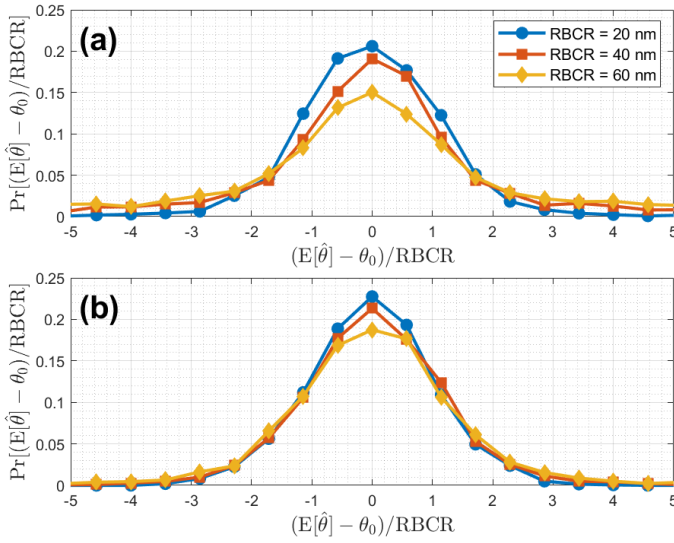


FIGURE 4.8 – Histogrammes de $(E[\hat{\theta}] - \theta_0) / \text{RBCR}$ en fonction de la **RBCR** lorsque (a) $\psi_{\max} = 1\lambda$, $\psi = 0, 2\lambda$ avec le Scénario A et (b) $\psi_{\max} = 1, 5\lambda$, $\psi = 0, 4\lambda$ avec le Scénario B. Les paramètres de simulation sont ceux de la Figure 4.1.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Pour mieux comprendre comment la distribution statistique des estimées $\hat{\theta}$ évolue lorsque la **RBCR** est supérieure à 20 nm, j’ai tracé sur la Figure 4.8 l’histogramme de $(E[\hat{\theta}] - \theta_0) / \text{RBCR}$ (avec $\text{RBCR} = \text{RBCR}_x = \text{RBCR}_y$) en fonction de la **RBCR**. On remarque que les histogrammes s’élargissent progressivement à mesure que le **RSB** décroît. L’augmentation de la variance n’est donc pas due à la présence de quelques valeurs aberrantes isolées.

En analysant plus en détail les résultats des Figures 4.6(b) et 4.7(b), on remarque deux points intéressants. Premièrement, pour certaines valeurs de ψ_{\max} et ψ , les performances de localisation ne sont pas exactement égales à la **RBCR** même lorsque $\text{RBCR} < 20$ nm. On remarque en effet que l’écart-type normalisé est légèrement supérieur à 1, d’un facteur pouvant aller jusqu’à 5%. Deuxièmement, lorsque la **RBCR** est supérieure à 20 nm, les performances de localisation s’écartent de la **RBCR** beaucoup plus rapidement en présence d’un masque de phase, que sans masque (points noirs et étoiles violettes).

Pour expliquer ces résultats, la Figure 4.9 compare, pour une configuration donnée — à savoir, $\psi_{\max} = 1, 5\lambda$ et $\psi_0 = 0, 55\lambda$ —, les valeurs de $n\text{Bias}$ et $n\text{STD}$ obtenues avec trois algorithmes de localisation différents basés sur le **MV** en fonction de la **RBCR**.

- ▶ Le premier algorithme est l’estimateur défini à l’Équation (4.9) (triangles jaunes).
- ▶ Pour le second, on suppose connaître le bon intervalle de défocalisation $m_0 = 2$ dans lequel se trouve l’émetteur, et on applique l’estimateur défini à l’Équation (4.6) avec le noyau de corrélation $r_{ij} = r_{ij}^{m_0}$ (croix rouges).
- ▶ Pour le dernier, on utilise l’estimateur défini à l’Équation (4.6) avec le noyau de

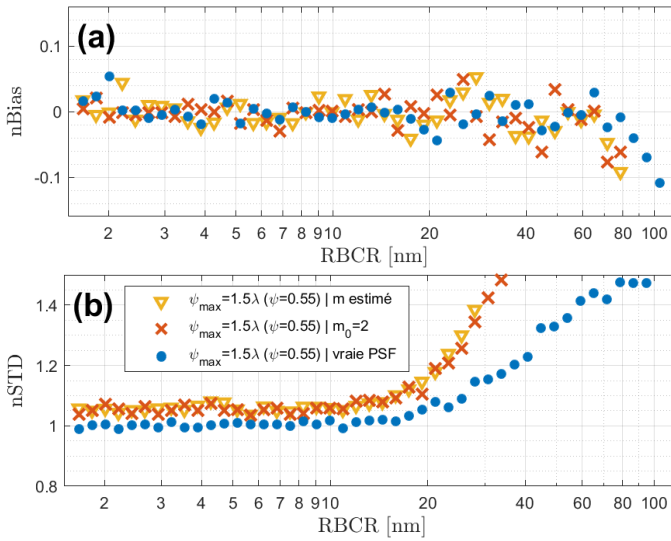


FIGURE 4.9 – Comparaison et caractérisation des estimateurs du MV, lorsque $\psi_{\max} = 1,5\lambda$ et $\psi = 0,55\lambda$. Le (a) biais et (b) l'écart-type sont tracés en fonction de la RBCR. L'estimateur du MV défini à l'Équation (4.9) est mise en œuvre soit en estimant conjointement le noyau de corrélation (marqueurs triangulaires jaunes), soit en le sélectionnant manuellement (marqueurs en croix rouges), soit en utilisant la vraie PSF (marqueurs circulaires bleus). Les paramètres de simulation sont ceux de la Figure 4.1.

corrélations $\mu_{ij}^{\psi_0, \theta_0}$ correspondant à la « vraie » PSF calculée pour $\psi_0 = 0,55\lambda$ (ronds bleus).

On constate que les courbes obtenues avec le premier et le deuxième algorithme sont très similaires, avec un écart-type légèrement supérieur à 1 pour RBCR < 20 nm et une augmentation rapide après RBCR > 20 nm. L'estimation de l'intervalle m pour l'estimateur défini à l'Équation (4.9) est donc correcte, puisque supposer connaître *a priori* le bon noyau n'améliore pas les performances. En revanche, l'écart-type obtenu avec le troisième algorithme est très proche de 1 lorsque RBCR < 20 nm et a une augmentation beaucoup plus lente, similaire à celle observée dans le cas focalisé (voir la Figure 4.4). Les écarts observés entre les deux premiers algorithmes et le dernier proviennent donc des dissimilarités entre le noyau de corrélation utilisé et la « vraie » PSF. Ces écarts pourraient être réduits en augmentant le nombre M_ψ d'intervalles considérés. Cependant, le coût des calculs pour estimer θ_0 augmenterait linéairement avec M_ψ .

Il est important aussi de préciser qu'en pratique, d'autres facteurs tels que des aberrations optiques ou un étalonnage imprécis de la PSF peuvent être à l'origine de la dissimilarité entre la « vraie » PSF et le noyau de corrélation utilisé. Thorsen *et al.* [2018], Siemons *et al.* [2018], Mazidi *et al.* [2020] ont récemment étudié la sensibilité des algorithmes de localisation basés sur l'ajustement de gabarit pour quantifier la perte de précision amenée par cette dissimilarité.

4.3. CONCLUSION

L'objectif de ce chapitre était d'étudier plus en détail les modèles de bruit utilisés pour optimiser les masques et de valider l'utilisation de la BCR comme critère d'optimisation.

Nous avons tout d'abord mis en évidence que lorsque les sources de bruit dominantes sont les bruits de photon provenant respectivement du fluorophore (de moyenne N_0) et du fond diffus (de moyenne b), les masques optimaux dépendent en général du bilan photonique. Cependant, on peut définir deux scénarios dans lesquels ils n'en dépendent pas : le *Scénario A*, où l'on considère uniquement le bruit de photons provenant du fluorophore, et le *Scénario B*, où le fond est la source de bruit dominante. L'intérêt de ces scénarios est qu'ils permettent de concevoir des masques de phase génériques indépendants de l'intensité des marqueurs fluorescents et du bruit de fond. Nous avons donc étudié les domaines de valeurs de N_0/b pour lesquels les masques optimisés dans ces deux scénarios restent proches de l'optimalité. La principale conclusion est que le domaine d'optimalité du *Scénario B* est d'autant plus étendu que la plage de PdC visée est grande. En effet, nous avons vu dans le Chapitre 3 que dans ce cas, la PSF s'étale le long de l'axe optique. Elle se « noie » alors dans le bruit de fond, qui devient la source de bruit prépondérante. En particulier, cette étude montre que les paramètres expérimentaux considérés dans le Chapitre 3 correspondent au domaine d'optimalité du *Scénario B*. Il était donc légitime d'optimiser les masques dans le cadre d'un modèle de bruit additif gaussien, car ce modèle conduit à un critère d'optimisation identique à celui du *Scénario B*.

Dans la seconde partie de ce chapitre, l'objectif a été de définir précisément les conditions dans lesquelles la BCR est un indicateur fiable de la précision de localisation qui peut être atteinte dans les expériences SMLM. On a montré que l'estimateur du MV est efficace (*i.e.*, sans biais et atteignant la BCR) lorsque les paramètres de l'expérience sont tels que la RBCR est inférieure à 20 nm. Cette limite est identique en présence et en l'absence de masque d'extension de la PdC, mais lorsqu'un masque est présent, les performances de l'estimateur du MV divergent beaucoup plus rapidement quand les valeurs de la RBCR deviennent supérieures à 20 nm. D'autre part, dans certains scénarios où la PdC est étendue, on peut observer un écart-type légèrement supérieur à la RBCR même lorsque $RBCR < 20$ nm. Cet écart vient de la différence entre la PSF réelle et le noyau de corrélation utilisé dans l'algorithme de localisation.

Comme de nombreuses expériences de SMLM sont menées dans des conditions où la RBCR est inférieure à 20 nm, la pratique courante consistant à évaluer et / ou optimiser la précision de localisation à l'aide de la BCR et à employer l'estimateur du MV pour atteindre cette précision est donc justifiée. Cependant, lorsque les conditions expérimentales sont telles que $RBCR > 20$ nm, il faut tenir compte du fait que la BCR ne représente plus fidèlement les performances de l'estimateur du MV.

5

INFLUENCE DU MODÈLE D'IMAGERIE

*La méthode d'optimisation des masques présentée au Chapitre 3 s'appuie sur un modèle d'imagerie où la défocalisation est modélisée par un simple terme de phase quadratique dans le plan pupillaire. Cependant, ce modèle ne prend pas en compte deux caractéristiques essentielles des configurations de microscopie par localisation : une ouverture numérique élevée et une différence entre les indices de réfraction nominaux du liquide d'immersion et de l'échantillon biologique étudié. Il existe des modèles scalaires ou vectoriels bien plus précis qui prennent mieux en compte ces caractéristiques d'imagerie. Une question importante se pose donc : quelle influence peut avoir le modèle d'imagerie sur l'optimisation des masques de phase pour augmenter la **profondeur de champ** ?*

LES objectifs de microscopes modernes offrent des conditions d'imagerie optimales pour une source lumineuse ponctuelle située immédiatement sous la lamelle couvre-objet (*i.e.*, $z_p = z_{\text{focus}} = 0$). Cependant, lorsque la source est située à quelques micromètres sous la lamelle, par exemple, dans le cas d'un émetteur situé en profondeur dans l'échantillon et en dehors du plan focal, ces conditions ne sont plus réunies. Une forte ouverture numérique et un indice de réfraction élevé du milieu d'immersion peuvent alors conduire à des aberrations sphériques — du troisième ordre ou plus — non négligeables.

Les objectifs de microscope sont conçus avec une ouverture numérique et un indice de réfraction élevés pour améliorer leur résolution latérale. Il existe de nombreux modèles scalaires ou vectoriels, plus précis que celui introduit au Chapitre 3, qui tiennent compte de ces caractéristiques d'imagerie pour mieux décrire l'image d'un émetteur dans toute la plage de PdC. Nous pouvons donc nous interroger sur l'influence que pourrait avoir un modèle d'imagerie plus réaliste que celui utilisé jusqu'à présent sur l'optimisation des masques de phase.

5

5.1. MODÈLES SCALAIRES ET VECTORIELS

Comme en témoignent les travaux de thèse d'Aguet [2009], la modélisation des PSF fait l'objet de nombreuses recherches. La Figure 5.1 hiérarchise les modèles les plus connus pour décrire la formation d'une image par un système optique en fonction de leur degré de précision (ou d'approximation). Nous avons : la tache d'Airy; le modèle d'approximation quadratique (AQ); le modèle de Gibson & Lanni (GL); celui de Richards *et al.* [1959]; et les équations de Maxwell. Nous distinguons ainsi deux catégories de modèles. Ceux dits « scalaires » (en bleu) qui s'appuient sur l'optique de Fourier pour calculer la réponse impulsionnelle spatiale du système d'imagerie, et les autres dits « vectoriels » (en vert) qui tiennent compte de la nature vectorielle du champ électrique.

Les modèles scalaires décrivent généralement la PSF à l'aide des Équations (1.2) et (1.3) dont je rappelle ici l'expression¹ :

$$h_{z_p}(x, y) \propto \left| \text{FT}_{2D} \left[\Pi_{\text{Disk}} \exp(i\Phi_{z_p}) \right] \left(x \frac{\text{NA}}{|M|\lambda}, y \frac{\text{NA}}{|M|\lambda} \right) \right|^2 \quad (5.1)$$

avec λ la longueur d'onde de la lumière incidente, NA l'ouverture numérique objet du système d'imagerie et M le grandissement transversal. La fonction de phase pupillaire Φ_{z_p} est donnée par :

$$\Phi_{z_p}(r) = \frac{2\pi}{\lambda} W_{z_p}(r) \quad (5.2)$$

où $W_{z_p}(r)$ correspond à la différence de chemin optique, mesurée dans la pupille de sortie à la coordonnée radiale (normalisée) $r \in [0; 1]$, entre la surface d'onde sphérique de référence et la surface d'onde réelle défocalisée. Ainsi les trois modèles scalaires mentionnés dans la Figure 5.1 correspondent à différentes expressions de $W_{z_p}(r)$.

Ces modèles ne prennent pas en compte la polarisation de la lumière. Or à des ouvertures élevées, les rayons entrant dans l'objectif sont très inclinés et il peut donc être nécessaire, pour certaines applications, de tenir compte du caractère vectoriel du champ

1. L'indice Δz_i a été remplacé par z_p et l'ouverture numérique image NA_i a été remplacée par $\text{NA}/|M|$ (condition des sinus d'Abbe [Born et Wolf, 1999])

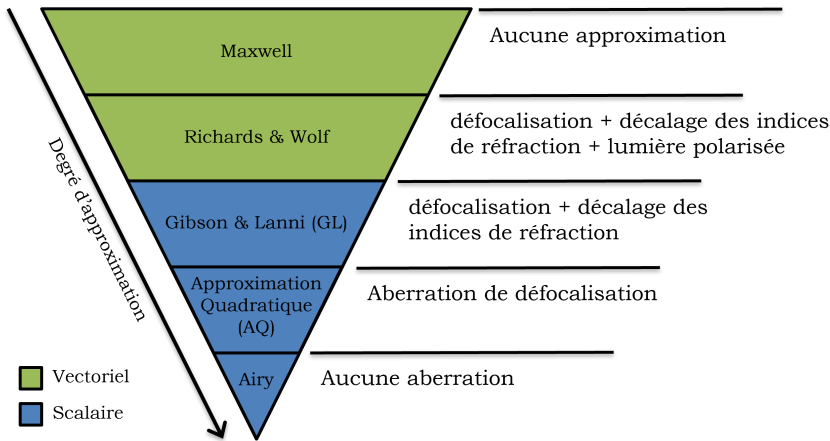


FIGURE 5.1 – Modèles les plus connus pour décrire la formation d’une image par un système optique en fonction de leur degré de précision ou d’approximation. Cette figure s’inspire de celle présentée dans les travaux de thèse d’Aguet [2009].

électrique pour calculer la PSF. Les fondements de cette approche ont été proposés par Richards *et al.* [1959] sur la base des équations de Maxwell, puis développés par Hell *et al.* [1993] et Török et Varga [1997]. Cependant, comme l’a montré Aguet [2009], pour de nombreuses applications — y compris celle de la super-localisation de molécules uniques — le modèle scalaire de Gibson et Lanni [1992] est suffisamment précis pour décrire la formation des images.

Le modèle le plus simple est celui de la tache d’Airy. Il permet de décrire la réponse impulsionnelle spatiale d’un instrument optique d’ouverture circulaire et uniquement limité par la diffraction (*i.e.*, sans défaut de mise au point). La différence de chemin optique $W_z(r)$ est donc nulle et le système est entièrement décrit par l’Équation (3.3). En présence d’un défaut de mise au point (*i.e.*, une aberration supplémentaire de défocalisation pure), l’approximation quadratique (AQ) introduite au Chapitre 1 à l’Équation (1.14) est couramment utilisée pour décrire la formation de l’image par le système optique. Nous rappelons ci-dessous l’expression de ce modèle, formulée comme la différence des chemins optiques $A'C$ (trajet de référence) et $B'C$ (trajet réel) illustrée à la Figure 1.3 [Goodman, 2017] :

$$W_{AQ}(r) \simeq \underbrace{\frac{NA^2}{2n_s} (z_p - z_{\text{focus}})}_{\psi} r^2 \quad (5.3)$$

où NA désigne l’ouverture numérique objet de l’objectif de microscope, n_s l’indice de réfraction de l’échantillon biologique, z_p la position longitudinale du marqueur fluorescent et z_{focus} la position longitudinale du plan focal (*i.e.*, plan de mise au point). Cette approximation, souvent utilisée en microscopie, permet de décrire l’image d’un fluorophore en dehors du plan focal, mais elle n’est valide que pour des systèmes optiques à ouverture faible ou modérée. D’autre part, les indices de réfraction de l’échantillon et du

milieu d'immersion sont supposés égaux.

Le modèle **GL**, proposé par **Gibson et Lanni [1992]**, permet de mieux décrire l'évolution réelle de la **PSF** avec la défocalisation que le modèle **AQ**. Ce modèle suppose que les conditions d'imagerie sont dénuées d'aberration si l'émetteur est situé juste en dessous de la lamelle et que les paramètres optiques — dont l'épaisseur et l'indice de réfraction de la lamelle — correspondent à leurs valeurs nominales. La Figure 5.2 (partie haute) correspond à cette configuration. Le chemin optique de référence est représenté par le trajet **ABC**. Ainsi toutes les aberrations observées proviennent de facteurs extérieurs à l'objectif du microscope, tels que le déplacement de l'émetteur ou la variation des paramètres optiques. Dans cette section, nous supposons que les valeurs des indices de réfraction et les réglages du microscope sont parfaitement connus, et que la lamelle possède ses propriétés nominales. Le chemin optique réel est représenté en Figure 5.2 (partie basse) par le trajet **PQRS**. Sous ces hypothèses, la différence entre les chemins optiques **ABC** et **PQRS** illustrés à la Figure 5.2 a pour expression [**Gibson et Lanni, 1992**] :

$$W_{\text{GL}}(r) = z_p n_s \left[\sqrt{1 - \left(\frac{\text{NA} r}{n_s} \right)^2} - 1 \right] - d n_i \left[\sqrt{1 - \left(\frac{\text{NA} r}{n_i} \right)^2} - 1 \right], \quad (5.4)$$

avec n_s (respectivement n_i) l'indice de réfraction de l'échantillon (respectivement du milieu d'immersion), d le paramètre permettant d'ajuster la distance de travail du microscope, z_p et $r \in [0; 1]$ décrits à l'équation précédente. Notons que si $z_p = 0$ et $d = 0$ (*i.e.*, l'émetteur est situé juste en dessous de la lamelle et dans le plan focal), alors $W_{\text{GL}}(r) = 0$ et la **PSF** est décrite par la tache d'Airy. De plus, si $n_i = n_s$ et $\text{NA} \ll 1$, le modèle **GL** défini par l'Équation (5.4) peut être approximé par le modèle **AQ** sous la forme suivante :

$$W_{\text{GL}}(r) = (z_p - d) n_s \left[\sqrt{1 - \left(\frac{\text{NA} r}{n_s} \right)^2} - 1 \right] \approx \underbrace{\frac{\text{NA}^2}{2n_s}}_{\psi} (z_p - d) r^2. \quad (5.5)$$

Nous nous concentrerons, dans la suite du manuscrit, sur la comparaison de ce modèle avec le modèle **AQ**, utilisé au Chapitre 3.

5.2. DISTANCE DE TRAVAIL OPTIMALE

Pour correctement imager les fluorophores, il est nécessaire d'ajuster la distance de travail du microscope en fonction de la profondeur d'imagerie que l'on souhaite atteindre, et ce afin d'avoir une **PSF** la plus concentrée possible dans tout le volume imagé. Ce réglage est caractérisé dans le modèle **AQ** par la position longitudinale du plan focal, notée z_{focus} (voir l'Équation (5.3)), et dans le modèle **GL** par le paramètre d (voir l'Équation (5.4)). Ces deux grandeurs sont illustrées à la Figure 5.2. Notons $[z_{\text{min}}, z_{\text{max}}]$ l'intervalle caractérisant la **PdC** souhaitée du système d'imagerie.

5.2.1. MODÈLE D'APPROXIMATION QUADRATIQUE (AQ)

Avec le modèle **AQ**, l'évolution de la **PSF** en fonction de la défocalisation est entièrement caractérisée par le paramètre réduit ψ . Ajuster correctement la distance de travail du microscope revient donc à choisir la valeur de z_{focus} qui minimise la valeur

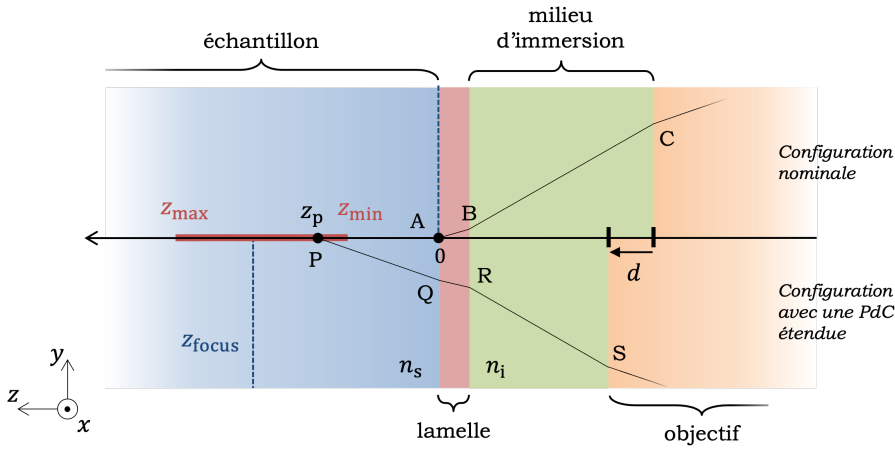


FIGURE 5.2 – Construction associée à la définition du paramètre d . La position longitudinale du plan focal, notée z_{focus} , est ajusté en diminuant la distance entre l'objectif et la lamelle. La configuration nominale est telle que $z_{\text{focus}} = 0$. Pour obtenir $z_{\text{focus}} > 0$, il est nécessaire de s'écarter de cette configuration. Le paramètre $d \geq 0$ caractérise cet écart.

maximale de $|\psi|$ lorsque la position longitudinale de l'émetteur z_p varie dans l'intervalle $[z_{\text{min}}, z_{\text{max}}]$. Le réglage optimal est donc obtenu en plaçant le plan focal :

$$z_{\text{focus}}^{\text{opt}} = \frac{z_{\text{max}} + z_{\text{min}}}{2} . \tag{5.6}$$

La valeur maximale de $|\psi|$, notée ψ_{max} , est donc atteinte en z_{max} et z_{min} et vaut :

$$\psi_{\text{max}} = \frac{\text{NA}^2}{4n_s} (z_{\text{max}} - z_{\text{min}}) . \tag{5.7}$$

Le paramètre de défocalisation ψ appartient donc à l'intervalle $[-\psi_{\text{max}}, \psi_{\text{max}}]$ lorsque $z_p \in [z_{\text{min}}, z_{\text{max}}]$.

À titre d'illustration, la Figure 5.3(a) représente la variation du profil de la PSF en fonction de ψ , pour la configuration expérimentale décrite dans le Tableau 5.1. On note que par symétrie, une section transversale de la PSF le long de toute ligne passant par son centre est suffisante pour représenter l'ensemble de ses propriétés. L'axe vertical à gauche de la Figure 5.3(a) représente le paramètre de défocalisation ψ exprimé en unités de longueur d'onde λ de la lumière collectée, le graphique étant tracé pour $\psi \in [-1,5\lambda; 1,5\lambda]$. L'axe vertical à droite représente la position longitudinale z_p de l'émetteur. La relation entre ψ et z_p est celle exprimée à l'Équation (3.2) avec $z_{\text{focus}} = z_{\text{focus}}^{\text{opt}}$. On retrouve les résultats décrits au Chapitre 3, à savoir que plus l'émetteur est éloigné du plan focal (*i.e.*, plus $|\psi|$ est grand), plus la PSF s'étale et son lobe principal s'atténue. Cela limite considérablement la précision de localisation des émetteurs fluorescents éloignés du plan focal.

Paramètres de simulation	Symboles	Valeurs
Position transverse du fluorophore	(x_p, y_p)	$(0; 0)$ μm
Longueur d'onde d'émission du fluorophore	λ	700 nm
Largeur de l'imagette contenant une PSF	$2P + 1$	21 pixels
Largeur d'un pixel	Δ_{xy}	10 μm
Ouverture numérique objet	NA	1,3
Grandissement	M	60
Nombre de photo-électrons par PSF	N_0	500 ph.e ⁻
Indice de réfraction du milieu biologique	n_s	1,33
Indice de réfraction du milieu d'immersion*	n_i	1,33 ou 1,52

* On considère deux types de milieu d'immersion : l'eau ou l'huile.

TABLEAU 5.1 – Configuration du microscope et paramètres de simulation utilisés dans ce chapitre

5

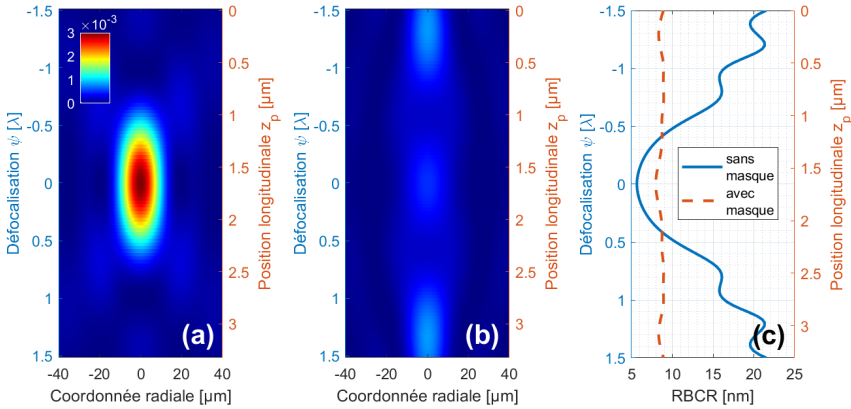


FIGURE 5.3 – Variation du profil de la PSF, simulée avec le modèle AQ, en fonction du paramètre de défocalisation $\psi \in [-1,5\lambda; 1,5\lambda]$ ou de la position longitudinale de l'émetteur z_p (a) pour un système d'ouverture circulaire limité uniquement par la diffraction, (b) pour le même système optique utilisant un masque de phase binaire annulaire optimisé tel que $\psi_{\max} = 1,5\lambda$. (c) Variations de la RBCR sans masque de phase (en trait plein bleu) et avec (en tirets rouges). La configuration du microscope et les paramètres de simulation utilisés sont définis dans le Tableau 5.1 (avec $n_i = n_s = 1,33$).

5.2.2. MODÈLE DE GIBSON & LANNI (GL)

Avec le modèle **GL**, l'évolution de la **PSF** n'est plus caractérisée par un unique paramètre. Il est donc plus difficile d'ajuster la distance de travail du microscope en fonction de la profondeur d'imagerie que l'on souhaite atteindre. Pour contourner cette difficulté, la variation de chemin optique $W_{\text{GL}}(r)$ peut être caractérisée par une grandeur scalaire : sa dispersion quadratique autour de sa moyenne, notée σ_{GL}^2 .

De manière générale, la dispersion quadratique de l'écart entre la surface d'onde de référence et celle réelle défocalisée, notée $W_{z_p}(r)$ dans l'Équation (5.2), est définie par :

$$\sigma^2 = \frac{1}{\int_0^1 r dr} \int_0^1 [W_{z_p}(r) - \bar{W}]^2 r dr = 2 \int_0^1 [W_{z_p}(r) - \bar{W}]^2 r dr, \quad (5.8)$$

où la valeur moyenne \bar{W} a pour expression :

$$\bar{W} = \frac{1}{\int_0^1 r dr} \int_0^1 W_{z_p}(r) r dr = 2 \int_0^1 W_{z_p}(r) r dr. \quad (5.9)$$

Pour le modèle **GL**, la dispersion quadratique de $W_{\text{GL}}(r)$ définie à l'Équation (5.4) a donc l'expression polynomiale suivante :

$$\sigma_{\text{GL}}^2(z_p, d) = z_p^2 \kappa_s^2 + d^2 \kappa_i^2 - 2 z_p d c_{\text{si}}^2 \quad (5.10)$$

où les coefficients κ_s^2 , κ_i^2 et c_{si}^2 sont définis par

$$\begin{cases} \kappa_s^2 = 2 \int_0^1 [h_s(r) - \bar{h}_s]^2 r dr \\ \kappa_i^2 = 2 \int_0^1 [h_i(r) - \bar{h}_i]^2 r dr \\ c_{\text{si}}^2 = 2 \int_0^1 [h_s(r) - \bar{h}_s] [h_i(r) - \bar{h}_i] r dr \end{cases} \quad (5.11)$$

avec

$$\bar{h}_k = 2 \int_0^1 h_k(r) r dr \quad \text{et} \quad h_k(r) = \sqrt{n_k^2 - \text{NA}^2 r^2}, \quad (5.12)$$

où k représente les indices "s" ou "i" utilisés à l'Équation (5.11).

Le paramètre d qui intervient dans l'Équation (5.10), et illustré à la Figure 5.2, permet indirectement de déplacer le plan focal à la position longitudinale z_{focus} de son choix.

Pour garantir que la **PSF** soit la plus concentrée possible dans tout le volume imagé, le paramètre d doit être choisi de manière à minimiser la valeur maximale de σ_{GL}^2 lorsque la position longitudinale de l'émetteur z_p varie dans l'intervalle $[z_{\text{min}}, z_{\text{max}}]$. Cela conduit à résoudre :

$$d_{\text{opt}} = \arg \min_d \left\{ \max_{z_p \in [z_{\text{min}}, z_{\text{max}}]} \sigma_{\text{GL}}^2(z_p, d) \right\}. \quad (5.13)$$

Puisque l'on montre à l'Équation (5.10) que $\sigma_{\text{GL}}^2(z_p, d)$ est un polynôme du second degré en z_p dont le coefficient du terme z_p^2 est positif, sa valeur maximale — pour une valeur de paramètre d donnée — est atteinte aux extrémités $z_p = z_{\text{min}}$ ou z_{max} . On a alors :

$$\sigma_{\text{GL}}^2(z_{\text{min}}, d_{\text{opt}}) = \sigma_{\text{GL}}^2(z_{\text{max}}, d_{\text{opt}}). \quad (5.14)$$

En utilisant l'Équation (5.10), on montre que l'Équation (5.14) conduit à :

$$d_{\text{opt}} = \frac{z_{\text{min}} + z_{\text{max}}}{2} \frac{\kappa_s^2}{c_{\text{si}}^2}. \quad (5.15)$$

Calculons maintenant à quelle position $z_{\text{focus}}^{\text{opt}}$ du plan focal correspond cette valeur optimale de $d = d_{\text{opt}}$. Par définition, la position du plan focal correspond à la valeur de z_p pour laquelle la dispersion quadratique est minimale. Ainsi, la relation liant d_{opt} à $z_{\text{focus}}^{\text{opt}}$ peut s'écrire :

$$z_{\text{focus}}^{\text{opt}} = \arg \min_{z_p \in [z_{\text{min}}, z_{\text{max}}]} \sigma_{\text{GL}}^2(z_p, d_{\text{opt}}). \quad (5.16)$$

En résolvant cette équation, on montre que $z_{\text{focus}}^{\text{opt}}$ a la valeur suivante :

$$z_{\text{focus}}^{\text{opt}} = \frac{z_{\text{max}} + z_{\text{min}}}{2}. \quad (5.17)$$

On constate qu'il s'agit de la même que celle obtenue pour le modèle AQ (voir l'Équation (5.6)) : la position de focalisation optimale est à mi-distance entre z_{min} et z_{max} . Par ailleurs, on montre que lorsque $d = d_{\text{focus}}$, la valeur de la dispersion quadratique pour une position z_p quelconque est égale à :

$$\sigma_{\text{GL}}^2(z_p, d_{\text{opt}}) = \kappa_s^2 \left[\left(z_p - z_{\text{focus}}^{\text{opt}} \right)^2 + \alpha \left(z_{\text{focus}}^{\text{opt}} \right)^2 \right] \quad (5.18)$$

avec

$$\alpha = \frac{\kappa_s^2 \kappa_i^2}{c_{\text{si}}^4} - 1. \quad (5.19)$$

On peut vérifier qu'elle est minimale pour $z_p = z_{\text{focus}}^{\text{opt}}$, mais non nulle si $\alpha \neq 0$.

5.3. CONDITIONS D'ÉQUIVALENCE DES MODÈLES GL ET AQ

Nous avons représenté à la Figure 5.4(b) la variation du profil de la PSF en fonction de la position longitudinale z_p de l'émetteur lorsque $d = d_{\text{opt}}$. La configuration du microscope et les paramètres de simulation sont décrits dans le Tableau 5.1, où $n_i = n_s = 1,33$. On remarque que la Figure 5.4(b) est très similaire à la Figure 5.4(a) obtenue avec le modèle AQ (il s'agit de la Figure 5.3(a) reproduite ici pour faciliter la comparaison). La principale différence que l'on observe entre ces deux modèles est une « contraction » longitudinale de la PSF. Cela signifie que la PdC naturelle prédite par le modèle GL semble être plus petite que celle prédite par le modèle AQ.

Pour confirmer ce résultat, nous avons représenté à la Figure 5.4(d) le rapport de Strehl obtenu avec le modèle AQ (en trait plein rouge) et le modèle GL (en trait plein bleu). Ce rapport, noté S , correspond à la plus grande valeur de la PSF évaluée à la profondeur z_p divisée par celle de la tache d'Airy :

$$S = \frac{\max_{(x,y)} h_{z_p}(x,y)}{f_{\text{Airy}}(0,0)}. \quad (5.20)$$

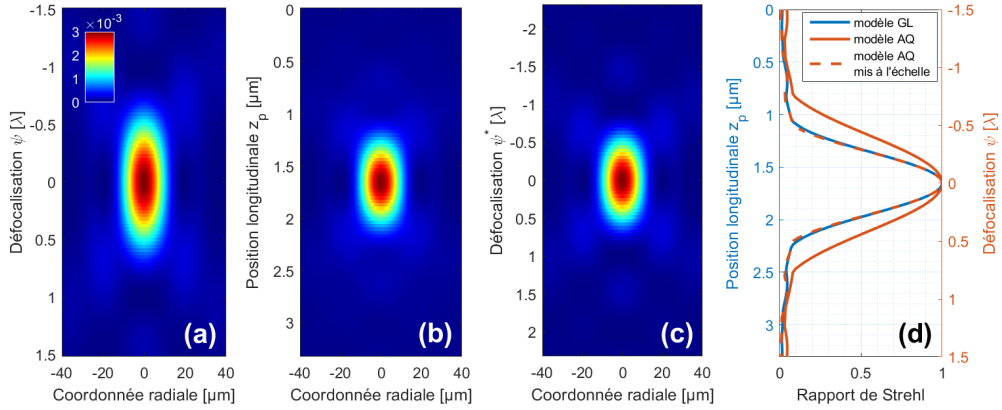


FIGURE 5.4 – Variation du profil de la PSF en fonction du paramètre de défocalisation ψ , de la position longitudinale z_p de l'émetteur ou du paramètre équivalent ψ^* respectivement simulée (a) avec le modèle AQ, (b) avec le modèle GL ($n_i = n_s = 1,33$) et (c) avec le modèle AQ mis à l'échelle. La Figure 5.3(a) est reproduite à gauche pour faciliter la comparaison. (d) Variation du rapport de Strehl associé aux PSF illustrées. La configuration du microscope et les paramètres de simulation sont définis dans le Tableau 5.1.

Les rapports de Strehl correspondant aux modèles AQ et GL de la Figure 5.4(d) sont très similaires et semblent être liés par un simple facteur d'échelle. En d'autres termes, il apparaît que pour une valeur donnée de z_p , la PSF décrite par le modèle AQ est quasi-égale à celle prédite par le modèle GL, mais pour une valeur de ψ différente de celle définie à l'Équation (3.2). On montre dans les Annexes C.1 et C.2 que cette valeur « équivalente » de ψ est égale à :

$$\psi^* = \kappa_\psi \left(z_p - z_{\text{focus}}^{\text{opt}} \right) \quad (5.21)$$

où

$$\kappa_\psi \simeq \frac{NA^2}{2n_s} + \frac{NA^4}{8n_s^3} + \frac{11NA^6}{192n_s^5} + \frac{25NA^8}{768n_s^7}. \quad (5.22)$$

On constate que le premier terme de cette équation correspond à celui du modèle AQ de l'Équation (3.2) et que les termes suivants sont positifs. On a donc $\psi^* > \psi$. La valeur du paramètre de défocalisation prédite par le modèle GL est donc plus importante que celle prédite par le modèle AQ et cette différence augmente avec l'ouverture numérique.

Pour vérifier ce résultat, nous avons représenté à la Figure 5.4(c) la variation du profil de la PSF obtenue avec le modèle AQ en fonction de ψ^* (il s'agit d'une version « dilatée » de la Figure 5.4(a)). Il apparaît clairement que la Figure 5.4(c) est maintenant quasi-identique à la Figure 5.4(b) : avec cette nouvelle définition du paramètre de défocalisation ψ^* , les profils de PSF donnés par les modèles AQ et GL sont quasi-égaux. Ce résultat se vérifie à nouveau en calculant le rapport de Strehl du modèle AQ pour la valeur ψ^* et en le représentant sur la Figure 5.4(d) (en tirets rouges) : il est quasiment superposé au modèle GL (en trait plein bleu).

Considérons maintenant le cas où $n_i \neq n_s$. Nous avons tracé à la Figure 5.5 le même type de graphes qu'à la Figure 5.4(b-d), mais pour $n_i = 1,52$ et $n_s = 1,33$. Nous remarquons, de nouveau, que les rapports de Strehl des modèles GL (en trait plein bleu) et

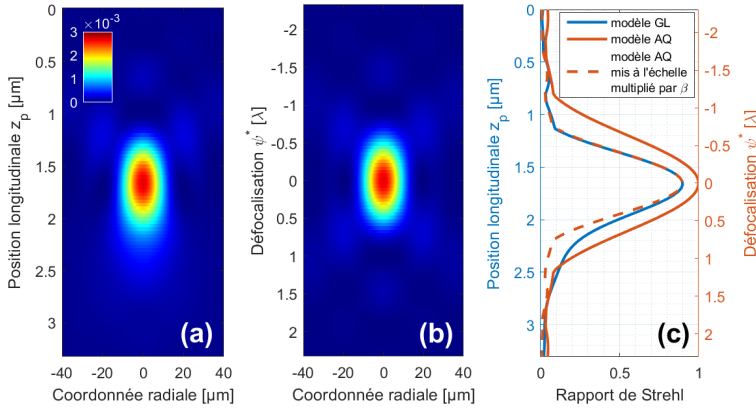


FIGURE 5.5 – Variation du profil de la PSF en fonction de la position longitudinale z_p ou du paramètre équivalent ψ^* respectivement simulée (a) avec le modèle GL ($n_i = 1,52$ et $n_s = 1,33$) et (b) avec le modèle AQ mis à l'échelle multiplié par le facteur de correction β . (c) Variation du rapport de Strehl associée aux PSF illustrés. La configuration du microscope et les paramètres de simulations sont définis dans le Tableau 5.1.

5

AQ mis à l'échelle (en trait plein rouge), illustrés à la Figure 5.5(c), sont très similaires. Cependant, le fait que $n_i \neq n_s$ introduit deux différences supplémentaires importantes. Premièrement, le rapport de Strehl obtenu avec le modèle GL au meilleur point focal n'est plus égal à 1 (voir la courbe en trait plein bleu de la Figure 5.5(c)). En effet, la dispersion quadratique de l'écart de front d'onde ne peut s'annuler si $n_i \neq n_s$, même pour $z_p = z_{\text{focus}}^{\text{opt}}$ (voir l'Équation (5.18)). Pour prendre en compte le fait que $n_i \neq n_s$ dans le modèle AQ, un facteur de correction sur le rapport de Strehl, noté β , est donné dans l'Annexe C.1 à l'Équation (C.7). Deuxièmement, la variation du profil de la PSF est dissymétrique autour du plan focal. En effet, lorsque les indices optiques ne sont plus égaux, l'erreur de front d'onde $W_{\text{GL}}(r)$ sur la pupille, définie à l'Équation (5.4), n'est plus symétrique autour du point z_{focus} même si la dispersion quadratique reste parfaitement symétrique, comme le montre l'Équation (5.18).

Nous avons illustré à la Figure 5.5(b) la variation du profil de la PSF obtenue avec le modèle AQ en fonction du paramètre équivalent ψ^* et multipliée par le facteur de correction β , égal à $\beta = 0,89$ dans notre cas. Nous avons également tracé à la Figure 5.5(c) la valeur correspondante du rapport de Strehl multipliée par β (en tirets rouges). Nous constatons que les variations de la PSF et du rapport de Strehl multipliés par β sont quasi-identiques à celles obtenues avec le modèle GL, hormis cette légère dissymétrie de part et d'autre du plan focal.

Si l'on évalue l'Équation (5.21) en z_{max} (ou z_{min}), la plage de PdC définie par l'intervalle $[z_{\text{min}}, z_{\text{max}}]$ du modèle GL correspond donc à la plage $[-\psi_{\text{max}}^*, \psi_{\text{max}}^*]$ du modèle AQ, avec

$$\psi_{\text{max}}^* = \kappa_{\psi} \frac{z_{\text{max}} - z_{\text{min}}}{2}. \quad (5.23)$$

On peut noter que cette expression ne dépend pas de l'indice de réfraction n_i du milieu d'immersion. Cela signifie que la dilatation longitudinale observée entre les modèles AQ et GL aux Figures 5.5(a-b) provient de la forte ouverture numérique et de l'indice de

réfraction n_s et non de l'écart entre les indices de réfraction du milieu d'immersion et de l'échantillon. Cet écart explique en revanche l'atténuation du rapport de Strehl dans le plan focal et la dissymétrie de la PSF par rapport à celui-ci.

En conclusion, le principal avantage du passage du modèle AQ au modèle GL est de mieux prédire la PdC dans des configurations réelles avec une ouverture élevée. Cela évite de surestimer la plage de PdC avec un modèle d'imagerie trop optimiste.

5.4. CONDITIONS D'ÉQUIVALENCE DES DEUX MODÈLES EN PRÉSENCE D'UN MASQUE

Considérons à présent qu'un masque de phase est placé dans le diaphragme d'ouverture du microscope pour améliorer la PdC. Comme décrit à l'Équation (1.15), cela revient à ajouter à la fonction pupillaire la fonction de phase du masque $\Phi_{\text{mask}}(r)$. On peut noter que la fonction de phase du masque est indépendante de la position longitudinale z_p de l'émetteur. Par conséquent, si une configuration correspondant à z_p dans le modèle GL est équivalente à une configuration correspondant à ψ^* dans le modèle AQ — *i.e.*, elles produisent une aberration « équivalente » au sens de la dispersion quadratique de W_{z_p} —, la surface d'onde aberrante décrite par les deux modèles reste équivalente si l'on utilise un masque de phase. On peut donc s'attendre à ce que les conclusions obtenues à la section précédente (sans masque) soient également valides en présence d'un masque de phase.

Pour vérifier cette conjecture, nous avons tracé en Figure 5.6 les mêmes types de graphes que ceux présentés en Figure 5.4. Le microscope optique simulé est équipé d'un masque de phase, $n_i = 1,52$ et $n_s = 1,33$. Le masque utilisé est celui optimisé pour $\psi_{\text{max}} = 1,5\lambda$ avec le Scénario A. Il est illustré dans le Tableau 4.1 (première ligne et deuxième colonne). Nous pouvons dresser les mêmes conclusions : la principale différence entre les Figures 5.6(a) (modèle AQ) et 5.6(b) (modèle GL) est une « contraction » de l'axe longitudinal. La Figure 5.6(c) représente la variation du profil de la PSF obtenue avec le modèle AQ en fonction du paramètre équivalent ψ^* défini à l'Équation (5.21), et la Figure 5.6(d) représente les variations du rapport de Strehl pour les configurations illustrées aux Figures 5.6(a-c). On constate que même en utilisant un masque de phase, les variations de la PSF et du rapport de Strehl en fonction du paramètre équivalent ψ^* restent assez proches de celles obtenues avec le modèle GL.

5.5. COMPARAISONS DES MASQUES DE PHASE OPTIMAUX

La méthode d'optimisation d'un masque basée sur la BCR est définie à l'Équation (3.10). Elle consiste à minimiser le critère $J(\boldsymbol{\rho})$ correspondant à la plus grande valeur de la BCR sur la plage de défocalisation visée. Puisque l'expression de la PSF est différente dans les modèles AQ et GL, la valeur de la RBCR l'est aussi. Il faut donc définir pour chacun des modèles un critère d'optimisation distinct :

$$\begin{aligned} J_{\text{AQ}}(\boldsymbol{\rho}) &= \max_{\psi \in [-\psi_{\text{max}}, \psi_{\text{max}}]} \text{RBCR}_{\text{AQ}}(\boldsymbol{\rho}, \psi), \\ J_{\text{GL}}(\boldsymbol{\rho}) &= \max_{z_p \in [z_{\text{min}}, z_{\text{max}}]} \text{RBCR}_{\text{GL}}(\boldsymbol{\rho}, z_p), \end{aligned} \quad (5.24)$$

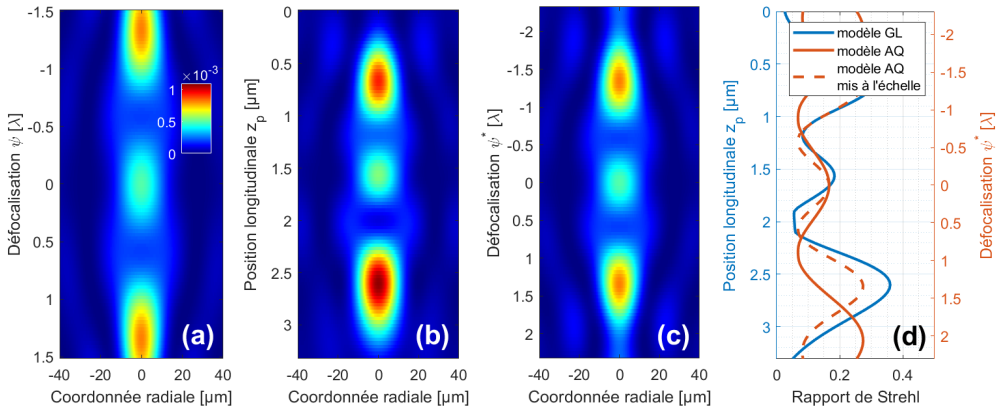


FIGURE 5.6 – Variation du profil de la PSF en fonction du paramètre de défocalisation ψ , de la position longitudinale z_p de l'émetteur ou du paramètre équivalent ψ^* respectivement simulée (a) avec le modèle AQ, (b) avec le modèle GL ($n_i = 1,52$ et $n_s = 1,33$) et (c) avec le modèle AQ mis à l'échelle. (d) Variation du rapport de Strehl associée aux PSF illustrées. Le microscope est équipé du masque de phase illustré dans le Tableau 4.1 (première ligne, deuxième colonne). Sa configuration et les paramètres de simulation sont définis dans le Tableau 5.1.

5

où $RBCR_{AQ}$ et $RBCR_{GL}$ sont les valeurs de la RBCR obtenues respectivement avec les PSF calculées à partir des modèles AQ et GL. Dans cette section, nous comparons les masques optimisés avec ces deux critères.

Pour mener à bien cette comparaison, nous choisissons d'étudier des configurations équivalentes des modèles AQ et GL. En supposant pour simplifier que $z_{\min} = 0$, la valeur de z_{\max} est choisie telle que $\psi_{\max}^* = \psi_{\max}$, avec ψ_{\max}^* défini à l'Équation (5.23). On se place dans deux situations différentes. Dans la première, les indices du milieu d'immersion et de l'échantillon sont égaux : $n_i = n_s = 1,33$. Dans la seconde, ils sont différents : $n_i = 1,52$ et $n_s = 1,33$. Les autres paramètres du système d'imagerie sont définis dans le Tableau 5.1.

Considérons pour commencer une plage de PdC telle que $\psi_{\max} = 1\lambda$. Comme nous l'avons vu à la Figure 3.8(a), les masques binaires à $L = 2$ anneaux — caractérisés par un seul paramètre noté ρ_1 — sont presque suffisants pour atteindre les performances optimales sur cette PdC. La Figure 5.7 représente les valeurs de $J_{AQ}(\rho_1)$ (en trait plein bleu), et de $J_{GL}(\rho_1)$ avec $n_i = n_s$ (en trait plein rouge) ou avec $n_i \neq n_s$ (en trait plein jaune), en fonction de ρ_1 . Les masques optimisés sont ceux dont le rayon ρ_1 correspond au minimum global du paysage d'optimisation. On observe que ces paysages sont très similaires et que les minima globaux se produisent quasiment aux mêmes positions. On peut donc en conclure que les masques de phase binaires à $L = 2$ anneaux optimisés dans le cadre des modèles AQ et GL sont quasi-identiques.

Ce résultat se vérifie aussi pour de plus grandes plages de PdC. Comme j'ai pu le montrer au Chapitre 3, un plus grand nombre d'anneaux est nécessaire pour atteindre une précision de localisation optimale sur de grandes plages de PdC. Je vais donc considérer, pour l'optimisation des masques, des structures annulaires composées au maxi-

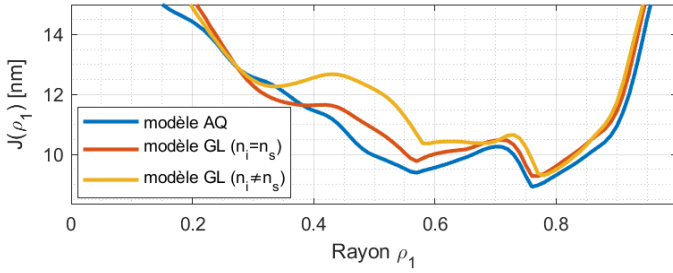


FIGURE 5.7 – Paysage d’optimisation des masques de phase binaires à 2 anneaux optimisés pour $\psi_{\max} = 1\lambda$. La configuration du microscope et les paramètres de simulation utilisés sont définis dans le Tableau 5.1.

num de $L = 5$ anneaux². Notons, cependant, que les performances des masques optimaux peuvent se stabiliser pour une valeur plus petite de L , auquel cas le masque optimal a moins de cinq anneaux. On considère trois plages de PdC : $\psi_{\max} = 1\lambda, 1,5\lambda$ et 2λ .

L’ensemble des résultats obtenus est résumé dans le Tableau 5.2 pour les différentes valeurs de ψ_{\max} (première colonne) et d’indices optiques (deuxième colonne : $n_i = n_s$ ou $n_i \neq n_s$). Les masques optimaux obtenus avec le modèle GL, désignés par le vecteur $\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}^{\text{GL}}$, sont illustrés dans la troisième colonne avec la valeur correspondante du critère $J_{\text{GL}}(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}^{\text{GL}})$. On remarque que lorsque ψ_{\max} augmente, $J_{\text{GL}}(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}^{\text{GL}})$ augmente aussi : étendre la PdC devient plus difficile. On constate également que le critère $J_{\text{GL}}(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}^{\text{GL}})$ est légèrement plus grand lorsque $n_i \neq n_s$. La quatrième colonne du Tableau 5.2 représente les masques optimaux pour le modèle AQ, désignés par le vecteur $\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}^{\text{AQ}}$ avec la valeur correspondante du critère $J_{\text{AQ}}(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}^{\text{AQ}})$. Par comparaison, on observe que les masques optimaux pour les modèles AQ et GL, bien que différents, présentent certaines similitudes. En particulier, leurs anneaux principaux ont les mêmes rayons. La question est donc de savoir si ces masques sont équivalents en termes de performances d’extension de la PdC.

Pour répondre à cette question, considérons un masque de phase, optimisé avec le modèle AQ pour atteindre la PdC ψ_{\max} , placé dans un microscope optique où les paramètres — ouverture numérique, indices optiques, distance de travail, etc. — sont tels que $\psi_{\max}^* = \psi_{\max}$. La valeur du critère de localisation obtenue dans ce cas, $J_{\text{GL}}(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}^{\text{AQ}})$, est donnée à la cinquième colonne du Tableau 5.2. En comparant les valeurs de la troisième et de la cinquième colonne, on remarque que $J_{\text{GL}}(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}^{\text{AQ}}) > J_{\text{GL}}(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}^{\text{GL}})$. Ce résultat était attendu puisque le masque $\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}^{\text{AQ}}$ n’est pas optimal pour le modèle GL. Cependant, les valeurs de $J_{\text{GL}}(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}^{\text{AQ}})$ et $J_{\text{GL}}(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}^{\text{GL}})$ sont proches, ce qui signifie que même si le masque a été optimisé avec le modèle AQ, il reste quasi-optimal avec le modèle GL. On remarque aussi dans le Tableau 5.2 que plus la valeur de ψ_{\max} et l’écart d’indices optiques augmentent, plus le masque s’éloigne de l’optimalité avec le modèle GL. Cependant, même dans le pire cas où $\psi_{\max} = 2\lambda$ et $n_i \neq n_s$, on a $J_{\text{GL}}(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}^{\text{GL}}) = 10,25$ nm et $J_{\text{GL}}(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}^{\text{AQ}}) = 11,45$ nm. Cela correspond à une différence relative de seulement 12%. Cette différence est faible

2. Pour optimiser les critères qui sont fortement non convexes, j’utilise l’algorithme d’optimisation globale par essaim de particules (*particle swarm*) proposé par Kennedy et Eberhart [1995].

et correspond par exemple en ordre de grandeur à l'écart entre les deux minima locaux principaux du paysage d'optimisation représenté à la Figure 4.1(b).

En résumé, les masques de phase optimisés avec le modèle **AQ** sont similaires à ceux obtenus avec le modèle **GL**, à condition que la **PdC** souhaitée soit spécifiée par le paramètre ψ_{\max}^* défini à l'Équation (5.23). Ce résultat est important car il permet l'usage de masques génériques calculés pour une plage de **PdC** sans avoir besoin de connaître précisément les paramètres optiques du microscope (*i.e.*, NA , n_i et n_s). En effet, considérons différentes configurations de microscopes ayant des indices de réfraction, une ouverture numérique et une profondeur d'imagerie différentes, mais correspondant à la même valeur du paramètre réduit de défocalisation ψ_{\max}^* . Les masques optimaux obtenus avec le modèle **GL** pour toutes ces configurations offrent des performances très similaires, et sont quasi-identiques au masque optimal obtenu avec le modèle **AQ** pour une plage de **PdC** égale à $[-\psi_{\max}^*, \psi_{\max}^*]$.

5.6. CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons comparé les performances d'extension de la **PdC** des masques de phase optimisés avec le modèle **AQ** et le modèle **GL**. Ce dernier caractérise de manière plus précise la formation d'image dans un microscope optique avec une forte ouverture numérique et un écart important entre les indices de réfraction du milieu biologique et du milieu d'immersion. Nous avons tout d'abord montré que la validité du modèle **AQ** peut être étendue en modifiant la définition du paramètre de défocalisation ψ . Cette nouvelle définition repose sur une équivalence en termes de dispersion quadratique des écarts de surface d'onde entre le modèle **AQ** et le modèle **GL**. Nous avons ensuite montré que pour ces configurations équivalentes, les masques optimaux obtenus avec les deux modèles sont similaires et conduisent à des performances de localisation proches. Ce résultat est important car il permet l'utilisation de masques génériques qui peuvent être optimisés sans connaître précisément les paramètres optiques du microscope.

PdC	Indices de réfraction	modèle GL		modèle AQ		
		ρ_{opt}^{GL}	$J_{GL}(\rho_{opt}^{GL})$	ρ_{opt}^{AQ}	$J_{AQ}(\rho_{opt}^{AQ})$	$J_{GL}(\rho_{opt}^{AQ})$
1λ	$n_i = n_s$		8,32 nm		8,17 nm	8,55 nm
	$n_i \neq n_s$		8,42 nm			8,90 nm
$1,5\lambda$	$n_i = n_s$		9,13 nm		8,95 nm	9,58 nm
	$n_i \neq n_s$		9,32 nm			10,33 nm
2λ	$n_i = n_s$		9,87 nm		10,08 nm	10,82 nm
	$n_i \neq n_s$		10,25 nm			11,45 nm

TABLEAU 5.2 – Masques de phase binaires optimisés à l'aide des critères définis à l'Équation (5.24). Les configurations du microscope et les paramètres de simulation utilisés sont décrits dans le Tableau 5.1.

6

CO-CONCEPTION POUR LA DÉTECTION DE MOLÉCULES UNIQUES

*Nous avons optimisé des masques de phase binaires annulaires pour étendre la **profondeur de champ** des techniques SMLM. Ces masques modifient la réponse impulsionnelle du système d'imagerie pour rendre la précision de localisation transverse d'un marqueur fluorescent la plus invariante possible le long de l'axe optique. Ils permettent ainsi d'améliorer la localisation dans un volume imagé au prix d'une perte raisonnable de précision dans le plan focal.*

Cependant, le traitement numérique d'une image acquise se compose de deux étapes successives : la « pré-localisation » (ou « détection »), où l'on détermine les régions de l'image dans lesquelles se trouvent des fluorophores, et la localisation sous-pixellique des fluorophores dans chacune de ces régions. Or, la présence d'un masque de phase dans la pupille du microscope conduit à un étalement de la PSF, qui peut affecter l'étape de pré-localisation. Il est donc nécessaire d'évaluer l'effet que peut avoir un masque de phase sur l'étape de pré-localisation, et de proposer le cas échéant une méthode d'optimisation des masques réalisant un compromis entre probabilité de détection et précision de localisation.

Certaines parties de ce chapitre ont été présentées dans OSA Imaging and Applied Optics Congress 2021c (COSI), paper CF4B.5.

JUSQU'À présent, je me suis intéressé à la précision avec laquelle la position transverse d'un fluorophore peut être déterminée dans un volume imagé. J'ai montré qu'avec une configuration expérimentale adaptée, la précision de localisation de l'estimateur du **MV** est entièrement caractérisée par la **BCR**. En plaçant dans la pupille de l'objectif un masque de phase binaire annulaire optimisé selon ce critère, il est possible de modifier la réponse impulsionnelle du système d'imagerie afin d'étendre la **PdC** des techniques **SMLM**.

Cependant, le traitement numérique complet d'une image se compose de deux étapes successives. La première, nommée « pré-localisation » ou « détection », consiste à déterminer grossièrement la position des régions de l'image dans lesquelles se trouve un fluorophore. La seconde étape consiste à localiser le fluorophore, dans chacune des régions pré-détectées, avec une précision sous-pixellique (bien inférieure à la limite de diffraction) en utilisant les algorithmes décrits dans les chapitres 3 et 4.

Les masques de phase binaires annulaires déterminés dans les chapitres précédents ont été optimisés uniquement pour cette seconde étape : ils permettent de maximiser la précision de super-localisation d'un marqueur fluorescent sur une plage de **PdC** étendue. Or on ignore l'influence que peuvent avoir ces masques sur l'étape de pré-localisation. L'objectif de ce chapitre est de répondre à cette question. Pour cela, nous allons tout d'abord construire un critère basé sur la distance de Bhattacharyya pour discriminer un fluorophore du fond diffus. Nous utiliserons ensuite ce critère pour optimiser des masques de phase binaires annulaires adaptés à la détection. Nous comparerons enfin les masques obtenus à ceux optimisés précédemment pour la localisation, afin de déterminer s'il existe des masques efficaces à la fois pour la détection et la localisation.

6.1. DÉTECTABILITÉ D'UN MARQUEUR FLUORESCENT

L'étape de pré-localisation (ou de détection) de marqueurs fluorescents peut être formulée comme un problème de classification, où l'on distingue automatiquement les données acquises selon qu'elles contiennent l'image d'un fluorophore ou qu'elles n'en contiennent pas. Pour évaluer la difficulté de ce problème de classification, nous proposons dans cette section d'utiliser la distance de Bhattacharyya¹. Cette distance permettra de définir un critère pour optimiser des masques de phase, afin d'augmenter la capacité à détecter un marqueur — en d'autres termes, sa détectabilité — dans un volume imagé.

6.1.1. TEST D'HYPOTHÈSES

On définit deux hypothèses, aussi appelées classes, pour caractériser la présence ou non d'un signal de fluorescence provenant du marqueur à détecter dans une imagerie de taille $(2P + 1) \times (2P + 1)$ pixels.

Hypothèse H1 : un fluorophore est présent dans la scène. Le signal mesuré au pixel (i, j) , noté s_{ij} , est alors décrit par un bruit de grenaille provenant du signal de fluorescence du marqueur et d'un fond constant de niveau moyen b provenant de l'autofluorescence du milieu biologique. La loi de probabilité de la variable aléatoire discrète s_{ij} ,

1. La distance de Bhattacharyya est une mesure de la similarité de deux distributions de probabilités.

sous l'*Hypothèse H1*, est une loi de Poisson dont l'expression est :

$$P_{1,ij}[k] = \frac{\lambda_{1,ij}^k}{k!} \exp(-\lambda_{1,ij}) . \quad (6.1)$$

Cette loi, de moyenne

$$\lambda_{1,ij} = N_0 \mu_{ij}^{\psi, \theta} + b , \quad (6.2)$$

dépend du pixel (i, j) avec N_0 le nombre moyen de photo-électrons mesurés, émis par le marqueur. La variable $\mu_{ij}^{\psi, \theta}$ correspond à la PSF du système d'imagerie intégrée sur la grille de pixels et évaluée au pixel (i, j) . Elle est définie à l'Équation (3.5). Les paramètres ψ et θ sont supposés connus.

Hypothèse H0 : il n'y a pas de fluorophore dans la scène. Seule la fluorescence du fond est alors mesurée. La loi de probabilité de la variable aléatoire discrète s_{ij} , sous l'*Hypothèse H0*, est notée $P_0[k]$. Il s'agit à nouveau d'une loi de Poisson, comme définie à l'Équation (6.1), mais dont la moyenne est indépendante du pixel (i, j) :

$$\lambda_0 = b . \quad (6.3)$$

Pour illustrer ces deux hypothèses, nous avons simulé en Figure 6.1 un ensemble d'acquisitions pour lesquelles l'image d'un fluorophore est soit absente (comme illustré à la Figure 6.1(a)), soit présente (comme illustré aux Figures 6.1(b-d)). La Figure 6.1(e) représente l'histogramme de la valeur du pixel central construit à partir de 8000 réalisations différentes de bruit. Ces simulations numériques sont réalisées avec les paramètres décrits dans le Tableau 5.1 et pour trois valeurs du paramètre de défocalisation ψ , à savoir $\psi = \{0; 0,25\lambda; 0,5\lambda\}$. Comme nous l'avons mis en évidence au Chapitre 3, on remarque qu'en présence d'un fluorophore, plus le paramètre ψ est important, plus la PSF s'étale et disparaît dans la fluorescence du fond. À l'œil nu, il semble de plus en plus difficile de déterminer si l'image d'un fluorophore est présente ou non. C'est aussi ce que l'on constate à la Figure 6.1(e), où l'histogramme associé au pixel central $P_{1,44}[k]$ se rapproche de $P_0[k]$ à mesure que le paramètre ψ augmente. On dit alors que les *Hypothèses H1* et *H0* sont de moins en moins discernables.

Un algorithme de décision consiste à classer automatiquement les données acquises $\underline{s} = (s_{ij})_{(i,j) \in [-P,P]^2}$ en distinguant celles contenant un signal de fluorescence (*i.e.*, celles vérifiant l'*Hypothèse H1*) et celles n'en contenant pas (*i.e.*, celles vérifiant l'*Hypothèse H0*). Cette classification est communément appelée un « test d'hypothèses ». Neyman *et al.* [1933] ont montré que l'algorithme optimal, *i.e.*, le plus efficace, consiste à comparer le rapport de vraisemblance à un seuil.

6.1.2. DISTANCE DE BHATTACHARYYA

Aucun test, même optimal, ne peut conduire à une classification parfaite. De plus, comme en témoigne la Figure 6.1, il est légitime de penser que plus un fluorophore est éloigné du plan focal (*i.e.*, $|\psi|$ grand), moins les *Hypothèses H1* et *H0* sont discernables, et plus difficile alors est la classification. Afin d'évaluer la performance d'un algorithme de décision, nous pouvons calculer sa probabilité d'erreur, *i.e.*, la probabilité qu'une image \underline{s} soit affectée à la mauvaise classe.

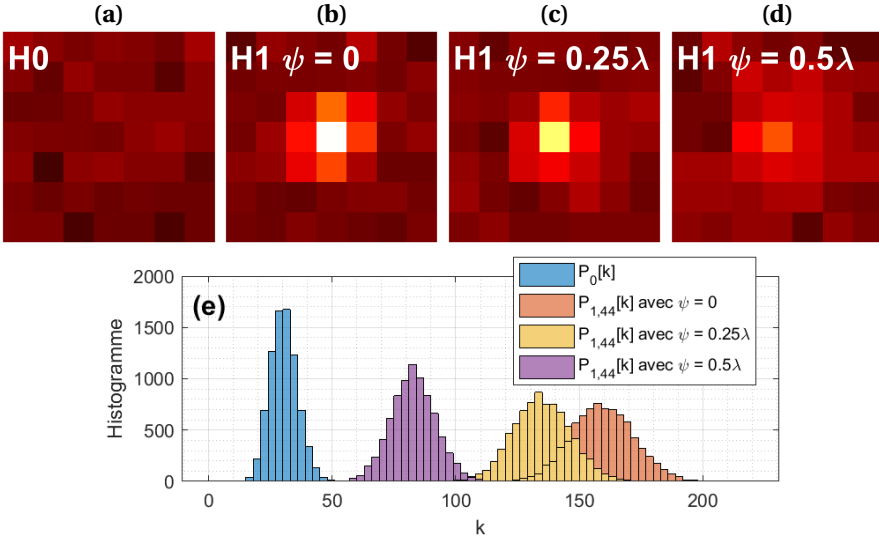


FIGURE 6.1 – (a-d) Simulations d'imagerie \mathbf{s} vérifiant l'Hypothèse H_0 ou H_1 pour des microscopes optiques sans masque de phase et pour plusieurs valeurs du paramètre de défocalisation ψ . (e) Histogramme de la valeur du pixel central $(i, j) = (4, 4)$ réalisé sur 8000 réalisations de bruit. La configuration du microscope et les paramètres de simulation utilisés sont définis dans le Tableau 5.1.

6

Le taux d'erreur de Bayes est la plus petite probabilité d'erreur possible à laquelle un algorithme de classification puisse conduire. Étant donné que dans les deux Hypothèses H_1 et H_0 , les valeurs mesurées s_{ij} en chaque pixel sont statistiquement indépendantes les unes des autres, son expression dépend de $P_{1,ij}[k]$ et $P_0[k]$ définies plus haut, de la manière suivante [Cover et Thomas, 2005] :

$$\epsilon = \sum_{s_{11}, s_{12}, s_{21}, \dots} \min \left\{ p_1 \prod_{i=-P}^P \prod_{j=-P}^P P_{1,ij}[s_{ij}]; p_0 \prod_{i=-P}^P \prod_{j=-P}^P P_0[s_{ij}] \right\} \quad (6.4)$$

avec p_1 , respectivement p_0 , la probabilité *a priori* des Hypothèses H_1 respectivement H_0 . Le symbole \sum désigne les sommes sur les réalisations de bruit des $(2P+1)^2$ pixels, telles que $s_{ij} = \{0, 1, \dots, +\infty\}$. En utilisant l'inégalité $\min\{a; b\} \leq a^\gamma b^{1-\gamma}$ (où $a, b \geq 0$ et $0 \leq \gamma \leq 1$), on montre que l'Équation (6.4) peut être majorée par :

$$\epsilon_u = p_1^\gamma p_0^{1-\gamma} \prod_{i=-P}^P \prod_{j=-P}^P \underbrace{\sum_{k=1}^{+\infty} P_{1,ij}[k]^\gamma P_0[k]^{1-\gamma}}_{e^{-C_{ij}(\gamma)}} \quad (6.5)$$

avec $0 \leq \gamma \leq 1$. La fonction $C_{ij}(\gamma)$ est appelée la « distance de Chernoff [1952] » entre les lois de probabilité $P_{1,ij}[k]$ et $P_0[k]$. Puisque $p_1 \leq 1$ et $p_0 \leq 1$, le taux d'erreur de Bayes est majoré par un coefficient exponentiel qui ne dépend que des distances de Chernoff

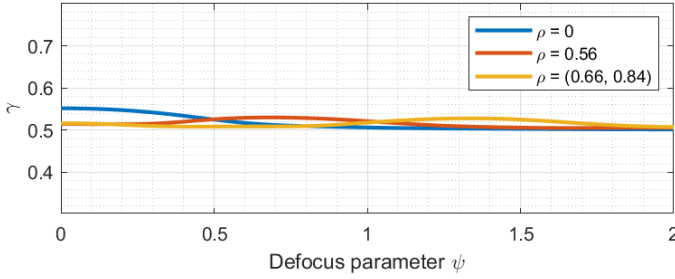


FIGURE 6.2 – Valeur optimale du paramètre γ , qui maximise la somme des distances de Chernoff définies à l'Équation (6.7). Cette valeur est tracée en fonction du paramètre de défocalisation ψ pour différentes valeurs du vecteur de paramètres ρ . La configuration du microscope et les paramètres de simulation sont donnés dans le Tableau 5.1.

$C_{ij}(\gamma)$ avec $(i, j) \in [-P, P]^2$:

$$\epsilon \leq \exp \left[- \sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P C_{ij}(\gamma) \right]. \quad (6.6)$$

Lorsque les lois de probabilité $P_{1,ij}[k]$ et $P_0[k]$ suivent respectivement des distributions de Poisson de moyennes $\lambda_{1,ij}$ et λ_0 telles que définies aux Équations (6.2) et (6.3), la distance de Chernoff $C_{ij}(\gamma)$ a l'expression analytique suivante :

$$C_{ij}(\gamma) = \gamma \lambda_{1,ij} + (1 - \gamma) \lambda_0 - \lambda_{1,ij}^\gamma \lambda_0^{1-\gamma}. \quad (6.7)$$

D'après l'inégalité exprimée à l'Équation (6.6), la plus petite borne sur ϵ — aussi appelée la borne d'information de Chernoff — est obtenue avec la valeur de γ qui maximise la somme des $C_{ij}(\gamma)$. Cette valeur dite « optimale » dépend des moyennes $\lambda_{1,ij}$ et λ_0 , et n'a pas de forme analytique. Cependant, Jain *et al.* [2002] ont montré que pour de nombreuses applications, la valeur optimale de γ est proche de 1/2. C'est d'ailleurs ce que l'on observe à la Figure 6.2 où la valeur optimale du paramètre γ est représentée en fonction du paramètre de défocalisation ψ : la somme des distances de Chernoff atteint son maximum pour une valeur de γ proche de 1/2. La distance :

$$\mathcal{B}_{ij}(\rho, \psi) = C_{ij}(1/2) = -\ln \left[\sum_{k=1}^{+\infty} \sqrt{P_{1,ij}[k] P_0[k]} \right] = \frac{1}{2} \left(\sqrt{\lambda_{1,ij}} - \sqrt{\lambda_0} \right)^2 \quad (6.8)$$

calculée au pixel (i, j) est appelée « distance de Bhattacharyya [1943] ». La dépendance de \mathcal{B}_{ij} à ρ et ψ provient de la moyenne $\lambda_{1,ij}$ définie à l'Équation (6.2).

De même que nous avons utilisé la BCR pour caractériser la précision de la localisation, nous aimerions disposer d'un critère ou d'une mesure de contraste simple et analytique permettant de caractériser la détectabilité d'un fluorophore. La somme des distances de Bhattacharyya, notée \mathcal{B} , est une bonne candidate puisqu'elle permet de définir une borne proche de celle d'information de Chernoff. Son expression :

$$\mathcal{B}(\rho, \psi) = \sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \mathcal{B}_{ij}(\rho, \psi) = \frac{b}{2} \sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \left(\sqrt{\frac{N_0}{b} \mu_{ij}^{\psi, \theta}} + 1 - 1 \right)^2 \quad (6.9)$$

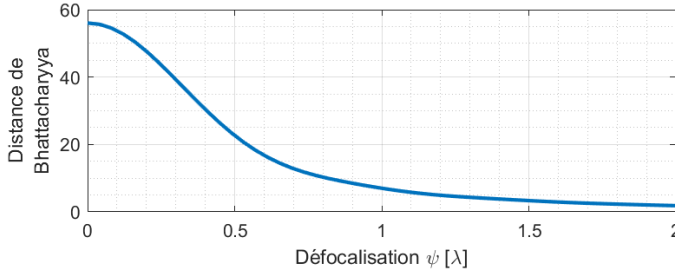


FIGURE 6.3 – Évolution de la distance de Bhattacharyya pour un système optique sans masque de phase en fonction du paramètre de défocalisation ψ . La configuration du microscope et les paramètres de simulation utilisés sont définis dans le Tableau 5.1.

évalue la difficulté intrinsèque d'un problème de détection en présence d'un bruit de Poisson spatialement non corrélé. Goudail *et al.* [2004] ont montré l'intérêt d'utiliser l'Équation (6.9) comme mesure de contraste.

La distance \mathcal{B} peut être interprétée comme une mesure de similarité (ou de séparabilité) entre l'*Hypothèse H1* (la présence d'un fluorophore) et l'*Hypothèse H0* (son absence). Ainsi, l'Équation (6.9) sera utilisée pour évaluer la capacité intrinsèque avec laquelle le signal de fluorescence d'un marqueur peut être détecté dans une image mesurée. À titre d'illustration, la Figure 6.3 représente l'évolution de la distance \mathcal{B} (que nous appellerons dans la suite distance de Bhattacharyya), définie à l'Équation (6.9), pour un système optique sans masque de phase (*i.e.*, $\rho = 0$) en fonction du paramètre de défocalisation ψ . On constate qu'elle diminue à mesure que ψ augmente. Autrement dit, les *Hypothèses H1* et *H0* sont de moins en moins discernables. Ce résultat confirme l'intuition que nous avons au préalable : un fluorophore éloigné du plan focal est plus difficile à détecter qu'un fluorophore situé dans le plan de mise au point (*i.e.*, pour $\psi = 0$).

6.2. CO-OPTIMISATION DES MASQUES POUR LA DÉTECTION

Pour étendre la profondeur sur laquelle les marqueurs fluorescents peuvent être détectés, nous proposons d'optimiser des masques de phase à l'aide d'un critère basé sur la distance de Bhattacharyya définie à l'Équation (6.9). Un critère raisonnable pour l'optimisation du masque est de maximiser la plus petite valeur possible de la distance de Bhattacharyya évaluée sur l'ensemble de la plage de PdC souhaitée. Les paramètres optimaux du masque, désignés par le vecteur ρ_{opt} , sont donc obtenus en résolvant le problème d'optimisation suivant :

$$\rho_{\text{opt}} = \arg \max_{\rho} J_{\text{det}}(\rho) \quad \text{avec} \quad J_{\text{det}}(\rho) = \min_{\psi \in [-\psi_{\text{max}}, \psi_{\text{max}}]} \mathcal{B}(\rho, \psi) \quad (6.10)$$

où nous avons explicitement indiqué la dépendance de \mathcal{B} par rapport au vecteur de paramètres du masque ρ et au paramètre de défocalisation ψ .

Compte tenu de l'expression de \mathcal{B} dans l'Équation (6.9), le vecteur de paramètres optimal du masque ρ_{opt} ne dépend de N_0 que par le rapport N_0/b (*i.e.*, le bilan photonique). Comme la fonction de coût $J_{\text{det}}(\rho)$ est non convexe, l'Équation (6.10) est résolue

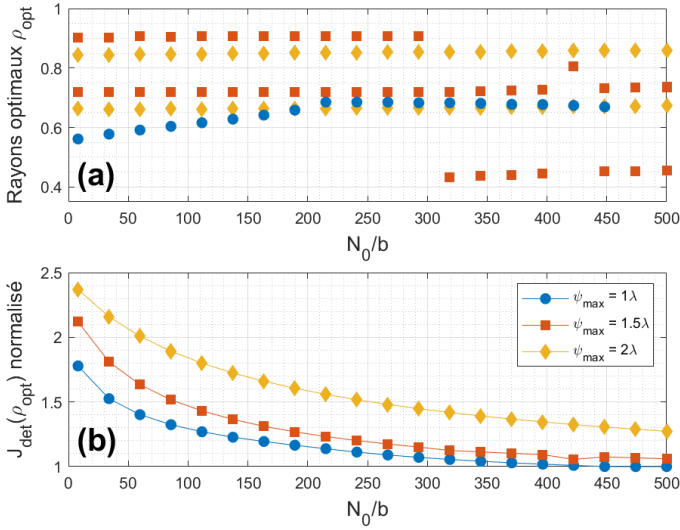


FIGURE 6.4 – (a) Évolution des paramètres optimaux ρ_{opt} du masque de phase binaire annulaire en fonction du bilan photonique N_0/b pour $\psi_{\text{max}} = \{1\lambda; 1.5\lambda; 2\lambda\}$. (b) Valeurs normalisées du critère pour la détection, *i.e.*, $J_{\text{det}}(\rho_{\text{opt}})/J_{\text{det}}(0)$, associées aux masques optimaux. La configuration du microscope et les paramètres de simulation sont donnés dans le Tableau 5.1, sauf pour N_0 et b qui sont choisis tels que $N_0/b \in [8; 500]$

à l'aide de l'algorithme d'optimisation par essaim de particules utilisé aux chapitres précédents [Kennedy et Eberhart, 1995]. L'optimisation est réalisée avec des structures annulaires composées au maximum de $L = 5$ anneaux. Cependant, dans les conditions que nous considérons (voir Tableau 5.1 avec $N_0/b \in [8; 500]$), les performances des masques se stabilisent pour une valeur plus petite de L : le masque optimal a moins de 5 anneaux.

Comme pour la localisation, le masque optimal optimisé pour la détection avec le critère de l'Équation (6.10) dépend de la position θ utilisée pour simuler la PSF durant l'optimisation. Cependant, on peut montrer que ce paramètre influe très peu sur ρ_{opt} . Au Chapitre 3, nous avons choisi $\theta_0 = (0, 0)$. Pour faciliter la comparaison des masques obtenus dans ce chapitre avec ceux du Chapitre 3, on suppose donc que la position transverse réelle de l'émetteur est située au centre d'un pixel, *i.e.*, $\theta_0 = (0; 0)$.

La Figure 6.4(a) illustre les paramètres optimaux du masque de phase binaire annulaire optimisé pour différentes plages de PdC, *i.e.*, $\psi_{\text{max}} = \{1\lambda; 1.5\lambda; 2\lambda\}$, en fonction du bilan photonique. Pour une valeur de N_0/b donnée, les paramètres du masque sont représentés par un ensemble vertical de points : chaque point caractérise le rayon ρ_k d'un anneau avec $k \in \{1; \dots; L-1\}$ (les rayons unitaires ou nuls ne sont pas illustrés). Les performances des masques, illustrées à la Figure 6.4(b), sont normalisées en divisant le critère $J_{\text{det}}(\rho_{\text{opt}})$ par celui obtenu sans masque $J_{\text{det}}(0)$.

Pour commencer, analysons les résultats obtenus pour $\psi_{\text{max}} = 1\lambda$ (marqueurs ronds bleus). Quelle que soit la valeur de N_0/b , les masques optimaux sont composés de seulement $L = 2$ anneaux. Lorsque que $N_0/b < 200$, le paramètre ρ_1 du masque optimal varie linéairement entre 0,56 et 0,66. Il se stabilise ensuite à $\rho_1 = 0,68$ lorsque $N_0/b \in [200; 450]$, puis lorsque $N_0/b > 450$, ρ_1 est nul : la configuration optimale correspond

à celle sans masque. C'est pour de faibles valeurs de N_0/b que l'on observe à la Figure 6.4(b) que l'écart de performance entre les cas avec et sans masque est le plus important. Par exemple, lorsque $N_0/b = 8$, on obtient $J_{\text{det}}(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}) = 1,78 \times J_{\text{det}}(0)$. L'usage d'un masque de phase permet donc d'améliorer significativement la détection des fluorophores. Cette situation correspond à celle du *Scénario B* (introduit au Chapitre 4) où la source de bruit dominante est due aux fluctuations du fond. Dans ce scénario, la PSF du système d'imagerie sans masque est noyée dans le bruit de fond. Le masque modifie alors la PSF pour améliorer le contraste entre l'image du fluorophore et le fond.

On observe par ailleurs que $J_{\text{det}}(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}})$ tend asymptotiquement vers $J_{\text{det}}(0)$ à mesure que le bilan photonique augmente. Ainsi pour de grandes valeurs de N_0/b , l'usage d'un masque de phase n'améliore plus la détection des fluorophores. Cette situation correspond à celle du *Scénario A* (aussi introduit au Chapitre 4) où la source de bruit dominante est le bruit de photons provenant du signal de fluorescence. Dans ce scénario, le contraste entre l'image du fluorophore et le fond est suffisant pour une détection correcte sans l'aide d'un masque sur la profondeur $\psi_{\text{max}} = 1\lambda$.

Lorsque ψ_{max} augmente, les masques optimaux sont composés d'un plus grand nombre d'anneaux : pour $\psi_{\text{max}} = 1\lambda$, on compte $L = 2$ anneaux ; tandis que pour $\psi_{\text{max}} = 1,5\lambda$ ou 2λ , $L = 3$ anneaux. Cette augmentation traduit la difficulté croissante d'optimiser un masque pour atteindre une plus grande PdC. Ce résultat est similaire à celui que nous avons établi pour la localisation au Chapitre 3 où le nombre d'anneaux du masque optimal augmentait avec ψ_{max} (voir la Figure 3.8).

Par ailleurs, les conclusions établies précédemment à partir de la Figure 6.4(b) avec $\psi_{\text{max}} = 1\lambda$ restent similaires lorsque $\psi_{\text{max}} \in \{1,5\lambda; 2\lambda\}$: l'écart de performance entre les cas avec et sans masque est maximum pour $N_0/b = 8$ puis décroît à mesure que le bilan photonique augmente. On remarque que $J_{\text{det}}(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}})$ tend vers $J_{\text{det}}(0)$ lorsque N_0/b augmente. On peut montrer que cette convergence est asymptotique. En effet, si le signal de fluorescence est tel que $N_0\mu_{ij}^{\psi, \theta_0} \gg b$, alors la distance de Bhattacharyya \mathcal{B} définie à l'Équation (6.9) devient :

$$\mathcal{B} \simeq \frac{N_0}{2} \sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \mu_{ij}^{\psi, \theta_0}. \quad (6.11)$$

Cette expression approchée ne dépend plus des paramètres $\boldsymbol{\rho}$ et ψ puisque la conservation de l'énergie par un masque de phase impose :

$$\sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \mu_{ij}^{\psi, \theta_0} = \text{constante}. \quad (6.12)$$

Ainsi, le critère $J_{\text{det}}(\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}})$ défini à l'Équation (6.10) tend asymptotiquement vers $J_{\text{det}}(0)$.

On remarque aussi sur la Figure 6.4(b) que les masques optimisés sur la plage $N_0/b \in [8; 500]$ varient de moins en moins en fonction du bilan photonique lorsque ψ_{max} augmente. Ce résultat s'explique par une conjecture établie au Chapitre 4 : pour une même valeur de N_0/b , la PSF se noie dans le bruit de fond à mesure que ψ_{max} augmente. On a alors $N_0\mu_{ij}^{\psi, \theta_0} \ll b$ (hypothèse du *Scénario B*) et la distance de Bhattacharyya \mathcal{B} a pour

expression approchée :

$$\mathcal{B}(\boldsymbol{\rho}, \psi) \simeq \frac{1}{8} \frac{N_0^2}{b} \sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \left(\mu_{ij}^{\psi, \theta_0} \right)^2. \quad (6.13)$$

Ainsi, le vecteur de paramètres $\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}}$ du masque optimal qui minimise le critère $J_{\text{det}}(\boldsymbol{\rho})$ ne dépend plus du bilan photonique N_0/b . Les masques optimisés sur la plage $N_0/b \in [8; 500]$ et illustrés à la Figure 6.4(a) varient donc de moins en moins lorsque ψ_{max} augmente.

Pour conclure, l'usage d'un masque optimal pour la détection n'est nécessaire que pour des conditions expérimentales où l'hypothèse du *Scénario B* est vérifiée. Pour les autres conditions expérimentales, l'image du fluorophore est suffisamment contrastée et l'usage du masque de phase pour la détection n'est plus indispensable.

6.3. DÉTECTION VS. LOCALISATION

En comparant les résultats de la Figure 6.4(a) à la seconde ligne du Tableau 4.1, on remarque lorsque la source de bruit dominante est principalement due aux fluctuations du fond (hypothèse du *Scénario B* : $N_0 \mu_{ij}^{\psi, \theta_0} \ll b$) que les masques optimisés pour la détection sont similaires à ceux optimisés pour la localisation. Par exemple, lorsque $\psi_{\text{max}} = 1\lambda$ et $N_0/b = 8$, on observe que le masque de phase binaire optimal pour la détection est composé de 2 anneaux tel que $\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}} = 0,56$ (voir la Figure 6.4(a)); et que celui optimisé pour la localisation est un masque à 2 anneaux tel que $\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}} = 0,55$ (voir la seconde ligne première colonne du Tableau 4.1). Ces deux masques sont très similaires. Lorsque $\psi_{\text{max}} = 1,5\lambda$ et $N_0/b = 8$, on montre à la Figure 6.4(a) que le masque de phase binaire optimal pour la détection est un masque à 3 anneaux avec $\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}} = (0,72; 0,90)$. Celui optimisé pour la localisation, et illustré à la seconde ligne deuxième colonne du Tableau 4.1, est aussi composé de 3 anneaux avec $\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}} = (0,74; 0,92)$. À nouveau, ces deux masques sont très similaires. On retrouve le même résultat lorsque $\psi_{\text{max}} = 2\lambda$ et $N_0/b = 8$. Le masque de phase optimal pour la détection est caractérisé par le vecteur de paramètre $\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}} = (0,66; 0,84)$ (voir la Figure 6.4(a)) et celui pour la localisation par $\boldsymbol{\rho}_{\text{opt}} = (0,68; 0,84)$ (voir la seconde ligne troisième colonne du Tableau 4.1).

Ce constat se comprend en analysant les critères d'optimisation pour la détection et la localisation définis respectivement aux Équations (6.10) et (3.10). Lorsque le bilan photonique est faible, les fluctuations du signal utile sont négligeables par rapport à celles du fond autofluorescent. En supposant que $N_0 \mu_{ij}^{\psi, \theta_0} \ll b$, on montre que ces critères peuvent être respectivement approchés par la maximisation des fonctions suivantes :

$$J_{\text{det}}(\boldsymbol{\rho}) \simeq \min_{\psi} \sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \left(\mu_{ij}^{\psi, \theta_0} \right)^2 \quad (6.14)$$

et

$$J^{-1}(\boldsymbol{\rho}) \simeq \min_{\psi} \sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \left(\frac{\partial \mu_{ij}^{\psi, \theta_0}}{\partial x} \right)^2, \quad (6.15)$$

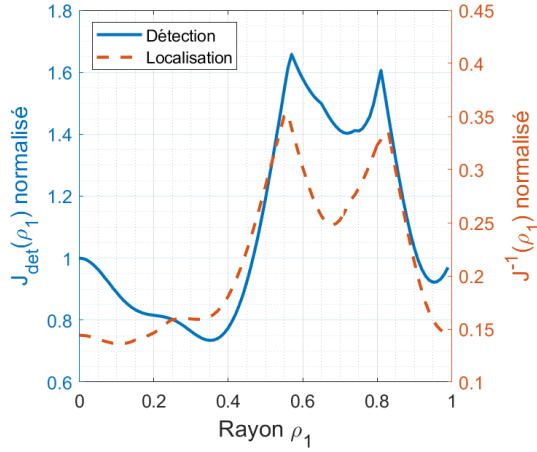


FIGURE 6.5 – Paysages d’optimisation d’un masque de phase binaire à 2 anneaux pour la détection (en trait plein bleu) et la localisation (en trait pointillé rouge) lorsque $\psi_{\max} = 1\lambda$. Les valeurs du critère $J_{\text{det}}(\boldsymbol{\rho})$ défini à l’Équation (6.10) et du critère $J(\boldsymbol{\rho})$ défini à l’Équation (3.10) sont normalisées en les divisant respectivement par $J_{\text{det}}(0)$ et $\text{RBCR}(0,0)$. Les paramètres de simulation sont donnés dans le Tableau 5.1 avec $b = 30 \text{ ph.e}^-$.

sous la contrainte :

$$\sum_{i=-P}^P \sum_{j=-P}^P \mu_{ij}^{\psi, \theta_0} = \text{constante} . \quad (6.16)$$

Pour rappel, cette contrainte provient de la conservation de l’énergie par un masque de phase. On remarque que la maximisation de chacun des deux critères (6.14) et (6.15) conduit à rechercher un masque de phase produisant des PSF les plus concentrées possibles sur un nombre restreint de pixels. Cela permet de comprendre pourquoi les masques optimaux sont très similaires.

Pour vérifier cette conjecture, j’ai tracé aux Figures 6.5 et 6.6 le paysage d’optimisation des fonctions de coût $J_{\text{det}}(\boldsymbol{\rho})$ et $J(\boldsymbol{\rho})$ respectivement définies aux Équations (6.10) et (3.10) en fonction du vecteur de paramètres $\boldsymbol{\rho}$ du masque. Les conditions expérimentales utilisées pour la simulation sont celles décrites au Tableau 5.1 avec $b = 30 \text{ ph.e}^-$, soit $N_0/b = 16,7$. Comme nous l’avons évoqué plus haut, les masques optimaux, obtenus avec $\psi_{\max} \in \{1\lambda; 1,5\lambda\}$ et $N_0\mu_{ij}^{\psi, \theta_0} \ll b$ (hypothèse du Scénario B), sont composés aux plus de 3 anneaux. Une représentation graphique en 2D du paysage d’optimisation est donc possible.

La Figure 6.5 représente les paysages d’optimisation pour la détection (en trait plein bleu) et pour la localisation (en trait pointillé rouge) d’un masque binaire composé de 2 anneaux défini par son rayon ρ_1 , pour $\psi_{\max} = 1\lambda$ et $N_0/b = 16,7$. On remarque que ces deux paysages d’optimisation ont des reliefs similaires et atteignent leurs extremums locaux pour la même valeur de paramètre ρ_1 . Pour $\psi_{\max} = 1,5\lambda$ et $N_0/b = 16,7$, nous avons représenté à la Figure 6.6(a) le paysage d’optimisation pour la détection d’un masque binaire composé de 2 anneaux défini par ses rayons $(\rho_1; \rho_2)$ et à la Figure 6.6(b) le paysage d’optimisation pour la localisation. On remarque à nouveau que ces deux paysages d’optimisation ont des reliefs similaires dont l’extremum est signalé d’une croix blanche.

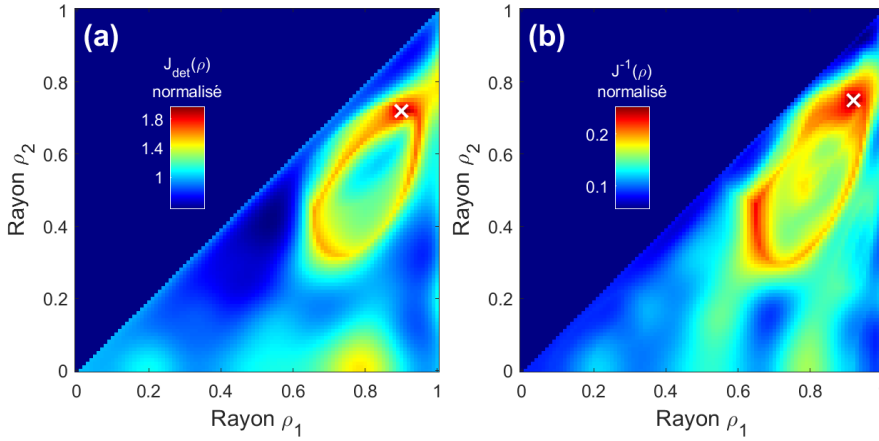


FIGURE 6.6 – Paysages d’optimisation d’un masque de phase binaire à 3 anneaux pour (a) la détection et (b) la localisation lorsque $\psi_{\max} = 1,5\lambda$. Les valeurs du critère $J_{\text{det}}(\boldsymbol{\rho})$ défini à l’Équation (6.10) et du critère $J(\boldsymbol{\rho})$ défini à l’Équation (3.10) sont normalisées en les divisant respectivement par $J_{\text{det}}(0)$ et $\text{RBCR}(0,0)$. La croix blanche correspond au minimum global du critère. Les paramètres de simulation sont donnés dans le Tableau 5.1 avec $b = 30 \text{ ph.e}^-$.

On en conclut que dans les conditions expérimentales où l’usage d’un masque est nécessaire pour améliorer la détection des fluorophores (*i.e.*, où l’hypothèse du *Scénario B* est vérifiée), les masques optimaux correspondent à ceux optimisés pour la localisation. Ce résultat est très intéressant car il montre que la méthode d’optimisation des masques de phase pour étendre la PdC en SMLM, utilisée jusqu’à maintenant, optimise à la fois la probabilité de détection et la précision de localisation.

6.4. CONCLUSION

L’étude menée dans ce chapitre nous a permis de montrer que dans la situation où la pré-localisation des marqueurs est la plus difficile, *i.e.*, lorsque le bilan photonique (le rapport N_0/b entre le signal du fluorophore et le niveau du fond) est faible, les masques binaires annulaires optimisant la détection sont identiques aux masques optimisant la précision de localisation sous-pixellique. Ce résultat est important car il permet de simplifier l’optimisation de ces masques pour la chaîne complète de traitement des images des techniques SMLM. De plus, ce résultat peut s’interpréter par la similarité des critères pour la détection et pour la localisation (voir respectivement les Équations (6.14) et (6.15)). Cette similarité est indépendante du modèle de masque utilisé, elle laisse donc présager que ce résultat peut se généraliser à d’autres structures de masques. Une perspective intéressante serait donc de vérifier la validité de ce résultat pour d’autres modèles de masques augmentant la PdC et également en imagerie 3D.

7

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

CE manuscrit de thèse est consacré à l'extension de la **profondeur de champ (PdC)** d'un système d'imagerie en utilisant des masques de phase binaires annulaires placés dans la pupille. La méthodologie d'optimisation de ces masques, introduite par *Diaz et al.* [2009], repose sur un critère défini par la différence quadratique entre une image idéalement nette et celle délivrée par le système après déconvolution par un filtre linéaire (le filtre de Wiener). Mes travaux m'ont conduit à considérer d'autres types de critères : ceux où le produit final est une image restaurée par un algorithme de déconvolution non linéaire, et ceux où le produit final est une information plus simple, comme la position ou la présence d'un marqueur individuel.

Pour la restauration d'image, j'ai montré au Chapitre 2 que les masques optimaux obtenus avec un critère basé sur le filtre de Wiener et ceux issus d'un critère basé sur une méthode de déconvolution non linéaire (la régularisation **TV**) sont pratiquement identiques. Ce résultat justifie une pratique fréquente consistant à optimiser un système d'imagerie avec un critère analytique basé sur une déconvolution linéaire et à restaurer les images acquises avec un algorithme non linéaire, afin d'obtenir une meilleure qualité d'image. J'ai proposé une conjecture pour expliquer ce fait : le masque de phase doit produire des PSF presque invariante à la défocalisation, et ce quel que soit l'algorithme utilisé pour réaliser la déconvolution. Cette conjecture sera bien évidemment à vérifier sur d'autres applications et d'autres familles d'algorithmes de restauration.

Dans le cadre de la collaboration avec l'équipe de Laurent COGNET, basée au **LP2N**, j'ai exploré la problématique de co-conception pour la microscopie par localisation de molécule unique (**SMLM**). Le critère repose non plus sur la qualité d'une image restaurée mais sur la précision avec laquelle la position d'un marqueur fluorescent peut être estimée. Cette précision est exprimée à l'aide de la **borne de Cramér-Rao (BCR)**. Le critère d'optimisation consiste donc à minimiser la **BCR** sur une plage de **PdC** spécifiée. En plaçant un masque de phase binaire annulaire optimisé dans la pupille de l'objectif du microscope et en appliquant un algorithme de localisation sous-pixelique adapté

aux images acquises, il est possible d'étendre de manière significative la PdC des techniques SMLM. Par exemple, pour une plage de PdC visée de $\psi_{\max} = 1\lambda$, je montre au Chapitre 3 qu'un masque optimal permet d'obtenir une précision trois fois meilleure en bord de plage au prix d'une légère dégradation autour du plan focal. Les masques optimaux obtenus pour la localisation sont significativement différents de ceux obtenus pour la déconvolution d'image, ce qui était attendu puisque les critères d'optimisation n'induisent pas les mêmes contraintes sur la PSF.

Les expériences de SMLM dépendent d'un certain nombre de paramètres optiques. Il est donc important d'analyser l'influence de ces paramètres sur la précision de localisation, afin de délimiter le domaine de valeurs de ces paramètres dans lequel les techniques d'extension de la PdC peuvent être utilisées efficacement. Dans ce but, j'ai tout d'abord étudié au Chapitre 4 l'influence des sources de bruit dominantes sur l'optimisation des masques. Tout dépend d'un paramètre réduit appelé « bilan photonique », noté N_0/b dans le manuscrit, qui correspond au rapport entre le nombre total N_0 de photons provenant du marqueur fluorescent et le nombre b de photons provenant de la fluorescence du fond (par pixel). J'ai montré que dans des conditions expérimentales telles que le bilan photonique est faible — ce qui est fréquemment le cas car les masques de phase atténuent le signal de fluorescence — les masques optimisés en supprimant le bruit additif et gaussien ont des performances proches de l'optimalité.

J'ai également vérifié que, dans la majorité des conditions expérimentales rencontrées en pratique, la BCR est un indicateur fiable de la précision de localisation effectivement obtenue. En effet, j'ai montré que si les conditions expérimentales sont telles que la RBCR est inférieure à 20 nm, alors l'estimateur du MV atteint la précision de localisation prédite par la BCR, que ce soit pour un marqueur situé dans le plan focal en utilisant un algorithme standard, ou pour des marqueurs situés hors du plan focal en utilisant l'estimateur adapté aux masques d'extension de PdC proposé au Chapitre 3. Dans le cas où les conditions expérimentales ne permettent pas d'obtenir une RBCR inférieure à 20 nm, les Figures 4.6 et 4.7 du Chapitre 4 peuvent être utilisées comme des abaques pour caractériser l'écart entre les performances des estimateurs et la BCR.

Afin de se rapprocher des conditions réelles d'une expérience de SMLM, et ainsi de préparer une validation expérimentale des masques d'extension de la PdC, j'ai ensuite amélioré au Chapitre 5 l'environnement de simulation en prenant en compte un modèle de formation d'image plus réaliste que l'approximation quadratique (AQ) couramment utilisée dans la littérature pour représenter un défaut de mise au point. Pour cela, j'ai utilisé le modèle de Gibson et Lanni [1992] (GL) qui prend en compte de manière plus précise les aberrations optiques provenant de la forte ouverture numérique des objectifs de microscope et de l'écart entre les indices de réfraction du milieu biologique et du milieu d'immersion. L'utilisation de ce modèle a une influence importante sur l'optimisation des masques, mais j'ai pu établir une relation d'équivalence simple entre les masques optimaux obtenus dans le cadre du modèle GL et ceux obtenus à partir du modèle AQ. Ce résultat est important car il permet d'optimiser des masques génériques sans avoir besoin de spécifier de manière très précise les paramètres optiques du microscope.

Pour finir, je me suis intéressé au Chapitre 6 à l'étude de la chaîne de traitement complète des images SMLM afin de déterminer l'influence des masques de phase sur l'étape de détection (pré-localisation des marqueurs fluorescents), qui précède toujours l'étape

de localisation sous-pixellique. J'ai tout d'abord construit un nouveau critère basé sur la distance de Bhattacharyya pour déterminer des masques de phase optimisant la probabilité de détection d'un fluorophore dans un volume imagé. Cette étude a révélé que lorsque le bilan photonique est faible, l'usage d'un masque optimal et d'un traitement adapté permet d'améliorer la détection des marqueurs sur une plage de PdC étendue. De plus, j'ai montré que dans cette situation, les masques optimaux pour la détection et pour la localisation sous-pixellique sont similaires. Autrement dit, les masques optimisés à partir de la BCR optimisent à la fois la probabilité de détection et la précision de localisation. Ce résultat établi, à la Section 6.3, peut s'expliquer par la ressemblance des critères d'optimisation sous l'hypothèse d'un bilan photonique faible. Dans les deux cas, les masques optimaux produisent des PSF les plus concentrées possible sur un nombre restreint de pixels pour les extraire du bruit de fond. À l'inverse, si le bilan photonique est important, l'usage d'un masque optimisé pour la détection n'est pas nécessaire et celui optimisé pour la localisation ne dégrade que très peu la probabilité de détection.

* * *

À l'issue de ces travaux, nous avons donc la capacité d'optimiser des masques d'extension de la PdC dans des conditions réalistes, en tenant compte des paramètres clés d'une expérience de SMLM, et de prédire les performances de localisation qu'ils peuvent atteindre. Nous savons également comment traiter les images afin de localiser les fluorophores avec la précision prévue par ces modèles. Ces résultats nous permettent de dégager plusieurs perspectives intéressantes.

La première est de valider expérimentalement l'extension de la PdC qu'apporte un masque de phase binaire annulaire en imagerie de molécule unique. Comme nous avons pu le mettre en évidence, tout est prêt pour commencer les expériences. Malgré les contraintes et le retard liés à la crise sanitaire, nous avons déjà amorcé ce travail. Des masques ont été fabriqués par Anne-Lise COUTROT, ingénieure de recherche CNRS au Laboratoire Charles Fabry, au sein des installations de la Plateforme de Technologie Commune à Thales, l'Institut Optique Graduate School et l'École Polytechnique (hébergée par *Thales Research & Technology*). Ils sont obtenus au moyen d'un procédé classique de lithographie UV / gravure ICP (gravure ionique réactive assistée par couplage inductif) sur un substrat de silice fondue. Grâce à la collaboration avec l'équipe du LP2N, l'extension de la PdC apportée par ces masques a commencé à être testée sur un Nikon Ti Eclipse (microscope optique inversé) équipé d'un objectif Nikon Plan Apo TIRF $\times 60$ d'ouverture numérique 1,45 à immersion dans l'huile. L'échantillon analysé est réalisé avec des micro-sphères fluorescentes (des TetraSpeck™ T7279) sédimentés dans une solution tampon de phosphate salin. Les résultats sont actuellement en cours d'analyse. C'est la raison pour laquelle ces travaux n'ont pas pu être présentés dans ce manuscrit. S'ils sont suffisamment aboutis, ils feront l'objet d'une présentation le jour de ma soutenance.

Une fois que les modèles d'imagerie, la méthode d'optimisation des masques et les performances de localisation ont été validés par l'expérience, il sera possible d'étendre la PdC des expériences de SMLM en s'adaptant aux besoins applicatifs. En effet, ces masques dépendent des exigences spécifiques aux conditions de l'expérience. Leur optimisation est un compromis entre profondeur d'exploration, précision de localisation,

et bilan photonique — ce dernier étant lié à la fréquence d'imagerie, aux propriétés du fluorophore et aux problèmes de phototoxicité. Nous serons donc en mesure de « dimensionner » un problème d'extension de PdC en SMLM et ainsi de proposer un masque co-conçu adapté à un type d'expérimentation précis pour lequel les performances attendues sont spécifiées.

Une perspective également très intéressante est de généraliser la démarche d'extension de la PdC développée dans ce manuscrit à des applications où la position 3D des marqueurs fluorescents est estimée. Pour cela, il faudra prendre en compte la BCR dans les trois dimensions de l'espace pour optimiser les masques et un compromis entre précision de localisation latérale et longitudinale devra être déterminé. Comme les conclusions établies autour du bilan photonique au Chapitre 4, du modèle GL au Chapitre 5 et de l'optimisation des masques pour la détection au Chapitre 6 restent valide, nous disposons de la méthodologie et des outils nécessaires pour explorer cette problématique. D'autres structures de masque devront évidemment être envisagées, car l'orientation ou l'élongation de la PSF doivent varier avec la défocalisation pour pouvoir estimer la profondeur à laquelle se trouve un marqueur. Les masques dont la fonction de phase est décrite par des modes de Laguerre-Gauss (voir les travaux de Piestun *et al.* [2000]) ont par exemple cette propriété. L'étude de cette structure de masque est donc un bon point de départ pour généraliser la démarche d'extension de la PdC développée dans ce manuscrit à la 3D.

A

COMPARAISON DES CRITÈRES MSE ET BCR

Le critère **MSE**, présenté au Chapitre 2 et défini à l'Équation (2.4), permet d'optimiser des masques de phase placés dans la pupille d'un système d'imagerie dont le produit final est une image restaurée à l'aide d'un algorithme de déconvolution. Le critère **BCR**, présenté au Chapitre 3 et défini à l'Équation (3.10), permet d'optimiser des masques de phase placés dans la pupille d'un microscope optique mais dont l'image acquise permet, cette fois-ci, d'estimer la position transverse d'un fluorophore. Ces critères sont différents et conduisent à des masques différents. Pour l'illustrer, nous comparons dans cette annexe deux masques de phase binaires annulaires optimisés pour $\psi_{\max} = 1\lambda$: l'un avec le critère **MSE** représenté à la Figure A.1(a); l'autre avec le critère **BCR** représenté à la Figure A.1(b). Nous montrerons qu'ils ne conduisent pas aux mêmes performances de localisation.

Les Figures A.2(a-b) représentent l'évolution du profil de la **PSF** d'un système d'imagerie, équipé avec les masques de phase illustrés à la Figure A.1, en fonction du paramètre de défocalisation ψ . On constate que l'évolution de ces profils sont bien différents. Le premier, obtenu avec un masque optimisé à l'aide du critère **MSE** (voir la Figure A.2(a)), est lisse, presque invariant à la défocalisation. Ce résultat, mis en évidence au Chapitre 2, est une propriété essentielle que doit avoir la **PSF** pour garantir une bonne restauration de l'image par un algorithme utilisant un noyau unique de déconvolution. *A contrario*, le second profil, obtenu avec un masque optimisé à l'aide du critère **BCR** (voir la Figure A.2(b)), varie plus fortement en fonction de la défocalisation. On distingue deux régimes : l'un entre $\psi = -0,4\lambda$ et $0,4\lambda$ où la **PSF** est étalée; l'autre (partout ailleurs) où la **PSF** est concentrée en un seul lobe. Comme nous l'avons expliqué à la section 3.2.2, ces deux régimes conduisent à de bonnes performances de localisation (*i.e.*, à de faibles valeurs de la **RBCR**).

Pour comparer les performances de localisation de systèmes d'imagerie équipés avec les masques illustrés à la Figure A.1, nous avons tracé à la Figure A.2(c) les valeurs de la **RBCR** en fonction du paramètre de défocalisation ψ . Pour rappel, ces valeurs sont nor-

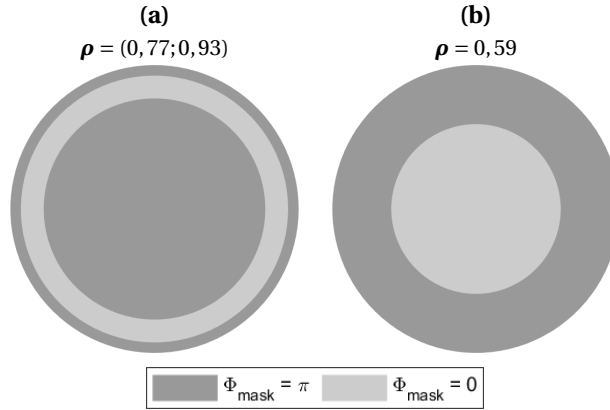


FIGURE A.1 – Masques de phase binaires annulaires optimisés pour $\psi_{\text{max}} = 1\lambda$ (a) en imagerie classique (critère basé sur le MSE) et (b) en microscopie de localisation (critère basé sur la BCR).

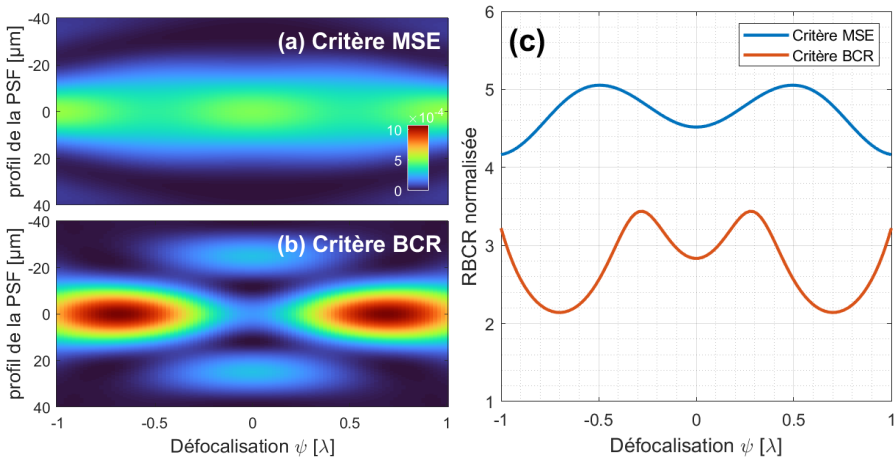


FIGURE A.2 – Variation du profil de la PSF en fonction du paramètre de défocalisation ψ , pour la configuration décrite dans le Tableau 3.1. (a) Système optique doté du masque de phase binaire annulaire illustré à la Figure A.1(a). (b) Le même système optique mais utilisant le masque illustré à la Figure A.1(b). (c) Variation de la RBCR normalisée de ces deux systèmes optiques en fonction du paramètre de défocalisation ψ .

malisées en divisant la **RBCR** par celle obtenue pour $\psi = 0$ et $\rho = 0$ (*i.e.*, sans masque de phase). On constate que les masques optimaux ne conduisent pas aux mêmes performances de localisation. Les masques optimisés avec le critère **BCR** ont de meilleures performances de localisation que ceux optimisés avec le critère **MSE**.

B

ALGORITHME DE LOCALISATION

B.1. EXPRESSION ANALYTIQUE DE LA VARIANCE D'ESTIMATION

On montre qu'il est possible, moyennant quelques approximations, d'obtenir une expression analytique de la variance d'estimation, notée $\text{var}_\psi[\hat{\theta}]$, de l'estimateur $\hat{\theta}$ défini à l'Équation (3.17). Pour alléger les notations, on modélise dans cette annexe le problème de localisation de molécule unique, introduit au Chapitre 3, par un modèle continu unidimensionnel. Cependant, les résultats et les conclusions obtenus seront facilement généralisables au problème de localisation 2D.

On suppose que le signal observé $s(x)$ est continu. Son expression est :

$$s(x) = N_0 h_\psi(x - \theta_0) + n(x) \quad (\text{B.1})$$

où θ_0 est la position de l'émetteur dans le plan d'imagerie (espace objet), N_0 est le nombre total de photo-électrons attendus sur l'ensemble du signal 1D, $n(x)$ est un bruit blanc gaussien de moyenne nulle et de DSP $S_{nn}(v) = q$. La PSF du système d'imagerie, notée $h_\psi(x)$, dépend du paramètre de défocalisation ψ défini à l'Équation (3.2).

On estime la position θ_0 de l'émetteur dans le plan d'imagerie en maximisant :

$$\hat{\theta} = \arg\max_{\theta} \int_{\mathbb{R}} s(x) r(x - \theta) dx \quad (\text{B.2})$$

où $r(x)$ est un noyau de corrélation supposé invariant à la défocalisation.

Pour quantifier la performance de cet estimateur, nous calculons son biais et sa variance. En utilisant l'Équation (B.1), l'estimateur peut s'écrire :

$$\hat{\theta} = \arg\max_{\theta} [N_0 \Omega(\theta) + n'(\theta)] \quad (\text{B.3})$$

où $\Omega(\theta) = \int_{\mathbb{R}} h_\psi(x - \theta_0) r(x - \theta) dx$ est un produit de corrélation et $n'(\theta) = \int_{\mathbb{R}} n(x) r(x - \theta) dx$ un bruit filtré. Avec un développement limité au second ordre de $\Omega(\theta)$ lorsque θ est

proche de la vraie valeur θ_0 (i.e., lorsque la variance d'estimation est faible), on obtient :

$$\Omega(\theta) \simeq \Omega(\theta_0) + (\theta - \theta_0) \left. \frac{\partial \Omega(\theta)}{\partial \theta} \right|_{\theta=\theta_0} + \frac{(\theta - \theta_0)^2}{2} \left. \frac{\partial^2 \Omega(\theta)}{\partial \theta^2} \right|_{\theta=\theta_0}. \quad (\text{B.4})$$

B

En utilisant les Équations (B.3) et (B.4) et le fait que la fonction de corrélation $\Omega(\theta)$ atteint son maximum pour $\theta = \theta_0$, on montre que :

$$\hat{\theta} = \theta_0 - \frac{\left. \frac{\partial n'(\theta)}{\partial \theta} \right|_{\theta=\theta_0}}{N_0 \left. \frac{\partial^2 \Omega(\theta)}{\partial \theta^2} \right|_{\theta=\theta_0}}. \quad (\text{B.5})$$

La position estimée $\hat{\theta}$ de l'émetteur est donc une variable aléatoire fluctuant autour de θ_0 . En utilisant le théorème de dérivation sous le signe somme, on obtient :

$$\frac{\partial n'(\theta)}{\partial \theta} = \int_{\mathbb{R}} n(x) \frac{\partial r(x-\theta)}{\partial \theta} dx = - \int_{\mathbb{R}} n(x+\theta) \frac{\partial r(x)}{\partial x} dx. \quad (\text{B.6})$$

Le processus aléatoire défini à l'Équation (B.6) est de moyenne nulle, l'estimateur $\hat{\theta}$ est donc sans biais. De plus, la DSP du bruit filtré $n'(\theta)$ est par définition égale à $|i2\pi\nu\tilde{r}(\nu)|^2 S_{nn}(\nu)$ où $S_{nn}(\nu) = q$ est constant car le bruit est blanc et le symbole \sim désigne la transformée de Fourier. Cela conduit à :

$$\text{var} \left[\left. \frac{\partial n'(\theta)}{\partial \theta} \right|_{\theta=\theta_0} \right] = 4\pi^2 q \int_{\mathbb{R}} \nu^2 |\tilde{r}(\nu)|^2 d\nu. \quad (\text{B.7})$$

D'autre part, on sait que la transformée de Fourier de $\frac{\partial^2 \Omega(\theta)}{\partial \theta^2}$ est égale à :

$$\text{TF}_{1\text{D}} \left[\frac{\partial^2 \Omega(\theta)}{\partial \theta^2} \right] (\nu) = (i2\pi\nu)^2 \text{TF}_{1\text{D}} [h_\psi(x-\theta_0)]^* (\nu) \tilde{r}(\nu) \quad (\text{B.8})$$

où l'opérateur $\text{TF}_{1\text{D}}$ désigne la transformée de Fourier 1D et l'exposant * désigne le complexe conjugué. En écrivant explicitement sa transformée de Fourier inverse, on obtient :

$$\frac{\partial^2 \Omega(\theta)}{\partial \theta^2} = -4\pi^2 \int_{\mathbb{R}} \nu^2 \text{TF}_{1\text{D}} [h_\psi(x-\theta_0)]^* (\nu) \tilde{r}(\nu) e^{i2\pi\nu\theta} d\nu \quad (\text{B.9})$$

$$= -4\pi^2 \int_{\mathbb{R}} \nu^2 \tilde{h}_\psi^* (\nu) \tilde{r}(\nu) e^{i2\pi\nu(\theta-\theta_0)} d\nu. \quad (\text{B.10})$$

Ainsi, en tenant compte des simplifications précédentes, nous obtenons l'expression analytique suivante de l'approximation de la variance $\text{var}_\psi[\hat{\theta}]$ pour une valeur donnée du paramètre de défocalisation ψ :

$$\text{var}_\psi[\hat{\theta}] \simeq \frac{1}{4\pi^2} \frac{q}{N_0^2} \frac{\int_{\mathbb{R}} \nu^2 |\tilde{r}(\nu)|^2 d\nu}{\left(\int_{\mathbb{R}} \nu^2 \tilde{h}_\psi^* (\nu) \tilde{r}(\nu) d\nu \right)^2}. \quad (\text{B.11})$$

B.2. NOYAU DE CORRÉLATION OPTIMAL

On détermine dans cette annexe l'expression du noyau de corrélation optimal de l'Équation (B.2), noté $r(x)$, qui minimise la variance d'estimation $\text{var}_{\psi}[\hat{\theta}]$ définie à l'Équation (B.11). Considérons un ensemble discret de valeurs ψ_k , tel que $k \in \{1, 2, \dots, K\}$, le noyau de corrélation optimal est alors défini comme celui qui maximise :

$$\sum_{k=1}^K (\text{var}_{\psi_k}[\hat{\theta}])^{-1} = \frac{4\pi^2 N_0^2}{q} \frac{\sum_{k=1}^K \left(\int_{\mathbb{R}} v^2 \tilde{h}_{\psi_k}^*(v) \tilde{r}(v) dv \right)^2}{\int_{\mathbb{R}} v^2 |\tilde{r}(v)|^2 dv}. \quad (\text{B.12})$$

Ce critère — bien qu'arbitraire — a l'avantage d'avoir une forme analytique simple, et le maximiser revient à maximiser la fonction $\sum_k \left(\int_{\mathbb{R}} v^2 \tilde{h}_{\psi_k}^*(v) \tilde{r}(v) dv \right)^2$ sous contrainte que $\int_{\mathbb{R}} v^2 |\tilde{r}(v)|^2 dv = A$ avec A une constante.

Le lagrangien associé à ce problème a pour expression :

$$\mathcal{L}(\tilde{r}, \lambda) = \sum_{k=1}^K \left(\int_{\mathbb{R}} v^2 \tilde{h}_{\psi_k}^*(v) \tilde{r}(v) dv \right)^2 - \lambda \left(\int_{\mathbb{R}} v^2 |\tilde{r}(v)|^2 dv - A \right) \quad (\text{B.13})$$

avec λ un multiplicateur de Lagrange. En annulant ses dérivées partielles par rapport à \tilde{r} et λ , on montre que la transformée de Fourier du noyau $r(x)$ est une combinaison linéaire des fonctions $\tilde{h}_{\psi_k}(v)$, *i.e.*,

$$\tilde{r}(v) = \sum_{k=1}^K \alpha_k \tilde{h}_{\psi_k}(v) \quad \text{avec} \quad \alpha_k = \int_{\mathbb{R}} v^2 \tilde{h}_{\psi_k}^*(v) \tilde{r}(v) dv. \quad (\text{B.14})$$

En substituant dans l'Équation (B.12) l'expression du noyau $\tilde{r}(v)$ donnée par l'Équation (B.14), la somme $\sum_k (\text{var}_{\psi_k}[\hat{\theta}])^{-1}$ s'exprime comme un quotient de Rayleigh généralisé :

$$\sum_{k=1}^K (\text{var}_{\psi_k}[\hat{\theta}])^{-1} = \frac{4\pi^2 N_0^2}{q} \frac{\boldsymbol{\alpha}^t \mathbf{W}^t \mathbf{W} \boldsymbol{\alpha}}{\boldsymbol{\alpha}^t \mathbf{W} \boldsymbol{\alpha}} \quad (\text{B.15})$$

où $\boldsymbol{\alpha} = (\alpha_1; \alpha_2; \dots; \alpha_k)$ est le vecteur de coefficients de la combinaison linéaire (B.14) et \mathbf{W} est une matrice dont les composantes sont définies par $[\mathbf{W}]_{mn} = \int_{\mathbb{R}} v^2 \tilde{h}_{\psi_m}^*(v) \tilde{h}_{\psi_n}(v) dv$.

Ainsi, le noyau $r(x)$ optimal qui maximise $\sum_k (\text{var}_{\psi_k}[\hat{\theta}])^{-1}$ est une combinaison linéaire des fonctions $h_{\psi_k}(x)$ dont les coefficients sont les composantes du vecteur propre associé à la plus grande valeur propre de la matrice \mathbf{W} .

C

MODÈLES D'IMAGERIE

C.1. COMPARAISON DES MODÈLES GL ET AQ

L'Équation (5.18), que nous reproduisons ci-dessous, exprime la dispersion quadratique autour de sa moyenne de l'écart entre la surface d'onde de référence (sphérique) et la surface d'onde défocalisée décrite par le modèle GL :

$$\sigma_{\text{GL}}^2(z_p, d_{\text{opt}}) = \kappa_s^2 \left[(z_p - z_{\text{focus}})^2 + \alpha (z_{\text{focus}})^2 \right]. \quad (\text{C.1})$$

L'objectif de cette annexe est de comparer cette expression à celle de la dispersion quadratique correspondant au modèle AQ. Cette dernière est obtenue à l'aide des Équations (3.2), (5.3) et (5.8) :

$$\sigma_{\text{AQ}}^2 = \frac{\psi^2}{12} = \kappa_{\text{AQ}}^2 (z_p - z_{\text{focus}})^2 \quad (\text{C.2})$$

avec

$$\kappa_{\text{AQ}}^2 = \frac{\text{NA}^4}{48n_s^2}. \quad (\text{C.3})$$

En comparant les expressions (C.1) et (C.2), on constate que σ_{GL}^2 et σ_{AQ}^2 dépendent de $\Delta z_0^2 = (z_p - z_{\text{focus}})^2$, mais comportent deux différences importantes. La première porte sur le coefficient du terme Δz_0^2 qui est différent dans les deux expressions. Pour le modèle AQ, ce coefficient vaut κ_{AQ} (voir l'Équation (C.3)), et pour le modèle GL, il vaut κ_s dont l'expression est donnée dans l'Équation (5.11). Avec l'aide de la Symbolic Math Toolbox™ de MATLAB®, on montre que les premiers termes du développement limité de la variable κ_s^2 en $(\text{NA}/n_s)^2$ sont :

$$\kappa_s^2 \simeq \frac{\text{NA}^4}{48n_s^2} \left(1 + \frac{\text{NA}^2}{2n_s^2} + \frac{7\text{NA}^4}{24n_s^4} + \frac{3\text{NA}^6}{16n_s^6} \right). \quad (\text{C.4})$$

On remarque que le premier terme est égal à κ_{AQ}^2 . Ce résultat montre que pour une faible ouverture, les deux modèles prédisent le même comportement. Cependant, dans le cas

général, c'est pour des profondeurs Δz_0 différentes que les modèles **GL** et **AQ** conduisent à des dispersions quadratiques identiques. Notons Δz_{GL} et Δz_{AQ} les profondeurs telles que : $\kappa_{\text{AQ}}^2 \Delta z_{\text{AQ}}^2 = \kappa_{\text{s}}^2 \Delta z_{\text{GL}}^2$. On définit alors le facteur suivant :

$$\eta = \frac{\Delta z_{\text{AQ}}}{\Delta z_{\text{GL}}} = \frac{\kappa_{\text{s}}}{\kappa_{\text{AQ}}} \simeq 1 + \frac{1}{4} \left(\frac{\text{NA}}{n_{\text{s}}} \right)^2 + \frac{11}{96} \left(\frac{\text{NA}}{n_{\text{s}}} \right)^4 + \frac{25}{384} \left(\frac{\text{NA}}{n_{\text{s}}} \right)^6 \quad (\text{C.5})$$

On remarque que ce facteur est proche de 1 pour une faible ouverture et croît significativement à mesure que **NA** augmente. Ainsi, pour de fortes ouvertures, le modèle **AQ** conduit à surestimer la profondeur Δz_0 . Il est donc nécessaire de la diviser par η lorsque **NA** augmente. C'est ce que l'on observe, par exemple, aux Figures 5.4(a-b). Par ailleurs, il est intéressant de noter que le facteur η ne dépend que de n_{s} (au travers de la variable κ_{s}), et non de n_{i} . Il est donc indépendant de la différence des indices de réfraction qui peut exister entre le milieu d'immersion et celui de l'échantillon : le facteur η provient uniquement d'une valeur élevée de **NA** dans un milieu d'indice n_{s} .

La seconde différence entre les Équations (C.1) et (C.2) est la présence d'un terme additif égal à $\alpha \kappa_{\text{s}}^2 z_{\text{focus}}^2$ dans l'expression de σ_{GL}^2 . D'après l'inégalité de Cauchy-Schwartz appliquée à l'Équation (5.11) : $\kappa_{\text{s}} \kappa_{\text{i}} \geq c_{\text{si}}^2$. Ainsi, le facteur α , dont l'expression est donnée à l'Équation (5.19), est positif ou nul. Le terme additif disparaît alors lorsque $n_{\text{i}} = n_{\text{s}}$ (puisque $\alpha = 0$) et augmente avec la différence des indices de réfraction et la distance z_{focus} .

Pour illustrer les effets de ces deux différences, considérons le rapport de Strehl noté S et défini à l'Équation (5.20). Mahajan [1983] a montré que si la dispersion quadratique σ^2 de l'écart entre la surface d'onde de référence et celle défocalisée n'est pas trop grande, le rapport de Strehl peut être approché par :

$$S \simeq \exp \left[- \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^2 \sigma^2 \right]. \quad (\text{C.6})$$

Ainsi, pour $n_{\text{i}} \neq n_{\text{s}}$, l'évolution de rapport du Strehl évalué avec le modèle **GL** et comparé avec celle du modèle **AQ** devrait présenter un rétrécissement longitudinal proportionnel à η et une atténuation globale égale à :

$$\beta = \exp \left[- \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^2 \alpha \kappa_{\text{s}}^2 z_{\text{focus}}^2 \right]. \quad (\text{C.7})$$

La Figure 5.5(c) illustre parfaitement ce résultat.

C.2. PARAMÈTRE DE DÉFOCALISATION « ÉQUIVALENT »

On peut noter que même si $n_{\text{s}} \neq n_{\text{i}}$, le terme additif $\alpha \kappa_{\text{s}}^2 z_{\text{focus}}^2$, dans l'expression de σ_{GL}^2 définie à l'Équation (C.1), reste souvent très faible. Par exemple, les conditions expérimentales décrites dans le Tableau 5.1 conduisent à $\alpha = 0,0062$. Comme les fluorophores se situent à seulement quelques micromètres sous la lamelle, z_{focus} est petit. Ainsi le terme additif est négligé, et l'Équation (C.1) devient :

$$\sigma_{\text{GL}}^2(z_{\text{p}}, d_{\text{opt}}) \simeq \kappa_{\text{s}}^2 (z_{\text{p}} - z_{\text{focus}})^2 \quad (\text{C.8})$$

En égalisant cette expression à celle de σ_{AQ}^2 définie à l'Équation (C.2), on peut définir un paramètre de défocalisation « équivalent » ψ^* du modèle AQ correspondant à une position longitudinale z_p du fluorophore dans le modèle GL :

$$\psi^* = \kappa_\psi (z_p - z_{\text{focus}}) . \quad (\text{C.9})$$

avec

$$\kappa_\psi = 2\sqrt{3}\kappa_s \simeq \frac{\text{NA}^2}{2n_s} + \frac{\text{NA}^4}{8n_s^3} + \frac{11\text{NA}^6}{192n_s^5} + \frac{25\text{NA}^8}{768n_s^7} . \quad (\text{C.10})$$

En remplaçant z_p par z_{max} ou z_{min} dans l'Équation (C.9), on peut aussi définir une plage de PdC « équivalente », telle que :

$$\psi_{\text{max}}^* = \kappa_\psi \frac{z_{\text{max}} - z_{\text{min}}}{2} . \quad (\text{C.11})$$

L'Équation (C.11) permet d'établir une correspondance simple entre les modèles GL et AQ.

BIBLIOGRAPHIE

- [Abbe 1873] ABBE, Ernst : Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. Dans : *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 9 (1873), Décembre, Num. 1, p. 413–468. <https://doi.org/10.1007/bf02956173>. – DOI 10.1007/bf02956173. – ISSN 0176–7364
- [Abrahamsson *et al.* 2006] ABRAHAMSSON, Sara; USAWA, Satoru; GUSTAFSSON, Mats : A new approach to extended focus for high-speed high-resolution biological microscopy. Dans : CONCHELLO, Jose-Angel (Éd.); COGSWELL, Carol J. (Éd.); WILSON, Tony (Éd.); International Society for Optics and Photonics (Événement) : *Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy : Image Acquisition and Processing XIII* Vol. 6090 International Society for Optics and Photonics, SPIE, 2006, p. 128–135
- [Aguet 2009] AGUET, François : *Super-Resolution Fluorescence Microscopy Based on Physical Models*, École polytechnique fédérale de Lausanne, Thèse de doctorat, Mai 2009
- [Ashok et Neifeld 2010] ASHOK, Amit; NEIFELD, Mark A. : Point spread function engineering for iris recognition system design. Dans : *Appl. Opt.* 49 (2010), Avril, Num. 10, p. B26–b39. <https://doi.org/10.1364/AO.49.000b26>. – DOI 10.1364/AO.49.000b26
- [Badieirostami *et al.* 2010] BADIEIROSTAMI, Majid; LEW, Matthew D.; THOMPSON, Michael A.; MOERNER, W. E. : Three-dimensional localization precision of the double-helix point spread function versus astigmatism and biplane. Dans : *Applied Physics Letters* 97 (2010), Num. 16, p. 161103. <https://doi.org/10.1063/1.3499652>. – DOI 10.1063/1.3499652
- [Ben-Eliezer *et al.* 2008] BEN-ELIEZER, Eyal; KONFORTI, Naim; MILGROM, Benjamin; MAROM, Emanuel : An optimal binary amplitude-phase mask for hybrid imaging systems that exhibit high resolution and extended depth of field. Dans : *Opt. Express* 16 (2008), Décembre, Num. 25, p. 20540–20561. <https://doi.org/10.1364/OE.16.020540>. – DOI 10.1364/OE.16.020540
- [Betzig *et al.* 2006] BETZIG, Eric; PATTERSON, George H.; SOUGRAT, Rachid; LINDWASSER, O. W.; OLENYCH, Scott; BONIFACINO, Juan S.; DAVIDSON, Michael W.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, Jennifer; HESS, Harald F. : Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. Dans : *Science* 313 (2006), Num. 5793, p. 1642–1645. <https://doi.org/10.1126/science.1127344>. – DOI 10.1126/science.1127344. – ISSN 0036–8075
- [Bhattacharyya 1943] BHATTACHARYYA, Anil : On a measure of divergence between two statistical populations defined by their probability distributions. Dans : *Bull. Calcutta Math. Soc.* 35 (1943), p. 99–109

- [Bon *et al.* 2018] BON, Pierre; LINARÈS-LOYEZ, Jeanne; FEYEU, Maxime; ALESSANDRI, Kevin; LOUNIS, Brahim; NASSOY, Pierre; COGNET, Laurent : Self-interference 3D super-resolution microscopy for deep tissue investigations. Dans : *Nature Methods* 15 (2018), Juin, Num. 6, p. 449–454. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0005-3>. – DOI 10.1038/s41592-018-0005-3. – ISSN 1548-7105
- [Born et Wolf 1999] BORN, Max; WOLF, Emil : *Principles of Optics : Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*. 7e édition. Cambridge University Press, 1999. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139644181>. DOI 10.1017/CBO9781139644181. – ISBN 9781139644181
- [Burcklen *et al.* 2015] BURCKLEN, Marie-Anne; DIAZ, Frédéric; LEPRÊTRE, François; ROLLIN, Joël; DELBOULBÉ, Anne; LEE, Mane-Si L.; LOISEAUX, Brigitte; KOUDOLI, Allan; DENEL, Simon; MILLET, Philippe; DUHEM, François; LEMONNIER, Fabrice; SAUER, Hervé; GOUDAIL, François : Experimental demonstration of extended depth-of-field f/1.2 visible High Definition camera with jointly optimized phase mask and real-time digital processing. Dans : *Journal of the European Optical Society : Rapid publications* 10 (2015), Octobre, p. 15046. <https://doi.org/10.2971/jeos.2015.15046>. – DOI 10.2971/jeos.2015.15046
- [Cathey et Dowski 2002] CATHEY, Wade T.; DOWSKI, Edward R. : New paradigm for imaging systems. Dans : *Appl. Opt.* 41 (2002), Octobre, Num. 29, p. 6080–6092. <https://doi.org/10.1364/AO.41.006080>. – DOI 10.1364/AO.41.006080
- [Chambolle et Pock 2011] CHAMBOLLE, Antonin; POCK, Thomas : A First-Order Primal-Dual Algorithm for Convex Problems with Applications to Imaging. Dans : *Journal of Mathematical Imaging and Vision* 40 (2011), Num. 1, p. 120–145. <https://doi.org/10.1007/s10851-010-0251-1>. – DOI 10.1007/s10851-010-0251-1. – ISSN 1573-7683
- [Chernoff 1952] CHERNOFF, Herman : A Measure of Asymptotic Efficiency for Tests of a Hypothesis Based on the sum of Observations. Dans : *The Annals of Mathematical Statistics* 23 (1952), Num. 4, p. 493–507. <https://doi.org/10.1214/aoms/1177729330>. – DOI 10.1214/aoms/1177729330
- [Cognet *et al.* 2014] COGNET, Laurent; LEDUC, Cécile; LOUNIS, Brahim : Advances in live-cell single-particle tracking and dynamic super-resolution imaging. Dans : *Current Opinion in Chemical Biology* 20 (2014), p. 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.04.015>. – DOI 10.1016/j.cbpa.2014.04.015. – ISSN 1367-5931
- [Cover et Thomas 2005] *Chapitre 11*. Dans : COVER, Thomas M.; THOMAS, Joy A. : *Information Theory and Statistics*. John Wiley & Sons, Ltd, 2005. – ISBN 9780471748823, p. 347–408
- [Diaz *et al.* 2009] DIAZ, Frédéric; GOUDAIL, François; LOISEAUX, Brigitte; HUIGNARD, Jean-Pierre : Increase in depth of field taking into account deconvolution by optimization of pupil mask. Dans : *Opt. Lett.* 34 (2009), Octobre, Num. 19, p. 2970–2972. <https://doi.org/10.1364/OL.34.002970>. – DOI 10.1364/OL.34.002970

- [Diaz *et al.* 2010] DIAZ, Frédéric; GOUDAIL, François; LOISEAUX, Brigitte; HUIGNARD, Jean-Pierre : Comparison of depth-of-focus-enhancing pupil masks based on a signal-to-noise-ratio criterion after deconvolution. Dans : *J. Opt. Soc. Am. A* 27 (2010), Octobre, Num. 10, p. 2123–2131. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.27.002123>. – DOI 10.1364/JOSAA.27.002123
- [Diaz *et al.* 2011] DIAZ, Frédéric; LEE, Mane-Si L.; REJEAUNIER, Xavier; LEHOUCQ, Gaele; GOUDAIL, François; LOISEAUX, Brigitte; BANSROPUN, Shailendra; ROLLIN, Joel; DEBES, Eric; MILS, Philippe : Real-time increase in depth of field of an un-cooled thermal camera using several phase-mask technologies. Dans : *Opt. Lett.* 36 (2011), Février, Num. 3, p. 418–420. <https://doi.org/10.1364/OL.36.000418>. – DOI 10.1364/OL.36.000418
- [von Diezmann *et al.* 2017] DIEZMANN, Lexy von; SHECHTMAN, Yoav; MOERNER, W. E. : Three-Dimensional Localization of Single Molecules for Super-Resolution Imaging and Single-Particle Tracking. Dans : *Chemical Reviews* 117 (2017), Juin, Num. 11, p. 7244–7275. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00629>. – DOI 10.1021/acs.chemrev.6b00629. – ISSN 0009–2665
- [Dowski et Cathey 1995] DOWSKI, Edward R.; CATHEY, Wade T. : Extended depth of field through wave-front coding. Dans : *Appl. Opt.* 34 (1995), Avril, Num. 11, p. 1859–1866. <https://doi.org/10.1364/AO.34.001859>. – DOI 10.1364/AO.34.001859
- [Elmalem *et al.* 2018] ELMALEM, Shay; GIRYES, Raja; MAROM, Emanuel : Learned phase coded aperture for the benefit of depth of field extension. Dans : *Opt. Express* 26 (2018), Juin, Num. 12, p. 15316–15331. <https://doi.org/10.1364/OE.26.015316>. – DOI 10.1364/OE.26.015316
- [Falcón 2017] FALCÓN, Rafael : *Co-conception des systemes optiques avec masques de phase pour l'augmentation de la profondeur du champ : evaluation du performance et contribution de la super-résolution*, Université Paris-Saclay (COMUE), Thèse de doctorat, Octobre 2017
- [Falcón *et al.* 2017] FALCÓN, Rafael; GOUDAIL, François; KULCSÁR, Caroline; SAUER, Hervé : Performance limits of binary annular phase masks codesigned for depth-of-field extension. Dans : *Optical Engineering* 56 (2017), Num. 6, p. 1–12. <https://doi.org/10.1117/1.OE.56.6.065104>. – DOI 10.1117/1.OE.56.6.065104
- [Fisher 1925] FISHER, Ronald A. : Theory of Statistical Estimation. Dans : *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* 22 (1925), Num. 5, p. 700–725. <https://doi.org/10.1017/S0305004100009580>. – DOI 10.1017/S0305004100009580
- [Fontbonne *et al.* 2021] FONTBONNE, Alice; SAUER, Hervé; GOUDAIL, François : Theoretical and experimental analysis of co-designed binary phase masks for enhancing the depth of field of panchromatic cameras. Dans : *Optical Engineering* 60 (2021), Num. 3, p. 1–20. <https://doi.org/10.1117/1.OE.60.3.033101>. – DOI 10.1117/1.OE.60.3.033101

- [Fontbonne *et al.* 2019] FONTBONNE, Alice; SAUER, Hervé; KULCSÁR, Caroline; COUTROT, Anne-Lise; GOUDAIL, François : Experimental validation of hybrid optical–digital imaging system for extended depth-of-field based on co-optimized binary phase masks. Dans : *Optical Engineering* 58 (2019), Num. 11, p. 1–12. <https://doi.org/10.1117/1.OE.58.11.113107>. – DOI 10.1117/1.OE.58.11.113107
- [Gibson et Lanni 1992] GIBSON, Sarah E.; LANNI, Frederick : Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy. Dans : *J. Opt. Soc. Am. A* 9 (1992), Janvier, Num. 1, p. 154–166. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.9.000154>. – DOI 10.1364/JOSAA.9.000154
- [Godin *et al.* 2017] GODIN, Antoine G.; VARELA, Juan A.; GAO, Zhenghong; DANNÉ, Noémie; DUPUIS, Julien P.; LOUNIS, Brahim; GROG, Laurent; COGNET, Laurent : Single-nanotube tracking reveals the nanoscale organization of the extracellular space in the live brain. Dans : *Nature Nanotechnology* 12 (2017), Mars, Num. 3, p. 238–243. <https://doi.org/10.1038/nnano.2016.248>. – DOI 10.1038/nnano.2016.248. – ISSN 1748–3395
- [Goodman 2017] GOODMAN, Joseph W. : *Introduction to Fourier optics*. 4e édition. W.H. Freeman & Company, 2017. – ISBN 9781319119164
- [Goudail *et al.* 2004] GOUDAIL, François; RÉFRÉGIER, Philippe; DELYON, Guillaume : Bhattacharyya distance as a contrast parameter for statistical processing of noisy optical images. Dans : *J. Opt. Soc. Am. A* 21 (2004), Juillet, Num. 7, p. 1231–1240. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.21.001231>. – DOI 10.1364/JOSAA.21.001231
- [Hajj *et al.* 2014] HAJJ, Bassam; EL BEHEIRY, Mohamed; IZEDDIN, Ignacio; DARZACQ, Xavier; DAHAN, Maxime : Accessing the third dimension in localization-based super-resolution microscopy. Dans : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014), p. 16340–16348. <https://doi.org/10.1039/c4cp01380h>. – DOI 10.1039/c4cp01380h
- [Harvey *et al.* 2008] HARVEY, Andrew R.; VETTENBURG, Tom; DEMENIKOV, Mads; LUCOTTE, Bertrand; MUYO, Gonzalo; WOOD, Andrew; BUSTIN, Nicholas; SINGH, Amritpal; FINDLAY, Ewan : Digital image processing as an integral component of optical design. Dans : KOSHEL, R. J. (Éd.); GREGORY, G. G. (Éd.); JR., James D. M. (Éd.); KREVER, David H. (Éd.); International Society for Optics and Photonics (Événement) : *Novel Optical Systems Design and Optimization XI* Vol. 7061 International Society for Optics and Photonics, SPIE, 2008, p. 32–42
- [Hell *et al.* 1993] HELL, S.; REINER, G.; CREMER, C.; STELZER, E. H. K. : Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index. Dans : *Journal of Microscopy* 169 (1993), Num. 3, p. 391–405. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03315.x>. – DOI 10.1111/j.1365-2818.1993.tb03315.x
- [Hell et Wichmann 1994] HELL, Stefan W.; WICHMANN, Jan : Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. Dans : *Opt. Lett.* 19 (1994), Juin, Num. 11, p. 780–782. <https://doi.org/10.1364/OL.19.000780>. – DOI 10.1364/OL.19.000780

- [Hess *et al.* 2006] HESS, Samuel T.; GIRIRAJAN, Thanu P.; MASON, Michael D. : Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. Dans : *Biophysical Journal* 91 (2006), Num. 11, p. 4258–4272. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.091116>. – DOI 10.1529/biophysj.106.091116. – ISSN 0006–3495
- [Hopkins et Burch 1955] HOPKINS, H. H.; BURCH, Cecil R. : The frequency response of a defocused optical system. Dans : *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* 231 (1955), Num. 1184, p. 91–103. <https://doi.org/10.1098/rspa.1955.0158>. – DOI 10.1098/rspa.1955.0158
- [Huang *et al.* 2009] HUANG, Bo; BATES, Mark; ZHUANG, Xiaowei : Super-Resolution Fluorescence Microscopy. Dans : *Annual Review of Biochemistry* 78 (2009), Num. 1, p. 993–1016. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061906.092014>. – DOI 10.1146/annurev.biochem.77.061906.092014
- [Jain *et al.* 2002] JAIN, A.; MOULIN, P.; MILLER, M.I.; RAMCHANDRAN, K. : Information-theoretic bounds on target recognition performance based on degraded image data. Dans : *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 24 (2002), Num. 9, p. 1153–1166. <https://doi.org/10.1109/TPAMI.2002.1033209>. – DOI 10.1109/TPAMI.2002.1033209
- [Jouchet *et al.* 2019] JOUCHET, Pierre; CABRIEL, Clément; BOURG, Nicolas; BARDOU, Marion; POÛS, Christian; FORT, Emmanuel; LÉVÊQUE-FORT, Sandrine : Nanometric axial localization of single fluorescent molecules with modulated excitation. Dans : *bioRxiv* (2019). <https://doi.org/10.1101/865865>. – DOI 10.1101/865865
- [Kay 1993] KAY, Steven M. : *Fundamentals of Statistical Signal Processing : Estimation theory*. Prentice-Hall PTR, 1993 (Prentice Hall signal processing series)
- [Kennedy et Eberhart 1995] KENNEDY, J.; EBERHART, R. : Particle swarm optimization. Dans : *Proceedings of ICNN'95 – International Conference on Neural Networks* Vol. 4, 1995, p. 1942–1948
- [Kirstein *et al.* 2007] KIRSTEIN, Johanna; PLATSCHEK, Barbara; JUNG, Christophe; BROWN, Ross; BEIN, Thomas; BRÄUCHLE, Christoph : Exploration of nanostructured channel systems with single-molecule probes. Dans : *Nature Materials* 6 (2007), Avril, Num. 4, p. 303–310. <https://doi.org/10.1038/nmat1861>. – DOI 10.1038/nmat1861. – ISSN 1476–4660
- [Lagarias *et al.* 1998] LAGARIAS, Jeffrey C.; REEDS, James A.; WRIGHT, Margaret H.; WRIGHT, Paul E. : Convergence Properties of the Nelder–Mead Simplex Method in Low Dimensions. Dans : *SIAM Journal on Optimization* 9 (1998), Num. 1, p. 112–147. <https://doi.org/10.1137/s1052623496303470>. – DOI 10.1137/s1052623496303470
- [Lasne *et al.* 2008] LASNE, D.; MAALI, A.; AMAROUCHENE, Y.; COGNET, L.; LOUNIS, B.; KELLAY, H. : Velocity Profiles of Water Flowing Past Solid Glass Surfaces Using Fluorescent Nanoparticles and Molecules as Velocity Probes. Dans : *Phys. Rev. Lett.* 100

- (2008), Mai, p. 214502. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.100.214502>. – DOI 10.1103/PhysRevLett.100.214502
- [Lévêque *et al.* 2021a] LÉVÊQUE, Olivier; DUVERGER, Romain; SAUER, Hervé; KULCSÁR, Caroline; GOUDAIL, François : Influence of high numerical aperture on depth-of-field enhancing phase mask optimization in localization microscopy. Dans : *J. Opt. Soc. Am. A* 38 (2021), Septembre, Num. 9, p. 1380–1390. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.432696>. – DOI 10.1364/JOSAA.432696
- [Lévêque *et al.* 2021b] LÉVÊQUE, Olivier; KULCSÁR, Caroline; GOUDAIL, François : Comparison of linear and nonlinear deconvolution algorithms for co-optimization of depth-of-field enhancing binary phase masks. Dans : *OSA Continuum* 4 (2021), Février, Num. 2, p. 589–601. <https://doi.org/10.1364/OSAC.415925>. – DOI 10.1364/OSAC.415925
- [Lévêque *et al.* 2021c] LÉVÊQUE, Olivier; KULCSÁR, Caroline; LEE, Antony; BON, Pierre; COGNET, Laurent; GOUDAIL, François : How to assess depth-of-field extension strategies applied to single-molecule super-resolution microscopes? Dans : *OSA Imaging and Applied Optics Congress 2021 (3D, COSI, DH, ISA, pCAOP)*, Optical Society of America, 2021, p. CF4B.5
- [Lévêque *et al.* 2022] LÉVÊQUE, Olivier; KULCSÁR, Caroline; LEE, Antony; BON, Pierre; COGNET, Laurent; GOUDAIL, François : On the validity domain of maximum likelihood estimators for depth-of-field extension in single-molecule localization microscopy. Dans : *J. Opt. Soc. Am. A* 39 (2022), Janvier, Num. 1, p. 37–43. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.439993>. – DOI 10.1364/JOSAA.439993
- [Lévêque *et al.* 2020] LÉVÊQUE, Olivier; KULCSÁR, Caroline; LEE, Antony; SAUER, Hervé; ALEKSANYAN, Artur; BON, Pierre; COGNET, Laurent; GOUDAIL, François : Co-designed annular binary phase masks for depth-of-field extension in single-molecule localization microscopy. Dans : *Opt. Express* 28 (2020), Octobre, Num. 22, p. 32426–32446. <https://doi.org/10.1364/OE.402752>. – DOI 10.1364/OE.402752
- [Lu *et al.* 2017] LU, Rongwen; SUN, Wenzhi; LIANG, Yajie; KERLIN, Aaron; BIERFELD, Jens; SEELIG, Johannes D.; WILSON, Daniel E.; SCHOLL, Benjamin; MOHAR, Boaz; TANIMOTO, Masashi; KOYAMA, Minoru; FITZPATRICK, David; ORGER, Michael B.; JI, Na : Video-rate volumetric functional imaging of the brain at synaptic resolution. Dans : *Nature Neuroscience* 20 (2017), Avril, Num. 4, p. 620–628. <https://doi.org/10.1038/nn.4516>. – DOI 10.1038/nn.4516. – ISSN 1546–1726
- [Mahajan 1983] MAHAJAN, Virendra N. : Strehl ratio for primary aberrations in terms of their aberration variance. Dans : *J. Opt. Soc. Am.* 73 (1983), Juin, Num. 6, p. 860–861. <https://doi.org/10.1364/JOSA.73.000860>. – DOI 10.1364/JOSA.73.000860
- [Mait *et al.* 2018] MAIT, Joseph N.; EULISS, Gary W.; ATHALE, Ravindra A. : Computational imaging. Dans : *Adv. Opt. Photon.* 10 (2018), Juin, Num. 2, p. 409–483. <https://doi.org/10.1364/AOP.10.000409>. – DOI 10.1364/AOP.10.000409

- [Mazidi *et al.* 2020] MAZIDI, Hesam; DING, Tianben; NEHORAI, Arye; LEW, Matthew D. : Quantifying accuracy and heterogeneity in single-molecule super-resolution microscopy. Dans : *Nature Communications* 11 (2020), Décembre, Num. 1, p. 6353. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20056-9>. – DOI 10.1038/s41467-020-20056-9. – ISSN 2041-1723
- [Mirani *et al.* 2005] MIRANI, T.; CHRISTENSEN, M. P.; DOUGLAS, S. C.; RAJAN, D.; WOOD, S. L. : Optimal co-design of computational imaging system. Dans : *Proceedings. (ICASSP '05). IEEE International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing, 2005*. Vol. 2, 2005. – ISSN 2379-190x, p. ii/597-ii/600 Vol. 2
- [Mirani *et al.* 2008] MIRANI, Tejaswini; RAJAN, Dinesh; CHRISTENSEN, Marc P.; DOUGLAS, Scott C.; WOOD, Sally L. : Computational imaging systems : joint design and end-to-end optimality. Dans : *Appl. Opt.* 47 (2008), Avril, Num. 10, p. B86-b103. <https://doi.org/10.1364/AO.47.000b86>. – DOI 10.1364/AO.47.000b86
- [Neyman *et al.* 1933] NEYMAN, Jerzy; PEARSON, Egon S.; PEARSON, Karl : IX. On the problem of the most efficient tests of statistical hypotheses. Dans : *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical or Physical Character* 231 (1933), Num. 694-706, p. 289-337. <https://doi.org/10.1098/rsta.1933.0009>. – DOI 10.1098/rsta.1933.0009
- [Ober *et al.* 2004] OBER, Raimund J.; RAM, Sripad; WARD, E. S. : Localization Accuracy in Single-Molecule Microscopy. Dans : *Biophysical Journal* 86 (2004), Num. 2, p. 1185-1200. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74193-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74193-4). – DOI 10.1016/S0006-3495(04)74193-4. – ISSN 0006-3495
- [Pavani et Piestun 2008a] PAVANI, Sri Rama P.; PIESTUN, Rafael : High-efficiency rotating point spread functions. Dans : *Opt. Express* 16 (2008), Mars, Num. 5, p. 3484-3489. <https://doi.org/10.1364/OE.16.003484>. – DOI 10.1364/OE.16.003484
- [Pavani et Piestun 2008b] PAVANI, Sri Rama P.; PIESTUN, Rafael : Three dimensional tracking of fluorescent microparticles using a photon-limited double-helix response system. Dans : *Opt. Express* 16 (2008), Décembre, Num. 26, p. 22048-22057. <https://doi.org/10.1364/OE.16.022048>. – DOI 10.1364/OE.16.022048
- [Perry 1943] PERRY, J W. : Thermal effects upon the performance of lens systems. Dans : *Proceedings of the Physical Society* 55 (1943), Juillet, Num. 4, p. 257-285. <https://doi.org/10.1088/0959-5309/55/4/301>. – DOI 10.1088/0959-5309/55/4/301
- [Piestun *et al.* 2000] PIESTUN, Rafael; SCHECHNER, Yoav Y.; SHAMIR, Joseph : Propagation-invariant wave fields with finite energy. Dans : *J. Opt. Soc. Am. A* 17 (2000), Février, Num. 2, p. 294-303. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.17.000294>. – DOI 10.1364/JOSAA.17.000294
- [Portilla et Barbero 2018] PORTILLA, Javier; BARBERO, Sergio : Hybrid digital-optical imaging design for reducing surface asphericity cost while keeping high performance . Dans : SMITH, Daniel G. (Éd.); WYROWSKI, Frank (Éd.); ERDMANN, Andreas (Éd.); International Society for Optics and Photonics (Événement) : *Computational Optics II* Vol. 10694 International Society for Optics and Photonics, SPIE, 2018, p. 28-37

- [Rayleigh 1896] RAYLEIGH, Lord : On the theory of optical images, with special reference to the microscope. Dans : *Philos. Mag.* 42 (1896), Num. 255, p. 167–195. <https://doi.org/10.1080/14786449608620902>. – DOI 10.1080/14786449608620902
- [Ren et Han 2021] REN, Jinhan; HAN, Kyu Y. : 2.5D Microscopy : Fast, High-Throughput Imaging via Volumetric Projection for Quantitative Subcellular Analysis. Dans : *ACS Photonics* 8 (2021), Mars, Num. 3, p. 933–942. <https://doi.org/10.1021/acsp Photonics.1c00012>. – DOI 10.1021/acsp Photonics.1c00012
- [Richards *et al.* 1959] RICHARDS, B.; WOLF, E.; GABOR, Dennis : Electromagnetic diffraction in optical systems, II. Structure of the image field in an aplanatic system. Dans : *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* 253 (1959), Num. 1274, p. 358–379. <https://doi.org/10.1098/rspa.1959.0200>. – DOI 10.1098/rspa.1959.0200
- [Robinson et Stork 2006] ROBINSON, M. D.; STORK, David G. : Joint Design of Lens Systems and Digital Image Processing. Dans : *International Optical Design*, Optical Society of America, 2006, p. Wb4
- [Rudin *et al.* 1992] RUDIN, Leonid I.; OSHER, Stanley; FATEMI, Emad : Nonlinear total variation based noise removal algorithms. Dans : *Physica D : Nonlinear Phenomena* 60 (1992), Num. 1, p. 259–268. [https://doi.org/10.1016/0167-2789\(92\)90242-F](https://doi.org/10.1016/0167-2789(92)90242-F). – DOI 10.1016/0167-2789(92)90242-F – ISSN 0167-2789
- [Rust *et al.* 2006] RUST, Michael J.; BATES, Mark; ZHUANG, Xiaowei : Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). Dans : *Nature Methods* 3 (2006), Octobre, Num. 10, p. 793–796. <https://doi.org/10.1038/nmeth929>. – DOI 10.1038/nmeth929. – ISSN 1548-7105
- [Sage *et al.* 2019] SAGE, Daniel; PHAM, Thanh-An; BABCOCK, Hazen; LUKES, Tomas; PENGU, Thomas; CHAO, Jerry; VELMURUGAN, Ramraj; HERBERT, Alex; AGRAWAL, Anurag; COLABRESE, Silvia; WHEELER, Ann; ARCHETTI, Anna; RIEGER, Bernd; OBER, Raimund; HAGEN, Guy M.; SIBARITA, Jean-Baptiste; RIES, Jonas; HENRIQUES, Ricardo; UNSER, Michael; HOLDEN, Seamus : Super-resolution fight club : assessment of 2D and 3D single-molecule localization microscopy software. Dans : *Nature Methods* 16 (2019), Mai, Num. 5, p. 387–395. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0364-4>. – DOI 10.1038/s41592-019-0364-4. – ISSN 1548-7105
- [Sharonov et Hochstrasser 2006] SHARONOV, Alexey; HOCHSTRASSER, Robin M. : Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (2006), Num. 50, p. 18911–18916. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609643104>. – DOI 10.1073/pnas.0609643104. – ISSN 0027-8424
- [Shechtman *et al.* 2014] SHECHTMAN, Yoav; SAHL, Steffen J.; BACKER, Adam S.; MOERNER, W. E. : Optimal Point Spread Function Design for 3D Imaging. Dans : *Phys. Rev. Lett.* 113 (2014), Septembre, p. 133902. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.113.133902>. – DOI 10.1103/PhysRevLett.113.133902

- [Sherif *et al.* 2004] SHERIF, Sherif S.; CATHEY, Wade T.; DOWSKI, Ed R. : Phase plate to extend the depth of field of incoherent hybrid imaging systems. Dans : *Appl. Opt.* 43 (2004), Mai, Num. 13, p. 2709–2721. <https://doi.org/10.1364/AO.43.002709>. – DOI 10.1364/AO.43.002709
- [Siemons *et al.* 2018] SIEMONS, M.; HULLEMAN, C. N.; THORSEN, R. ; SMITH, C. S.; STALLINGA, S. : High precision wavefront control in point spread function engineering for single emitter localization. Dans : *Opt. Express* 26 (2018), Avril, Num. 7, p. 8397–8416. <https://doi.org/10.1364/OE.26.008397>. – DOI 10.1364/OE.26.008397
- [Sitzmann *et al.* 2018] SITZMANN, Vincent; DIAMOND, Steven; PENG, Yifan; DUN, Xiong; BOYD, Stephen; HEIDRICH, Wolfgang; HEIDE, Felix; WETZSTEIN, Gordon : End-to-End Optimization of Optics and Image Processing for Achromatic Extended Depth of Field and Super-Resolution Imaging. Dans : *ACM Trans. Graph.* 37 (2018), Juillet, Num. 4. <https://doi.org/10.1145/3197517.3201333>. – DOI 10.1145/3197517.3201333. – ISSN 0730–0301
- [Stork et Robinson 2008] STORK, David G.; ROBINSON, M. D. : Theoretical foundations for joint digital-optical analysis of electro-optical imaging systems. Dans : *Appl. Opt.* 47 (2008), Avril, Num. 10, p. B64–B75. <https://doi.org/10.1364/AO.47.000B64>. – DOI 10.1364/AO.47.000B64
- [Tao et Nicholson 1995] TAO, L.; NICHOLSON, C. : The three-dimensional point spread functions of a microscope objective in image and object space. Dans : *Journal of Microscopy* 178 (1995), Num. 3, p. 267–271. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1995.tb03604.x>. – DOI 10.1111/j.1365–2818.1995.tb03604.x
- [Thorsen *et al.* 2018] THORSEN, Rasmus .; HULLEMAN, Christiaan N.; HAMMER, Mathias; GRÜNWARD, David; STALLINGA, Sjoerd; RIEGER, Bernd : Impact of optical aberrations on axial position determination by photometry. Dans : *Nature Methods* 15 (2018), Décembre, Num. 12, p. 989–990. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0227-4>. – DOI 10.1038/s41592–018–0227–4. – ISSN 1548–7105
- [Titterington 1985] TITTERINGTON, D. M. : Common Structure of Smoothing Techniques in Statistics. Dans : *International Statistical Review* 53 (1985), Num. 2, p. 141–170. <https://doi.org/10.2307/1402932>. – DOI 10.2307/1402932
- [Török et Varga 1997] TÖRÖK, P.; VARGA, P. : Electromagnetic diffraction of light focused through a stratified medium. Dans : *Appl. Opt.* 36 (1997), Avril, Num. 11, p. 2305–2312. <https://doi.org/10.1364/AO.36.002305>. – DOI 10.1364/AO.36.002305
- [Trouvé *et al.* 2013] TROUVÉ, Pauline; CHAMPAGNAT, Frédéric; BESNERAIS, Guy L.; SABATER, Jacques; AVIGNON, Thierry; IDIER, Jérôme : Passive depth estimation using chromatic aberration and a depth from defocus approach. Dans : *Appl. Opt.* 52 (2013), Octobre, Num. 29, p. 7152–7164. <https://doi.org/10.1364/AO.52.007152>. – DOI 10.1364/AO.52.007152

- [Trouvé *et al.* 2013] TROUVÉ, Pauline; CHAMPAGNAT, Frédéric; LE BESNERAIS, Guy; DRUART, Guillaume; IDIER, Jérôme : Design of a Chromatic 3D Camera with an End-to-End Performance Model Approach. Dans : *The IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR) Workshops*, 2013
- [Unser *et al.* 2017] UNSER, Michael; SOUBIES, Emmanuel; SOULEZ, Ferréol; MCCANN, Michael; DONATI, Laurène : GlobalBioIm : A Unifying Computational Framework for Solving Inverse Problems. Dans : *Imaging and Applied Optics 2017 (3D, AIO, COSI, IS, MATH, pcAOP)*, Optical Society of America, 2017, p. CTu1B.1
- [Vettenburg *et al.* 2010] VETTENBURG, Tom; BUSTIN, Nicholas; HARVEY, Andrew R. : Fidelity optimization for aberration-tolerant hybrid imaging systems. Dans : *Opt. Express* 18 (2010), Avril, Num. 9, p. 9220–9228. <https://doi.org/10.1364/OE.18.009220>. – DOI 10.1364/OE.18.009220
- [Waltham 2013] *Chapitre 23*. Dans : WALTHAM, Nick : *CCD and CMOS sensors*. New York, NY : Springer New York, 2013. – ISBN 9781461478041, p. 423–442
- [Wang *et al.* 2003] WANG, Z.; SIMONCELLI, E. P.; BOVIK, A. C. : Multiscale structural similarity for image quality assessment. Dans : *The Thirty-Seventh Asilomar Conference on Signals, Systems Computers, 2003* Vol. 2, 2003, p. 1398–1402 Vol.2
- [Xu *et al.* 2020] XU, Fan; MA, Donghan; MACPHERSON, Kathryn P.; LIU, Sheng; BU, Ye; WANG, Yu; TANG, Yu; BI, Cheng; KWOK, Tim; CHUBYKIN, Alexander A.; YIN, Peng; CALVE, Sarah; LANDRETH, Gary E.; HUANG, Fang : Three-dimensional nanoscopy of whole cells and tissues with in situ point spread function retrieval. Dans : *Nature Methods* 17 (2020), Mai, Num. 5, p. 531–540. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0816-x>. – DOI 10.1038/s41592-020-0816-x. – ISSN 1548-7105
- [Yang *et al.* 2007] YANG, Qingguo; LIU, Liren; SUN, Jianfeng : Optimized phase pupil masks for extended depth of field. Dans : *Optics Communications* 272 (2007), Num. 1, p. 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2006.11.021>. – DOI 10.1016/j.optcom.2006.11.021. – ISSN 0030-4018
- [Zahreddine et Cogswell 2015] ZAHREDDINE, Ramzi N.; COGSWELL, Carol J. : Total variation regularized deconvolution for extended depth of field microscopy. Dans : *Appl. Opt.* 54 (2015), Mars, Num. 9, p. 2244–2254. <https://doi.org/10.1364/AO.54.002244>. – DOI 10.1364/AO.54.002244
- [Zammit *et al.* 2014] ZAMMIT, Paul; HARVEY, Andrew R.; CARLES, Guillem : Extended depth-of-field imaging and ranging in a snapshot. Dans : *Optica* 1 (2014), Octobre, Num. 4, p. 209–216. <https://doi.org/10.1364/OPTICA.1.000209>. – DOI 10.1364/OPTICA.1.000209
- [Zhao *et al.* 2017] ZHAO, Hang; GALLO, Orazio; FROSIO, Iuri; KAUTZ, Jan : Loss Functions for Image Restoration With Neural Networks. Dans : *IEEE Transactions on Computational Imaging* 3 (2017), Num. 1, p. 47–57. <https://doi.org/10.1109/TCI.2016.2644865>. – DOI 10.1109/TCI.2016.2644865

[Zhou *et al.* 2009] ZHOU, Feng; LI, Guangwei; ZHANG, Haitao; WANG, Dongsheng : Rational phase mask to extend the depth of field in optical-digital hybrid imaging systems. Dans : *Opt. Lett.* 34 (2009), Février, Num. 3, p. 380–382. <https://doi.org/10.1364/OL.34.000380>. – DOI 10.1364/OL.34.000380

[Zhou et Carles 2020] ZHOU, Yongzhuang; CARLES, Guillem : Precise 3D particle localization over large axial ranges using secondary astigmatism. Dans : *Opt. Lett.* 45 (2020), Avril, Num. 8, p. 2466–2469. <https://doi.org/10.1364/OL.388695>. – DOI 10.1364/OL.388695

REMERCIEMENTS

Je remercie François GOUDAIL, mon directeur de thèse, et Caroline KULCSÁR, ma co-directrice de thèse, pour leur disponibilité, leurs encouragements et leurs brillantes intuitions. Ensemble, nous avons réalisé un véritable travail exploratoire sur la problématique de co-conception pour la microscopie par localisation de molécule unique. Ce travail nous a conduit à encadrer plusieurs stagiaires, à publier dans différentes revues scientifiques et à présenter nos travaux à l'international. Je tire de ces années de recherche une grande fierté. C'est en grande partie grâce à eux!

Je tiens également à remercier Laurent COGNET et son équipe qui sont à l'initiative de ce projet. La collaboration entre nos deux équipes a permis de définir les objectifs de cette thèse et de réaliser les premiers tests expérimentaux pour la validation des modèles d'imagerie utilisés.

Je remercie Olivier HAEBERLÉ et Jérôme IDIER, mes deux rapporteurs, pour leurs lectures attentives du manuscrit et leurs suggestions. J'exprime aussi ma profonde gratitude aux autres membres du jury, à savoir, Sandrine LÉVÊQUE-FORT (présidente), Laure BLANC-FÉRAUD et Daniel SAGE dont les questions et suggestions, le jour de ma soutenance, ont suscité des débats stimulants.

Un grand merci à tous les membres du groupe *Imagerie et Information* et plus généralement aux membres du Laboratoire Charles Fabry avec lesquels j'ai eu la chance et le plaisir d'interagir. Je remercie en particulier Anne-Lise COUTROT pour la fabrication des masques de phase, Hervé SAUER pour ses précieux conseils / cours d'optique, Alice FONTBONNE pour nos nombreux échanges dans notre bureau partagé et Benjamin LE TEURNIER pour avoir accepté d'endosser la responsabilité technique de diffuser ma soutenance en direct.

Je remercie également Romain DUVERGER, Nathanaël HULARD, Hugo PITOT-BELIN, et Damien RINNERT, quatre jeunes stagiaires brillants venant de l'Institut d'Optique Graduate School (IOGS) avec lesquels j'ai eu le plaisir de travailler.

Je remercie les équipes pédagogiques d'électronique, de traitement du signal et d'automatique de l'IOGS au sein desquelles j'ai eu la chance d'enseigner. Un grand merci en particulier à Fabienne BERNARD et à Julien VILLEMEJANE.

Et pour finir, un grand merci à ma famille, et notamment à mes parents, pour leur soutien sans faille. Elle m'accompagne et m'aide chaque jour à me surpasser pour réaliser mes rêves!

LISTE DES PUBLICATIONS ET CONFÉRENCES

PUBLICATIONS DANS DES REVUES AVEC COMITÉ DE LECTURE

4. **O. LÉVÊQUE**, C. KULCSÁR, A. LEE, P. BON, L. COGNET, F. GOUDAIL, *On the validity domain of maximum likelihood estimators for depth-of-field extension in single-molecule localization microscopy*, *J. Opt. Soc. Am. A* 39, 37–43 (2022).
3. **O. LÉVÊQUE**, R. DUVERGER, H. SAUER, C. KULCSÁR, F. GOUDAIL, *Influence of high numerical aperture on depth-of-field enhancing phase mask optimization in localization microscopy*, *J. Opt. Soc. Am. A* 38, 1380–1390 (2021).
2. **O. LÉVÊQUE**, C. KULCSÁR, F. GOUDAIL, *Comparison of linear and nonlinear deconvolution algorithms for co-optimization of depth-of-field enhancing binary phase masks*, *OSA Continuum* 4, 589–601 (2021).
1. **O. LÉVÊQUE**, C. KULCSÁR, A. LEE, H. SAUER, A. ALEKSANYAN, P. BON, L. COGNET, F. GOUDAIL, *Co-designed annular binary phase masks for depth-of-field extension in single-molecule localization microscopy*, *Opt. Express* 28, 32426–32446 (2020).

CONFÉRENCES INTERNATIONALES AVEC ACTES

3. **O. LÉVÊQUE**, C. KULCSÁR, F. GOUDAIL, *Can better performance be obtained when an imaging system is co-optimized with a nonlinear deconvolution algorithm?*, *Proc. SPIE 11866*, Electro-Optical and Infrared Systems: Technology and Applications XVIII and Electro-Optical Remote Sensing XV, 118660A (13 Septembre 2021).
2. **O. LÉVÊQUE**, C. KULCSÁR, A. LEE, P. BON, L. COGNET, F. GOUDAIL, *How to assess depth-of-field extension strategies applied to single-molecule super-resolution microscopes?*, in *Imaging and Applied Optics Congress*, OSA Technical Digest (Optical Society of America, 2021), paper CF4B.5.
1. **O. LÉVÊQUE**, C. KULCSÁR, H. SAUER, A. LEE, P. BON, L. COGNET, F. GOUDAIL, *Can phase masks extend depth-of-field in localization microscopy?*, *Proc. SPIE 11351*, Unconventional Optical Imaging II, 113510E (30 Mars 2020).

CONFÉRENCES NATIONALES OU FRANCOPHONES

6. **O. LÉVÊQUE**, C. KULCSÁR, A. LEE, P. BON, L. COGNET, F. GOUDAIL. *Masques de phases optimisés pour l'augmentation de profondeur de champ en microscopie de molécules uniques (MASK)*, Présentation scientifique — projets de l'appel 2019, AG du GdR-ISIS (CNRS), Juin 2021, Biarritz, France.
5. **O. LÉVÊQUE**, C. KULCSÁR, F. GOUDAIL, *Quelle influence peut avoir le modèle d'imagerie sur l'optimisation de masques de phase augmentant la profondeur de champ en microscopie de localisation?*, *Journée Co-conception de systèmes hybrides*, GdR-ISIS (CNRS), Mai 2021, Paris, France.

4. **O. LÉVÊQUE**, C. KULCSÁR, F. GOUDAIL, *Obtient-on de meilleures performances lorsqu'un système d'imagerie est co-optimisé avec un algorithme de déconvolution non linéaire?*, Journées d'Imagerie Optique Non Conventionnelle, GdR-ISIS (CNRS), Mars 2021, Paris, France.
3. **O. LÉVÊQUE**, C. KULCSÁR, F. GOUDAIL, *Co-conception en imagerie PALM : comment imager dans les milieux épais?*, Journées d'Imagerie Optique Non Conventionnelle, GdR-ISIS (CNRS), Mars 2020, Paris, France.
2. **O. LÉVÊQUE**, *Augmentation de la profondeur de champ d'un système d'imagerie pour la localisation de molécules uniques*, Séminaire des doctorants, LCF-IOGS, Janvier 2020, Palaiseau, France.
1. **O. LÉVÊQUE**, C. KULCSÁR, F. GOUDAIL, *Optimisation de masques de phase binaires pour l'augmentation de la profondeur de champ en imagerie de la molécule unique*, Journée Co-conception de systèmes hybrides, GdR-ISIS (CNRS), Octobre 2019, Paris, France.

VULGARISATION SCIENTIFIQUE

1. **O. LÉVÊQUE**, *L'infiniment petit sous observation : Finale MT180 Université Paris-Saclay, Ma Thèse en 180 secondes*, Mars 2020, Palaiseau, France.