amU
Aix Marseille Université

NNT : 2024AIXM0365

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à AMU — Aix-Marseille Université
le 21 novembre 2024 par

Guillaume GIROUSSENS

Microscopie par éclairements aléatoires (RIM) : Nouvelles méthodes d'inversion et extensions

Discipline
Physique et science de la Matière

Spécialité
Optique, Photonique et Traitement d'Image

École doctorale
ED 352 Physique et science de la matière

Laboratoire/Partenaires de recherche
Institut Fresnel (Marseille)
Laboratoire des Sciences du Numérique de Nantes (Nantes)
Centre de Biologie Intrégrative (Toulouse)

Composition du jury

Irène WANG Ingénieure de recherche	Rapporteure (LIPhy)
François ORIEUX Maître de conférences	Rapporteur (L2S)
Nicolas DUCROS Ingénieure de recherche	Examinateur (Créatis)
Alexandra FRAGOLA Professeure des universités	Présidente du jury (ISMO)
Anne SENTENAC Directrice de recherche	Directrice de thèse (Institut Fresnel)
Jérôme IDIER Directeur de recherche	Co-directeur de thèse (LS2N)
Marc ALLAIN Maître de Conférence	Membre invité (Institut Fresnel)

INSTITUT FRESNEL
LS2N
CBI Toulouse Centre de Biologie Intégrative

Affidavit

Je soussigné, [Guillaume Giroussens], déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Anne Sentenac et Jérôme Idier, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte AMU relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille le 21 Novembre 2024



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et participation aux conférences

Liste des publications et/ou brevets réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. "Fast super-resolved reconstructions in fluorescence random illumination microscopy (RIM)", *IEEE Transaction on Computational Imaging*, Guillaume Giroussens, Simon Labouesse, Marc Allain, Thomas Mangeat, Lorry Mazzella, Loïc le Goff, Anne Sentenac, and Jérôme Idier
   Accepté - https ://hal.science/hal-04139086/document
2. "Superresolution capacity of variance-based stochastic fluorescence microscopy : From random illumination microscopy to superresolved optical fluctuation imaging", *Physical Review A*, Simon Labouesse, Jérôme Idier, Marc Allain, Guillaume Giroussens, Thomas Mangeat, and Anne Sentenac
   Publié - https ://journals.aps.org/pra/abstract/10.1103/PhysRevA.109.033525
3. "Extended-depth of field random illumination microscopy (EDF-RIM) provides super-resolved projective imaging", *Light : Science & Applications*, Loïc Le Goff, Lorry Mazzella, Benoit Rogez, Guillaume Giroussens, Marc Allain, Frédéric Galland, Anne Sentenac, Jérome Idier, Carla Martins, Mehdi Saadaoui, Thomas Mangeat, Justine Creff, Hao Li, Simon Labouesse, and Ronan Bouzignac
   Publié - https ://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2024/05/14/2023.10.30.564754.full.pdf

Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

1. SIAM Conference on imaging science (2022) (Speaker)
2. Congrès de la Société Française d'Optique (2022) (Speaker)
3. Journée de l'Optique Non Conventionnelles (2023) (Speaker)
4. Conférence du Groupe de Recherche et d'Etude en Traitement du Signal et des Images (2023) (Speaker)
5. Conférence Focus On Microscopy (2024) (Speaker)

Résumé

L'intensité d'un champ électromagnétique de longueur d'onde λ enregistrée par une caméra ne peut présenter de fréquences spatiales plus grandes que $2/\lambda$. Cette limite fondamentale provient du filtrage passe-bas imposé par la propagation des ondes et ne peut être évitée. Ainsi, la résolution des meilleurs microscopes optiques classiques est de l'ordre de 200 nm. Cependant, de nombreuses applications, en particulier dans le domaine de la biologie, bénéficieraient de techniques de microscopie optique présentant une meilleure résolution. La question est alors, comment extraire des informations fréquentielles sur l'échantillon au-delà de $2/\lambda$ à partir d'images forcément limitées en fréquence à $2/\lambda$. Une solution largement répandue est de combiner les diverses informations sur l'échantillon contenues dans des images acquises sous différentes illuminations.

Ainsi, la méthode *Random Illumination Microscopy* (RIM) introduite en 2019 pour la microscopie de fluorescence, permet de reconstruire une image de l'échantillon deux fois plus résolue que celle d'un microscope standard à partir d'une centaine d'images obtenues sous différents éclairements de *speckle* inconnus. L'intérêt principal de cette méthode est qu'elle se passe de l'estimation *a posteriori* des éclairements lors de la reconstruction. Pour cela, RIM se base sur la résolution d'un problème inverse non linéaire de type *variance matching*. En pratique, ceci revient à chercher à trouver l'objet dont la variance théorique correspond au mieux à la variance des images mesurées.

RIM a été développé dans le cadre simplifié d'un échantillon bidimensionnel (2D), où seule la fluorescence au niveau du plan focal contribue au signal utile, et la fluorescence provenant de structures hors-focus est modélisée comme un bruit de fond. L'objectif de ma thèse est l'extension de RIM à la reconstruction d'échantillons tridimensionnels (3D). Cette extension requiert d'améliorer les méthodes numériques, afin de pouvoir traiter des données bien plus nombreuses, et d'étudier les montages optiques, pour préciser les modalités d'acquisition des images tridimensionnelles.

Pour cela, j'ai développé deux nouveaux schémas d'inversion pour la reconstruction RIM, basés sur l'écart-type plutôt que la variance des données. Le premier schéma est un algorithme approché. Il propose une déconvolution linéaire de l'écart-type par un filtre adapté. Cette déconvolution permet des gains de résolution de l'ordre de 50% sur des objets denses, avec un temps de calcul compatible avec une reconstruction temps réel. Le deuxième schéma de reconstruction estime de manière itérative la densité de fluorescence de façon à minimiser l'erreur entre l'écart-type expérimental et l'écart-type modèle. En introduisant un préconditionneur adapté, cette inversion itérative basée sur l'écart-type s'est avérée au moins 20 fois plus rapide que la méthode itérative de variance matching précédemment développée, tout en conservant le même niveau

de super-résolution.

J'ai ensuite étudié les différentes modalités d'acquisition d'images 3D couramment utilisées en microscopie optique (translation de l'échantillon ou translation du plan focal objet par *remote focusing*). J'ai montré que les images 3D réalisées avec un système de *remote focusing* sont parfaitement adaptées à l'extension de la théorie RIM en 3D. Elles permettent d'obtenir des reconstructions avec des résolutions axiale et transverse optimales. Cette approche est particulièrement adaptée aux applications qui souffrent d'un budget de photons limité. J'ai montré également que des acquisitions obtenues en translatant l'échantillon, plus simples à mettre en œuvre expérimentalement, ne dégradent que faiblement la qualité de l'image reconstruite.

La dernière contribution de cette thèse sort du cadre de la microscopie de fluorescence, et s'intéresse à l'applicabilité de la méthode RIM pour l'imagerie cohérente. Dans ce cas, on peut montrer qu'une image d'intensité standard acquise en *brightfield* ou *darkfield*, est directement équivalente à une variance asymptotique d'images sous éclairements de speckle. On montre alors que la méthode RIM est équivalente à une méthode de Ptychographie de Fourier Multiplexée, qui permet simultanément une augmentation de la résolution ainsi que la récupération de l'information de phase. Le formalisme de RIM apporte cependant une nouvelle vision sur la Ptychographie de Fourier puisqu'il permet de réduire le nombre d'images nécessaires à la reconstruction.

Mots clés : Imagerie computationnelle, Super-résolution, Microscopie de fluorescence, Speckle, Problème inverse quadratique, Reconstruction de phase, Ptychographie de Fourier

Abstract

The intensity of an electromagnetic field of wavelength λ recorded by a camera cannot have spatial frequencies greater than $2/\lambda$. This fundamental limit arises from the low-pass filtering imposed by wave propagation and cannot be avoided. As a result, the resolution of the best conventional optical microscopes is of the order of 200 nm. However, many applications, particularly in biology, would benefit from optical microscopy techniques with better resolution. The question then is how to extract frequency information on the sample beyond $2/\lambda$ from images necessarily limited in frequency to $2/\lambda$. A widely used solution is to combine the various information on the sample contained in images acquired under different illuminations.

The Random Illumination Microscopy (RIM) method, introduced in 2019 for fluorescence microscopy, reconstructs an image of the sample with twice the resolution of that obtained with a standard microscope, from around a hundred images obtained under different illuminations of unknown intensity. The main advantage of this method is that it dispenses with the need for a posteriori estimation of illuminances during reconstruction. To achieve this, RIM is based on the resolution of a nonlinear inverse problem of the variance matching type. In practice, this means trying to find the object whose theoretical variance best matches the variance of the recorded images.

RIM has been developed within the simplified framework of a two-dimensional (2D) sample, where only fluorescence at the focal plane contributes to the useful signal, and fluorescence from out-of-focus structures is modeled as background noise. The aim of my thesis is to extend RIM to the reconstruction of three-dimensional (3D) samples. This requires improvements in numerical methods, to be able to process much more data, and the study of optical setups, in order to specify the methods used to acquire three-dimensional images.

To this end, I have developed two new inversion schemes for RIM reconstruction, based on the standard deviation rather than the variance of the data. The first scheme is an approximate algorithm. It proposes a linear deconvolution of standard deviation by a suitable filter. This deconvolution enables resolution gains of the order of 50% on dense objects, with a computation time compatible with real-time reconstruction. The second reconstruction scheme iteratively estimates the fluorescence density to minimize the error between the experimental standard deviation and the model standard deviation. By introducing a suitable preconditioner, this standard deviation-based iterative inversion proved to be at least 20 times faster than the previously developed iterative variance matching method, while maintaining the same level of super-resolution.

I then studied the different 3D acquisition modalities commonly used in optical

microscopy (sample translation or translation of the object focal plane by remote focusing). I have shown that 3D images produced with a remote focusing are perfectly suited to extend RIM theory into 3D. They enable us to obtain reconstructions with optimal axial and transverse resolutions. This approach is particularly interesting to applications that suffer from a limited photon budget. I have also shown that acquisitions obtained by translating the sample, which are simpler to implement experimentally, only slightly degrade the quality of the reconstructed image.

The final contribution of this thesis goes beyond fluorescence microscopy, and looks at the applicability of the RIM method to coherent imaging. In this case, it can be shown that a standard intensity image acquired in brightfield or darkfield, is directly equivalent to an asymptotic variance of images under speckle illuminations. We then show that the RIM method is equivalent to a Multiplexed Fourier Ptychography method, which simultaneously increases resolution and recovers phase information. The RIM formalism brings a new perspective to Fourier Ptychography, as it reduces the number of images required for reconstruction.

Keywords: Computational Imaging, Super-resolution, Fluorescence Microscopy, Speckle, Qudratic inverse problems, Phase reconstruction, Fourier ptychography

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Irène Wang et François Orieux qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteur de ce manuscrit. Je remercie également Alexandra Fragola et Nicolas Ducros, pour leur participation au jury lors de la soutenance de ce travail.

Je remercie également Lorry Mazzella, Benoit Rogez, Loïc Le Goff de l'équipe MOSAIC de l'Institut Fresnel, qui ont travaillé sur le développement d'un microscope RIM 3D au sein de l'Institut Fresnel, me permettant de facilment tester mon travail sur des données expérimentales. Ces données expérimentales ont été complétées par des données acquises par Thomas Mangeat et Simon Labouesse au Centre de Biologie Intégrative de Toulouse, qui m'ont également formé aux contraintes expérimentales en microscopie.

Enfin, je remercie mes encadrants de thèse Jérôme Idier du Laboratoire des Sciences du Numérique de Nantes et Anne Sentenac de m'avoir proposé ce sujet de recherche et pour leur accompagnement pendant ces quatre années de travail. Je remercie plus particulièrement Marc Allain, qui bien que n'étant pas officiellement directeur de thèse, aurait parfaitement pu remplir ce rôle en étant présent pour répondre à mes interrogations scientifiques, administratives et personnelles.

Table des matières

Affidavit 2

Liste de publications et participation aux conférences 3

Abstract 6

Remerciements 8

Table des matières 9

Table des figures 13

Liste des tableaux 16

Introduction 17

1. Généralités sur la microscopie de fluorescence 20
1.1. Modélisation de l'image d'un microscope . . . 22
1.1.1. Description du champ électrique . . . 22
1.1.2. Principe du microscope . . . 23
1.1.3. Champ en présence d'une source unique . . . 25
1.1.4. Champ en présence de multiples sources . . . 26
1.1.5. Possibles simplifications . . . 27
1.1.6. Microscopie incohérente . . . 28
1.1.7. Fonction de Transfert Optique (OTF) . . . 29
1.2. Application à la microscopie de Fluorescence . . . 32
1.2.1. Principe général de la fluorescence . . . 32
1.2.2. Intensité de la fluorescence . . . 32
1.2.3. Modèle final de formation d'image . . . 33
1.3. Reconstruction de la densité de fluorescence . . . 34
1.3.1. Image Widefield . . . 34
1.3.2. Déconvolution . . . 35
1.3.3. Généralisation aux problèmes inverses . . . 38
1.4. Super-résolution par imagerie computationnelle . . . 39
1.4.1. Super-résolution à l'aide d'*a priori* . . . 39
1.4.2. Super-résolution par fluctuation optique . . . 40
1.4.3. Super-résolution par éclairements structurés . . . 41

2. Théorie de la microscopie par éclairements aléatoires (RIM) 47
2.1. Généralités . . . 48
2.1.1. Modèle d'imagerie et hypothèses . . . 48
2.1.2. Propriétés des éclairements de speckle . . . 49
2.2. Capacité de super-résolution de RIM . . . 52
2.2.1. Cas de la moyenne . . . 52
2.2.2. Cas de la covariance . . . 52
2.2.3. Cas de la variance . . . 53
2.3. Reformulation de la variance . . . 56
2.3.1. Décomposition spectrale . . . 56
2.3.2. Approximation de la variance par troncature . . . 58
2.3.3. Cas particulier de la troncature de rang 1 . . . 60
2.4. Quelques cas particuliers . . . 62
2.4.1. Cas particulier des sources isolées . . . 62
2.4.2. Cas particulier d'illuminations . . . 64
2.4.3. Illumination totalement correllée . . . 64
2.4.4. Illumination totalement décorrélée . . . 65
2.5. Conclusion . . . 65

3. Nouvelles méthodes d'inversion pour RIM 66
3.1. Prérequis pour l'implémentation numérique . . . 67
3.1.1. Discrétisation du problème . . . 67
3.1.2. Approche par *moment matching* . . . 68
3.1.3. Calcul efficace de la variance modèle . . . 69
3.1.4. Statistiques empiriques . . . 72
3.2. Première méthode de reconstruction : RIM-VAR . . . 73
3.2.1. Critère à minimiser . . . 73
3.2.2. Accélération de l'algorithme . . . 73
3.3. Nouvel estimateur non itératif : RIM-CF . . . 77
3.4. Nouvel algorithme itératif : RIM-STD . . . 82
3.4.1. Nouvelle proposition de critère . . . 82
3.4.2. Calcul du gradient et du Hessien du critère . . . 82
3.4.3. Schéma final de gradient conjugué préconditionné . . . 86
3.5. Comparatif des performances . . . 87
3.5.1. Illustration sur un problème 1D . . . 87
3.5.2. Cas des émetteurs isolés . . . 92
3.5.3. Illustration sur des problèmes 2D . . . 97
3.5.4. Traitement de données expérimentales . . . 106

4. Application à l'imagerie 3D 109
4.1. Spécificités de l'imagerie 3D . . . 110
4.1.1. Image d'une coupe transverse de l'échantillon . . . 110
4.1.2. Acquisition d'une image 3D . . . 111
4.1.3. Retour en imagerie conventionnelle . . . 114

4.2. Super-résolution 3D . . . 116
4.2.1. Enjeux . . . 116
4.2.2. Méthodes par éclairements structurés . . . 116
4.2.3. Autres méthodes de super-résolution 3D . . . 119
4.3. Mise en œuvre de RIM 3D . . . 120
4.3.1. Acquisition des images . . . 120
4.3.2. Calcul de la variance . . . 122
4.3.3. Discussion relative au préfiltrage . . . 124
4.4. Approches inverses pour RIM 3D . . . 126
4.5. Résultats . . . 127
4.5.1. Comparaison des méthodes en simulation numérique . . . 127
4.5.2. Préfiltrage 3D sur des acquisitions sans *remote focusing* . . . 128
4.5.3. Simulation 3D . . . 130
4.5.4. Test sur données expérimentales . . . 132
4.6. Conclusion sur le fonctionnement de RIM 3D . . . 136

5. Extension de RIM pour l'imagerie cohérente 137
5.1. Principe de l'imagerie cohérente . . . 138
5.1.1. Montage en transmission . . . 138
5.1.2. Modèle *brightfield* . . . 141
5.1.3. Modèle *darkfield* . . . 142
5.1.4. Détection sur la caméra . . . 142
5.2. Liens avec la ptychographie . . . 145
5.2.1. Méthode de ptychographie de Fourier multiplexée . . . 146
5.3. Schéma numérique pour la reconstruction RIM cohérent . . . 147
5.3.1. Discrétisation des mesures . . . 147
5.3.2. Schéma itératif . . . 148
5.4. Reconstruction de l'échantillon complexe en simulation . . . 150
5.4.1. Simulation d'un problème de transmittance . . . 150
5.4.2. Simulation d'un problème darkfield . . . 154
5.5. Conclusion . . . 157

Conclusion 159

Bibliographie 162

ANNEXES 172
A. Preuve de la Proposition 1 . . . 173
A.1. Rappels sur RIM . . . 173
A.2. Positivité de u_1 . . . 173
A.3. Preuve du support spectral Ω_{u_1} . . . 174
B. Approche par algorithme MM (Minimize Majoration) pour RIM-STD . . . 178
B.1. Construction d'un schéma par approximation majorante . . . 178
B.2. Lien avec le préconditionneur de RIM-STD . . . 180

C. Calcul du pas pour l'algorithme RIM-STD 181
D. Modélisation du préfiltrage 3D 184
D.1. Cas du préfiltrage sur des acquisitions en *remote focusing* 184
D.2. Cas du préfiltrage sur des acquisitions en translatant l'échantillon 185
D.3. Cas du préfiltrage sur des acquisitions plan par plan 185
E. Cas d'équivalence entre les décompositions RIM et MPFM 186
F. Lien entre RIM et la reconstruction de phase 188
F.1. Rappel sur la reconstruction de phase 188
F.2. Le problème RIM 189
F.3. Illustration géométrique sur un problème de signe 190

Table des figures

1.1. Montage d'un microscope en 4f 24
1.2. Support des OTF en 3D 31
1.3. Support des OTF en 2D 31
1.4. Montage en épi-fluorescence 33
1.5. Représentation des différents critères de résolution pour deux sources ponctuelles 34
1.6. Déconvolution de deux billes 36
1.7. Illustration des méthodes de déconvolution par filtre inverse 37
1.8. Domaine de fréquences accessibles en éclairant à l'aide d'une grille de lumière 43

2.1. Coupes transverse et axiale d'un speckle en intensité, simulée et expérimentale 49
2.2. Représentation des vecteurs propres de t dans le domaine de Fourier . 58
2.3. Décroissance des valeurs propres de l'opérateur T, et évolution de la qualité de l'approximation t_K dans le cadre de la microscopie en épi-fluorescence 59
2.4. Variance pour différents niveaux d'approximation 59
2.5. Illustration de la convergence de la somme décrite (2.39) 63

3.1. Illustration des intérêts du préfiltrage 76
3.2. Illustration de l'impact du préfiltrage pour la méthode RIM-VAR 77
3.3. Comparaison de différents estimateurs basés un traitement linéaire de la statistique d'ordre 2 79
3.4. Impact du préfiltrage sur RIM-CF avec et sans préfiltrage 80
3.5. Impact du préfiltrage sur le premier vecteur propre 81
3.6. Reconstruction RIM-VAR 1D 89
3.7. Reconstruction RIM-VAR 1D 90
3.8. Reconstruction RIM-VAR 1D 91
3.9. Test de la méthode RIM-CF sans préfiltrage sur une source unique . . . 92
3.10. Évolution des reconstructions de la méthode RIM-CF sans préfiltrage en fonction de la distance entre les sources 93
3.11. Test de la méthode RIM-CF avec et sans préfiltrage et comparaison avec la méthode RIM-STD, sur différentes densités de sources. 94
3.12. Etude de l'impact du choix de l'estimée initiale dans la reconstruction RIM. 96

3.13. Comparaison des différentes méthodes de reconstruction sur une mire de super-résolution à partir de l'écart-type asymptotique 98
3.14. Comparaison de l'écart-type avec différent nombre de speckles 100
3.15. Comparaison des différentes méthodes de reconstruction sur une mire de super-résolution à partir de l'écart-type formé à partir de 500 images de speckles 101
3.16. Illustration des données brutes et de leurs moyennes, et de leurs écarts-types pour différents niveaux de RSB 103
3.17. Reconstruction obtenue à partir des différentes méthodes d'inversion 105
3.18. Reconstruction 2D sur l'échantillon de vimentine présenté dans MANGEAT et al. 2021 [Fig.2-A] 106
3.19. Reconstruction 2D de l'intérieur d'un échantillon dense (Cellule U2OS) 108

4.1. Illustration des différences entre le modèle 2D et le modèle 3D 110
4.2. Coupe axiale et transverse de la PSF 3D et support dans l'espace de Fourier 111
4.3. Différence entre 112
4.4. Séparabilité de 2 sources localisées sur l'axe optique 114
4.5. Illustration du problème de sectionnement optique 115
4.6. Domaines de fréquences accessibles pour les différentes stratégies SIM 3D 118
4.7. Support de l'OTF du microscope et domaine de reconstruction théorique pour la méthode RIM 3D 119
4.8. Mire de résolution et image widefield en XZ 121
4.9. Différences entre les acquisitions RIM en XZ selon la modalité d'acquisition 122
4.10. Comparaison de l'écart-type 3D, pour 100, 500, et 2500 réalisations de speckle pour les 3 modalités d'acquisition 3D 124
4.11. Écart-type avant et après préfiltrage obtenu pour les différentes méthodes proposées. Le préfiltrage est 2D dans le cadre d'une acquisition plan par plan ou en translatant l'échantillon et 3D pour une acquisition en *remote focusing*. 126
4.12. Reconstruction XZ selon la madalité d'acquisition 128
4.13. Reconstruction sur chaque méthode avec un traitement complètement 3D 129
4.14. Simulation sur un échantillon 3D 131
4.15. Montage experimental pour le *remote focusing* 132
4.16. Reconstruction d'un échantillon de bille au dessus d'un plan fluorescent, calculée à partir de 200 images expérimentales acquises en *remote focusing*. 133
4.17. Reconstruction 3D sur échantillon biologique 135

5.1. Schéma d'un montage en transmission 139
5.2. Acquisitions *darkfield* et *brightfield* sur un échantillon de billes transparentes 144
5.3. Acquisitions sur un échantillon simulant un tapis de cellules 151

5.4. Pupille du microscope considérée (identique pour les quatre images), ainsi que les quatre pupilles utilisées pour l'illumination. 151
5.5. Les 4 images réalisées dans le cadre du RIM cohérent 152
5.6. Recouvrement des différents domaines de sensibilité et décroissance des valeurs propres 153
5.7. Reconstruction RIM cohérent (échantillon dense) 154
5.8. Acquisitions sur un échantillon de billes transparentes 155
5.9. Reconstruction RIM cohérente sur un échantillon de billes 155
5.10. Reconstruction RIM cohérente sur un échantillon de billes - 2 157

.1. Illustration géométrique d'un problème de reconstruction de phase classique 192
.2. Illustration géométrique d'un problème de reconstruction de phase généralisé 193
.3. Illustration géométrique d'un problème de reconstruction de phase généralisé, autorisant des matrices à valeurs propres négatives 194

Liste des tableaux

3.1. Évolution du SNR avant et après préfiltrage pour différentes valeurs d'intensité moyenne du speckle I_0 103

4.1. Récapitulatif des différentes approches d'acquisition et de traitement pour RIM 3D 126

Introduction

La microscopie de fluorescence est une méthode d'imagerie permettant d'observer un échantillon fluorescent avec un grossissement, afin d'observer des détails qui ne sont pas visibles à l'œil nu. Dans ce cadre, on peut montrer que le microscope agit comme un système d'imagerie actif, dont l'équation d'observation est donnée par (MERTZ 2019) :

$$y(\boldsymbol{r}) = \int h(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\rho(\boldsymbol{r}_1)A(\boldsymbol{r}_1)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1 + \epsilon(\boldsymbol{r}). \qquad (\star)$$

Dans cette équation, h désigne la réponse impulsionnelle ou PSF, ρ la densité de fluorescence que l'on souhaite observer, et A l'activation locale de la fluorescence. En première approximation, la fonction d'activation peut être externe, si l'on considère la structuration spatiale de la lumière atteignant les fluorophores, ou interne pour modéliser la réponse stochastique de certains fluorophores à une illumination uniforme. Les mesures sont également perturbées, et l'on modélise ici cette perturbation à l'aide d'un bruit additif ϵ.

Commençons par supposer une activation uniforme de la fluorescence (*i.e.*, A est constante), ce qui correspond à la microscopie à champ large (*widefield*) conventionnelle. Par définition, l'image d'une source ponctuelle au travers du microscope sera donc toujours égale à la PSF, avec éventuellement une variation d'intensité liée à la valeur de la fonction d'activation. La PSF du microscope n'étant pas réduite à un point, elle possède une extension spatiale non nulle, deux points relativement proches ne pourront pas être séparés sur l'image enregistrée.

Ce phénomène s'explique en regardant la transformée de Fourier de la PSF, $\widetilde{h}$ correspondant à l'OTF du microscope. L'équation ($\star$) étant une convolution, son contenu fréquentiel est toujours limité au support de l'OTF Ω_h. Si sa forme précise dépend de la géométrie du système utilisée, celle-ci est toujours bornée, et on montre que ce support est toujours contenu dans un disque de rayon $\frac{2}{\lambda}$ avec λ la longueur d'onde d'émission de la fluorescence. Le microscope agit donc comme un filtre passe bas, qui supprime de l'image enregistrée toutes les fréquences de la fluorescence à l'extérieur de Ω_h. Dans le cas de l'imagerie conventionnelle, la totalité de la fluorescence est active et l'information structurelle de taille plus faible que $\frac{2}{\lambda}$ est simplement perdue.

Cependant, si l'on utilise des activations non uniformes, l'image obtenue, bien que limitée en fréquence à $\frac{2}{\lambda}$, devient, par un effet de modulation, sensible à des fréquences de l'échantillon supérieures à $\frac{2}{\lambda}$. Il est alors possible de combiner l'information de plusieurs images basses fréquences pour reconstruire une unique image synthétique super-résolue.

Parmi les différentes méthodes de super-résolution existantes, la méthode RIM *Random Illumination Microscopy* développée depuis 2019 en collaboration entre

l'Institut Fresnel (Marseille), le Centre de Biologie Intrégrative (Toulouse) et le LS2N (Nantes), construit cette image super-résolue à partir d'images acquises avec des éclairements structurés inconnus. Pour cela, la méthode RIM exploite les statistiques des images. En effet, ces dernières ne dépendent que des statistiques des éclairements et non des motifs des éclairements. Or, si les éclairements sont des *speckles* (tavelure), leurs statistiques sont parfaitement connues (Joseph W. GOODMAN 2007). RIM se place alors à mi-chemin entre les méthodes par éclairements structurés qui nécessite la connaissance des illuminations lors de la reconstruction (CHAKROVA et al. 2015), et la méthode SOFI (DERTINGER et al. 2009) basée sur les statistiques des images, mais avec une fonction d'activation interne.

La méthode RIM a déjà fait ses preuves pour la microscopie 2D. Il a été montré que ses performances sont équivalentes à celles des microscopies à éclairement structuré classique (SIM périodique et scanning SIM), tout en étant plus robuste aux aberrations et beaucoup plus facile à implémenter et utiliser (MANGEAT et al. 2021).

L'objectif principal de cette thèse est d'étendre la méthode RIM à l'imagerie tridimensionnelle. Si la théorie RIM est suffisamment générale pour s'étendre directement au cadre de la microscopie 3D, cette extension laisse deux problèmes pratiques à résoudre. Le premier concerne l'explosion du temps de reconstruction lié à l'augmentation du nombre de données lors d'une acquisition 3D. Le second porte sur la mise en œuvre expérimentale, puisqu'il existe de multiples façons d'acquérir une image 3D sur un détecteur 2D, qui ne sont pas équivalentes dans le cadre de RIM.

Les quatre premiers chapitres de ce manuscrit forment un tout consacré à l'étude théorique et pratique de la méthode RIM pour des acquisitions 3D. Le premier chapitre de cette thèse établit le lien entre l'image d'un microscope et l'échantillon ($\star$) à partir des équations de la physique. Il présente un état de l'art général sur l'estimation de la densité de fluorescence aussi bien en microscopie conventionnelle qu'en microscopie super-résolue.

Le chapitre suivant rentre plus en détail sur la théorie de la microscopie par éclairements aléatoires en rappelant ses résultats clefs. Il démontre la capacité de super-résolution de RIM : Sous certaines conditions, il y a une bijection entre les fréquences spatiales de la variance des images de speckles et les fréquences spatiales de l'objet dans un domaine étendu correspondant au support du carré de la psf d'observation, h^2. Ce chapitre propose aussi une approximation qui permet de relier l'écart-type des images de speckles à l'échantillon par une simple convolution.

Les difficultés algorithmiques et expérimentales liées à la mise en œuvre de RIM 3D sont abordées dans les deux chapitres suivants. Le chapitre 3 décrit deux nouvelles techniques de reconstruction de l'échantillon à partir de l'écart-type plutôt qu'à partir de la variance des images de speckles. Cette nouvelle approche s'avère beaucoup plus efficace en temps de calcul et en nombre d'itérations pour retrouver les hautes fréquences spatiales de l'objet que la méthode de *variance matching* précédemment développée dans le cadre d'imagerie bi-dimensionnel ibid. Ces nouveaux algorithmes sont directement applicables à des images tridimensionnelles, sous réserve que le modèle d'observation corresponde effectivement à l'équation ($\star$).

Le chapitre 4 est consacré à l'étude et à la comparaison de différentes méthodes

d'acquisition des images tridimensionnelles. On distingue la technique classique consistant à translater l'échantillon le long de l'axe optique, de la technique moins répandue consistant à changer la position du plan focal à l'aide d'une lentille accordable (*remote focusing*). Lorsque l'éclairement est structuré dans les trois dimensions, ces deux modalités produisent des images tri-dimensionnelles différentes. Après avoir défini les modèles des images, j'ai montré que l'écart type et de manière générale les moments statistiques des images étaient les mêmes Quelle que soit la modalité d'acquisition. En revanche, le préfiltrage utilisé sur les images brutes, qui permet de diminuer l'influence du bruit et de rehausser les fréquences spatiales élevées, doit être adapté à chaque modalité d'acquisition. Ce chapitre démontre la supériorité d'une reconstruction basée sur une modélisation tri-dimensionnelle de l'écart-type par rapport à un traitement des données 'bi-dimensionnel' (dans lequel chaque plan de l'écart-type est traité de manière indépendante des autres). Il permet aussi de montrer l'intérêt du *remote focusing* pour acquérir une image 3D, en particulier lorsque le budget de photons est limité.

Le dernier chapitre de ce manuscrit est une extension de la méthode RIM à la microscopie de diffraction. Il s'agit de retrouver le contraste de permittivité (complexe) de l'échantillon à partir de la variance du champ électrique sous éclairement de speckle. Cette variance correspond tout simplement à l'image enregistrée par la caméra lorsque l'éclairement de l'échantillon provient d'une source incohérente ou partiellement cohérente. Pour reconstruire la permittivité complexe de l'échantillon, une seule image de variance est insuffisante. Nous proposons alors d'utiliser plusieurs images de variance avec des éclairements présentant des statistiques différentes. Nous pouvons alors établir un lien entre la technique RIM adaptée à l'imagerie de diffraction et les techniques de type Ptychographie de Fourier. L'approche RIM permet de proposer différentes configurations expérimentales permettant de reconstruire de manière quantitative la permittivité complexe d'un échantillon tout en limitant le nombre d'images à enregistrer.

1. Généralités sur la microscopie de fluorescence

Sommaire

1.1. Modélisation de l'image d'un microscope . . . 22
1.1.1. Description du champ électrique . . . 22
1.1.2. Principe du microscope . . . 23
1.1.3. Champ en présence d'une source unique . . . 25
1.1.4. Champ en présence de multiples sources . . . 26
1.1.4.1. Champ dans l'espace objet . . . 26
1.1.4.2. Champ dans l'espace image . . . 26
1.1.5. Possibles simplifications . . . 27
1.1.5.1. Grossissement unitaire . . . 27
1.1.5.2. Détection sur un plan unique . . . 27
1.1.5.3. Cas particulier de l'imagerie 2D . . . 28
1.1.6. Microscopie incohérente . . . 28
1.1.7. Fonction de Transfert Optique (OTF) . . . 29
1.1.7.1. Notion Générale . . . 29
1.1.7.2. Application au cas d'une ouverture circulaire . . . 30
1.2. Application à la microscopie de Fluorescence . . . 32
1.2.1. Principe général de la fluorescence . . . 32
1.2.2. Intensité de la fluorescence . . . 32
1.2.3. Modèle final de formation d'image . . . 33
1.3. Reconstruction de la densité de fluorescence . . . 34
1.3.1. Image Widefield . . . 34
1.3.2. Déconvolution . . . 35
1.3.2.1. Filtre inverse naïf . . . 35
1.3.2.2. Filtre inverse régularisé . . . 36
1.3.3. Généralisation aux problèmes inverses . . . 38
1.4. Super-résolution par imagerie computationnelle . . . 39
1.4.1. Super-résolution à l'aide d'*a priori* . . . 39
1.4.1.1. Prolongement analytique . . . 39
1.4.1.2. Méthodes de localisation . . . 39
1.4.1.3. Méthodes par apprentissage . . . 40
1.4.2. Super-résolution par fluctuation optique . . . 40

1.4.3. Super-résolution par éclairements structurés 41
1.4.3.1. Principe de base de la méthode 41
1.4.3.2. Principe de reconstruction 43
1.4.3.3. Méthodes jointes pour SIM 44
1.4.3.4. Méthodes sans estimation des illuminations 45

1.1. Modélisation de l'image d'un microscope

1.1.1. Description du champ électrique

Un microscope est un appareil conçu pour mesurer l'intensité moyenne du champ électrique au niveau d'un plan donné, avec un facteur d'échelle. Classiquement, le champ électrique se modélise comme un champ vectoriel dépendant à la fois de l'espace et du temps. L'aspect vectoriel de cette modélisation n'étant pas exploité au cours de ce travail, nous adopterons l'approximation scalaire du champ électrique. De plus, nous considèrerons dans ce manuscrit uniquement des champs monochromatiques, c'est-à-dire avec une dépendance temporelle harmonique de fréquence ν. Avec ces hypothèses, le champ électrique peut se décrire à l'aide de nombres complexes :

$$E_{\text{elec}}(\boldsymbol{r}, t) \propto \text{Re}(E(\boldsymbol{r})e^{2i\pi\nu t}) \tag{1.1}$$

où l'amplitude complexe E encode simultanément l'amplitude locale (avec son module) et le déphasage (avec sa phase) du champ électrique. À la fréquence d'oscillation du champ ν est associée une longueur d'onde λ telle que $\lambda\nu = c$ avec la c la vitesse de la lumière dans le vide.

Dans le vide, le champ complexe E obéit aux contraintes de la propagation libre,

$$(\Delta + k_0^2)E = 0 \tag{1.2}$$

avec $k_0 = 2\pi\frac{\nu}{c} = 2\pi\frac{1}{\lambda}$ [1], Δ l'opérateur désignant le laplacien.
Dans la suite, on prend en compte la géométrie particulière du microscope. Un point $\boldsymbol{r}$ de l'espace sera décomposé en $\boldsymbol{r} = (\boldsymbol{x}, z)$ où z indiquera l'axe optique du microscope et $\boldsymbol{x}$ indiquera les coordonnées dans un plan transverse (voir Fig. 1.1). Le champ peut être décomposé sur une base de Fourier transverse,

$$E(\boldsymbol{x}, z) = \int \widetilde{A}(\boldsymbol{k}_\perp, z)e^{i\boldsymbol{k}_\perp\cdot\boldsymbol{x}}\mathrm{d}\boldsymbol{k}_\perp. \tag{1.3}$$

En injectant cette décomposition dans Eq. (1.2), on trouve,

$$\widetilde{A}(\boldsymbol{k}_\perp, z) = \widetilde{A}_\pm(\boldsymbol{k}_\perp)e^{\pm i\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)z} \tag{1.4}$$

$$\text{avec, } \gamma(\boldsymbol{k}_\perp) = \sqrt{k_0^2 - |\boldsymbol{k}_\perp|^2}. \tag{1.5}$$

Pour une valeur arbitraire de $\boldsymbol{k}_\perp$, le champ électrique décrit par $\widetilde{A}_\pm(\boldsymbol{k}_\perp)e^{\pm i\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)z}$, s'appelle une onde plane, car ses surfaces équiphases sont des plans parallèles, de vecteur normal $\boldsymbol{k} = (\boldsymbol{k}_\perp, \gamma(\boldsymbol{k}_\perp))$ On constate alors une séparation explicite du champ selon les ondes qui se propagent dans le sens des z croissants, qui seront associées à la contribution $\widetilde{A}_+(\boldsymbol{k}_\perp)e^{+i\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)z}$ et celle se propageant dans le sens des z décroissants $\widetilde{A}_-(\boldsymbol{k}_\perp)e^{-i\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)z}$. Dans la suite, l'axe des z sera dirigé de l'échantillon à la caméra.

1. Si le milieu de propagation du champ n'est plus le vide, il faut remplacer c par $\frac{c}{n}$, avec n l'indice optique du milieu.

Le champ détecté par la caméra consistera donc uniquement d'ondes planes se propageant dans le sens des z croissants.

Un autre point important à remarquer est que lorsque $|\boldsymbol{k}_\perp|^2 > k_0^2$, la quantité $\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)$ devient imaginaire pure. L'onde plane telle que décrite dans (1.4) affichera alors une décroissance exponentielle lors de la propagation. Ces ondes sont dites évanescentes, car leur contribution devient négligeable après une faible distance de propagation. Si ces ondes trouvent certaines applications en microscopie, par exemple dans le cadre de la microscopie en réflexion totale interne (TIRF) (KENNETH 2009), elles ne seront pas considérées ici.

Le but de cette section est de dériver les transformations sur le champ induites par la propagation au travers d'un microscope. Nous verrons que dans la modélisation choisie, le microscope se comporte comme un système linéaire invariant, qui peut donc être étudié avec des outils tels que la transformée de Fourier. Cette section se base sur les résultats proposés dans différents ouvrages consacrés à la microscopie comme J. W. GOODMAN 1996, MERTZ 2019 ou Rémi CARMINATI et al. 2021.

1.1.2. Principe du microscope

Nous nous intéressons ici à la configuration la plus classique du microscope, c'est-à-dire le montage en 4f (voir Fig. 1.1), où deux lentilles minces sont alignées le long de l'axe optique du microscope. Ces deux lentilles sont placées de sorte que le plan focal image de la première et le plan focal objet de la seconde soient confondus dans le plan de Fourier du microscope. Au niveau de ce plan, est placé une pupille $\widetilde{P}$, ne laissant passer qu'une partie de la lumière incidente. Le microscope divise alors l'espace en deux, l'espace objet, où sera placé l'échantillon, et l'espace image, où sera placé un détecteur permettant de mesurer le champ produit par l'échantillon. Si les lentilles sont construites selon la condition des sinus (WASSERMANN et al. 1949), alors une onde plane dans l'espace objet porté par un vecteur d'onde transverse $\boldsymbol{k}_\perp$, deviendra dans l'espace image une onde plane porté par un vecteur d'onde transverse $\alpha\boldsymbol{k}_\perp$. De plus, l'amplitude complexe de l'onde plane $\widetilde{A}(\boldsymbol{k}_\perp)$, est conservée entre le plan focal objet $z = z_F$, et le plan focal image $z = z_I$. Une façon de modéliser ce phénomène est de travailler avec une référence de phase dans l'espace objet et une autre dans l'espace image, et de décrire la transformation du microscope par :

$$E_{\text{Obj}}(\boldsymbol{r}) = \widetilde{A}(\boldsymbol{k}_\perp) e^{i\boldsymbol{k}_\perp\cdot\boldsymbol{x}} e^{i\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)(z-z_F)} \rightarrow E_{\text{Im}}(\boldsymbol{r}) = \widetilde{P}(\boldsymbol{k}_\perp)\widetilde{A}(\boldsymbol{k}_\perp) e^{i\alpha\boldsymbol{k}_\perp\cdot\boldsymbol{x}} e^{i\gamma(\alpha\boldsymbol{k}_\perp)(z-z_I)} \quad (1.6)$$

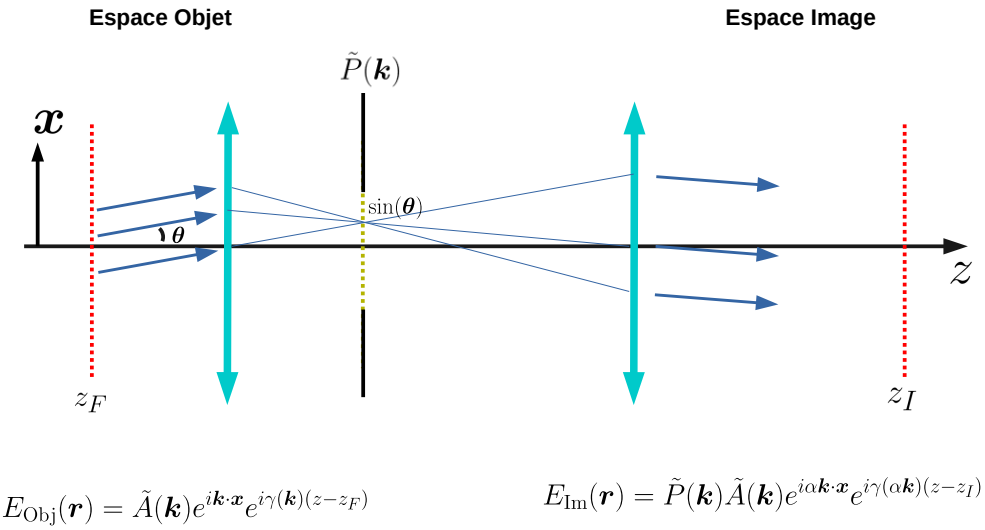


FIGURE 1.1. – Montage d'un microscope en 4f

Enfin, du fait de la présence de la pupille, une partie des ondes planes incidentes sera filtrée par la pupille. On définit donc un angle d'incidence maximal θ, au delà duquel les ondes planes ne sont plus transmises. Cet angle permet de définir l'ouverture numérique du microscope NA, par :

$$\mathrm{NA} = n\sin(\theta) \tag{1.7}$$

où n désigne l'indice d'immersion de l'objectif ($n = 1$ dans le vide ou l'air).

En plus de couper certaines ondes incidentes, la traversée du microscope peut également modifier l'amplitude complexe $\widetilde{A}(\boldsymbol{k}_\perp)$ de l'onde plane. Typiquement, les défauts sur les lentilles induisent des aberrations qui se traduisent par une modification de la phase associée à l'onde plane, ou mathématiquement, des valeurs complexes dans $\widetilde{P}$. De plus, le module de $\widetilde{P}$ n'est généralement pas unitaire, car les ondes arrivant avec de grands angles d'incidence, sont généralement transmises avec une intensité plus faible (KHADIR et al. 2019). Notons par ailleurs que sur la description microscope Fig. 1.1, les ondes planes sont exprimées avec un déphasage relatif aux plans focaux plutôt qu'à la position $z = 0$. Ceci n'est pas un problème puisque l'on peut inclure ce déphasage relatif dans l'expression de l'amplitude complexe du champ $\widetilde{A}$.

1.1.3. Champ en présence d'une source unique

Jusqu'à présent, nous avons décrit comment le microscope modifie un champ électrique composé d'ondes planes, sans nous soucier des sources qui l'ont créé. Dans ce paragraphe nous faisons le lien entre le champ et les sources présentes dans l'espace objet. Commençons par nous intéresser à une unique source ponctuelle placée à la position $\boldsymbol{r}_0$. Le champ produit par cette source unique est décrit par la fonction de Green du champ, que nous noterons $\mathscr{G}(\boldsymbol{r},\boldsymbol{r}_0)$ dans la suite. Elle vérifie l'équation de Helmholtz avec source(1.2) :

$$(\Delta + k_0^2)\mathscr{G}(\boldsymbol{r},\boldsymbol{r}_0) = -\delta(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_0). \tag{1.8}$$

Le champ étant produit manière isotrope, il semble assez intuitif que ce champ soit décrit par des ondes sphériques :

$$\mathscr{G}(\boldsymbol{r},\boldsymbol{r}_0) = \frac{e^{i\boldsymbol{k}\cdot(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_0)}}{4\pi|\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_0|}, \tag{1.9}$$

dont une dérivation rigoureuse peut-être trouvée dans SHEPPARD et al. 2014.

Afin d'exploiter la propriété de transformation des ondes planes du microscope, il faut réécrire l'expression de l'onde sphérique (1.9), sous la forme d'une somme d'ondes planes (1.4). Ceci peut se faire à l'aide de la représentation de Weyl (Rémi CARMINATI et al. 2021[Chap.6.2]) :

$$\mathscr{G}(\boldsymbol{r},\boldsymbol{r}_0) = \frac{i}{8\pi^2}\int \frac{1}{\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)} e^{i\boldsymbol{k}_\perp\cdot(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_0)} e^{i\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)|z-z_0|}\mathrm{d}\boldsymbol{k}_\perp. \tag{1.10}$$

Plaçons-nous maintenant au niveau d'un plan perpendiculaire à l'axe optique, et proche de la lentille décrit par sa position z, et tel que $z > z_0$. La source étant placée en amont du plan considéré, seules les ondes se propageant dans le sens des z croissants sont présentes au niveau de ce plan. Le champ électrique mesuré est alors décrit par :

$$\begin{aligned} E_{\mathrm{Obj}}(\boldsymbol{x},z) &= \frac{i}{8\pi^2}\int \frac{1}{\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)} e^{i\boldsymbol{k}_\perp\cdot(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_0)} e^{i\gamma\left(\boldsymbol{k}_\perp\right)(z-z_0)}\mathrm{d}\boldsymbol{k}_\perp \\ &= \frac{i}{8\pi^2}\int \frac{1}{\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)} e^{i\boldsymbol{k}_\perp\cdot(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_0)} e^{i\gamma\left(\boldsymbol{k}_\perp\right)(z-z_F)} e^{i\gamma\left(\boldsymbol{k}_\perp\right)(z_F-z_0)}\mathrm{d}\boldsymbol{k}_\perp \\ &= \int \widetilde{A}(\boldsymbol{k}_\perp;\boldsymbol{r}_0,z_F) e^{i\boldsymbol{k}_\perp\cdot\boldsymbol{x}} e^{i\gamma\left(\boldsymbol{k}_\perp\right)(z-z_F)}\mathrm{d}\boldsymbol{k}_\perp \end{aligned} \tag{1.11}$$

avec :

$$\widetilde{A}(\boldsymbol{k}_\perp;\boldsymbol{r}_0,z_F) = \frac{i}{8\pi^2}\frac{1}{\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)} e^{-i\boldsymbol{k}_\perp\boldsymbol{x}_0} e^{i\gamma\left(\boldsymbol{k}_\perp\right)(z_F-z_0)}. \tag{1.12}$$

l'amplitude complexe des ondes plane, dépendante de la position des sources, et en particulier de leur distance au plan focal objet.

Pour obtenir l'équation du champ dans l'espace image, il suffit alors d'appliquer la

transformation des ondes planes du microscope (1.6). On obtient alors :

$$E_{\mathrm{Im}}(\boldsymbol{r}) = \int \widetilde{A}(\boldsymbol{k}_\perp; \boldsymbol{r}_0, z_F)\widetilde{P}(\boldsymbol{k}_\perp) e^{i(\alpha \boldsymbol{k}_\perp \cdot \boldsymbol{x})} e^{i\gamma\left(\alpha \boldsymbol{k}_\perp\right)(z-z_I)} \mathrm{d}\boldsymbol{k}_\perp. \tag{1.13}$$

Cette dernière équation décrit le champ dans l'espace image (*i.e.*, après le microscope), produit par une source placée en $(\boldsymbol{x}_0, z_0)$. Il s'agit de la fonction d'étalement du point du microscope, ou PSF (Point Spread Function) en champ (cohérente) du microscope. que nous noterons $\mathscr{H}$.

$$\mathscr{H}(\alpha\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_0, z, z_0) = \frac{i}{8\pi^2} \int \frac{\widetilde{P}(\boldsymbol{k}_\perp)}{\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)} e^{i\gamma\left(\boldsymbol{k}_\perp\right)(z_F - z_0)} e^{i\boldsymbol{k}_\perp \cdot (\alpha\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_0)} e^{i\gamma\left(\alpha\boldsymbol{k}_\perp\right)(z-z_I)} \mathrm{d}\boldsymbol{k}_\perp \tag{1.14}$$

Si cette PSF est invariante par translation le long des coordonnées transverses, ce n'est pas le cas dans la direction axiale, à cause des dépendances en $\gamma(\alpha\boldsymbol{k}_\perp)z$ et $\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)z_0$.

1.1.4. Champ en présence de multiples sources

1.1.4.1. Champ dans l'espace objet

La fonction de Green et la PSF en champ sont des outils très pratiques pour décrire le champ en présence de multiples sources. En effet, l'équation de propagation étant linéaire, on sait que le champ produit par une distribution de sources S, sera simplement la somme des champs produits individuellement par chacune des sources. Dans ce cas, le champ dans l'espace objet est décrit par :

$$E_{\mathrm{Obj}}(\boldsymbol{r}) = \int \mathscr{G}(\boldsymbol{r} - \boldsymbol{r}_0) S(\boldsymbol{r}_0) \mathrm{d}\boldsymbol{r}_0. \tag{1.15}$$

Notons qu'ici, nous avons remplacé la dépendance en $(\boldsymbol{r}, \boldsymbol{r}_0)$ par une dépendance en $\boldsymbol{r} - \boldsymbol{r}_0$, car une telle dépendance apparaît clairement dans la description de la fonction de Green (1.9). Le champ dans l'espace objet est alors directement décrit par la convolution entre la distribution de sources et la fonction de Green en champ.

1.1.4.2. Champ dans l'espace image

Similairement, on peut utiliser la PSF en champ afin d'obtenir l'expression du champ rayonné par cette même distribution de sources dans l'espace image du microscope. Cependant, la PSF n'étant pas invariante à cause du grossissement, le modèle du champ dans l'espace image :

$$E_{\mathrm{Im}}(\boldsymbol{r}) = \int \mathscr{H}(\alpha\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_0, z, z_0) S(\boldsymbol{x}_0, z_0) \mathrm{d}\boldsymbol{x}_0 \mathrm{d}z_0 \tag{1.16}$$

n'est plus une convolution. En pratique cela signifie que les objets proches du plan focal objet seront correctement focalisés dans l'espace image, mais les objets qui en sont éloignés ne pourront pas être focalisés. On peut cependant imposer différentes

contraintes pour retrouver un modèle de convolution 3D.

1.1.5. Possibles simplifications

1.1.5.1. Grossissement unitaire

La simplification la plus directe, bien que d'un intérêt pratique minime, est de considérer que le grossissement du microscope α est égal à 1. Dans ce cas, l'équation de la fonction d'appareil (1.14) se simplifie en :

$$\mathscr{H}(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_0, z-z_0) = \frac{i}{8\pi^2}\int \frac{\widetilde{P}(\boldsymbol{k}_\perp)}{\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)} e^{i\gamma\left(\boldsymbol{k}_\perp\right)(z_F-z_I)} e^{i\boldsymbol{k}_\perp\cdot(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_0)} e^{i\gamma\left(\boldsymbol{k}_\perp\right)(z-z_0)} \mathrm{d}\boldsymbol{k}_\perp$$

qui est bien une fonction invariante par translation. Dans ce cas, le modèle (1.16) devient rigoureusement un modèle de convolution 3D, et le champ dans l'espace image est une version retournée du champ dans l'espace objet, dans laquelle les ondes planes avec des angles d'incidences élevés ont été supprimées.

1.1.5.2. Détection sur un plan unique

De manière plus réaliste, même lorsque le grossissement n'est pas unitaire, les expériences de microscopie sont généralement réalisées avec un capteur plan, typiquement une caméra, placé perpendiculairement à l'axe optique dans l'espace image. Dans ce cas, le modèle d'observation au niveau d'un plan donné, par exemple le plan focal image en $z = z_I$ est :

$$E_{\mathrm{Im}}(\alpha\boldsymbol{x}, z=z_I) = \int \mathscr{H}_{z_I}(\alpha\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_0, z_F-z_0) S(\boldsymbol{x}_0, z_0)\mathrm{d}\boldsymbol{x}_0\mathrm{d}z_0 \tag{1.17}$$

qui correspond à la convolution 3D de la fonction d'appareil $\mathscr{H}_{z_I}$ et la distribution de sources, évaluée au niveau du plan focal objet z_F. La PSF 3D du microscope $\mathscr{H}_{z_I}$, est alors donnée par :

$$\mathscr{H}_{z_I}(\alpha\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_0, z-z_0) = \frac{i}{8\pi^2}\int \frac{\widetilde{P}(\boldsymbol{k}_\perp)}{\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)} e^{i\boldsymbol{k}_\perp\cdot(\alpha\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_0)} e^{i\gamma\left(\boldsymbol{k}_\perp\right)(z-z_0)} \mathrm{d}\boldsymbol{k}_\perp. \tag{1.18}$$

Avec ce modèle, si l'on change le plan d'observation, c'est-à-dire la position du détecteur dans l'espace image, on observera toujours une convolution 3D évaluée en z_F, mais avec une PSF 3D différente. Il reste cependant possible de retrouver une mesure dans l'espace image rigoureusement décrite par une convolution 3D avec la PSF $\mathscr{H}_{z_I}$, en utilisant des stratégies d'acquisition particulières. Ces stratégies seront étudiées plus en détail dans le chapitre 4 consacré à l'imagerie de fluorescence 3D, mais l'approche la plus courante est de translater l'échantillon.

1.1.5.3. Cas particulier de l'imagerie 2D

Un dernier cas particulièrement intéressant à étudier est le cas où les sources sont placées dans le plan focal objet du microscope, et où l'on mesure le champ au niveau du plan focal image, à la position z_I. Dans ce cas, la distribution de sources peut se noter comme :

$$S(\boldsymbol{x}_0, z_0) = S_{2\mathrm{D}}(\boldsymbol{x}_0)\delta(z_F - z_0), \tag{1.19}$$

et les expressions précédentes se simplifient grandement. Par exemple la majorité des termes de déphasage s'annulent dans (1.14). En repartant du modèle de convolution 3D introduit dans (1.17), on a :

$$\begin{aligned} E_{\mathrm{Im}}(\alpha\boldsymbol{x}) &= \int \mathscr{H}_{z_I}(\alpha\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_0, z_F - z_0) S_{2\mathrm{D}}(\boldsymbol{x}_0)\delta(z_F - z_0)\mathrm{d}\boldsymbol{x}_0\mathrm{d}z_0 \\ &= \int \mathscr{H}_{z_I}(\alpha\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_0, 0) S_{2\mathrm{D}}(\boldsymbol{x}_0)\mathrm{d}\boldsymbol{x}_0 \\ E_{\mathrm{Im}}(\alpha\boldsymbol{x}) &= \int \mathscr{H}_{2D}(\alpha\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_0) S_{2\mathrm{D}}(\boldsymbol{x}_0)\mathrm{d}\boldsymbol{x}_0. \end{aligned} \tag{1.20}$$

Le champ observé est alors directement la convolution de la distribution de sources au niveau du plan focal, par une PSF 2D $\mathscr{H}_{2D}$, correspondant à la PSF 3D évaluée à la position $z = 0$:

$$\mathscr{H}_{2D}(\alpha\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_0) = \mathscr{H}(\alpha\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_0, 0) = \frac{i}{8\pi^2}\int \frac{\widetilde{P}(\boldsymbol{k}_\perp)}{\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)} e^{i\boldsymbol{k}_\perp\cdot(\alpha\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_0)}\mathrm{d}\boldsymbol{k}_\perp \tag{1.21}$$

1.1.6. Microscopie incohérente

Le modèle que nous avons développé précédemment permet de relier le champ existant au niveau de la caméra E_{Im} aux sources S qui l'ont créé. Cependant, la caméra n'est pas capable de mesurer le champ électrique instantané. Elle mesure une intensité sur un long temps d'intégration. Lorsque les sources sont cohérentes entre elles, c'est-à-dire que leur déphasage relatif est invariant dans le temps, l'intensité moyennée dans le temps est proportionnelle à $|E_{\mathrm{Im}}|^2$.

En revanche, lorsque les sources sont incohérentes entre elles, c'est-à-dire que le déphasage relatif entre les sources varie dans le temps, avec une fréquence bien supérieure à la fréquence d'intégration du détecteur, l'intensité mesurée par la caméra se modèlise différemment. Dans ce cas, la distribution instantanée des sources s'écrit comme $S(\boldsymbol{r}, t) = S_{Co}(\boldsymbol{r})\mu(\boldsymbol{r}, t)$, avec S_{Co} la distribution de sources, et $\mu(\boldsymbol{r}, t)$ un tirage uniforme et décorrélé de phases aléatoires dans $[-\pi, \pi]$, changeant à des intervalles de temps aléatoirement répartis selon un processus de Poisson. Cette modélisation correspond au modèle de phase interrompu (MERTZ 2019[Chap.9]). On peut alors montrer que l'intensité moyenne du champ électrique $I(\boldsymbol{r}) = \langle|E_{\mathrm{Im}}(\boldsymbol{r}, t)|^2\rangle$, où $\langle\cdot\rangle$ désigne la moyenne temporelle sur le temps d'intégration de la caméra [2], reste décrite

2. Ou de manière équivalente, la moyenne sur un grand nombre de tirages de μ

par un modèle de convolution. En effet, en repartant du modèle de convolution (1.17), on a :

$$\begin{aligned} I(\boldsymbol{r}) &= \langle |E_{\mathrm{Im}}(\boldsymbol{r},t)|^2 \rangle \qquad (1.22)\\ &= \langle | \int \mathscr{H}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1) S(\boldsymbol{r}_1,t) \mathrm{d}\boldsymbol{r}_1 |^2 \rangle \\ &= \iint \mathscr{H}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\mathscr{H}^*(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_2) S_{Co}(\boldsymbol{r}_1) S^*_{Co}(\boldsymbol{r}_2) \langle \mu(\boldsymbol{r}_1,t)\mu^*(\boldsymbol{r}_2,t)\rangle \, \mathrm{d}\boldsymbol{r}_1 \mathrm{d}\boldsymbol{r}_2 \\ &= \iint \mathscr{H}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\mathscr{H}^*(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_2) S_{Co}(\boldsymbol{r}_1) S^*_{Co}(\boldsymbol{r}_2) \delta(\boldsymbol{r}_1-\boldsymbol{r}_2) \mathrm{d}\boldsymbol{r}_1 \mathrm{d}\boldsymbol{r}_2 \\ I(\boldsymbol{r}) &= \iint |\mathscr{H}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)|^2 |S_{Co}(\boldsymbol{r}_1)|^2 \mathrm{d}\boldsymbol{r}_1. \qquad (1.23) \end{aligned}$$

On retrouve alors que l'intensité des sources incohérentes est la convolution d'une PSF incohérente h, avec l'intensité des sources. Cette PSF incohérente est par ailleurs simplement le module carré de la PSF en champ $\mathscr{H}$

$$h(\boldsymbol{r}) = |\mathscr{H}(\boldsymbol{r})|^2. \qquad (1.24)$$

L'expression de cette la PSF 3D est alors donné à partir de l'équation (1.18) :

$$\mathscr{H}_{z_I}(\boldsymbol{r}) = \frac{i}{8\pi^2} \int \frac{\widetilde{P}(\boldsymbol{k}_\perp)}{\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)} e^{i\alpha \boldsymbol{k}_\perp \cdot \boldsymbol{x}} e^{i\gamma\left(\boldsymbol{k}_\perp\right) z} \mathrm{d}\boldsymbol{k}_\perp. \qquad (1.25)$$

1.1.7. Fonction de Transfert Optique (OTF)

1.1.7.1. Notion Générale

Nous avons défini la PSF cohérente (ou en champ) comme le champ d'une source ponctuelle observé au niveau de la caméra. Cette PSF est souvent invariante par translation et elle apparaît dans un modèle de convolution. Cette PSF donne directement le lien entre la transformée de Fourier des sources et celle du champ électrique (ou de son intensité) observé. Par exemple, on a :

$$\widetilde{E}_{\mathrm{Im}}(\boldsymbol{k}) = \widetilde{\mathscr{H}}(\boldsymbol{k}) \widetilde{S}(\boldsymbol{k}). \qquad (1.26)$$

$\widetilde{\mathscr{H}}$ est alors la transformée de Fourier de la PSF en cohérente $\mathscr{H}$ que l'on appelle également Fonction de Transfert Optique cohérente (OTF), donnée par :

$$\widetilde{\mathscr{H}}(\boldsymbol{k}) = \frac{i}{8\pi^2} \frac{\widetilde{P}(\boldsymbol{k}_\perp)}{\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)} \delta(k_z - \gamma(\boldsymbol{k}_\perp)). \qquad (1.27)$$

Le support spectral de cette fonction correspond alors à la surface de la demi-sphère de rayon k_0, dans $k_z > 0$, telle que les $\boldsymbol{k}_\perp$ sont dans le support de la pupille $\widetilde{P}$.

Dans le cas de la microscopie incohérente, le théorème de convolution nous permet

de montrer que l'OTF incohérente $\widetilde{h}$ est l'auto-corrélation de l'OTF cohérente $\widetilde{\mathscr{H}}$:

$$\widetilde{h}(\boldsymbol{k}) = [\widetilde{\mathscr{H}} \otimes \widetilde{\mathscr{H}}^*](\boldsymbol{k}), \tag{1.28}$$

où $\otimes$ désigne la convolution de deux fonctions. Obtenir une expression analytique de ces fonctions est généralement compliqué, voire impossible dans le cas 3D, mais il reste néanmoins possible de les estimer numériquement, et une estimation de ces deux supports est disponible dans le cas d'une pupille circulaire Fig. 1.2.

1.1.7.2. Application au cas d'une ouverture circulaire

On considérera par la suite uniquement le cas de pupilles $\widetilde{P}$ circulaires, qui sont les plus courantes. De plus, on supposera que $\frac{1}{\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)} \approx \frac{1}{k_0}$, ce qui revient à supposer uniquement de petits angles d'incidence, *i.e.*, des angles tels que $||\boldsymbol{k}_\perp|| < \boldsymbol{k}_0$. Enfin, on considérera que $\widetilde{P}$ est une fonction indicatrice, ce qui donne :

$$\widetilde{P}(\boldsymbol{k}) = \begin{cases} 1 & \text{si } |\boldsymbol{k}| < \frac{\mathrm{NA}}{\lambda} \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \tag{1.29}$$

Notons qu'à cause de la présence d'un sinus dans l'expression de l'ouverture numérique (1.7), celle-ci ne peut jamais dépasser 1. Par conséquent, même si l'on enlevait le diaphragme matériel du montage optique, l'OTF aurait toujours un support limité, équivalent à la présence d'une pupille de rayon $\frac{1}{\lambda}$.

Dans le cas 3D, l'OTF incohérente devient proportionnelle [3] à l'indicatrice d'une calotte de sphère (ou une demi-sphère lorsque NA = 1), et l'OTF incohérente est l'auto-corrélation de celle-ci. Les supports de ces deux fonctions sont présentés Fig. 1.2. Notons que cette OTF est anisotrope, ce qui aura des conséquences particulières lors de l'acquisition d'images 3D, qui seront discutées plus en détail dans le chapitre 4.

3. Le facteur de proportionnalité est $\frac{i}{8\pi^2 k_0}$

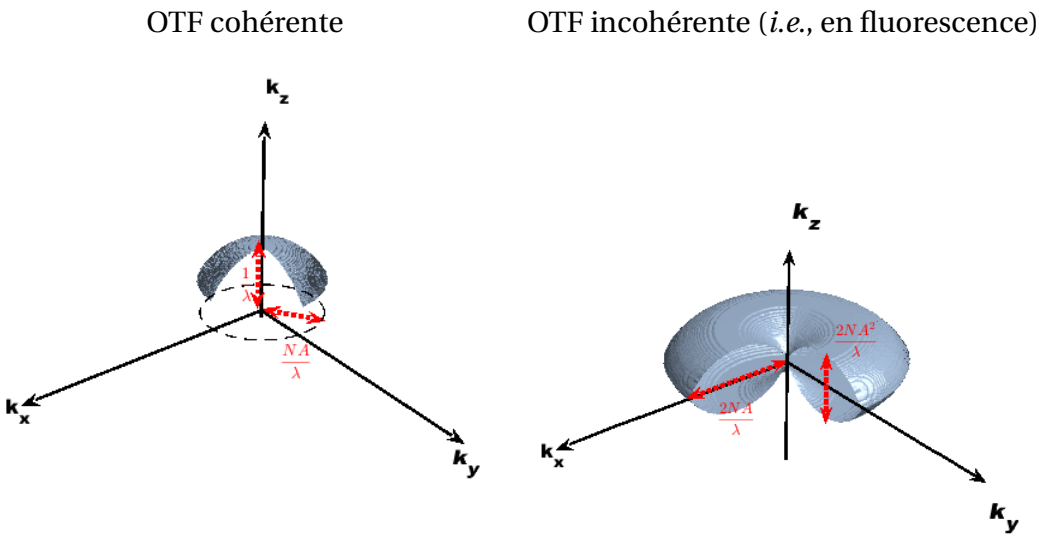


FIGURE 1.2. – Support de l'OTF cohérente et incohérente pour la microscopie 3D.

Si l'on s'intéresse maintenant au cas de l'imagerie 2D, tel que défini dans la section 1.1.5.3, l'OTF cohérente est simplement l'intégrale selon k_z de l'OTF cohérente 3D. Avec les simplifications effectuées précédemment, cette OTF est directement la pupille $\widetilde{P}$. Dans le cas d'une ouverture circulaire, le support de l'OTF incohérente sera alors un disque de rayon $\frac{2NA}{\lambda}$, dont le profil en fréquence est représenté sur la figure 1.3 :

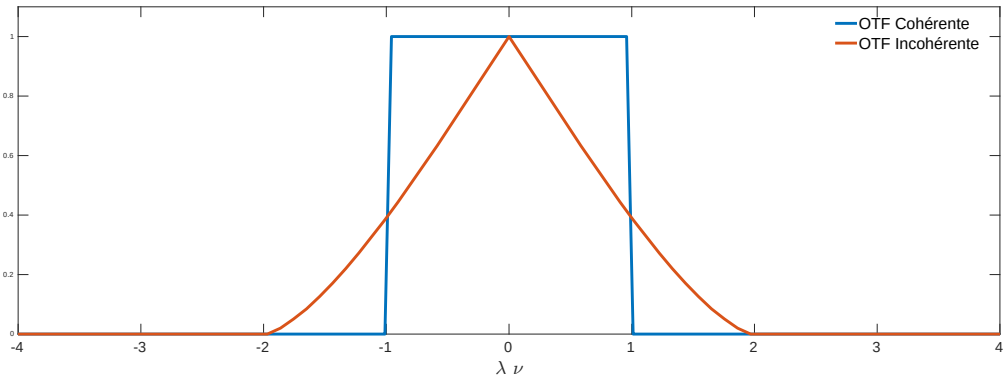


FIGURE 1.3. – Support et profil radial de l'OTF cohérente et incohérente pour la microscopie 2D.

Que ce soit en 2D ou en 3D, pour la microscopie cohérente ou incohérente, le support de l'OTF noté recpectivement $\Omega_{\mathscr{H}}$ ou Ω_{h}, est limité. Le modèle de convolution dans l'espace de Fourier, nous affirme donc que la mesure ne contiendra qu'une information limitée sur la distribution de sources, les fréquences mesurées dans l'espace image étant nulles à l'extérieur de Ω_{h}.

1.2. Application à la microscopie de Fluorescence

1.2.1. Principe général de la fluorescence

Cette thèse s'intéressera principalement aux applications en microscopie de fluorescence, qui est une modalité d'imagerie incohérente, dans laquelle les sources considérées sont des molécules fluorescentes. La fluorescence est un phénomène qui se produit au niveau quantique, lorsqu'une molécule est capable d'absorber, puis de réémettre de manière spontanée, un autre photon. Plus précisément, et dans un formalisme extrêmement simplifié, on considère que la molécule possède deux niveaux d'énergie associés respectivement à un état au repos et à un état excité.

Lorsque qu'une molécule au repos reçoit un photon dont l'énergie $h\nu$, avec h la constante de Planck, correspond à la différence d'énergie entre ses deux niveaux, elle va l'absorber pour passer dans un état excité. Dans l'état excité, et après une durée aléatoire, la molécule va retourner dans son état de repos en émettant un photon dans une direction aléatoire, avec une phase aléatoire, tirée uniformément entre $-\pi$ et π. Les émissions de chaque molécule étant indépendantes les unes des autres, on retrouve le formalisme proposé dans la section 1.1.6, pour la microscopie incohérente.

La modélisation choisie ici néglige deux phénomènes pouvant avoir des impacts expérimentaux. Le premier de ces phénomènes est le décalage de Stokes, qui décrit le léger décalage de longueur d'onde entre l'absorption et l'émission. Ce décalage est particulièrement pratique puisqu'il permet lors des expériences de séparer la lumière émise de la lumière issue du laser. L'autre phénomène est le photo-blanchiment (VICENTE et al. 2007), qui fait que l'intensité de la fluorescence rayonnée par la molécule diminue avec le temps.

1.2.2. Intensité de la fluorescence

Dans la suite, on choisit de se placer à une échelle suffisamment large afin de pouvoir définir la notion de densité de fluorescence ρ, de sorte que

$$S(\boldsymbol{r}) = V\rho(\boldsymbol{r})I_{\text{Inc}}(\boldsymbol{r}) \tag{1.30}$$

corresponde à l'intensité de fluorescence produite par les sources localisées dans un volume V contenant des milliers d'atomes [4], et centré en $\boldsymbol{r}$. Avec cette définition, la densité de fluorescence englobe simultanément la concentration en fluorophores et la brillance individuelle de chaque fluorophore.

L'équation (1.30), fait alors apparaître la quantité I_{Inc}, correspondant à l'intensité d'un champ électrique incident nécessaire pour activer la fluorescence des molécules. Sans celui-ci, les molécules ne peuvent pas absorber de photons, et donc ne peuvent pas non plus en émettre par fluorescence. En pratique le champ est produit par un laser éclairant à une longueur d'onde λ_{Inc} un peu inférieure à la longueur d'onde d'émission (c'est le décalage de Stokes). Un filtre placé en amont de la caméra

4. Typiquement un volume de l'ordre de 1000 nm^3

permet de ne laisser passer que la lumière émise par les fluorophores. La plupart des microscopes de fluorescence sont montés en configuration de réflexion (épi-fluorescence) 1.4. L'éclairement et la lumière émise passe par le même objectif de microscope. Dans ce cas, l'illumination est affectée par les règles de traversées du microscope proposées dans la section précédente, c'est-à-dire que le support des fréquences spatiales de l'illumination Ω_I doit être contenu dans Ω_h [5].

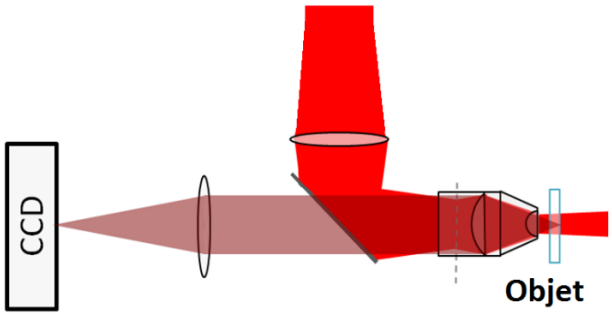


FIGURE 1.4. – Montage en épi-fluorescence

1.2.3. Modèle final de formation d'image

En combinant les résultats des équations (1.17), (1.23) et (1.30), on obtient que l'intensité du champ dans l'espace image est directement donnée par la convolution entre la PSF incohérente h et le produit de densité de fluorescence ρ avec l'intensité de l'éclairement incident I_{Inc} :

$$y(\boldsymbol{r}) = \int h(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\rho(\boldsymbol{r}_1)I_{\text{Inc}}(\boldsymbol{r}_1)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1. \tag{1.31}$$

Commençons par considérer le cas où l'illumination utilisée est spatialement uniforme, d'intensité I_0. Dans ce cas, on obtient le modèle de formation d'image en microscopie conventionnelle, ou image widefield :

$$I(\boldsymbol{r}) = I_0 \int \rho(\boldsymbol{r}_1)h(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1. \tag{1.32}$$

En utilisant le théorème de convolution, cette équation devient dans le domaine de Fourier :

$$\widetilde{I}(\boldsymbol{k}) = I_0\widetilde{h}(\boldsymbol{k})\widetilde{\rho}(\boldsymbol{k}). \tag{1.33}$$

L'OTF $\widetilde{h}$, ayant un support limité, on aura une perte d'information sur la densité de fluorescence. Ce problème s'illustre assez simplement à partir de la fonction d'étalement du point. Dans le cadre de l'imagerie 2D, cette fonction est la tâche d'Airy (voir Fig. 1.5), d'une taille caractéristique de l'ordre de $\frac{\lambda}{2\text{NA}}$. cette taille se situe entre 200 et 300 nm. Elle est nettement plus grande que la taille des molécules fluorescentes, qui

5. En pratique, à cause du décalage de Stokes, ce support peut être un peu plus large.

sont de l'ordre de quelques nm. Par conséquent, si deux molécules sont suffisamment proches l'une de l'autre, leur PSF vont se superposer et il deviendra impossible de les séparer (voir Fig 1.5). Ainsi, la convolution par h, impose une limite physique à la résolution des images qui seront réalisées avec un microscope.

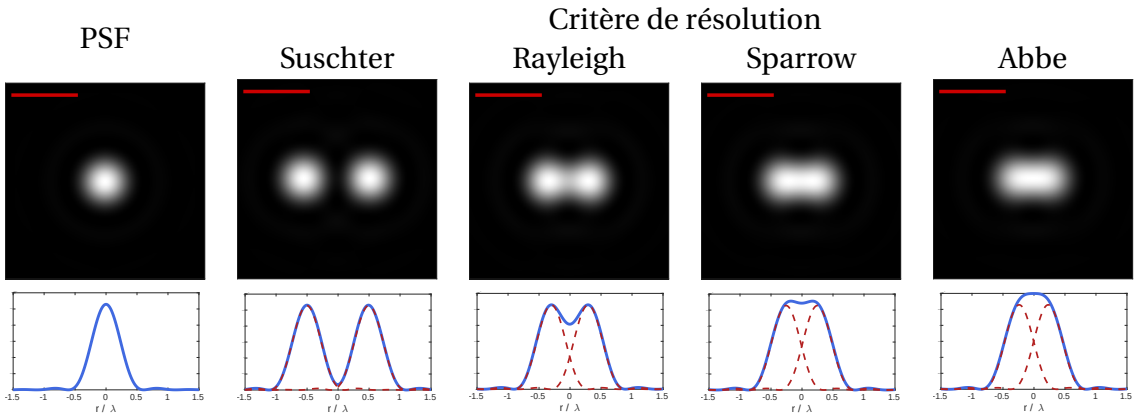


FIGURE 1.5. – Représentation des différents critères de résolution pour deux sources ponctuelles

Définir précisément à partir de quel moment deux sources ou plus deviennent réellement non séparables revient plus ou moins à imposer un critère arbitraire à la limite de résolution. Différents critères ont été proposés, mais nous choisirons ici de définir cette résolution comme précisément $\frac{\lambda}{2\mathrm{NA}}$, ce qui correspond à l'inverse du rayon de l'OTF dans le domaine de Fourier. Ce critère correspond au critère d'Abbe. Il indique la période minimale d'un réseau de lignes parallèles restant visible sur l'image. Notons qu'avec ce critère, deux billes placées à la limite de résolution peuvent être distinguées si l'on corrige l'atténuation des fréquences de l'OTF incohérente, comme illustré Fig. 1.6.

1.3. Reconstruction de la densité de fluorescence

1.3.1. Image Widefield

En microscopie de fluorescence, comme en imagerie en général, l'image n'est pas l'objet. Pour obtenir des informations quantitatives, il faut se donner un estimateur qui, à partir des mesures (des images), permettra de reconstruire la densité de fluorescence. L'approche la plus simple (et la plus usitée) considère que l'image obtenue sous éclairement homogène (microscopie widefield) correspond fidèlement à la densité de fluorescence [6]. On utilise alors directement l'image widefield comme estimateur :

$$\widehat{\rho}_{\mathrm{WF}}(\boldsymbol{r}) = y(\boldsymbol{r}). \tag{1.34}$$

6. Ceci revient à supposer que la PSF est un dirac

En l'absence d'aberrations, cet estimateur, bien qu'assez proche de la réalité terrain, est affecté par deux défauts. Le premier, vu précédemment, est que toutes les fréquences de l'échantillon au-delà du domaine Ω_h sont perdues lors de la convolution. La reconstruction des fréquences au-delà de Ω_h est une tâche délicate qui a donné lieu à de nombreuses méthodes dites de 'microscopie optique super-résolues'. La section 1.4 y sera dédiée.

Le second défaut, plus facile à résoudre, est que les fréquences ne sont pas toutes transmises de la même manière. En particulier, les fréquences sur les bords de Ω_h sont fortement atténuées (voir Fig. 1.3). Par conséquent, cet estimateur présente des biais sur les fréquences transmises par le microscope. Ce défaut est aisément corrigé avec une approche de déconvolution décrite dans le paragraphe suivant.

1.3.2. Déconvolution

1.3.2.1. Filtre inverse naïf

L'objectif est de retrouver la densité de fluorescence ρ à partir de l'image y, en connaissant le modèle d'observation (1.32) ainsi que la PSF h. Dans notre cas, le problème est particulièrement simple, puisqu'il s'agit d'un problème inverse linéaire dont le modèle direct est une convolution. La résolution de ce type de problème inverse s'appelle une déconvolution, et s'explique particulièrement bien à l'aide de la transformée de Fourier (IDIER 2008). Repartons de la transformée de Fourier l'image observée (1.33). Pour retrouver $\widetilde{\rho}$, il "suffit" de multiplier par $\widetilde{h}^{-1}$ à gauche et à droite de l'équation. Cependant, $\widetilde{h}$ prenant des valeurs nulles, son inverse n'est pas bien défini, et il faut plutôt utiliser l'inverse généralisé défini comme :

$$\widetilde{h}^g(\boldsymbol{k}) = \begin{cases} 0 & \text{si } \widetilde{h}(\boldsymbol{k}) = 0 \\ \frac{1}{\widetilde{h}(\boldsymbol{k})} & \text{sinon} \end{cases} \tag{1.35}$$

On construit alors l'estimateur du filtre inverse naïf :

$$\widehat{\rho}_{\text{NIF}}(\boldsymbol{r}) = \mathscr{F}^{-1}\left[\widetilde{h}^g \widetilde{y}\right](\boldsymbol{r}) \tag{1.36}$$

En l'absence de bruit, tout se passe alors comme si l'image avait été acquise avec la PSF $h^g \otimes h$, dont l'OTF est par construction l'indicatrice de Ω_h. Dans ce cas, la nouvelle PSF est une fonction de Bessel, qui peut prendre des valeurs négatives et qui apparaît visuellement plus fine que la tâche d'Airy[7]. Dans ce cas, les billes inséparables pour le critère de Abbe Fig. (1.5) deviennent visuellement séparables. Ainsi, l'égalisation des fréquences dans la bande passante Ω_h permet de mieux voir certains détails des images, sans pour autant augmenter leur résolution. Le support fréquentiel, n'étant pas modifié lors de cette déconvolution, un réseau de grille parallèle de fréquence supérieure[8] à $\frac{2\text{NA}}{\lambda}$ restera impossible à retrouver par une simple opération de rehaussement des fréquences.

7. Le support spectral reste cependant identique
8. Ou de période inférieure $\frac{\lambda}{2\text{NA}}$

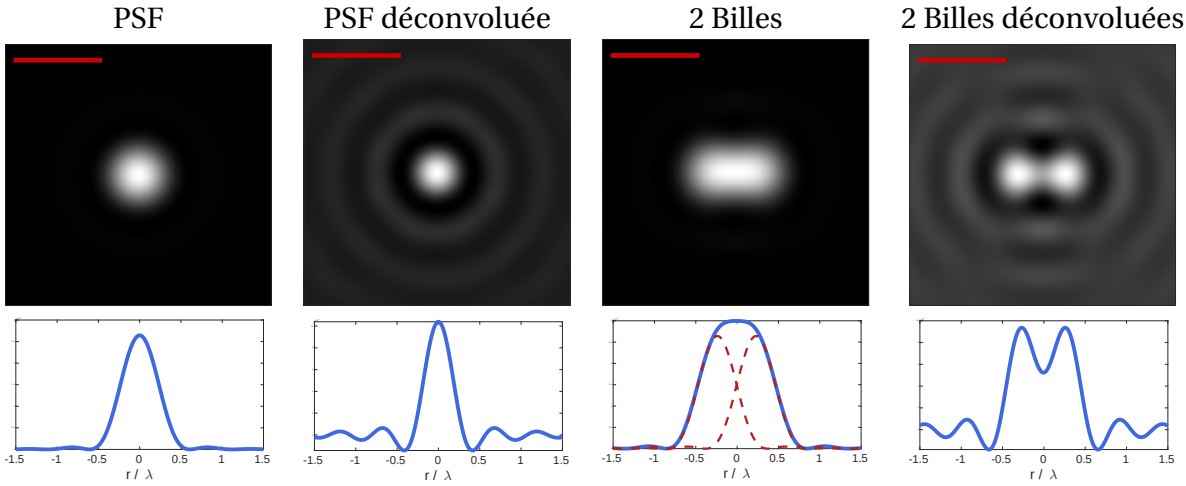


FIGURE 1.6. – Illustration du gain apparent de résolution lors de la résolution de deux billes

Si l'on observe Fig. 1.6, on peut constater deux éléments perturbants. Tout d'abord, du fait des changements de signe de la fonction de Bessel, les images estimées auront généralement des valeurs négatives. Si l'image est visualisée en niveau de gris, avec ses bornes min/max en limite d'échelle, comme ici [9], le fond n'est plus uniformément noir, mais grisé, la valeur zéro n'étant plus le minimum de l'image. Le second point marquant, est que les oscillations de la PSF déconvoluée sont nettement plus visibles. Ceci correspond au phénomène de Gibbs (GOTTLIEB et al. 1997), qui apparaît lorsque l'on tronque brutalement le spectre d'un objet ayant des hautes fréquences spatiales (comme une interface ou une bille isolée). Ces deux éléments cependant sont parfaitement exacts, dans le sens où ils permettent de représenter fidèlement (sans biais) l'objet (filtré), et ne doivent donc pas être vu comme des artefacts d'inversion.

L'estimateur (1.36) est cependant un estimateur dit naïf, qui fonctionne correctement dans un cadre théorique, tel qu'illustré Fig. 1.6, mais qui ne fonctionne généralement pas dans des cas pratiques (voir Fig. 1.7).

1.3.2.2. Filtre inverse régularisé

En effet, dans un cadre expérimental, on n'accède jamais à la mesure directement y, mais seulement à une version perturbée de celle-ci. Pour simplifier, on suppose généralement que la perturbation peut être vue comme un bruit additif, de sorte que l'image réellement obtenue est,

$$z(\boldsymbol{r}) = y(\boldsymbol{r}) + \epsilon(\boldsymbol{r}) \tag{1.37}$$

La présence de ce bruit rend l'utilisation du filtre inverse naïf totalement impossible. En effet, $\widetilde{h}$ tendant vers 0, il existe nécessairement une fréquence pour laquelle la

9. L'affichage min/max permet d'éviter l'ajout de hautes fréquences induites par d'éventuels seuillages

quantité $\widetilde{h}(\boldsymbol{k})\widetilde{\rho}(\boldsymbol{k})$ sera négligeable devant l'intensité du bruit. Pour les fréquences au-delà, la multiplication par $\widetilde{h}^g$, va principalement amplifier du bruit, ce qui mènera à une reconstruction difficilement exploitable, avec des variations hautes fréquences de très forte amplitude. Pour corriger ce problème, on peut introduire un hyper-paramètre η, servant à contrôler la régularité de la solution (TIKHONOV et al. 1977). On construit alors le filtre inverse régularisé de Tikhonov :

$$\widetilde{h}_{Tik}(\boldsymbol{k}) = \frac{\widetilde{h}^*(\boldsymbol{k})}{|\widetilde{h}(\boldsymbol{k})|^2 + \eta} \tag{1.38}$$

Plus ce paramètre est petit, plus on se rapproche du filtre inverse naïf, que l'on retrouve en posant $\eta = 0$. Cependant, en augmentant η, on limite le rehaussement des fréquences spatiales de l'objet affectées par une faible transmission donnée par $|\widetilde{h}(\boldsymbol{k})|$. Dans le cas de l'OTF incohérente, il s'agit des hautes fréquences, qui sont les plus polluées par le bruit et amplifiées dans le cas du filtre inverse naïf. Indirectement, ce paramètre sert donc à choisir une fréquence de coupure au-delà de laquelle les fréquences de l'image ne seront plus inversées, ce qui se traduit par une perte de résolution par rapport à la résolution théorique, mais permet d'avoir une reconstruction extrêmement robuste au bruit (voir Fig. 1.7).

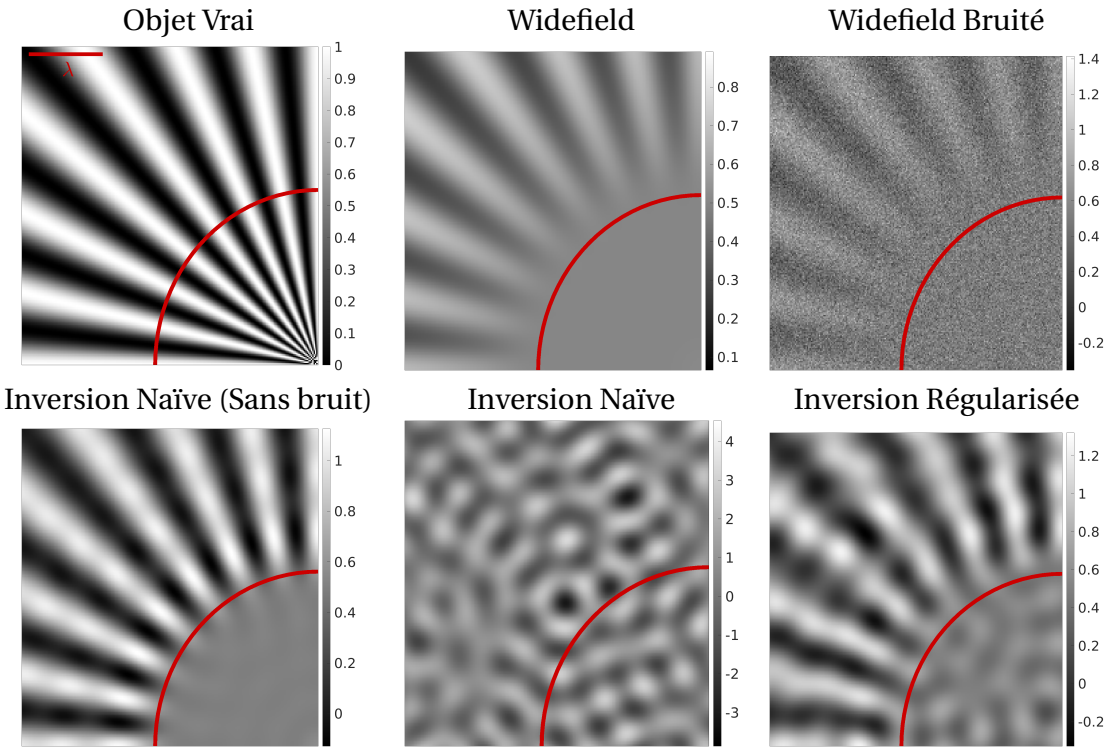


FIGURE 1.7. – Illustration des méthodes de déconvolution par filtre inverse sur une mire de résolution.

L'approche de déconvolution par filtre inverse régularisé est couramment utilisée

puisqu'elle permet d'obtenir une estimation de l'objet par le simple calcul d'une transformée de Fourier, mais d'autres méthodes de déconvolution existent (SAGE et al. 2017). Certaines méthodes itératives, comme la déconvolution de Richardson-Lucy (RICHARDSON 1972) imposent en plus une contrainte de positivité sur l'objet estimé, tandis que les méthodes aveugles peuvent estimer simultanément l'objet et la PSF.

1.3.3. Généralisation aux problèmes inverses

Plus généralement, supposons que l'on dispose d'une mesure bruitée $z \sim \mathscr{L}(\theta, \rho_0)$, associée à un échantillon ρ_0, avec θ les paramètres d'une loi $\mathscr{L}$ quelconque, par exemple la variance d'un bruit gaussien additif. Un estimateur de ρ_0 par problème inverse, se construit généralement en minimisant une fonction coût J (IDIER 2008) :

$$\widehat{\rho}_J = \arg\min_{\rho} J(\rho) \tag{1.39}$$

$$J(\rho) = \mathscr{D}(z, \rho) + \mathscr{R}(\rho) \tag{1.40}$$

La fonction coût se décompose en généralement en deux parties, une fonction d'attache aux données $\mathscr{D}$, vérifiant idéalement $\mathscr{D}(z, \rho_0) = 0$, et une fonction de pénalisation $\mathscr{R}$. Cette fonction vise à limiter l'influence du bruit ou à favoriser certaines caractéristiques de la reconstruction, par exemple la régularité, les bords francs ou bien la parcimonie. La méthode de déconvolution présentée précédemment correspond exactement à la résolution d'un problème inverse ayant pour fonction d'attache aux données le carré de la norme de l'erreur :

$$\mathscr{D}(z, \rho) = \left\| z - h \otimes \rho \right\|_2^2. \tag{1.41}$$

Dans le cas du filtre inverse naïf, la fonction de pénalisation est nulle, tandis que pour le filtre inverse régularisé, la fonction de pénalisation est $\mathscr{R}(\rho) = \mu \left\| \rho \right\|_2^2$. Nous ne nous attarderons pas ici sur les différents choix de fonctions objectifs ni sur les façons de la minimiser, le chapitre 3 étant consacré aux approches inverses pour un type d'imagerie précis.

Un intérêt des approches inverses est que le terme d'adéquation aux données peut incorporer l'information contenue dans plusieurs images. Ainsi, en modifiant les conditions d'acquisition entre chaque image, il devient possible d'obtenir des informations sur l'objet bien au-delà de la limite de diffraction. La plupart des méthodes d'imagerie computationnelle super-résolue allient l'acquisition de plusieurs images sous différentes modalités (en utilisant plusieurs éclairements non uniformes, par exemple) avec la résolution d'un problème inverse adapté afin de reconstruire une image avec une résolution dépassant la limite de diffraction (ZENG et al. 2017). Le terme de régularisation peut également permettre de produire de la super-résolution, mais dans ce cas, celle-ci provient des *a priori* sur l'objet et non pas directement des mesures. C'est par exemple le cas des approches utilisant une régularisation par variation totale (RODRIGUEZ 2013), qui privéligie les bords francs dans la reconstruction.

1.4. Super-résolution par imagerie computationnelle

Dans la suite, nous nous focaliserons principalement sur des méthodes de super-résolution à champ large. Leur principe repose sur l'enregistrement sur une caméra de multiples images de l'échantillon sous divers éclairements structurés grand champ (grille de lumière périodique), suivi d'un traitement numérique permettant théoriquement l'estimation de la densité de fluorescence à une résolution supérieure à celle de la limite de diffraction. D'autres approches sont implémentées dans une configuration à balayage, comme la microscopie confocale (PAWLEY 2015), la microscopie STED (HELL et al. 1994) ou encore l'approche Minflux (SCHMIDT et al. 2021). Dans ces techniques, on éclaire une région réduite de l'échantillon avec un faisceau focalisé, et one enregistre la fluorescence émise sur un pixel unique. L'image est ensuite reconstruite de manière analogique en scannant l'échantillon dans sa globalité.

1.4.1. Super-résolution à l'aide d'*a priori*

1.4.1.1. Prolongement analytique

Nous avons vu qu'avec les méthodes de déconvolution présentées précédemment, une image seule n'était pas suffisante pour retrouver les fréquences de l'objet à l'extérieur de Ω_h. Cependant, si l'on ajoute l'*a priori* que le support de l'objet est borné, il devient théoriquement possible de reconstruire l'objet avec une résolution infinie, à partir de la connaissance de son spectre sur Ω_h. Il s'agit de la méthode du prolongement analytique (J. W. GOODMAN 1996[Chap.6]), qui comme la méthode du filtre inverse naïf, n'est applicable qu'en théorie. En effet, une faible erreur dans le spectre observé modifiera significativement la reconstruction par prolongement analytique.

1.4.1.2. Méthodes de localisation

Un autre *a priori* possible pour la super-résolution est que l'objet n'est constitué que d'un faible nombre de sources. Dans ce cas, plutôt que de chercher à reconstruire la densité de fluorescence en résolvant un problème inverse du type (1.39), il est préférable de chercher la position individuelle de chaque source, ce qui revient à localiser le centre de chaque PSF. Dans ce cas, en présence d'un bruit de poisson, on peut montrer qu'une source unique peut-être localisée avec une précision de l'ordre de $\frac{\ell}{\sqrt{N}}$, avec ℓ la largeur de la PSF, et N le nombre de photons détectés (OBER et al. 2004). Ce nombre est typiquement de l'ordre de 10^4, ce qui permet multiplier la résolution par 100 afin d'atteindre une précision de localisation de l'ordre du nanomètre.

Cet *a priori* n'est cependant pas vérifié avec un échantillon dense dont toutes les molécules brillent en même temps. Pour pallier ce problème, les méthodes de localisation de type PALM (BETZIG et al. 2006) ou STORM (RUST et al. 2006), utilisent des fluorophores spéciaux. Ces fluorophores s'activent de manière stochastique, de sorte qu'à chaque instant seul un faible nombre de fluorophores soient dans un état

activé. Ce faible nombre de fluorophores activés rend alors possible la localisation de chaque émetteur, avec une précision de l'ordre de la dizaine de nanomètres.

Si cette méthode permet un très fort gain de résolution, elle possède plusieurs défauts majeurs MAILFERT et al. 2018. Tout d'abord, plus l'échantillon est dense, plus le risque d'activer simultanément deux fluorophores très proches est élevé, ce qui réduira la précision de l'algorithme de localisation. De plus, afin de s'assurer que tous les émetteurs ont été activés, il faut réaliser un nombre conséquent d'images, typiquement de l'ordre de 10^4, ce qui rend le temps total d'acquisition très long, typiquement de plusieurs minutes. Ce temps d'acquisition combiné à l'utilisation de fluorophores spéciaux rend cette méthode particulièrement inadaptée à l'imagerie *in vivo*.

1.4.1.3. Méthodes par apprentissage

Une dernière approche gagnant en popularité est la super-résolution par apprentissage (PRAKASH et al. 2022). Ces approches, qui peuvent produire de la super-résolution à partir d'une image unique, peuvent se voir comme des méthodes apprenant les fonctions $\mathscr{D}$, et principalement $\mathscr{R}$, afin d'y incorporer les *a priori* définissant un échantillon biologique possible. Il devient alors particulièrement difficile d'expliquer quels sont les *a priori* qui ont servi à reconstruire l'image obtenue, ce qui peut poser des problèmes d'interprétabilité des images reconstruites, et augmente le risque d'artefacts de reconstruction crédibles aux yeux d'un observateur (hallucinations). Ainsi, ces méthodes restent surtout des extensions des méthodes classiques présentées dans cette section, plutôt que des méthodes à part entière.

1.4.2. Super-résolution par fluctuation optique

Plutôt que chercher à localiser les sources individuellement, la méthode de super-résolution par fluctuation optique (SOFI) exploite les variations temporelles liées au scintillement des fluorophores pour obtenir une image super-résolue. Pour présenter cette méthode, nous adopterons un formalisme avec molécules discrètes tel que présenté originellement dans DERTINGER et al. 2009, mais une adaptation de ce formalisme avec une description sous forme de densité de fluorescence est disponible dans LABOUESSE, IDIER, ALLAIN et al. 2024. La distribution de fluorophores dans l'espace objet est alors donnée par :

$$S(\boldsymbol{r}, t) = \sum_{k=1}^{N} \delta(\boldsymbol{r} - \boldsymbol{r}_k)\epsilon_k s_k(t) \tag{1.42}$$

où ϵ_k est la brillance moléculaire et $s_k(t)$ caractérise les variations temporelles de la brillance des molécules. La description précise des ces variations n'est nécessaire, et pour fonctionner, il suffit d'assurer que s_k ne soit pas constante (*i.e.*, les fluorophores ont plus d'un état de fluorescence), et que les changement d'états soit indépendants

et décorrélés entre deux fluorophores. Cette dernière hypothèse revient à affirmer

$$\langle \bar{s}_{k_0}(t)\bar{s}_{k_1}(t+\tau_1)\rangle = \begin{cases} w_{k_0}^2(0) & \text{si } k_0 = k_1 \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \tag{1.43}$$

et plus généralement pour les ordres supérieurs :

$$\langle \bar{s}_{k_0}(t)\bar{s}_{k_1}(t+\tau_1)\dots\bar{s}_{k_n}(t+\tau_n)\rangle = \begin{cases} w_{k_0}^{n-1} & \text{si } k_1 = k_2 = \dots = k_n \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \tag{1.44}$$

avec $\bar{s}_k$ la variable s_k centrée. L'intensité de fluorescence dans l'espace image est alors donnée par :

$$\sum_{k=1}^{N} h(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_k)\epsilon_k s_k(t). \tag{1.45}$$

L'idée majeure derrière la méthode SOFI, est que le scintillement d'une molécule s_k n'est corrélé temporellement qu'avec lui-même. Par conséquent, le moment centré d'ordre n aux instants 0, peut s'écrire :

$$C_n(\boldsymbol{r}) = \sum_{k=1}^{N} h^n(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_k)\epsilon_k^n w_k^n(0). \tag{1.46}$$

On constate alors que l'on observe une image de l'échantillon, mais réalisée avec la PSF h^n qui est nettement plus fine que la PSF h de la microscopie widefield. Ceci résulte en un gain de résolution, de l'ordre d'un facteur $\sqrt{n}$. La méthode SOFI n'est *a priori* pas limitée en résolution, cependant l'apparition de la brillance à la puissance n, tend à faire totalement disparaître les molécules avec une brillance plus faible lorsque l'on augmente l'ordre utilisé, ce qui limite en pratique l'ordre du moment que l'on peut utiliser. Par ailleurs, la construction des moments empirique de manière robuste demande un grand nombre d'images, et en pratique SOFI ne peut pas exploiter des ordres trop élevés, ce qui limite sa résolution. Enfin, les fluorophores utilisés doivent une nouvelle fois être des fluorophores spécifiques, ce qui demande une étape supplémentaire pour la préparation de l'échantillon.

1.4.3. Super-résolution par éclairements structurés

1.4.3.1. Principe de base de la méthode

Si les méthodes SMLM et SOFI n'ont pas de limite théorique dans la résolution finale de l'image produite, les contraintes expérimentales pour leur mise en œuvre (grand nombre d'images et marquage spécifique) peuvent limiter leur cadre d'applicabilité (SCHERMELLEH et al. 2019). Le fonctionnement de ces méthodes étant basé sur la combinaison de l'information de plusieurs images acquises avec une activation spatialement variante de la fluorescence, une approche plus simple pour produire cette diversité d'activation serait simplement d'utiliser une illumination spatialement non uniforme. On bascule alors dans le cadre de la microscopie par éclairements

structurés (SIM). On réalisera alors de multiples images y_m selon le modèle (1.31), incluant la dépendance spatiale de l'illumination :

$$y_m(\boldsymbol{r}) = \int h(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\rho(\boldsymbol{r}_1)I_m(\boldsymbol{r})\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1. \tag{1.47}$$

Le nombre M d'images à réaliser dépend alors de la stratégie d'illumination choisie, généralement parmi trois grandes familles : les grilles de lumières (HEINTZMANN et al. 1999, M. G. L. GUSTAFSSON et al. 2000), les éclairements focalisés (GREGOR et al. 2019) et les éclairements de speckle (MUDRY et al. 2012). Bien que le principe général soit le même pour les trois types d'illuminations, nous présenterons la méthode SIM spécifiquement dans le cas où les illuminations sont des grilles de lumières de la forme :

$$I_m(\boldsymbol{r}) = I_0\Big(1+\cos\big(2\pi\boldsymbol{k}_m\cdot\boldsymbol{r}+\phi_m\big)\Big) \tag{1.48}$$

ayant pour représentation fréquentielle :

$$\widetilde{I}_m(\boldsymbol{k}) = I_0\left(\delta(\boldsymbol{k})+\frac{1}{2}\Big(e^{-i\phi_m}\delta(\boldsymbol{k}+\boldsymbol{k}_m)+e^{i\phi_m}\delta(\boldsymbol{k}-\boldsymbol{k}_m)\Big)\right) \tag{1.49}$$

avec $\boldsymbol{k}_m$ et ϕ_m respectivement la fréquence et la phase de l'illumination. En passant l'équation (1.47) dans le domaine de Fourier, et en réinjectant l'expression de la transformée de Fourier de l'illumination, on obtient :

$$\widetilde{y}(\boldsymbol{k}) = \widetilde{h}(\boldsymbol{k})\Big(\widetilde{\rho}_0(\boldsymbol{k})+\frac{1}{2}e^{-i\phi_m}\widetilde{\rho}(\boldsymbol{k}+\boldsymbol{k}_m)+\frac{1}{2}e^{i\phi_m}\widetilde{\rho}(\boldsymbol{k}-\boldsymbol{k}_m)\Big) \tag{1.50}$$

Notons que l'image observée reste une image basse fréquence, à cause du produit par la fonction $\widetilde{h}$. Cependant, contrairement à l'imagerie sous illumination uniforme, les fréquences observées ne sont plus directement celles de l'objet, mais une combinaison de plusieurs fréquences de l'objet. Pour une valeur de $\boldsymbol{k}$ donnée, on accède aux fréquences de l'objet en $\boldsymbol{k}+\boldsymbol{k}_m$ et $\boldsymbol{k}-\boldsymbol{k}_m$. Pour (1.50) ait une valeur non nulle, il faut que $\boldsymbol{k}\in\Omega_\mathrm{h}$. Par conséquent, l'image y contient en plus de l'information sur les fréquences de l'objet sur un domaine de même forme que Ω_h, mais décalé de $\boldsymbol{k}_m$ où $-\boldsymbol{k}_m$. Ce décalage en fréquence permet d'obtenir des informations sur les fréquences de l'objet au-delà de la limite de diffraction (voir Fig. 1.8)

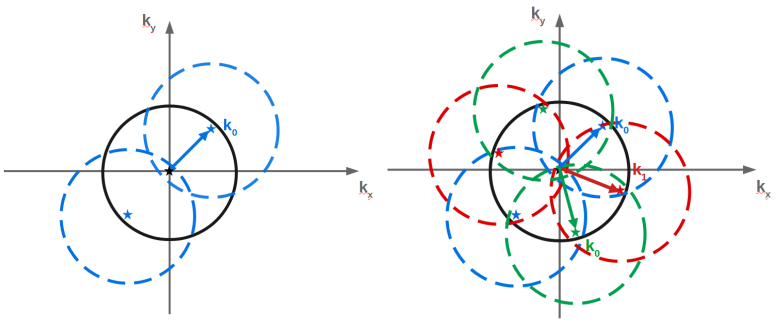


FIGURE 1.8. – Domaine de fréquence accessible en éclairant à l'aide d'une grille de lumière. En utilisant des grilles de différentes fréquences, on arrive à un doublement de la capacité de résolution du microscope.

Notons que l'illumination devant se propager de la source jusqu'à l'échantillon, elle se retrouve également limitée par la diffraction. Dans le cas d'un montage en épi-fluorescence tel que proposé sur la figure 1.4, ceci revient à imposer $\boldsymbol{k}_m \in \Omega_\mathrm{h}$. Ainsi, en choisissant des grilles avec des fréquences proches de la limite de diffraction, on parvient à obtenir un doublement de la résolution du microscope. Contrairement aux méthodes SMLM et SOFI, il existe une borne théorique à la résolution maximale que l'on peut atteindre en éclairements structurés [10].

1.4.3.2. Principe de reconstruction

L'équation (1.50) nous montre que nous sommes sensibles aux fréquences de l'objet sur un domaine étendu, mais ne nous permet pas de directement identifier les hautes fréquences. En effet, pour une grille donnée, et à une fréquence d'étude fixe $\boldsymbol{k}$, le signal mesuré mélange les informations de trois fréquences de l'objet. Pour pouvoir séparer ces informations fréquentielles, il faut acquérir des images supplémentaires, classiquement en changeant la phase Φ_m de la grille, et en conservant la fréquence $\boldsymbol{k}_m$ de l'illumination constante. On vérifie alors aisément que trois illuminations sont alors nécessaires et suffisantes pour retrouver toutes les fréquences de l'objet sur le domaine étendu présenté Fig. 1.8.

Dans ce cas, en l'absence de bruit, les trois mesures du signal à la fréquence $\boldsymbol{k}$ peuvent se réexprimer sous la forme du système matriciel :

$$\begin{pmatrix} \widetilde{x}_1(\boldsymbol{k}) \\ \widetilde{x}_2(\boldsymbol{k}) \\ \widetilde{x}_3(\boldsymbol{k}) \end{pmatrix} = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 2 & e^{-i\phi_1} & e^{i\phi_1} \\ 2 & e^{-i\phi_2} & e^{i\phi_2} \\ 2 & e^{-i\phi_3} & e^{i\phi_3} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \widetilde{\rho}(\boldsymbol{k}) \\ \widetilde{\rho}(\boldsymbol{k}+\boldsymbol{k}_m) \\ \widetilde{\rho}(\boldsymbol{k}-\boldsymbol{k}_m) \end{pmatrix}, \tag{1.51}$$

où $\widetilde{x}_m$ correspond à la transformée des images acquises avec différentes phases. Lorsque ce système est inversible, on peut alors retrouver les fréquences de l'ob-

10. Cette limite peut théoriquement être dépassée en utilisant une forte puissance laser, de façon à entrer dans un régime saturé (*i.e.*, non linéaire) tel que le modèle de fluorescence (1.30) et l'équation (1.47) qui en découle ne soient plus valides (Mats GL GUSTAFSSON 2005)

jet en $\boldsymbol{k}+\boldsymbol{k}_m$ et $\boldsymbol{k}-\boldsymbol{k}_m$. Un choix garantissant l'inversibilité de ce système est le choix des phases $\{0, \frac{2\pi}{3}, \frac{4\pi}{3}\}$. On peut alors retrouver l'ensemble des fréquences de l'objet sur le domaine présenté sur la figure 1.8. Ce domaine ne permet cependant pas un doublement de la résolution dans toutes les directions. Pour couvrir la totalité du domaine théoriquement accessible en éclairements structurés, il faut alors tourner les grilles pour changer la fréquence $\boldsymbol{k}_m$. Généralement, trois différentes orientations de grilles sont suffisantes pour couvrir la quasi-totalité du domaine de super-résolution. Ainsi, la méthode SIM, permet un doublement de la résolution avec seulement neuf illuminations (trois orientations de grille, et trois déphasages par orientation).

Si l'utilisation d'éclairements sous la forme de grille de lumière permet d'obtenir un schéma de reconstruction explicite pour doubler la résolution de l'estimée, les autres stratégies d'illuminations (grilles de points lumineux, éclairement de speckle) permettent d'obtenir des gains de résolution comparable (Chakrova et al. 2015). Dans ce cas, les hautes fréquences de l'objet sont rabattues de manière plus complexe [11], et il est généralement impossible de construire un schéma direct de reconstruction. On peut cependant estimer un objet super-résolu en minimisant un problème inverse avec une fonction d'attache aux données de la forme (Lal et al. 2016) :

$$\mathscr{D}_{\mathrm{SIM}}(\rho) = \sum_{m=1}^{M} \left\| \widehat{z}_m - h \otimes (\rho I_m) \right\|_2^2, \tag{1.52}$$

où $\widehat{z}_m$ correspond aux différentes acquisitions expérimentales, qui sont des versions perturbées de la sortie modèle (1.47).

Que la méthode SIM soit réalisée avec des grilles de lumière ou un autre type de motif, les illuminations I_m sont toujours supposées connues. En pratique, ceci pose une certain nombre de contraintes expérimentales, puisqu'il faut contrôler les illuminations et s'assurer qu'elles ne soient pas déformées lors de la propagation. Les principales limitations sont alors l'inhomogeneité optique de l'échantillon, qui perturbe l'illumination, les erreurs d'alignement du montage optique qui peuvent influer sur la fréquence et la position de la grille, et la qualité des objectifs utilisés.

1.4.3.3. Méthodes jointes pour SIM

La nécessité de connaître les éclairements pour reconstruire l'échantillon est une limite fondamentale des approches à éclairement structuré. Ainsi, certaines méthodes se proposent de faire une estimation conjointe des illuminations et de l'objet. Dans le cas où les illuminations sont des grilles de lumières, il est possible, plutôt que de chercher à retrouver globalement l'illumination, de se contenter de retrouver seulement les paramètres des différentes grilles (intensité, période, orientation et déphasage), ce qui permet de garder un nombre d'inconnues plutôt faible (Shroff et al. 2009, Wicker et al. 2013).

Cependant, même dans ces cas, il est possible que la lumière reçue par l'échantillon ne soit plus parfaitement une grille de lumière, à cause de distorsions subies lors de la

11. Chaque image est alors sensibles aux fréquences de l'objet sur le domaine $\Omega_{hI_m} = \Omega_h \ominus \Omega_{I_m}$

propagation jusqu'à l'échantillon. Les aberrations les plus difficiles à traiter sont alors celles induites par l'échantillon lui-même. La distorsion des grilles de lumière n'empêche pas d'adapter la stratégie d'estimation, mais il est alors nécessaire d'estimer la totalité de l'illumination et non plus seulement quelques paramètres (AYUK et al. 2013).

Le fait de donner une structuration précise, comme une grille de lumière à l'illumination, perd alors une grande partie de son intérêt si l'illumination doit être totalement ré-estimée *a posteriori*. Dans ce cas, on peut chercher à privilégier des motifs plus simples à générer, par exemple des motifs de speckle. C'est dans cette optique que des approches *Blind-SIM* (MUDRY et al. 2012, LABOUESSE, NEGASH et al. 2017) ont été développées, estimant conjointement l'objet et les illuminations, avec certaines contraintes sur ces dernières. Cependant, ces approches, et plus généralement les méthodes d'estimation jointes, ont un défaut majeur : l'estimation des illuminations est nécessaire à la reconstruction, mais totalement superflue pour l'expérimentateur qui ne s'intéresse qu'à l'estimation de l'objet. De plus, chaque nouvelle image demande d'estimer une nouvelle illumination, c'est-à-dire que le nombre de paramètres à estimer augmente globalement au même rythme que le nombre de mesures. Une conséquence fâcheuse est qu'il n'est pas garanti qu'augmenter le nombre d'illuminations permette d'améliorer la qualité de la reconstruction (PAWITAN 2001).

1.4.3.4. Méthodes sans estimation des illuminations

Une approche plus robuste, que la reconstruction jointe, serait de passer par une méthode de reconstruction marginale, où l'on ne cherche qu'à estimer la quantité d'intérêt ρ, sans chercher à estimer les différentes illuminations I_m. Une approche permettant d'éviter l'estimation des illuminations consiste à travailler sur les moments statistiques des images (PEARSON 1936). On va chercher à faire correspondre les moments empirique et théorique des images observées. Dans ce cas, pour des questions de robustesse et de simplicité, les moments d'ordre les plus faibles sont généralement privilégiés, car les moments empiriques convergent plus rapidement vers les moments théoriques.

Ceci n'est pas sans rappeler la méthode SOFI, qui se base sur le moment d'ordre n des fluctuations du scintillement des fluorophores. Cette méthode ne rentre pas directement dans le cadre de la microscopie à éclairement structurée, car les changements d'émissions de fluorescence proviennent de l'activation stochastique des fluorophores et non pas de l'illumination, qui est uniforme. Cependant, il existe une variante S-SOFI (MINKWAN et al. 2015), qui reprend les principes de SOFI, pour des problèmes de fluorescence plus classiques, dans lesquels les variations entre les images proviennent de l'utilisation de différents éclairements de speckle. Dans ce cas, on enregistre de multiples images avec différentes illuminations de speckle, et l'on forme la variance de celles-ci. La reconstruction est ensuite basée sur une déconvolution de la variance par h^2, ce qui permet de se passer totalement de l'estimation des illuminations. Une autre méthode notable est l'imagerie par speckle dynamique (DSI [12]) (VENTALON et al.

12. Dynamic Speckle Imaging

2005), qui utilise directement l'écart-type des images comme estimateur super-résolu de l'objet, et se passe une fois encore de l'estimation des illuminations. Cependant, ces deux techniques négligent le lien complexe entre l'échantillon et la statistique des images utilisée et ne sont donc pas quantitatives.

Ce lien a été clairement établi dans le cadre de la microscopie par éclairement aléatoire (RIM - *Random Illumination Microscopy*) (IDIER et al. 2018). Dans RIM, on estime la densité de fluorescence, en résolvant un problème inverse non linéaire basé sur la covariance des images. Cette méthode a ensuite été raffinée pour se contenter d'utiliser uniquement la variance des images (LABOUESSE, IDIER, SENTENAC, MANGEAT et al. 2021, MANGEAT et al. 2021). RIM s'appuie sur une théorie générale offrant des garanties sur la capacité de super-résolution des imageurs avec des éclairements aléatoires (LABOUESSE, IDIER, SENTENAC, ALLAIN et al. 2021), développée principalement pour la microscopie de fluorescence, tout en restant suffisamment générale pour pouvoir éventuellement trouver des applications dans d'autres domaines. Ce formalisme permet notamment d'établir des conditions pour lesquelles il est possible de garantir l'identifiabilité des composantes fréquentielles de l'objet, et donc de montrer que RIM possède le même pouvoir de super-résolution que SIM.

La suite de ce manuscrit est consacrée à l'étude du formalisme RIM, ainsi qu'au développement de nouvelles méthodes de reconstructions, permettant d'utiliser RIM dans d'autres cadres que la microscopie de fluorescence 2D, à savoir la microscopie 3D et la microscopie cohérente.

2. Théorie de la microscopie par éclairements aléatoires (RIM)

Sommaire

2.1. Généralités 48
2.1.1. Modèle d'imagerie et hypothèses 48
2.1.2. Propriétés des éclairements de speckle 49
2.1.2.1. Description du phénomène de speckle 49
2.1.2.2. Statistiques en champ 50
2.1.2.3. Statistiques en intensité 51
2.2. Capacité de super-résolution de RIM 52
2.2.1. Cas de la moyenne 52
2.2.2. Cas de la covariance 52
2.2.3. Cas de la variance 53
2.2.3.1. Etude des capacités de super-résolution 54
2.2.3.2. Unicité de la reconstruction en épi-fluorescence 54
2.3. Reformulation de la variance 56
2.3.1. Décomposition spectrale 56
2.3.2. Approximation de la variance par troncature 58
2.3.3. Cas particulier de la troncature de rang 1 60
2.4. Quelques cas particuliers 62
2.4.1. Cas particulier des sources isolées 62
2.4.1.1. Une source unique 62
2.4.1.2. Cas de deux sources 63
2.4.2. Cas particulier d'illuminations 64
2.4.3. Illumination totalement correllée 64
2.4.4. Illumination totalement décorrélée 65
2.5. Conclusion 65

2.1. Généralités

2.1.1. Modèle d'imagerie et hypothèses

La microscopie par éclairements aléatoires (RIM) est une modalité d'imagerie super-résolue utilisant des éclairements structurés de type speckle. Cette méthode se distingue des autres méthodes de super-résolution par éclairements structurés en proposant un procédé de reconstruction dans lequel l'estimation des illuminations utilisées n'est pas nécessaire. Pour fonctionner, RIM résout un problème de *moment matching*, et plus précisément, un *variance matching* dans LABOUESSE, IDIER, SENTENAC, MANGEAT et al. 2021. Ce chapitre est consacré à l'étude théorique des statistiques [1] des images RIM, acquises selon le modèle d'imagerie sous illumination non uniforme :

$$Y_m(\boldsymbol{r}) = \int h(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\rho(\boldsymbol{r}_1)I_m(\boldsymbol{r}_1)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1. \tag{2.1}$$

Dans cette thèse, nous allons principalement nous intéresser au cadre de la microscopie de fluorescence, une modalité d'imagerie incohérente, présentée dans le chapitre 1. Dans ce cadre, les illuminations I_m sont des réalisations d'intensité d'un champ aléatoire sur $\mathbb{R}^d$, ρ est la densité de fluorescence que l'on souhaite reconstruire, et h est la PSF incohérente du microscope.

Le modèle (2.1) reste suffisamment général pour être applicable à une grande variété de problèmes d'imagerie, bien au-delà de la microscopie de fluorescence. On retrouve par exemple la télédétection radar (MUNSON et al. 1983) ainsi que le scanner à micro-ondes (VAN DEN BERG et al. 2003). Pour d'autres modalités, par exemple la tomographie de diffraction (HAEBERLÉ et al. 2010), les grandeurs impliquées h, ρ et I_m peuvent même être complexes. C'est également le cas dans le cadre de la microscopie cohérente, pour laquelle une extension de la méthode RIM est étudiée dans le chapitre 5.

Dans le cadre de la microscopie de fluorescence, les contraintes physiques imposent un certain nombre d'hypothèses sur les quantités intervenant dans le modèle (2.1) (MERTZ 2019[Chap.4]).

— La PSF h est positive et paire, et par conséquent sa transformée de Fourier (l'OTF) $\widetilde{h}$ est symétrique et réelle.
— La PSF h est intégrable et de carré intégrable
— L'OTF $\widetilde{h}$ est non nulle uniquement sur le support borné Ω_h, qui dans le cadre de l'imagerie 2D est un disque de rayon $\frac{2\mathrm{NA}}{\lambda}$ (voir Fig. 1.3)
— La densité de fluorescence ρ est également une fonction positive

Afin d'assurer un bon fonctionnement de la méthode RIM, il est également nécessaire de spécifier certaines propriétés statistiques des illuminations. Ainsi, on suppose de plus que les illuminations sont indépendantes, de même loi, et stationnaires au second ordre. On supposera également que leurs moments statistiques d'ordre 1 et

1. Pour ne pas repréciser à chaque fois, dans ce chapitre, le terme *les statistiques* désignera spécifiquement les statistiques d'ordre 1 et 2, c'est-à-dire moyenne, covariance (et ses dérivées : variance et écart-type)

2 sont connus. Ceci s'applique en particulier dans le cadre classique de RIM pour lequel les illuminations sont des motifs de speckle, dont les propriétés sont discutées ci-après.

2.1.2. Propriétés des éclairements de speckle

2.1.2.1. Description du phénomène de speckle

Le choix de ce type d'éclairement a été principalement motivé par l'omniprésence du phénomène de speckle en optique. Une explication détaillée de ce phénomène pourra être trouvée dans Joseph W. GOODMAN 2007, et nous nous contenterons d'en rappeler ses principales caractéristiques. Visuellement, le motif de speckle est un motif aléatoire continu, présentant des taches claires et des taches sombres, dont les coupes transverse et axiale sont représentées sur Fig 2.1.

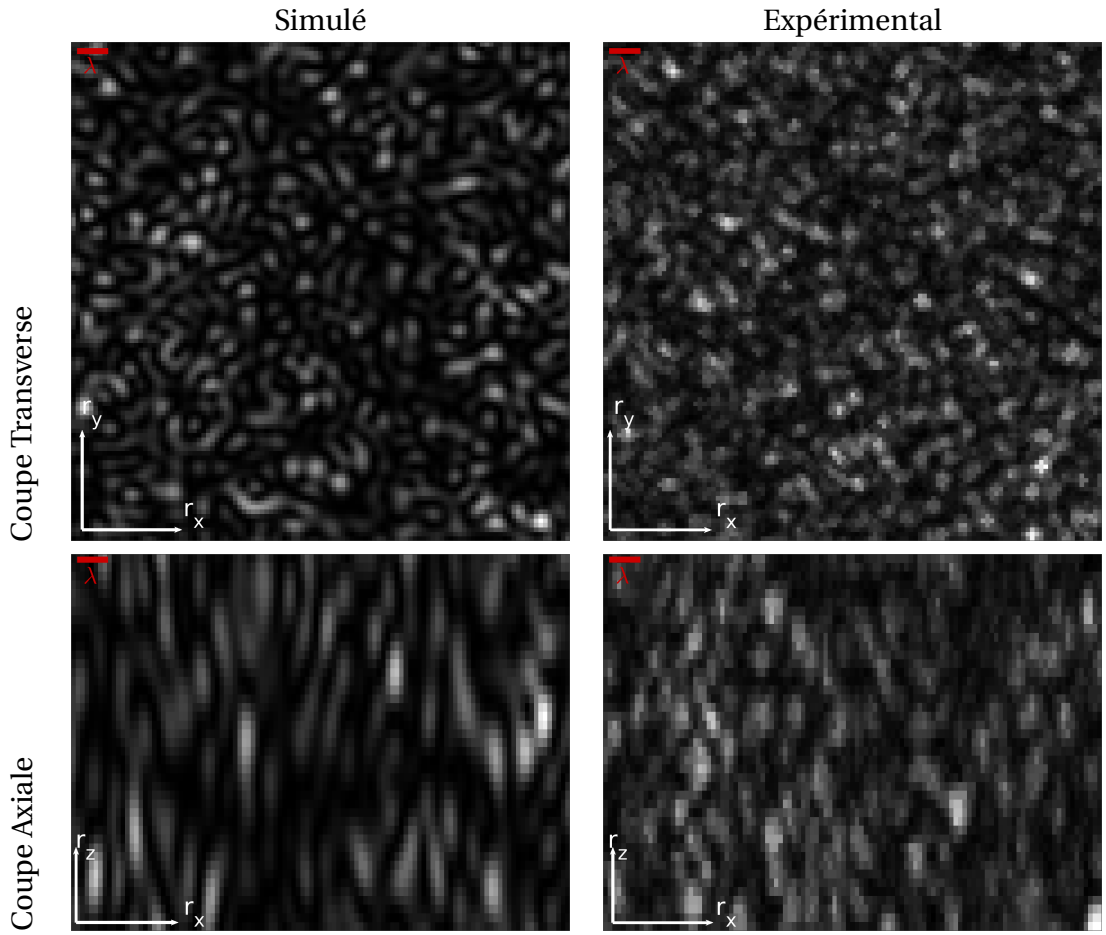


FIGURE 2.1. – Coupes transverse et axiale d'un speckle en intensité, simulée et expérimentale

Ces figures correspondent à l'intensité d'un champ complexe aléatoire E_m, qui dans le cas des éclairements de speckle se modélise comme étant le champ produit par un

grand nombre de sources cohérentes entre elles avec des phases aléatoires uniformément distribuées sur l'intervalle $[-\pi,\pi[$. De tels ensembles de sources apparaissent naturellement dans des milieux inhomogènes. Par exemple, les aspérités d'une surface rugueuse réfléchissante se comportent toutes comme de telles sources secondaires. De même, la diffusion d'un faisceau cohérent au travers d'un objet suffisamment diffusant, c'est-à-dire introduisant de nombreux déphasages, crée également un motif de speckle.

La distribution des sources de champ électromagnétique peut se modéliser comme un bruit blanc gaussien η (Joseph W. GOODMAN 2007[Chap.2]) temporellement décorrélé :

$$\langle \eta(\boldsymbol{r},t)\rangle = 0 \tag{2.2}$$

$$\langle \eta(\boldsymbol{r},t)\eta^*(\boldsymbol{r}_1,t)\rangle = \delta(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1) \tag{2.3}$$

On rappelle que dans l'expression précédente, $\langle\cdot\rangle$ désigne une moyenne temporelle, ou de manière équivalente, une moyenne sur un grand nombre de réalisations, si l'on suppose que les réalisations changent à intervalles de temps réguliers.

Le champ électrique produit après propagation, ou passage à travers d'un objectif sera alors la convolution de cette distribution de source avec un noyau de convolution, correspondant à la fonction de Green dans le cas d'une propagation libre, et à la PSF du microscope dans le cas de la propagation au travers d'un objectif. Dans la suite, nous considèrerons que cette propagation se fait au travers d'un objectif de PSF cohérente $\mathscr{H}_{\mathrm{Illu}}$. Le champ électrique après l'objectif est alors une version filtrée de la distribution de source :

$$E(\boldsymbol{r},t) = \int \mathscr{H}_{\mathrm{Illu}}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\eta(\boldsymbol{r}_1,t)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1. \tag{2.4}$$

2.1.2.2. Statistiques en champ

On vérifie de manière immédiate que la moyenne en champ du speckle est nulle :

$$\langle E(\boldsymbol{r},t)\rangle = \int \mathscr{H}_{\mathrm{Illu}}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\,\langle\eta(\boldsymbol{r}_1,t)\rangle\,\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1 = 0. \tag{2.5}$$

Pour ce qui est de la covariance, le calcul est un peu plus compliqué. Celle-ci est donnée par :

$$\begin{aligned}
\Gamma_E(\boldsymbol{r};\boldsymbol{r}') &= \langle E_m(\boldsymbol{r})E_m^*(\boldsymbol{r}')\rangle \\
&= \iint \mathscr{H}_{\mathrm{Illu}}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\mathscr{H}_{\mathrm{Illu}}^*(\boldsymbol{r}'-\boldsymbol{r}_2)\,\langle\eta(\boldsymbol{r}_1,t)\eta^*(\boldsymbol{r}_2,t)\rangle\,\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1\mathrm{d}\boldsymbol{r}_2 \\
&= \iint \mathscr{H}_{\mathrm{Illu}}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\mathscr{H}_{\mathrm{Illu}}^*(\boldsymbol{r}'-\boldsymbol{r}_2)\delta(\boldsymbol{r}_1-\boldsymbol{r}_2)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1\mathrm{d}\boldsymbol{r}_2 \\
\Gamma_E(\boldsymbol{r};\boldsymbol{r}') &= \frac{I_0}{2}\int \mathscr{H}_{\mathrm{Illu}}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\mathscr{H}_{\mathrm{Illu}}^*(\boldsymbol{r}'-\boldsymbol{r}_1)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1.
\end{aligned}$$

En passant les quantités $\mathscr{H}_{\text{Illu}}$ dans le domaine de Fourier on obtient :

$$\begin{aligned}
\Gamma_E(\boldsymbol{r};\boldsymbol{r}') &= \frac{I_0}{2}\int\Big(\int \widetilde{\mathscr{H}}(\boldsymbol{k}_1)e^{-i\boldsymbol{k}_1\cdot(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)}\mathrm{d}\boldsymbol{k}_1\Big)\Big(\int \widetilde{\mathscr{H}}^*_{\text{Illu}}(-\boldsymbol{k}_2)e^{-i\boldsymbol{k}_2\cdot(\boldsymbol{r}'-\boldsymbol{r}_1)}\mathrm{d}\boldsymbol{k}_2\Big)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1 \\
&= \frac{I_0}{2}\iiint \widetilde{\mathscr{H}}_{\text{Illu}}(\boldsymbol{k}_1)\widetilde{\mathscr{H}}^*(-\boldsymbol{k}_2)e^{-i\boldsymbol{k}_1\cdot\boldsymbol{r}}e^{-i\boldsymbol{k}_2\cdot\boldsymbol{r}'}e^{-i(\boldsymbol{k}_1+\boldsymbol{k}_2)\cdot\boldsymbol{r}_1}\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1\mathrm{d}\boldsymbol{k}_1\mathrm{d}\boldsymbol{k}_2 \\
&= \frac{I_0}{2}\int \widetilde{\mathscr{H}}_{\text{Illu}}(\boldsymbol{k}_1)\widetilde{\mathscr{H}}^*_{\text{Illu}}(-\boldsymbol{k}_2)e^{-i\boldsymbol{k}_1\cdot\boldsymbol{r}}e^{-i\boldsymbol{k}_2\cdot\boldsymbol{r}'}\delta(\boldsymbol{k}_1+\boldsymbol{k}_2)\mathrm{d}\boldsymbol{k}_1\mathrm{d}\boldsymbol{k}_2 \\
\Gamma_E(\boldsymbol{r};\boldsymbol{r}') &= \frac{I_0}{2}\int |\widetilde{\mathscr{H}}_{\text{Illu}}(\boldsymbol{k}_1)|^2 e^{-i\boldsymbol{k}_1\cdot(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}')}\mathrm{d}\boldsymbol{k}_1. \qquad (2.6)
\end{aligned}$$

On retrouve alors que le speckle est stationnaire au second ordre, puisque sa fonction d'auto-corrélation est invariante par translation. Par ailleurs, sa transformée de Fourier est le module carré de $\widetilde{\mathscr{H}}_{\text{Illu}}$. En particulier, dans le cas où $\widetilde{\mathscr{H}}_{\text{Illu}}$ est une fonction binaire, comme par exemple la pupille d'un objectif définie (1.29), on a : $\widetilde{\mathscr{H}}_{\text{Illu}} = |\widetilde{\mathscr{H}}_{\text{Illu}}|^2$. On trouve alors $\Gamma_E(\boldsymbol{r};\boldsymbol{r}') \propto \mathscr{H}_{\text{Illu}}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}')$, c'est-à-dire que la fonction d'auto-corrélation d'un champ de speckle est proportionnelle à la PSF cohérente de l'objectif au travers duquel le champ s'est propagé.

2.1.2.3. Statistiques en intensité

En microscopie de fluorescence, c'est l'intensité du champ incident qui intervient dans le modèle (2.1), et pas simplement le champ incident. On peut de la même manière que précédemment, calculer les statistiques de l'intensité du champ produit par les speckles. Pour le calcul de la moyenne on a :

$$\begin{aligned}
\langle I(\boldsymbol{r},t)\rangle &= \langle |E(\boldsymbol{r},t)|^2\rangle \qquad (2.7)\\
&= \int \mathscr{H}_{\text{Illu}}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\mathscr{H}^*_{\text{Illu}}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_2)\,\langle \eta(\boldsymbol{r},t)\eta^*(\boldsymbol{r}_1,t)\rangle\,\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1\mathrm{d}\boldsymbol{r}_2 \qquad (2.8)\\
&= \int \mathscr{H}_{\text{Illu}}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\mathscr{H}^*_{\text{Illu}}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_2)\delta(\boldsymbol{r}_1-\boldsymbol{r}_2)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1\mathrm{d}\boldsymbol{r}_2 \qquad (2.9)\\
&= \int |\mathscr{H}_{\text{Illu}}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)|^2\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1 \qquad (2.10)\\
\langle I(\boldsymbol{r},t)\rangle &= I_0 \qquad (2.11)
\end{aligned}$$

et on trouve que l'intensité moyenne du champ est spatialement uniforme. Pour le calcul de la covariance associée à l'intensité du speckle, on a :

$$\begin{aligned}
\Gamma_I(\boldsymbol{r},\boldsymbol{r}') &= \langle I(\boldsymbol{r})I^*(\boldsymbol{r}')\rangle - \langle I(\boldsymbol{r})\rangle\langle I(\boldsymbol{r}')\rangle^* \\
&= \langle E(\boldsymbol{r})E^*(\boldsymbol{r})E(\boldsymbol{r}')E^*(\boldsymbol{r}')\rangle - \langle E(\boldsymbol{r})E^*(\boldsymbol{r})\rangle\langle E(\boldsymbol{r}')E^*(\boldsymbol{r}')\rangle \qquad (2.12)\\
&= 2\langle E(\boldsymbol{r})E^*(\boldsymbol{r}')\rangle\langle E^*(\boldsymbol{r})E(\boldsymbol{r}')\rangle - \langle E(\boldsymbol{r})E^*(\boldsymbol{r})\rangle\langle E(\boldsymbol{r}')E^*(\boldsymbol{r}')\rangle \qquad (2.13)\\
&= \langle E(\boldsymbol{r})E^*(\boldsymbol{r}')\rangle\langle E^*(\boldsymbol{r})E(\boldsymbol{r}')\rangle \\
\Gamma_I(\boldsymbol{r},\boldsymbol{r}') &= |\Gamma_E(\boldsymbol{r};\boldsymbol{r}')|^2. \qquad (2.14)
\end{aligned}$$

Le passage de la ligne (2.12) à ligne (2.13) se justifie en utilisant les propriétés des moments d'un champ gaussien (J. W. GOODMAN 1996[Chap.4]). Le speckle étant stationnaire au second ordre, on notera dans la suite $\Gamma_I(\boldsymbol{r},\boldsymbol{r}') = \gamma(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}')$. On constate alors que la corrélation en intensité des speckles est simplement le module carré de la fonction d'auto-corrélation en champ des speckles. Si $\widetilde{\mathscr{H}}_{\text{Illu}}$ est une fonction indicatrice, on a de plus $\gamma(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}') \propto |\mathscr{H}_{\text{Illu}}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}')|^2$, ce qui correspond à la PSF incohérente de l'objectif d'illumination définie (1.24). Ainsi, dans le cadre de la microscopie en épi-fluorescence, où le champ incident se propage au travers de l'objectif de collection, on a $\mathscr{H} = \mathscr{H}_{\text{Illu}}$, et la fonction d'auto-corrélation est directement proportionnelle à la PSF d'observation, c'est-à-dire $\gamma \propto h$.

La connaissance de ces statistiques va nous permettre de réaliser une étude théorique des capacités de super-résolution de RIM.

2.2. Capacité de super-résolution de RIM

Une fois les statistiques des éclairements de speckle connus, il devient possible de calculer les statistiques des images à partir de celles des éclairements et d'analyser la capacité de super-résolution de la microscopie RIM. Cette section sera principalement un rappel des résultats théoriques démontrés dans IDIER et al. 2018, LABOUESSE, IDIER, SENTENAC, ALLAIN et al. 2021 et LABOUESSE, IDIER, ALLAIN et al. 2024.

2.2.1. Cas de la moyenne

Le calcul de la moyenne des images est assez direct, et en utilisant (2.11), on obtient :

$$\begin{aligned}\langle Y_m(\boldsymbol{r})\rangle &= \int h(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\rho(\boldsymbol{r}_1)\langle I_m(\boldsymbol{r}_1)\rangle \mathrm{d}\boldsymbol{r}_1 \\ &= I_0 \int h(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\rho(\boldsymbol{r}_1)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1 \end{aligned} \tag{2.15}$$

La moyenne des images est alors équivalente à une unique image réalisée avec l'éclairement moyen, d'intensité spatialement uniforme I_0. Par conséquent, la moyenne des images RIM s'apparente à une image widefield ne contenant aucune information sur les fréquences de l'objet à l'extérieur de Ω_{h}, et ce malgré le fait que les images ont été obtenues sous illuminations non uniformes. Pour s'affranchir de cette limitation, il est nécessaire de passer à l'utilisation des statistiques au second ordre.

2.2.2. Cas de la covariance

La moyenne n'étant pas suffisante pour retrouver de l'information super-résolue, il est nécessaire de s'intéresser aux moments d'ordre 2 des images, c'est-à-dire leur

covariance, donnée par :

$$\begin{aligned}\Gamma_Y(\boldsymbol{r},\boldsymbol{r}') &= \langle Y(\boldsymbol{r})Y^*(\boldsymbol{r}')\rangle - \langle Y(\boldsymbol{r})\rangle\langle Y^*(\boldsymbol{r}')\rangle \\ &= \iint h(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)h^*(\boldsymbol{r}'-\boldsymbol{r}_2)\rho(\boldsymbol{r}_1)\rho^*(\boldsymbol{r}_2)\Big(\langle I(\boldsymbol{r}_1)I^*(\boldsymbol{r}_2)\rangle - \langle I(\boldsymbol{r}_1)\rangle\langle I(\boldsymbol{r}_2)\rangle^*\Big)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1\mathrm{d}\boldsymbol{r}_2 \\ &= \iint h(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)h^*(\boldsymbol{r}'-\boldsymbol{r}_2)\rho(\boldsymbol{r}_1)\rho^*(\boldsymbol{r}_2)\gamma(\boldsymbol{r}_1-\boldsymbol{r}_2)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1\mathrm{d}\boldsymbol{r}_2 \qquad (2.16)\end{aligned}$$

Contrairement au cas de la moyenne, où l'on avait un problème de convolution linéaire, la covariance est ici une forme quadratique en fonction de l'objet. Par conséquent, aucune analyse directe par le théorème de convolution n'est possible afin de déterminer les fréquences qui seront normalement identifiables. Une étude spécifique de cette covariance, disponible dans IDIER et al. 2018, est alors nécessaire. Son résultat principal est :

Théorème 1 *Sous réserve que l'hypothèse $\Omega_\gamma \subseteq \Omega_\mathrm{h}$ soit vérifiée, il est possible de reconstruire sans ambiguïté les fréquences de l'objet sur le domaine $\Omega_{\gamma^2} := \Omega_\gamma \ominus \Omega_\gamma$.*

Notons que le domaine Ω_{γ^2} est alors contenu dans le domaine $\Omega_{\mathrm{h}\gamma}$ théoriquement accessible en utilisant des éclairements structurés. Si l'on se place en épi-fluorescence on a $\Omega_\gamma = \Omega_\mathrm{h}$, c'est-à-dire $\Omega_{\gamma^2} = \Omega_{\mathrm{h}\gamma}$, et la covariance offre les mêmes capacités de super-résolution théoriques que les autres méthodes par éclairements structurés. Cependant, cette covariance est difficilement exploitable en pratique, car elle se calcule à partir d'une intégration sur six variables spatiales, et peut difficilement être stockée en mémoire pour de grosses images (voir Chapitre 3).

2.2.3. Cas de la variance

En plus d'être numériquement inexploitable, la covariance semble contenir plus d'informations que nécessaire pour retrouver l'objet. En effet, Γ_Y est une fonction de deux variables d'espace, alors que nous cherchons à estimer ρ_0, qui ne dépend que d'une variable d'espace. Pour revenir sur un problème de dimension comparable, on peut simplement fixer une distance de corrélation $\delta\boldsymbol{r}$, et travailler uniquement avec la quantité $\Gamma_Y(\boldsymbol{r},\boldsymbol{r}+\delta\boldsymbol{r})$.

Le choix le plus simple est de considérer $\delta\boldsymbol{r} = 0$, ce qui revient à travailler avec la variance des données. On a alors par définition :

$$\mathrm{Var}_Y(\boldsymbol{r}) := \Gamma_Y(\boldsymbol{r},\boldsymbol{r}) = \iint h(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)h^*(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_2)\gamma(\boldsymbol{r}_1-\boldsymbol{r}_2)\rho(\boldsymbol{r}_1)\rho^*(\boldsymbol{r}_2)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1\mathrm{d}\boldsymbol{r}_2. \qquad (2.17)$$

Cette équation de variance (2.17) est l'expression principale autour de laquelle la majorité des résultats de RIM sont construits, que ce soit l'analyse de capacités de résolution de la méthode RIM (voir infra) ou l'implémentation de méthodes numériques (voir Chap. 3). Les principaux points que nous allons chercher à montrer dans cette section sont que :

1. La variance est sensible aux composantes de l'objet dans le domaine $\Omega_{\mathrm{h}\gamma}$.

2. Dans le cas de la microscopie en épi-fluorescence, la variance est suffisante pour retrouver l'objet super-résolu sur le domaine $\Omega_{\mathrm{h}\gamma} = \Omega_{h^2}$.

2.2.3.1. Etude des capacités de super-résolution

En réécrivant toutes les quantités dans le domaine de Fourier, on a :

$$\mathrm{Var}_\rho(\boldsymbol{r}) = \iint \widetilde{h}(\boldsymbol{k}_1)\widetilde{h}^*(-\boldsymbol{k}_2)\widetilde{A}(\boldsymbol{k}_1,\boldsymbol{k}_2)e^{i(\boldsymbol{k}_1+\boldsymbol{k}_2)\cdot\boldsymbol{r}}\mathrm{d}\boldsymbol{k}_1\mathrm{d}\boldsymbol{k}_2 \tag{2.18}$$

$$\text{avec} \quad \widetilde{A}(\boldsymbol{k}_1,\boldsymbol{k}_2) = \int \widetilde{\rho}(\boldsymbol{k}_1-\boldsymbol{k}_3)\widetilde{\rho}^*(-\boldsymbol{k}_2-\boldsymbol{k}_3)\widetilde{\gamma}(\boldsymbol{k}_3)\mathrm{d}\boldsymbol{k}_3 \tag{2.19}$$

Du fait des contraintes de support, on obtient $\boldsymbol{k}_1 \in \Omega_{\mathrm{h}}$ et $-\boldsymbol{k}_2 \in \Omega_{\mathrm{h}}$. De même, l'intégrale de $\widetilde{A}$ se calcule sur le domaine $\boldsymbol{k}_3 \in \Omega_\gamma$. Ainsi seules les valeurs de $\widetilde{\rho}$ sur le domaine $\Omega_{\mathrm{h}} \ominus \Omega_\gamma$ vont impacter le calcul de la variance, c'est-à-dire que la variance est précisément sensible aux composantes de l'échantillon sur le domaine $\Omega_{\mathrm{h}\gamma}$ des fréquences reconstructibles en microscopie par éclairement structurée.

De plus, en prenant la transformée de Fourier de la variance, on obtient :

$$\begin{aligned}
\widetilde{\mathrm{Var}_\rho}(\boldsymbol{k}) &= \iiint \widetilde{h}(\boldsymbol{k}_1)\widetilde{h}(\boldsymbol{k}_2)\widetilde{A}(\boldsymbol{k}_1,\boldsymbol{k}_2)e^{i(\boldsymbol{k}_1+\boldsymbol{k}_2-\boldsymbol{k})\cdot\boldsymbol{r}}\mathrm{d}\boldsymbol{k}_1\mathrm{d}\boldsymbol{k}_2\mathrm{d}\boldsymbol{r} \\
&= \iint \widetilde{h}(\boldsymbol{k}_1)\widetilde{h}(\boldsymbol{k}_2)\widetilde{A}(\boldsymbol{k}_1,\boldsymbol{k}_2)\delta(\boldsymbol{k}_1+\boldsymbol{k}_2-\boldsymbol{k})\mathrm{d}\boldsymbol{k}_1\mathrm{d}\boldsymbol{k}_2 \\
\widetilde{\mathrm{Var}_\rho}(\boldsymbol{k}) &= \int \widetilde{h}(\boldsymbol{k}_1)\widetilde{h}(\boldsymbol{k}-\boldsymbol{k}_1)\widetilde{A}(\boldsymbol{k}_1,\boldsymbol{k}-\boldsymbol{k}_1)\mathrm{d}\boldsymbol{k}_1
\end{aligned} \tag{2.20}$$

En particulier, étant donné une fréquence $\boldsymbol{k}$, pour que l'expression (2.20) soit non nulle, il faut que l'inteserction du support des fonctions $\widetilde{h}$ et $\widetilde{h}(\boldsymbol{k}-\cdot)$ soit non vide. Ceci est vérifié uniquement lorsque $\boldsymbol{k}$ appartient au domaine, $\Omega_{\mathrm{h}} \ominus \Omega_{\mathrm{h}} = \Omega_{h^2}$. Ainsi, la variance à un support spectral correspondant à celui de l'auto-convolution de Ω_{h}, ce qui est cohérent avec le fait que la variance fasse intervenir le carré d'images limitées à ce domaine.

2.2.3.2. Unicité de la reconstruction en épi-fluorescence

Replaçons-nous dans le cadre de la microscopie en épi-illumination comme présentée dans le chapitre 1 (voir Fig. 1.4), avec une pupille non aberrée, c'est-à-dire que l'on a $\gamma \propto h$. Dans la suite, on supposera que le coefficient de proportionnalité vaut 1 pour ne pas devoir le spécifier dans les calculs. Il devient alors possible de garantir que l'on peut alors retrouver un unique objet *positif* sur le domaine $\Omega_{\mathrm{h}\gamma}$ à partir de la variance mesurée. Plus précisément, on a le théorème suivant :

Théorème 2 *Dans le cas où $h = \gamma$, deux objets positifs produisent la même variance si et seulement si leurs transformées de Fourier sont égales sur le domaine $\Omega_{\mathrm{h}\gamma} = \Omega_{h^2}$.*

Nous proposons ici le résultat de LABOUESSE, IDIER, ALLAIN et al. 2024, qui est une extension, au cadre continu, du résultat présenté dans LABOUESSE, IDIER, SENTENAC,

ALLAIN et al. 2021 avec des opérateurs discrets.

Pour commencer, notons que la variance de n'importe quel échantillon ρ peut toujours s'écrire sous la forme $\mathrm{Var}_\rho = \mathscr{B}(\rho,\rho)$, où $\mathscr{B}$ est l'application bilinéaire symétrique [2] définie comme :

$$\mathscr{B}(\rho_1,\rho_2) = \int h(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\rho_1(\boldsymbol{r}_1)\gamma(\boldsymbol{r}_1-\boldsymbol{r}_2)\rho_2(\boldsymbol{r}_2)h(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_2)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1\mathrm{d}\boldsymbol{r}_2 \tag{2.21}$$

En utilisant les propriétés de bilinéarité et de symétrie de $\mathscr{B}$, on a :

$$\begin{aligned}\mathscr{B}(\rho_1-\rho_2,\rho_1+\rho_2) &= \mathscr{B}(\rho_1,\rho_1)+\mathscr{B}(\rho_1,\rho_2)-\mathscr{B}(\rho_2,\rho_1)-\mathscr{B}(\rho_2,\rho_2)\\ \mathscr{B}(\rho_1-\rho_2,\rho_1+\rho_2) &= \mathscr{B}(\rho_1,\rho_1)-\mathscr{B}(\rho_2,\rho_2)\end{aligned}$$

Ainsi, si deux objets ρ_1 et ρ_2 produisent la même variance, on a $\mathscr{B}(\rho_1,\rho_1)=\mathscr{B}(\rho_2,\rho_2)$, ce qui, en utilisant le résultat précédent, donne l'implication :

$$\forall \rho_1,\rho_2 \quad \mathrm{Var}_{\rho_1}=\mathrm{Var}_{\rho_2} \implies \mathscr{B}(\rho_1-\rho_2,\rho_1+\rho_2)=0 \tag{2.22}$$

De plus, en exploitant l'hypothèse $\gamma = h$, ainsi que la symétrie de h, on obtient l'égalité scalaire suivante :

$$\begin{aligned}\int \Big[\mathscr{B}(u,v)\Big](\boldsymbol{r})v(\boldsymbol{r})\mathrm{d}\boldsymbol{r} &= \int h(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)u(\boldsymbol{r}_1)\gamma(\boldsymbol{r}_1-\boldsymbol{r}_2)v(\boldsymbol{r}_2)h(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_2)v(\boldsymbol{r})\mathrm{d}\boldsymbol{r}\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1\mathrm{d}\boldsymbol{r}_2\\ &= \int\Big(\int h(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)v(\boldsymbol{r})\gamma(\boldsymbol{r}_1-\boldsymbol{r}_2)v(\boldsymbol{r}_2)h(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_2)\mathrm{d}\boldsymbol{r}\mathrm{d}\boldsymbol{r}_2\Big)u(\boldsymbol{r}_1)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1\\ &= \int\Big(\int h(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)v(\boldsymbol{r})h(\boldsymbol{r}_1-\boldsymbol{r}_2)v(\boldsymbol{r}_2)\gamma(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_2)\mathrm{d}\boldsymbol{r}\mathrm{d}\boldsymbol{r}_2\Big)u(\boldsymbol{r}_1)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1\\ \int \Big[\mathscr{B}(u,v)\Big](\boldsymbol{r})v(\boldsymbol{r})\mathrm{d}\boldsymbol{r} &= \int\Big[\mathscr{B}(v,v)\Big](\boldsymbol{r}_1)u(\boldsymbol{r}_1)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1 = \int \mathrm{Var}_v(\boldsymbol{r})u(\boldsymbol{r})\mathrm{d}\boldsymbol{r}\end{aligned} \tag{2.23}$$

Posons $u=\rho_1+\rho_2$ et $v=\rho_1-\rho_2$. En utilisant les équations (2.22) et (2.23), on obtient :

$$\begin{aligned}\forall\rho_1,\rho_2,\mathrm{Var}_{\rho_1}=\mathrm{Var}_{\rho_2} &\implies \mathscr{B}(\rho_1-\rho_2,\rho_1+\rho_2)=0\\ &\implies \int\Big[\mathscr{B}(\rho_1-\rho_2,\rho_1+\rho_2)\Big](\boldsymbol{r})\Big[\rho_1+\rho_2\Big](\boldsymbol{r})\mathrm{d}\boldsymbol{r}=0\\ &\implies \int \mathrm{Var}_{\rho_1-\rho_2}(\boldsymbol{r})\Big[\rho_1+\rho_2\Big](\boldsymbol{r})\mathrm{d}\boldsymbol{r}=0\end{aligned} \tag{2.24}$$

Notons que pour obtenir l'implication (2.24), seule l'hypothèse d'épi-fluorescence a été nécessaire. Cette égalité est donc valable pour tout objet réel, y compris négatif. Notons par ailleurs les deux cas triviaux pour lesquels le produit scalaire (2.24) est nul :

— $\rho_1=\rho_2$, alors le produit scalaire est nul car la variance associée au vecteur nul

2. Pour cette démonstration, on utilisera les contraintes que h, ρ et γ réelles

est nulle. On retrouve alors que deux objets égaux produisent la même variance.
— $\rho_1 = -\rho_2$, alors le produit scalaire est nul car la somme $\rho_1 + \rho_2$ est nulle. On a alors une indétermination sur le signe de l'objet. Cette indétermination triviale est parfaitement naturelle comme conséquence d'un problème quadratique.

En pratique, en microscopie de fluorescence, les objets sont nécessairement des quantités positives. Par conséquent, dans (2.24), les deux quantités $\mathrm{Var}_{\rho_1-\rho_2}$ et $\rho_1+\rho_2$, doivent être non négatives. Ainsi, si les objets ρ_1 et ρ_2 produisent la même variance, les fonctions $\mathrm{Var}_{\rho_1-\rho_2}$ et $\rho_1+\rho_2$ auront un support disjoint, sinon le produit scalaire (2.24) serait strictement positif. De plus, s'il existe un domaine spatial de mesure non nulle, Ω tel que $\rho_1+\rho_2$ soit strictement positive (*i.e.*, non nulle), on a nécessairement $\mathrm{Var}_{\rho_1-\rho_2}$ nulle sur Ω. La variance RIM est spectralement bornée, et est donc une fonction analytique. Ainsi, par prolongement analytique, l'annulation de la variance sur un domaine de mesure non nulle implique une variance uniformément nulle. Il reste alors à montrer que seul un objet nul sur $\Omega_{\mathrm{h}\gamma}$ produit une variance nulle. Ce résultat est assez intuitif, mais une preuve rapide sera présentée plus tard 2.3.3. Ainsi, la différence $\rho_1-\rho_2$ n'aura que des fréquences nulles sur $\Omega_{\mathrm{h}\gamma}$, ce qui revient à affirmer que les objets ρ_1 et ρ_2 sont égaux sur ce domaine.

L'implication réciproque du théorème 2 est triviale puisque la variance n'est sensible qu'aux fréquences de l'objet sur le domaine $\Omega_{\mathrm{h}\gamma}$. Ceci termine la démonstration du théorème 2.

2.3. Reformulation de la variance

2.3.1. Décomposition spectrale

La variance des images, exprimée sous la forme d'une double intégrale (de convolution) (2.17), reste compliquée à manipuler. Cependant, en utilisant la décomposition spectrale des opérateurs (DEIMLING 1985), il est possible de réexprimer la variance comme une somme pondérée de carrés de produits de convolutions (LABOUESSE, IDIER, SENTENAC, MANGEAT et al. 2021). Pour obtenir cette somme, il faut repartir de l'expression de la variance (2.17), et travailler à partir du noyau suivant :[3]

$$t(\boldsymbol{r},\boldsymbol{r}') = h(\boldsymbol{r})\gamma(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}')h^*(\boldsymbol{r}') \tag{2.25}$$

de sorte que la variance des images s'écrive comme la double convolution :

$$\mathrm{Var}_\rho(\boldsymbol{r}) = \int t(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1,\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_2)\rho(\boldsymbol{r}_1)\rho^*(\boldsymbol{r}_2)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1\mathrm{d}\boldsymbol{r}_2 \tag{2.26}$$

Par ailleurs, le noyau t est hermitien et défini non-négatif. D'après le théorème spectral, il admet donc une décomposition sous la forme d'une somme de fonctions

3. t est le noyau associé à l'opérateur intégral *linéaire* $T : \Phi \mapsto \int t(\boldsymbol{r},\boldsymbol{r}')\Phi(\boldsymbol{r}')\mathrm{d}\boldsymbol{r}'$

séparables :

$$t(\boldsymbol{r},\boldsymbol{r}') = \sum_{k\geqslant 1} \lambda_k \Psi_k(\boldsymbol{r}) \Psi_k^*(\boldsymbol{r}') \tag{2.27}$$

où $(\lambda_k)_{k\geqslant 1}$ est une famille de réels positifs que l'on peut supposer décroissante. Les $(\Psi_k)_{k\geqslant 1}$ sont des fonctions orthogonales (*i.e.*, $\int \Psi_{k_1}(\boldsymbol{r})\Psi_{k_2}(\boldsymbol{r})\mathrm{d}\boldsymbol{r} = \delta(k_1-k_2)$) de norme 1 (*i.e.*, $\int |\Psi_k|^2(\boldsymbol{r})\mathrm{d}\boldsymbol{r} = 1$). En introduisant $(u_k)_{k\geqslant 1}$ les vecteurs propres normalisées :

$$u_k(\boldsymbol{r}) := \sqrt{\lambda_k}\Psi_k(\boldsymbol{r}), \tag{2.28}$$

l'expression de la variance (2.26) devient

$$\mathrm{Var}_\rho(\boldsymbol{r}) = \sum_{k\geqslant 1} \left| \int u_k(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\rho(\boldsymbol{r}_1)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1 \right|^2. \tag{2.29}$$

Cette décomposition est semblable à la décomposition en mode cohérent de l'intensité d'un champ (WOLF 1982), où l'on réexprime l'intensité de n'importe quel champ électrique sous la forme d'une somme de modes incohérents. Par ailleurs, il est particulièrement important de décomposer le noyau t, et pas simplement la fonction γ [4].

Une représentation des vecteurs propres dans le domaine de Fourier est fournie figure 2.2. On peut alors regrouper les différents vecteurs propres selon différents ordres, de manière similaire à ce que l'on trouve dans d'autres décompositions orthogonales en optique, comme les polynômes de Zernike (TANGO 1977), ou les modes de Laguerre-Gauss (GOUBAU et al. 1961).

4. Plus en détails sur ce point dans le chapitre 5

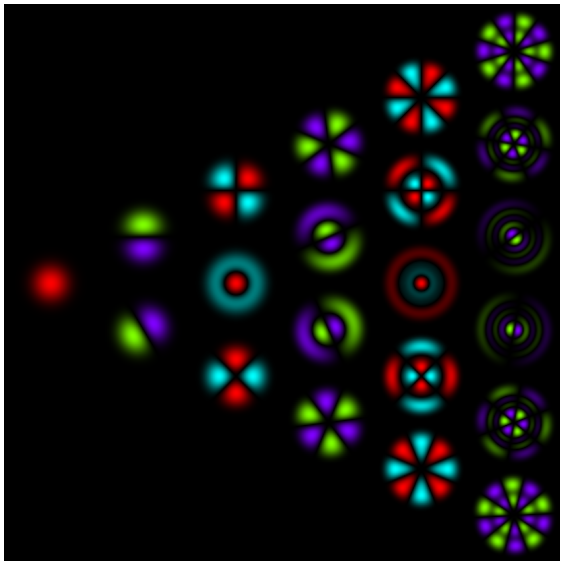


FIGURE 2.2. – Représentation des 21 premiers vecteurs propres (six ordres) de l'opérateur t dans le domaine de Fourier, dans le cadre de la microscopie en épi-fluorescence avec une pupille circulaire. La couleur représente le signe ou la phase associée (Rouge : +1, Vert : +i, Cyan : -1, Violet : -i).

2.3.2. Approximation de la variance par troncature

Dans LABOUESSE, IDIER, SENTENAC, MANGEAT et al. 2021, cette décomposition est présentée comme une façon d'accélérer les calculs numériques, s'appuyant sur une version tronquée t_K du noyau t, obtenue en ne gardant que les K premiers termes de la somme (2.27). Les détails de l'implémentation numérique sont discutés dans le chapitre 3, mais il reste possible d'estimer la qualité de l'approximation t_K, en regardant la quantité :

$$\frac{\|t - t_K\|_2^2}{\|t\|_2^2} = \frac{\sum_{k>K} \lambda_k^2}{\sum_{k\geqslant 1} \lambda_k^2}, \tag{2.30}$$

ce qui revient à s'intéresser à la vitesse de décroissance des valeurs propres du noyau t. Cette décroissance, ainsi que l'évolution de la quantité (2.30) sont représentées Fig 2.3, en échelle logarithmique.

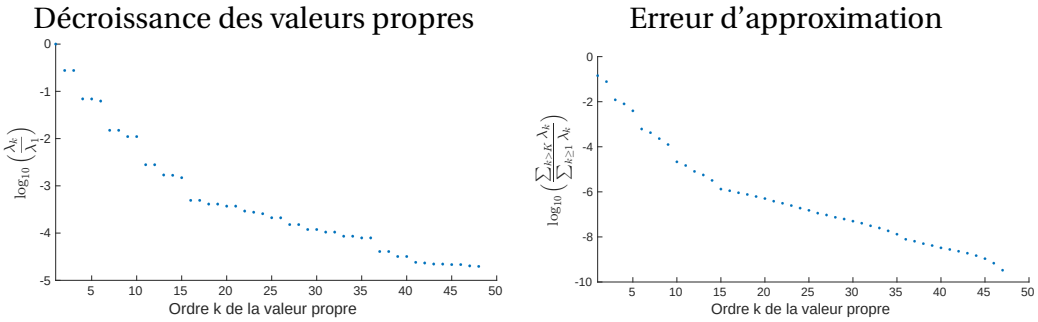


FIGURE 2.3. – Décroissance des valeurs propres de l'opérateur T, et évolution de la qualité de l'approximation t_K dans le cadre de la microscopie en épi-fluorescence

On constate alors que la décroissance des valeurs propres se fait de manière exponentielle, c'est-à-dire que le poids des premiers termes de la décomposition est nettement plus important, ce qui justifie la décroissance extrêmement rapide l'erreur d'approximation lorsque le nombre de vecteurs propres considéré augmente. Un autre point remarquable est que la majorité de valeurs propres semblent aller par paires, que l'on retrouve facilement Fig. 2.2. On peut alors regarder une variance calculée à partir de l'opérateur t complet, et la comparer avec une variance calculée à partir de l'opérateur tronqué. Cette comparaison est représentée Fig. 2.4.

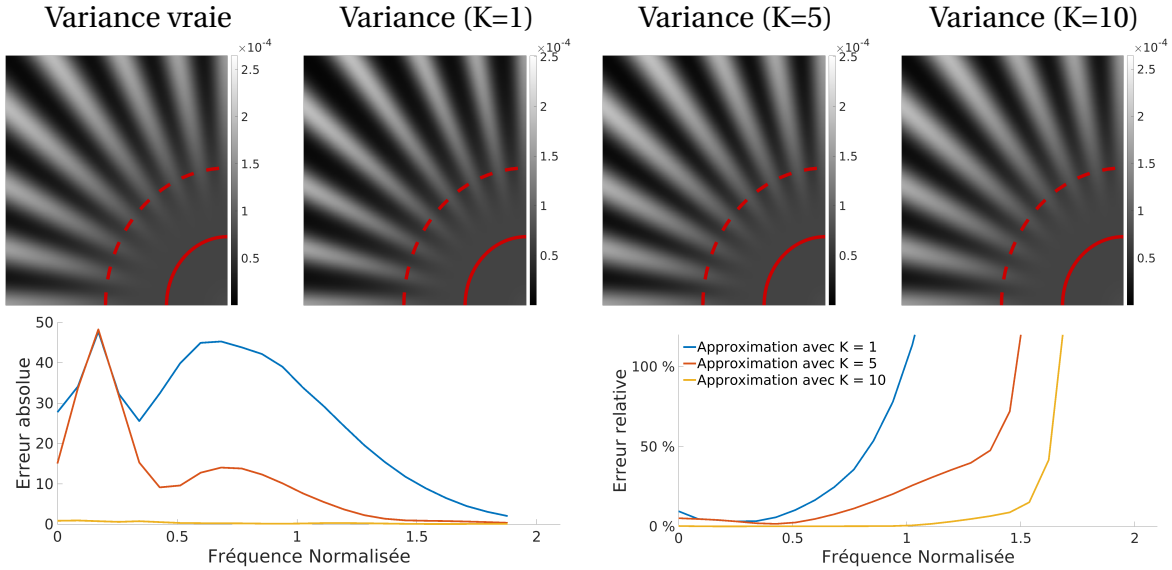


FIGURE 2.4. – Comparatif de la vraie variance asymptotique avec la variance calculée en utilisant le modèle tronqué, pour différents niveaux d'approximation et évolution de l'erreur sur la variance

Visuellement, il n'y a que très peu de différence entre les différentes approximations et la variance asymptotique, même si les approximations de rang plus faible semblent

accentuer les 'sauts de contraste'. Pour étudier la qualité de ces approximations, on regarde alors les erreurs relatives et absolues des approximations par rapport à la variance asymptotique, également présentés sur cette figure. Ces erreurs sont intégrées radialement à $|\boldsymbol{k}|$ constant :

$$\epsilon_{\text{Abs}}(|\boldsymbol{k}|) = \int_{\theta=0}^{\theta=2\pi} |\widetilde{\text{Var}}_{\rho}(|\boldsymbol{k}|,\theta) - \widetilde{\text{Var}}_{\rho,K}(|\boldsymbol{k}|,\theta)| \text{d}\theta \tag{2.31}$$

On constate que la majorité de l'erreur absolue est localisée sur les basses fréquences de l'échantillon, ce qui se justifie de deux manières.

— L'échantillon possède la majorité de son énergie dans les basses fréquences.
— L'OTF incohérente (Fig. 1.3) n'est pas 'plate', et laisse mieux passer les basses fréquences. Ce sont donc celles-ci qui possèdent le plus d'énergie dans la variance modèle, ce qui se traduit par des variations plus importantes d'erreur absolue.

L'étude de l'erreur absolue est donc fortement biaisée vers les basses fréquences, qui transportent la majorité du signal mesuré. Il est donc généralement plus pertinent de regarder l'erreur relative :

$$\epsilon_{\text{Rel}}(|\boldsymbol{k}|) = \frac{\int_{\theta=0}^{\theta=2\pi} |\widetilde{\text{Var}}_{\rho}(|\boldsymbol{k}|,\theta) - \widetilde{\text{Var}}_{\rho,K}(|\boldsymbol{k}|,\theta)| \text{d}\theta}{\int_{\theta=0}^{\theta=2\pi} |\widetilde{\text{Var}}_{\rho}(|\boldsymbol{k}|,\theta)| \text{d}\theta} \tag{2.32}$$

qui donne un discours totalement différent, puisque l'erreur relative dans les basses fréquences, globalement jusqu'à la fréquence de coupure de l'OTF, reste quasiment uniforme. Au-delà, pour un niveau de troncature K donné, il semble y avoir une fréquence au-delà de laquelle l'erreur relative explose subitement. Cette frontière se situe légèrement avant la fréquence de coupure de l'OTF pour l'approximation de rang 1, et autour de 1.5 pour les approximation de rang 5 et 10. Ainsi, l'approximation de rang K défini un niveau de niveau maximal de super-résolution à partir duquel la valeur calculée par approximation ne sera plus valable.

2.3.3. Cas particulier de la troncature de rang 1

La première contribution de cette thèse, a été d'étudier plus en détail RIM dans le cadre de l'approximation de rang 1. Ce choix peut sembler surprenant étant donné la courbe d'erreur relative précédente, dans laquelle l'erreur relative sur la variance explose au niveau de la fréquence de coupure de l'OTF. Néanmois une telle étude reste justifiable de plusieurs manières. La premier s'appuie sur Fig. 2.3, où constate que cette approximation apporte la majorité de l'information, puisque t_1 représente près de 90% de l'énergie totale de t, ce qui est également appuyé Fig. 2.4, où l'on ne voit pas de différence visuelle entre la variance asymptotique et la variance calculée à partir de la troncature de rang 1. Le second est qu'un pré-traitement des données, discuté dans la section 3.2.2, améliore grandement la convergence de l'approximation de la variance, et porte l'explosion de l'erreur d'approximation autour du facteur 1.5 pour l'approximation de rang 1 (voir Fig. 3.1).

Le dernier point, le plus important pour la suite, est que l'approximation de rang 1 permet de linéariser le modèle d'écart-type. Pour cela, repartons de l'expression (2.29) de la variance en une somme de carré de produits de convolutions, et considérons uniquement le premier terme de cette somme :

$$\mathrm{Var}_\rho(\boldsymbol{r}) \approx \left| \int u_1(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\rho(\boldsymbol{r}_1)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1 \right|^2. \tag{2.33}$$

Si l'on prend la racine carrée de l'expression précédente, et que l'on étudie cette fois l'écart-type des images, on arrive à un problème linéaire, mais encadré par des valeurs absolues.

$$\sigma_\rho(\boldsymbol{r}) \approx \left| \int u_1(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\rho(\boldsymbol{r}_1)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1 \right| \tag{2.34}$$

Il est alors fondamental de savoir sous quelles conditions on peut enlever ces valeurs absolues, leur retrait permettant d'obtenir une approximation linéaire de l'écart-type à partir de laquelle il sera possible d'estimer l'objet à l'aide d'une simple déconvolution. Pour cela, il suffit de garantir que $\int u_1(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\rho(\boldsymbol{r}_1)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1$ soit positive, pour toute valeur de $\boldsymbol{r}$. Dans le cas de la microscopie de fluorescence, la quantité ρ correspond à une densité de fluorescence, et est donc par construction non négative. Ainsi, la seule question qu'il nous reste à résoudre concerne la positivité du premier vecteur propre u_1. Cette question se ramène donc à l'étude du vecteur propre principal de l'opérateur linéaire de noyau t. En dimension finie, ceci reviendrait à appliquer le théorème de Perron-Frobenius (Deimling 1985[Chap.1]), puisque le noyau t est non négatif. Il existe des extensions plus faibles de ce théorème, applicables avec des opérateurs continus, qui permettent cependant d'obtenir le même type de résultat. Une de ces extensions, ainsi que la vérification des conditions d'applicabilité, plus longue que complexe, est fournie dans l'annexe A, ou dans l'article Giroussens et al. 2023. On peut ainsi en déduire

Proposition 1 *Dans le cadre de la microscopie en épi-fluorescence, le premier vecteur propre u_1 associé noyau intégral t est non-négatif.*

Ce qui nous permet d'enlever les valeurs absolues de l'équation (2.34) afin d'obtenir

$$\sigma_\rho(\boldsymbol{r}) \approx \int u_1(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\rho(\boldsymbol{r}_1)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1. \tag{2.35}$$

L'écart-type, peut donc être approximé comme une convolution entre l'objet et le vecteur propre principal de t. Dans ce cas, on sait qu'il sera en théorie [5] possible de retrouver les composantes fréquentielles de l'objet sur le domaine Ω_{u_1}. Par ailleurs, il est également montré en annexe que :

Proposition 2 *Lorsque $\Omega_\gamma \subseteq \Omega_\mathrm{h}$ on a $\Omega_{u_1} = \Omega_{\mathrm{h}\gamma}$*

5. En pratique, ça ne sera jamais le cas, principalement à cause de l'erreur de modèle

Commençons par noter que cette proposition permet de terminer la preuve du théorème 2, puisqu'elle garantit que le premier terme de la somme (2.29) est non nul dès que l'objet est non nul sur $\Omega_{h\gamma}$. Cette somme étant une somme de termes positifs, les termes suivants ne pourront pas annuler la première contribution, et la variance d'un objet non nul sur $\Omega_{h\gamma}$ ne peut pas être nulle.

Les propositions 1 et 2 rappellent les résultats expérimentaux de la méthode *Dynamic Speckle Imaging* (VENTALON et al. 2005) qui utilise directement l'écart-type comme estimateur super-résolu. La théorie développée ici apporte une nouvelle interprétation de cette méthode, l'équation (2.35) suggérant que l'écart-type doit être déconvolué par u_1 pour obtenir une estimée plus quantitative. Un tel procédé correspond à l'estimateur RIM-CF, qui sera étudié plus en détail dans le chapitre 3 consacré aux approches inverses pour l'estimation de l'objet.

Notons enfin que les propositions 1 et 2 sont des propriétés structurelles de t, et ne sont donc dépendantes que de la PSF du microscope h, et de la fonction d'autocorrélation γ des éclairements. Ces propriétés restent donc valables indépendamment de l'échantillon et du niveau de bruit de l'expérience, qui conservent néanmoins un impact non négligeable sur la qualité de l'approximation (2.35).

2.4. Quelques cas particuliers

2.4.1. Cas particulier des sources isolées

2.4.1.1. Une source unique

En particulier la structure, et plus précisément la densité de l'échantillon, va fortement impacter la qualité de l'approximation de rang 1 de l'écart-type (2.35). Pour illustrer ce point, considérons le cas d'un échantillon composé d'une unique source localisée à la position $\boldsymbol{r}_0$, c'est-à-dire que l'objet s'écrive :

$$\rho(\boldsymbol{r}) = \delta(\boldsymbol{r} - \boldsymbol{r}_0). \tag{2.36}$$

En reprenant l'expression analytique de la variance (2.17), et en remplaçant ρ, on obtient directement :

$$\mathrm{Var}_\rho(\boldsymbol{r}) = \gamma(0)\, h^2(\boldsymbol{r} - \boldsymbol{r}_0) \tag{2.37}$$

$$\sigma_\rho(\boldsymbol{r}) = \sqrt{\gamma(0)}\, h(\boldsymbol{r} - \boldsymbol{r}_0) \tag{2.38}$$

Dans ce cas, on constate que l'écart-type est simplement proportionnel à une PSF centrée sur la position de la bille. Cet écart-type ne contient pas plus d'information qu'une image widefield, et ni l'écart-type ni sa déconvolution ne permettront de réduire la taille de la signature associée à un émetteur isolé, par rapport à celle d'une image widefield déconvoluée. Ce constat n'invalide cependant en rien la proposition 2, le support du premier vecteur propre u_1 restant bien $\Omega_{h\gamma}$.

En fait, dans le cas d'un émetteur unique, la combinaison des équations (2.17) et

(2.29) nous donne :

$$h^2 = \sum_{k\geqslant 1} u_k^2 \quad \text{ou bien} \quad h = \Big(\sum_{k\geqslant 1} u_k^2 \Big)^{\frac{1}{2}}, \tag{2.39}$$

et ce, quel que soit h et γ. L'approximation de rang 1, revient alors à faire l'approximation

$$u_1 \approx h \tag{2.40}$$

qui est difficilement justifiable, les deux fonctions n'ayant pas le même support dans le domaine de Fourier. L'expression (2.39) est d'autant plus surprenante lorsque l'on constate, (voir Fig. 2.2), que tous les u_k ont globalement le même support dans le domaine de Fourier. Ainsi, les contributions hautes fréquences doivent parfaitement se compenser lorsque l'on rajoute des termes. Ce qui est effectivement le cas, comme illustré Fig. 2.5.

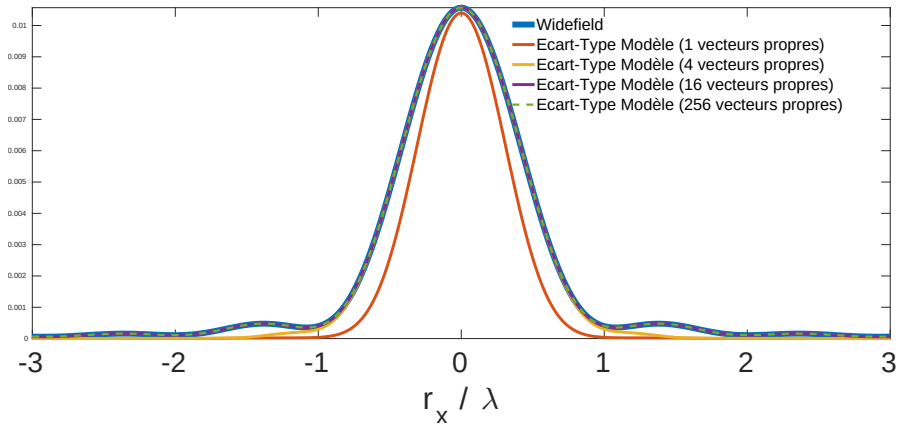


FIGURE 2.5. – Illustration de la convergence de la somme décrite (2.39), vers h lorsque le nombre de termes considéré augmente. On constate que l'approximation de rang 1 aura alors tendance à surestimer les hautes fréquences de l'écart-type modèle

Les émetteurs isolés risquent de se montrer problématiques, si l'on utilise des méthodes approchées. Cependant dans ce genre de cas, une méthode inverse exacte ne devrait pas avoir de problème, puisque le théorème 2 garantit que le seul objet positif produisant la variance (2.37) est une bille centrée sur la position $\boldsymbol{r}_0$.

Dans tous les cas, ce type d'échantillon n'est pas le plus intéressant à étudier avec RIM, puisque les méthodes de localisation de type PALM et STORM permettent de localiser des sources isolées avec une précision bien supérieure à la résolution maximale atteignable en microscopie par éclairements structurés.

2.4.1.2. Cas de deux sources

Cependant, les méthodes de localisation tendent à perdre en performance lorsque la densité de sources augmente. Pour étudier ce cas, nous allons nous concentrer sur

le cas simplifié avec deux émetteurs séparés d'une distance $\boldsymbol{r}_0$. L'objet et la variance associée s'écrivent alors :

$$\rho(\boldsymbol{r}) = \delta(\boldsymbol{r} - \frac{1}{2}\boldsymbol{r}_0) + \delta(\boldsymbol{r} + \frac{1}{2}\boldsymbol{r}_0) \tag{2.41}$$

$$v(\boldsymbol{r}) = \gamma(0)\Big(h^2(\boldsymbol{r} - \frac{1}{2}\boldsymbol{r}_0) + h^2(\boldsymbol{r} + \frac{1}{2}\boldsymbol{r}_0)\Big) + 2\gamma(\boldsymbol{r}_0)\Big(h(\boldsymbol{r} - \frac{1}{2}\boldsymbol{r}_0)h(\boldsymbol{r} + \frac{1}{2}\boldsymbol{r}_0)\Big) \tag{2.42}$$

où l'on constate l'apparition d'un terme de corrélation haute fréquence

$$2\gamma(\boldsymbol{r}_0)\Big(h(\boldsymbol{r} - \frac{1}{2}\boldsymbol{r}_0)h(\boldsymbol{r} + \frac{1}{2}\boldsymbol{r}_0)\Big).$$

Dans le cadre de la microscopie en épi-fluorescence, la fonction γ est proportionnelle à h. Dans ce cas, lorsque $\boldsymbol{r}_0$ est grand, le terme de corrélation sera négligeable, car $\gamma(\boldsymbol{r}_0) \approx 0$. On se retrouve alors dans un cas où chaque émetteur peut être vu comme un unique émetteur isolé, avec un écart-type correctement approximé par

$$\sigma_\rho(\boldsymbol{r}) \approx \sqrt{\gamma(0)}\Big(h(\boldsymbol{r} - \frac{1}{2}\boldsymbol{r}_0) + h(\boldsymbol{r} + \frac{1}{2}\boldsymbol{r}_0)\Big) \tag{2.43}$$

duquel aucun gain de résolution n'est attendu. Cependant, lorsque les sources sont à une distance proche de la limite de résolution, le terme $\gamma(\boldsymbol{r}_0)$ n'est plus négligeable, et le terme de corrélation va entraîner l'apparition de fréquences au-delà de Ω_h dans l'écart-type. Ces hautes fréquences pourront par la suite être corrigées par une déconvolution linéaire basée sur le premier vecteur propre. Une étude quantitative de cet effet semble hors d'atteinte, mais les études qualitatives proposées dans le chapitre suivant 3.5.2, montrent que l'approximation de rang 1 est particulièrement efficace sur des échantillons denses.

2.4.2. Cas particulier d'illuminations

2.4.3. Illumination totalement correllée

Plus généralement, une étude plus poussée du noyau t, en fonction de h et de γ, serait intéressante afin d'obtenir des informations plus précises sur la vitesse de décroissance des valeurs propres, ou une éventuelle expression analytique des vecteurs propres. Ces informations peuvent être particulièrement utiles pour estimer l'applicabilité de RIM dans d'autres modalités d'imagerie, par exemple en microscopie TIRF (Affannoukoué et al. 2023) ou en microscopie en profondeur de champ étendue (Mazzella et al. 2024). Si une telle étude dans un cas général est restée hors de portée de cette thèse, il existe cependant deux cas particuliers, correspondant à des situations extrêmes, qu'il est possible d'étudier analytiquement.

Le premier cas est le cas où $\gamma(\boldsymbol{r}) = 1$, correspondant au cas où l'on utilise des illuminations spatialement uniformes, d'intensité aléatoire. Dans ce cas, le noyau t et de rang 1, et devient :

$$t(\boldsymbol{r};\boldsymbol{r}') = h(\boldsymbol{r})h^*(\boldsymbol{r}') \tag{2.44}$$

Dans ce cas-là, la somme (2.29) ne contient qu'un seul terme, et, en passant à la racine carrée, on obtient que l'écart-type correspond exactement une image widefield, et n'apporte donc aucune information supplémentaire. Ceci est cohérent avec le fait que l'on ne puisse pas extraire de super-résolution à partir d'éclairements spatialement uniformes. Notons que dans ce cas, l'équation (2.39) ne contient qu'un unique terme, et l'approximation (2.40) devient exacte.

2.4.4. Illumination totalement décorrélée

Le deuxième cas limite est le cas où tous les speckles sont spatialement décorrélés, c'est-à-dire que $\gamma(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}') = \delta(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}')$. Ce cas ne vérifie plus la condition d'identifiabilité 1, mais peut se rencontrer en pratique, par exemple sur des problèmes d'opto-acoustique ((CHAIGNE et al. 2016)) où la longueur de corrélation lumineuse est négligeable devant la longueur des ondes sonores, et se modélise par un Dirac. En remplaçant γ dans l'expression (2.17), on trouve directement :

$$\mathrm{Var}_\rho(\boldsymbol{r}) = \int h^2(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1)\rho(\boldsymbol{r}_1)^2 \mathrm{d}\boldsymbol{r}_1 \tag{2.45}$$

c'est-à-dire que la variance des images est la convolution entre h^2 et ρ^2. Cette fois, la variance affiche une dépendance par rapport au carré de ρ, ce qui ne garanti pas un facteur deux de super-résolution, même si h^2 à un support spectral deux fois plus grand que celui de h. Par ailleurs, notons, que dans ce cas, la décomposition de t se fait directement sur la base de Fourier, et que la série des valeurs propres λ_n est constante. Cette décomposition n'est cependant pas utile, puisque l'on peut directement estimer ρ en déconvoluant la variance par h^2 sous contrainte de positivité, avant d'en prendre la racine carrée.

2.5. Conclusion

La méthode RIM peut rentrer dans le cadre de nombreuses modalités d'imagerie active suivant le modèle de formation d'image (2.1), ce qui inclut notamment la microscopie de fluorescence. Dans le cadre de la microscopie en épi-fluorescence, on peut par ailleurs montrer que la variance des images est suffisante pour permettre une reconstruction de l'échantillon sur une domaine correspondant à l'auto-corrélation de l'OTF, soit le maximum théorique pour la microscopie linéaire. Cette variance peut également se décomposer sous la forme d'une somme de carrés de produits de convolution, une décomposition qui sera particulièrement intéressante pour les implémentations numériques qui seront présentées dans le chapitre suivant. Dans cette décomposition, la décomposition de rang 1 joue un rôle particulier, puisqu'elle permet de construire une approximation linéaire de l'écart-type, particulièrement adaptée à l'étude d'échantillons denses.

3. Nouvelles méthodes d'inversion pour RIM

Sommaire

3.1. Prérequis pour l'implémentation numérique . . . 67
3.1.1. Discrétisation du problème . . . 67
3.1.2. Approche par *moment matching* . . . 68
3.1.3. Calcul efficace de la variance modèle . . . 69
3.1.3.1. Statistiques asymptotiques sans bruit . . . 69
3.1.3.2. Calcul à partir de la décomposition de la variance . . . 71
3.1.3.3. Perturbations de la variance . . . 72
3.1.4. Statistiques empiriques . . . 72
3.2. Première méthode de reconstruction : RIM-VAR . . . 73
3.2.1. Critère à minimiser . . . 73
3.2.2. Accélération de l'algorithme . . . 73
3.3. Nouvel estimateur non itératif : RIM-CF . . . 77
3.4. Nouvel algorithme itératif : RIM-STD . . . 82
3.4.1. Nouvelle proposition de critère . . . 82
3.4.2. Calcul du gradient et du Hessien du critère . . . 82
3.4.2.1. Calcul du gradient à partir des résidus . . . 83
3.4.2.2. Implémentation numérique du gradient . . . 83
3.4.2.3. Calcul du Hessien . . . 84
3.4.3. Schéma final de gradient conjugué préconditionné . . . 86
3.5. Comparatif des performances . . . 87
3.5.1. Illustration sur un problème 1D . . . 87
3.5.2. Cas des émetteurs isolés . . . 92
3.5.2.1. Cas des sources isolées . . . 92
3.5.2.2. Cas des sources multiples . . . 93
3.5.2.3. Initialisation et autres minimas . . . 95
3.5.3. Illustration sur des problèmes 2D . . . 97
3.5.3.1. Données asymptotiques . . . 97
3.5.3.2. Données à nombre de speckles fini . . . 99
3.5.3.3. Simulation en présence de bruit . . . 102
3.5.4. Traitement de données expérimentales . . . 106
3.5.4.1. Échantillon 2D de Vimentine . . . 106
3.5.4.2. Image de l'intérieur d'une cellule . . . 107

L'objectif du chapitre précédent était de présenter le formalisme de RIM, ainsi que ses garanties théoriques. En particulier, sous les hypothèses classiques de la microscopie en épi-fluorescence, il a été démontré que la variance des observations était suffisante pour retrouver l'échantillon sur un domaine fréquentiel correspondant au support de l'auto-corrélation de l'OTF du microscope, et ce, sans la connaissance, ni l'estimation des illuminations utilisées. L'implémentation de méthodes numériques permettant de retrouver l'échantillon à partir de cette variance n'a cependant pas encore été abordée et sera l'objet principal de ce chapitre.

La première partie est consacrée aux généralités liées à toute implémentation numérique d'une méthode RIM, c'est-à-dire principalement la discrétisation du problème tel que présenté dans le chapitre 2. La deuxième partie présente RIM-VAR, l'état de l'art pour la reconstruction RIM, dont le principe introduit dans LABOUESSE, IDIER, SENTENAC, MANGEAT et al. 2021 à été largement appliqué expérimentalement depuis (MANGEAT et al. 2021). Les deux parties suivantes sont consacrées à RIM-CF et RIM-STD, deux nouveaux estimateurs développés au cours de cette thèse, ayant pour objectif d'accélérer significativement les méthodes de reconstruction en RIM.

3.1. Prérequis pour l'implémentation numérique

3.1.1. Discrétisation du problème

Dans les chapitres 1 et 2, nous avons modélisé la physique de la microscopie dans un formalisme continu. Les traitements numériques se faisant par ordinateur, on ne peut en pratique travailler qu'avec des signaux discrets et quantifiés. Par souci de simplification, on ignorera le phénomène de quantification. Pour ce qui est de la discrétisation, nous avons déjà vu que chaque image est limitée en fréquence sur le domaine de l'OTF, noté Ω_h. Notons ν_{OTF} la fréquence maximale de l'OTF, et donc des images fournies par le microscope. Le théorème de Nyquist-Shannon (SHANNON 1949), nous garantit que si le pas δx entre deux pixels vérifie

$$\nu_{\text{ech}} := \frac{1}{\delta x} \geqslant 2\nu_{\text{OTF}}, \tag{3.1}$$

la discrétisation n'entraîne aucune perte d'information. Lors de la reconstruction, nous allons chercher à obtenir un doublement de la résolution. Afin que le critère de Shannon soit également vérifié sur la reconstruction, il est nécessaire d'utiliser une fréquence d'échantillonnage valide par rapport à $2\nu_{\text{OTF}}$, c'est-à-dire telle que : $\nu_{\text{ech}} \geqslant 4\nu_{\text{OTF}}$. Ceci peut se faire soit au moment de l'acquisition, soit de manière numérique, en rajoutant des zéros dans l'espace de Fourier, sur des images vérifiant la condition (3.1). On supposera par la suite que toutes les images sont échantillonnées de manière suffisamment fine pour permettre la reconstruction sans problème d'échantillonnage.

Pour la mise en œuvre de RIM, il faut acquérir M images basses fréquences $\mathcal{Z} =$

$\{\boldsymbol{z}_1, \ldots, \boldsymbol{z}_M\}$, selon l'équation d'observation (2.1), qui devient après discrétisation :

$$\begin{aligned} \boldsymbol{y}_m &= \mathbf{H}(\boldsymbol{\rho} \odot \boldsymbol{\iota}_m) \\ \boldsymbol{z}_m &= \boldsymbol{y}_m + \boldsymbol{\varepsilon}_m \end{aligned} \tag{3.2}$$

Dans ce modèle $\boldsymbol{y}_m$ correspond à l'image idéale modulée par le speckle, et $\boldsymbol{z}_m$ correspond à une acquisition perturbée de cette image par un bruit gaussien additif décorrélé $\boldsymbol{\varepsilon}_m$. Bien que ce modèle de bruit ne représente pas fidèlement la réalité des acquisitions caméra [1], cela reste généralement une approximation suffisante, qui permet de grandement simplifier les calculs.

La quantité $\boldsymbol{\rho}$ est la densité de fluorescence vraie que l'on souhaite estimer, et chaque $\boldsymbol{\iota}_m$ est un vecteur aléatoire correspondant à une réalisation de speckle. L'opérateur $\odot$ est le produit de Hadamard [2] (termes à termes), équivalent au produit sur des fonctions continues. La matrice $\mathbf{H}$ est une matrice de convolution, qui doit normalement être une matrice Toeplitz, afin de tenir compte du fait que les données sont observées uniquement sur une région limitée de l'espace (HANSEN et al. 2006). Une simplification supplémentaire est de travailler avec des matrices circulantes par blocs à blocs circulants (BCCB), ce qui revient à travailler avec une hypothèse de convolution circulaire. La matrice $\mathbf{H}$ est alors donnée par

$$\mathbf{H} = \mathrm{BCCB}(\boldsymbol{h}), \tag{3.3}$$

avec BCCB l'opérateur qui à partir d'un vecteur $\boldsymbol{u}$ donne la matrice de convolution (BCCB) avec le vecteur $\boldsymbol{u}$. Avec cette hypothèse, les convolutions (produits de la forme $\mathrm{BCCB}(\boldsymbol{u})\boldsymbol{v}$) peuvent directement se calculer à partir de transformées de Fourier discrètes. Cette approche ayant une complexité de l'ordre de $\mathcal{O}(N\log(N))$ est bien plus efficace que le calcul traditionnel d'un produit matrice-vecteur, de complexité $\mathcal{O}(N^2)$.

L'hypothèse de convolution circulaire peut cependant parfois être la source d'apparition d'artefacts sur les bords de l'image, puisqu'elle suppose que ceux-ci sont périodiques, ce qui n'est pas le cas en pratique. On observe alors l'apparition de contributions liées à un bord de l'image sur l'autre bord, et en particulier un phénomène de Gibbs extrêmement marqué si la différence d'intensité entre deux bords est importante (ibid.). Dans la suite, ces effets seront simplement ignorés, bien qu'il soit possible d'implémenter un opérateur Toeplitz par transformée de Fourier, en appliquant un bourrage de zéro adapté.

3.1.2. Approche par *moment matching*

Afin de reconstruire l'objet à partir des différentes images $\boldsymbol{z}_m$, et sans connaître ni estimer les différents éclairements $\boldsymbol{\iota}_m$, RIM procède par une méthode des moments (PEARSON 1936), ce qui revient à répondre à la question suivante :

1. Une simulation avec un modèle plus rigoureux est proposée dans la section 3.5.3.3
2. Selon les calculs que l'on souhaite effectuer, il est parfois plus intéressant de réexprimer ce produit sous forme matricielle : $\boldsymbol{a} \odot \boldsymbol{b} = \mathrm{Diag}(\boldsymbol{a})\boldsymbol{b} = \mathrm{Diag}(\boldsymbol{b})\boldsymbol{a}$

Quelle densité de fluorescence produit les statistiques empiriques observées ?

Pour retrouver cette densité de fluorescence $\boldsymbol{\rho}$, nous utiliserons ici des estimateurs tels qu'introduits dans la section 1.3.3 :

$$\widehat{\boldsymbol{\rho}} \in \arg\min_{\boldsymbol{\rho}} J(\boldsymbol{\rho}) \tag{3.4}$$

$$\text{avec,} \quad J(\boldsymbol{\rho}) = D(\mathcal{Z}, \boldsymbol{\rho}) + \mathcal{R}(\boldsymbol{\rho}) \tag{3.5}$$

où $D(\mathcal{Z}, \boldsymbol{\rho})$ est une fonction comparant la dissimilarité [3] entre les statistiques empiriques des images et les statistiques modèles (*i.e.*, théorique) associées à une densité de fluorescence précise. Le choix par défaut est la distance au sens des moindres carrés, qui correspond à la distance usuelles entre deux vecteurs. Un choix *a priori* plus adapté serait la divergence de Kullback-Leibler, généralement utilisée pour calculer la dissimilarité de deux distributions de probabilités (MILLER et al. 1987), qui dans le cas des mesures RIM est reliée à la fonction de vraisseblance sous l'hypothèse de mesures gaussiennes (IDIER et al. 2018). Des approches basées sur la divergence de Kullback ont été explorées en début de thèse sans résultat significatif, et nous n'étudierons dans la suite que des critères basés sur la distance des moindres carrées.

Par ailleurs, dans le chapitre précédent, nous avons vu que l'utilisation de la variance garantissait dans le cadre de la microscopie en épi-fluorescence l'obtention d'un gain de résolution maximal, équivalent à ce qui est réalisable avec les approches SIM traditionnelles (Théorème 2). Ainsi, les méthodes numériques présentées ici se baseront exclusivement sur la variance modèle $\boldsymbol{v}$, ou de manière équivalente, l'écart-type modèle $\boldsymbol{\sigma}$.

La fonction $\mathcal{R}(\boldsymbol{\rho})$ est une fonction de régularisation servant à limiter l'impact de différents bruits tels que le bruit de mesure, le caractère non asymptotique des statistiques où certaines erreurs de modèles, ainsi qu'à favoriser certaines propriétés dans la reconstruction, comme la régularité. Nous n'utiliserons ici que des pénalisations L_2 visant à assurer la régularité de la solution, et à contrôler l'explosion du bruit dans les reconstructions (voir 1.3.2.2).

Le problème inverse défini ainsi sera donc un problème quadratique (*i.e.*, non linéaire), qui ne peut pas être résolu de manière explicite. Afin de minimiser la fonction objectif J, nous utiliserons des schémas itératifs demandant de calculer la variance modèle pour différents $\boldsymbol{\rho}$. Ainsi, le temps de calcul des méthodes numériques qui seront présentés ici sera fortement impacté par l'efficacité avec laquelle la variance modèle peut être calculée.

3.1.3. Calcul efficace de la variance modèle

3.1.3.1. Statistiques asymptotiques sans bruit

Dans le modèle d'observation (3.2), chaque $\boldsymbol{y}_m$ est un vecteur aléatoire. Comme seule la quantité $\boldsymbol{\iota}_m$ est aléatoire, on peut facilement en déduire l'expression de la

3. C'est pour cette raison que l'on souhaite la minimiser

moyenne $\boldsymbol{\mu}$, la covariance $\boldsymbol{\Gamma}$ et la variance $\boldsymbol{v}_s$. On obtient alors une version discrétisée des statistiques (2.15), (2.16) et (2.17) calculées dans le chapitre 2 :

$$\boldsymbol{\mu} = I_0 \mathbf{H} \boldsymbol{\rho} \tag{3.6}$$

$$\boldsymbol{\Gamma} = \mathbf{H}\,\mathrm{Diag}(\boldsymbol{\rho})\,\mathbf{C}\,\mathrm{Diag}(\boldsymbol{\rho})\,\mathbf{H} \tag{3.7}$$

$$\boldsymbol{v}_s = \mathrm{diag}(\boldsymbol{\Gamma}) \tag{3.8}$$

où $\mathrm{Diag}(\boldsymbol{\rho})$ est la matrice diagonale de diagonale $\boldsymbol{\rho}$, et $\mathrm{diag}(\boldsymbol{\Gamma})$ s'obtient en extrayant la diagonale de la matrice $\boldsymbol{\Gamma}$. Dans l'expression , la matrice $\mathbf{C} = \mathrm{BCCB}(\boldsymbol{\gamma})$ est la matrice de convolution par le vecteur $\boldsymbol{\gamma}$, correspondant à l'auto-corrélation des éclairements. Le caractère BCCB de cette matrice est une conséquence directe de la stationnarité au second-ordre des speckles (voir section 2.1.2). Dans le cas de l'épi-fluorescence, ce vecteur est proportionnel à $\boldsymbol{h}$, mais nous garderons les notations $\mathbf{C}$ et $\boldsymbol{\gamma}$ dans la suite pour ne pas perdre en généralité.

On retrouve alors le principal défaut de la matrice de covariance, lié à sa taille. Par exemple, la covariance associée à une image de taille 1024×1024, devrait être représentée par 1024^4 coefficients, c'est-à-dire plusieurs Téra-octets de données. Les contraintes imposées par la covariance sont l'un des principaux facteurs motivant un travail basé sur la variance des images.

Naturellement, il est impossible d'extraire la variance directement en prenant la diagonale de la covariance, cette dernière ne pouvant être calculée. Il faut donc passer par le calcul individuel de chacun de ses coefficients. En discrétisant l'équation de la variance modèle (2.17) pour une position $\boldsymbol{r}$ donnée (correspondant à la position du pixel i), on vérifie que les coefficients de la variance modèle sont donnés par :

$$[\boldsymbol{v}_s]_i = [\boldsymbol{\Gamma}]_{i,i} = \boldsymbol{\rho}^{\mathrm{t}} \mathbf{T}_i \boldsymbol{\rho} \tag{3.9}$$

$$\mathbf{T}_i = \mathrm{Diag}(\mathbf{P}^i \boldsymbol{h})\,\mathbf{C}\,\mathrm{Diag}(\mathbf{P}^{-i} \boldsymbol{h}) \tag{3.10}$$

où $[\cdot]_{i,j}$ renvoie à un coefficient précis d'une matrice, et $\mathbf{P}^i$ est la matrice de permutation circulaire, plaçant le coefficient i en position 0 [4], ce qui revient à effectuer un décalage de la position lors de l'évaluation du noyau t de (2.17).

Les matrices $\mathbf{T}_i$ présentent une structure intéressante, puisqu'il s'agit d'un produit de matrices Diagonale-Circulante-Diagonale. Bien que peu de propriétés théoriques semblent pouvoir en être extraites, ce type de matrices apparaît lors de la modélisation de systèmes optiques complexes (Müller-Quade et al. 1998). Numériquement, le stockage et les opérations basées sur ce type de matrices, peut-être faite de manière bien plus efficace que l'implémentation d'une matrice standard. En effet, le stockage de ces matrices demande une complexité de l'ordre de $\mathcal{O}(N)$ en espace, le produit matrice-vecteur à une complexité de l'ordre de $\mathcal{O}(N \log(N))$, contre $\mathcal{O}(N^2)$ avec des matrices quelconques. L'algorithme 1 ci-après propose l'implémentation simple d'un produit matrice vecteur impliquant une matrice possédant cette structure.

Cet algorithme revient à calculer le produit matrice/vecteur de droite à gauche, et

4. On considère que les matrices sont indicées par $[0, \dots N-1]$, plutôt que $[1, \dots, N]$

Algorithm 1 Calcul du produit matrice vecteur $\mathbf{T}\boldsymbol{x}$, où $\mathbf{T} = \text{Diag}(\boldsymbol{h})\text{BCCB}(\boldsymbol{\gamma})\text{Diag}(\boldsymbol{h})$

Require : $\boldsymbol{h} \in \mathbb{R}^N, \boldsymbol{\gamma} \in \mathbb{R}^N$
  return $\boldsymbol{y} = \mathbf{T}\boldsymbol{x}$
  $\boldsymbol{y} \leftarrow \boldsymbol{h} \odot \boldsymbol{x}$
  $\boldsymbol{y} \leftarrow \texttt{ifftn}(\texttt{fftn}(\boldsymbol{\gamma}) \odot \texttt{fftn}(\boldsymbol{y}))$
  $\boldsymbol{y} \leftarrow \boldsymbol{h} \odot \boldsymbol{y}$

requiert uniquement la spécification des vecteurs de taille N : $\boldsymbol{h}$ et $\boldsymbol{\gamma}$. L'opération la plus coûteuse numériquement sera la transformée de Fourier discrète avec une complexité de $\mathcal{O}(N\log(N))$. Pour obtenir la totalité du vecteur de variance, il faut calculer individuellement chacun des N produits de (3.9). La complexité résultant du calcul du vecteur de variance par cette méthode est donc de l'ordre de $\mathcal{O}(N^2\log(N))$. Une telle complexité serait acceptable pour des problèmes de taille modérée, mais passera difficilement à l'échelle sur de larges volumes de données. Dans le chapitre 2, nous avons présenté une reformulation de la variance sous forme d'une somme de produit de convolutions, pouvant être tronquée à un faible rang. L'exploitation de cette forme approchée, ce qui permet une accélération significative des calculs.

3.1.3.2. Calcul à partir de la décomposition de la variance

En effet, les matrices $\mathbf{T}_i$ sont par définition des permutations circulaires les unes des autres, une structure qui n'est pas exploitée dans l'approche précédente. L'exploitation de cette structure revient à discrétiser la décomposition de la variance proposée dans 2.29, afin de faire apparaitre des produits de convolutions [5]. La variance modèle est alors donnée directement par :

$$\boldsymbol{v}_s(\boldsymbol{\rho}) = \sum_{k=1}^{N} (\mathbf{U}_k\boldsymbol{\rho})^{\odot 2} \approx \sum_{k=1}^{K} (\mathbf{U}_k\boldsymbol{\rho})^{\odot 2} \tag{3.11}$$

où $^{\odot n}$ est l'exponentiation terme à terme à la puissance n, et $\mathbf{U}_k = \text{BCCB}(\boldsymbol{u}_k)$, avec $\boldsymbol{u}_k$ un vecteur propre associée à la k-ième valeur propre de $\mathbf{T} = \mathbf{T}_0$, de norme $\sqrt{\lambda_k}$ [6]. Ces vecteurs propres peuvent être obtenus numériquement en spécifiant simplement le procédé de calcul matrice-vecteur décrit dans l'algorithme 1, ce qui permet de garder tous les avantages calculatoires liés à la structure de la matrice $\mathbf{T}$.

Notons que si la matrice $\mathbf{T}$ est de rang plein, le calcul de (3.11), requiert N convolutions, ce qui ne réduit pas la complexité globale du problème. Cependant, nous avons vu dans le chapitre 2 que les valeurs propres de t, qui sont par construction également celles de $\mathbf{T}$ décroissent rapidement, et que l'on pouvait convenablement approximer la somme (3.11), en ne considérant que les premiers termes de celle-ci (voir Fig. 3.1 et Fig. 2.4). L'ordre de troncature K étant globalement indépendant du nombre de pixels,

5. Cette relation peut également se dériver à partir du modèle discret, mais l'aspect convolution n'apparait pas de manière immédiate.
6. Il s'agit de la version discrète des fonctions propres u_k introduites dans 2.28

et bien inférieur à N, la variance se calcule en pratique avec une complexité de l'ordre de $\mathcal{O}(KN\log(N))$, qui est bien meilleure que la complexité initiale de $\mathcal{O}(N^2\log(N))$. Enfin, remarquons que la matrice $\mathbf{T}$ est entièrement déterminée par les quantités $\boldsymbol{h}$ et $\boldsymbol{\gamma}$, qui sont déterminés par le montage optique d'acquisition. Par conséquent, les vecteurs propres peuvent être pré-calculés et réutilisés pour différents échantillons acquis dans une même configuration expérimentale.

3.1.3.3. Perturbations de la variance

En pratique, on ne travaille pas directement avec les images modulées par le speckle $\boldsymbol{y}_m$, mais avec une version perturbée de celles-ci $\boldsymbol{z}_m$. L'expression de la variance modèle doit alors être modifiée pour tenir compte de ces perturbations. En supposant que les images sont simplement perturbées par un bruit additif, (3.2), indépendant de la fluctuation de speckles, la variance théorique devient

$$\boldsymbol{v}(\boldsymbol{\rho}) = \boldsymbol{v}_s(\boldsymbol{\rho}) + \boldsymbol{v}_\varepsilon, \tag{3.12}$$

où $\boldsymbol{v}_s$ est la variance associée aux fluctuations induites par les speckles définie (3.11), et $\boldsymbol{v}_\varepsilon$ la variance des perturbations additives $\boldsymbol{\varepsilon}_m$ introduites dans l'équation (3.2). En pratique, cette variance de perturbation doit également être estimée, par exemple en appliquant la méthode proposée dans LABOUESSE, IDIER, SENTENAC, MANGEAT et al. 2021, ce qui demande de remplacer $\boldsymbol{v}_\varepsilon$ par $\widehat{\boldsymbol{v}}_\varepsilon$ dans la définition de la variance modèle $\boldsymbol{v}_\varepsilon$.

3.1.4. Statistiques empiriques

Afin d'implémenter une méthode de reconstruction de la forme (3.4), il est nécessaire de disposer de l'expression de la variance théorique pour une densité de fluorescence donnée (3.11), ainsi que de la variance empirique des images $\widehat{\boldsymbol{v}}$. Pour calculer cette dernière, nous aurons également besoin leur moyenne $\widehat{\boldsymbol{\mu}}$. Ces deux quantités sont des propriétés locales qui s'obtiennent directement à partir d'opérations termes à termes sur les images :

$$\widehat{\boldsymbol{\mu}} = \frac{1}{M}\sum_{m=1}^{M} \boldsymbol{z}_m, \tag{3.13}$$

$$\widehat{\boldsymbol{v}} = \frac{1}{M}\sum_{m=1}^{M} (\boldsymbol{z}_m - \widehat{\boldsymbol{\mu}})^{\odot 2} = \frac{1}{M}\Big(\sum_{m=1}^{M} \boldsymbol{z}_m^{\odot 2}\Big) - \widehat{\boldsymbol{\mu}}^{\odot 2}. \tag{3.14}$$

Bien que la moyenne ne soit pas directement utilisée dans les algorithmes proposés, elle reste une statistique importante, puisqu'elle est nécessaire au calcul de la variance, et peut être utilisée comme image basse résolution de référence, la moyenne étant asymptotiquement équivalente à une image widefield.

3.2. Première méthode de reconstruction : RIM-VAR

3.2.1. Critère à minimiser

Le premier schéma de minimisation, proposé avant le début de cette thèse dans LABOUESSE, IDIER, SENTENAC, MANGEAT et al. 2021, utilise le calcul approché de la variance (3.11), pour construire une méthode de *variance matching*. Cette méthode, que nous appellerons RIM-VAR dans la suite de ce manuscrit, propose d'estimer la densité de fluorescence de la manière suivante :

$$\widehat{\boldsymbol{\rho}}_{\mathrm{VAR}} \in \arg\min_{\boldsymbol{\rho}} J_{\mathrm{VAR}}(\boldsymbol{\rho}) \tag{3.15}$$

$$J_{\mathrm{VAR}}(\boldsymbol{\rho}) = \left\| \widehat{\boldsymbol{v}} - \boldsymbol{v}(\boldsymbol{\rho}) \right\|^2 + \mu \left\| \boldsymbol{\rho} \right\|_2^2 \tag{3.16}$$

Dans ce cadre, la fonction d'adéquation aux données correspond à la distance au sens des moindres carrés entre la variance empirique (3.14) et la variance modèle (3.11). La régularisation $\|\cdot\|_2^2$ est simplement une régularisation permettant garantir que la solution reste robuste aux perturbations liées aux bruits. Cette régularisation a exactement le même rôle que la régularisation de Tikhonov présentée 1.3.2.2, et permet de couper les fréquences transmises avec un trop mauvais rapport signal à bruit, qui ne peuvent être estimées sans une amplification énorme de ce dernier.

La fonction objectif (3.16) est alors minimisée en suivant un schéma de gradient conjugué (WRIGHT et al. 1999[Chap.10]). Notons que cette fonction est un polynôme d'ordre 4 en fonction de la densité de fluorescence $\boldsymbol{\rho}$, donc une fois la direction de descente choisie, le pas optimal, est racine d'un polynôme d'ordre 3 et peut donc être obtenu de manière explicite.

Un dernier point à souligner est que la fonction (3.16) possède de multiples minima globaux. Si l'on ne considère que les objet ayant un support fréquentiel limité au domaine $\Omega_{\mathrm{h}\gamma}$, deux minimums triviaux sont la version filtrée de la densité de fluorescence vraie [7], et son opposé, qui sont deux solutions dont le signe n'est pas constant. Cependant, ces minima ne sont les seuls, et on peut facilement justifier, en utilisant un argument similaire à celui présenté dans l'annexe F que le nombre de minima doit être de 2^N. En pratique, avec une initialisation positive, la présence de ces différents minima n'est pas un problème (voir la discussion sur simulation section 3.5.2).

3.2.2. Accélération de l'algorithme

Telle que présenté précédemment, la méthode RIM-VAR permet de produire des images super-résolues, mais n'offre généralement qu'un gain de résolution limité (voir Fig. 3.2 et 3.6), à cause de sa faible vitesse de convergence. Pour améliorer la qualité des reconstructions MANGEAT et al. 2021 propose d'effectuer une déconvolution linéaire [8]

7. C'est cette quantité que l'on souhaite retrouver
8. Filtrage de Wiener avec un paramètre de régularisation indépendant de la fréquence

des images avant le calcul de la variance, analogue à la déconvolution de Tikhonov présentée section 1.3.2.2. On introduit alors :

$$\boldsymbol{z}' = \mathrm{BCCB}(\boldsymbol{g})\boldsymbol{z} \tag{3.17}$$

$$\mathscr{F}(\boldsymbol{g}) = \frac{\mathscr{F}(\boldsymbol{h})^*}{|\mathscr{F}(\boldsymbol{h})|^{\odot 2} + \eta} \tag{3.18}$$

avec la notation $\mathscr{F}$ reprise ici pour définir la transformée de Fourier discrète, et l'opération de division étant effectuée termes à termes. La procédure RIM-VAR est ensuite effectuée à partir de la variance des images préfiltrées $\boldsymbol{z}'$, plutôt que celle des images brutes $\boldsymbol{z}$. Ce préfiltrage induit trois principaux effets lors du calcul de la variance :

— Tout d'abord, on montre simplement que le problème revient à considérer que l'on travaille avec une nouvelle PSF $\boldsymbol{g}\otimes\boldsymbol{h}$. Cette PSF, bien que n'étant plus positive, possède un lobe central bien plus fin que la PSF initiale $\boldsymbol{h}$ (voir Fig. 3.1), mais avec des rebonds plus prononcés. Même si ce préfiltrage permet de mieux distinguer certains détails sur les images brutes (voir Fig. 1.6) la résolution des images reste inchangée.

— Dans le domaine des fréquences, ce préfiltrage se traduit par un rehaussement des fréquences partiellement atténuées par la PSF. Dans le cas d'expériences réalisées avec bruit, ce préfiltrage limite également son impact, puisqu'il supprime les composantes fréquentielles des images au-delà du support théorique de l'image Ω_h, qui nécessairement du bruit. De plus, en choisissant un réglage adapté du paramètre η du préfiltre (3.18), on peut également enlever les fréquences transmises, mais totalement dominées par le bruit, et dont l'inversion produiraient une amplification incontrôlée du bruit [9] dans la solution (TIKHONOV et al. 1977). Ce préfiltrage modifie également le modèle du bruit, mais le modèle additif (3.12) reste valide.

— Un dernier point notable, est que ce préfiltrage permet d'accroître le poids des premières valeurs propres dans la décomposition de la matrice $\mathbf{T}$, ce qui permet (voir Fig. 3.1) de considérer un niveau de troncature plus faible lors du calcul de la variance. En particulier, l'augmentation du *spectral gap* [10], montre que l'approximation de rang 1 de la matrice $\mathbf{T}$ sera plus fidèle après un préfiltrage des données. Une partie de l'énergie perdue par les valeurs propres suivantes (de 2 à 10 Fig. 3.1) est alors reportée sur les valeurs propres au-delà de 10, ce qui leur donne un poids relatif supérieur, même si leurs contributions restent négligeables. En particulier, ce préfiltrage permet d'accroître considérablement la vitesse de convergence de la variance tronquée vers la variance théorique. Cette convergence est illustrée Fig 3.1, par l'évolution de l'erreur relative entre la variance tronquée et la variance théorique après préfiltrage pour différent

9. Ce rôle est exactement le même que celui du paramètre de régularisation μ de la méthode d'inversion. En pratique, on privilégiera une augmentation de μ plutôt que de η afin de conserver un maximum de fréquence de l'objet présente dans le calcul de l'écart-type.

10. Différence d'énergie relative entre la première est la deuxième valeur propre

rang de troncature, de la même manière que ce qui est présenté Fig 2.3. On constate cette fois qu'avec seulement dix vecteurs propres, on atteint une bonne approximation jusqu'à 1.8 fois la fréquence de coupure, contre seulement 1.5 fois sans préfiltrage.

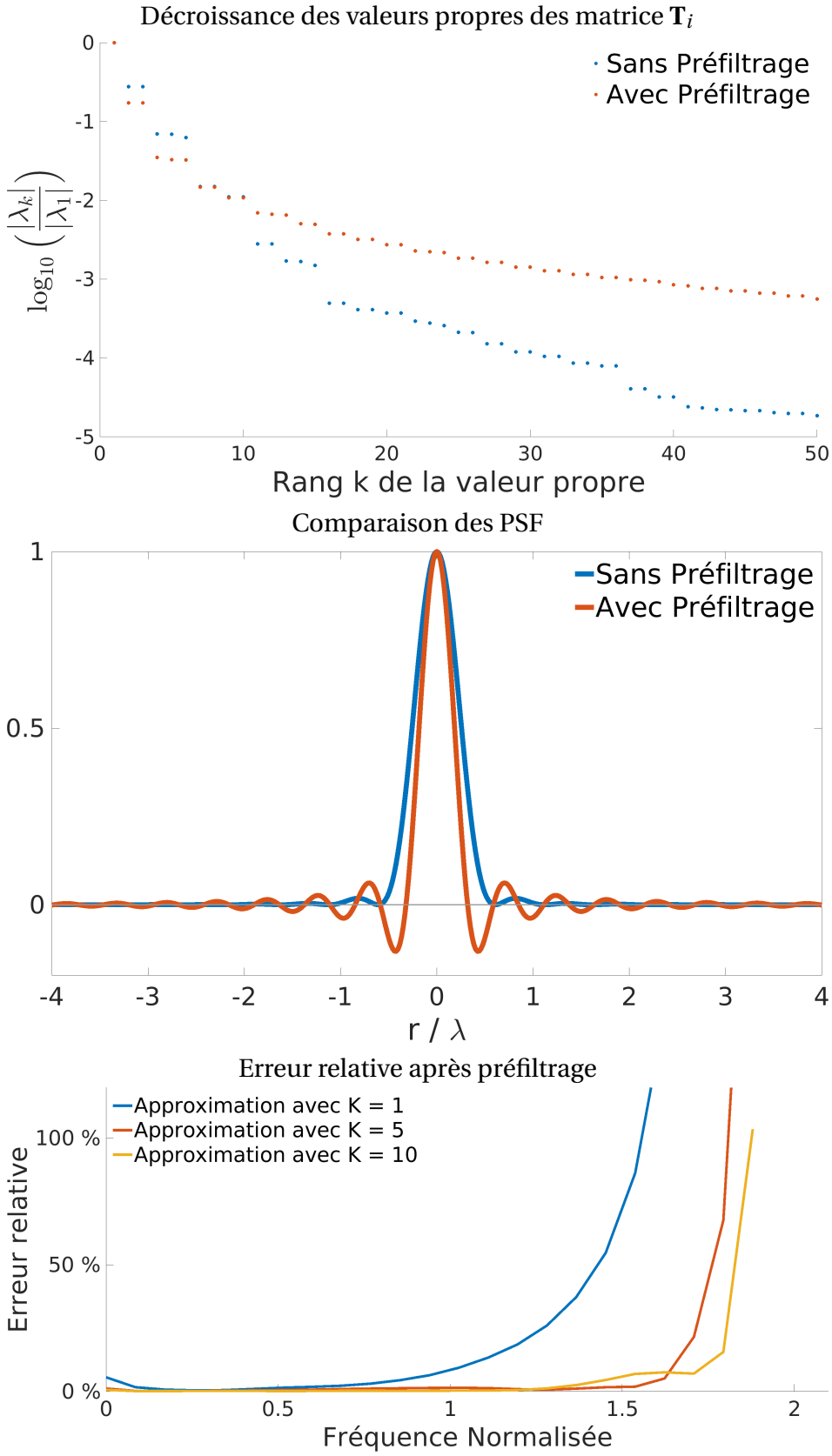


FIGURE 3.1. – Illustration des intérêts du préfiltrage, on constate un poids plus important des premières valeurs propres, ainsi qu'une convergence plus rapide, et donc une erreur relative en fréquence plus faible sur un modèle tronqué.

L'impact de ce préfiltrage en termes de vitesse de reconstruction est particulièrement visible sur les figures 3.2 et 3.6. Cependant, même avec les gains obtenus en introduisant le préfiltrage, RIM-VAR reste limité en termes de vitesse de convergence et demande plusieurs milliers d'itérations pour atteindre la résolution théorique de RIM, même dans le cas où la variance empirique inversée serait la variance asymptotique [11].

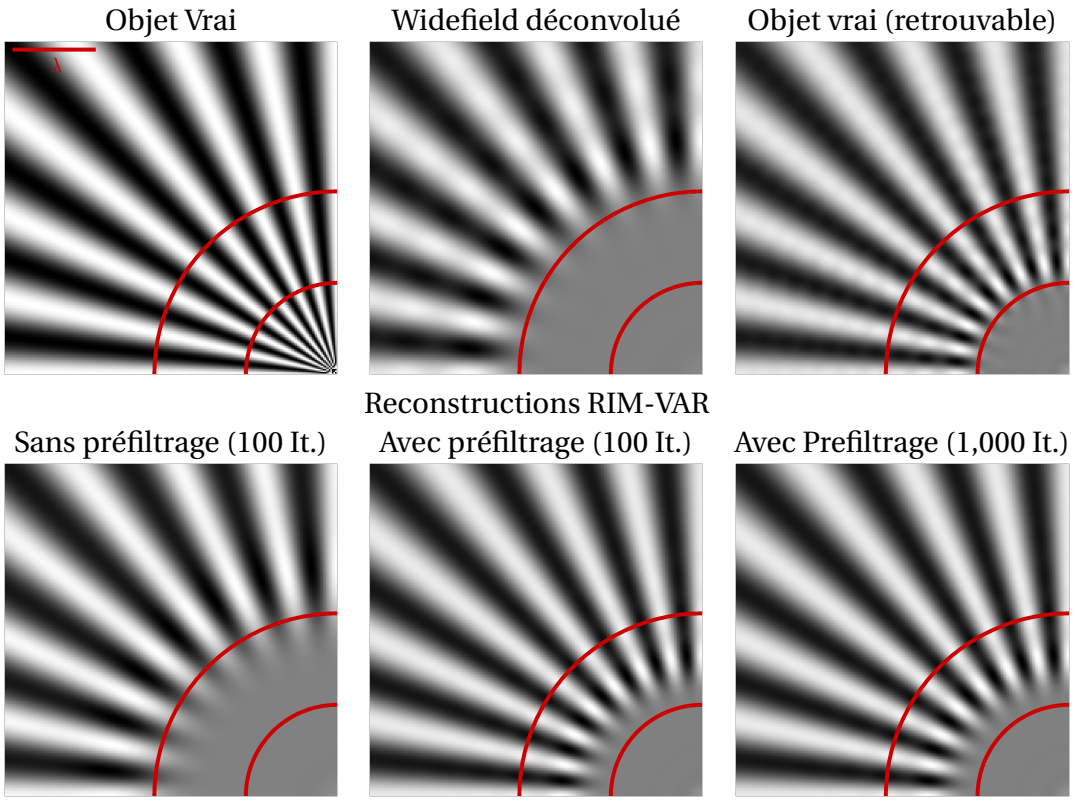


FIGURE 3.2. – Illustration de l'impact du préfiltrage pour la méthode RIM-VAR

Au cours de cette thèse, deux nouvelles méthodes d'inversion, RIM-CF et RIM-STD, ont été proposées. La première est une méthode non itérative, qui donne une estimée super-résolue de l'échantillon, en réalisant une déconvolution linéaire de l'écart-type par un noyau adapté. La deuxième est une méthode itérative basée sur un nouveau critère qui permet de réduire le temps de reconstruction de près de deux ordres de grandeurs, sans dégrader le niveau maximal de super-résolution théorique.

3.3. Nouvel estimateur non itératif : RIM-CF

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que pour des raisons d'homogénéité, il pouvait être plus naturel de travailler avec l'écart-type des images, plutôt que leur variance. Dans ce cas, sous certaines hypothèses, notamment $\boldsymbol{h}$ non négatif, nous

11. Une telle configuration correspond au problème (3.15) avec $\widehat{\boldsymbol{v}} = \boldsymbol{v}(\boldsymbol{\rho})$ et $\mu = 0$

avons vu qu'il est possible d'approcher cet écart-type comme une fonction linéaire de l'objet (voir (2.35)), qui après discrétisation devient simplement :

$$\boldsymbol{\sigma}_s \approx \mathbf{U}_1 \boldsymbol{\rho}, \tag{3.19}$$

avec $\boldsymbol{\sigma}_s$ la racine la carré termes à termes de la variance (3.11). Cette approximation se retrouve assez facilement en tronquant (3.11) à l'ordre 1, et en exploitant la positivité de la matrice $\mathbf{U}_1$ et du vecteur $\boldsymbol{\rho}$.

L'estimation de la densité de fluorescence à partir de l'écart-type peut alors être vu en première approximation comme un simple problème de déconvolution linéaire, dont le principe a déjà été présenté dans la section 1.3.2.2. Il est cependant nécessaire de déconvoluer la quantité $\boldsymbol{\sigma}_s$, correspondant uniquement aux variations induites par le speckle, qui n'est jamais accessible expérimentalement, à cause des perturbations des mesures. La solution est alors d'estimer cette variance liée au speckle à partir de la variance $\boldsymbol{\sigma}_s$ à partir de la variance empirique, et de la variance estimée du bruit $\widehat{\boldsymbol{v}}_\varepsilon$. En se basant sur l'équation (3.12), deux estimations de $\boldsymbol{v}_s$, et donc de $\boldsymbol{\sigma}_s$ sont possibles :

$$\widehat{\boldsymbol{\sigma}}_s = \begin{cases} \widehat{\boldsymbol{v}}^{\odot\frac{1}{2}} & \text{si l'on choisi de négliger le bruit de mesure} \\ \left(\widehat{\boldsymbol{v}} - \widehat{\boldsymbol{v}}_\varepsilon, 0\right)^{\odot\frac{1}{2}} & \text{si l'on tient compte du bruit d'instrument} \end{cases} \tag{3.20}$$

dont les différences sont étudiées plus en détail Fig. 3.17. L'estimée de la densité de fluorescence de l'échantillon s'obtient alors à partir de cette variance estimée en résolvant le problème inverse linéaire :

$$\widehat{\rho}_{\mathrm{CF}} = \underset{\boldsymbol{\rho}}{\arg\min} \left\| \widehat{\boldsymbol{\sigma}}_s - \mathbf{U}_1 \boldsymbol{\rho} \right\| + \mu \left\| \boldsymbol{\rho} \right\|_2^2 \tag{3.21}$$

Ce schéma est équivalent à la déconvolution de Tikhonov, (TIKHONOV et al. 1977) où l'hyper-paramètre μ sert à régler le compromis entre les fréquences rehaussées et l'amplification du bruit. La solution de ce problème est alors donnée directement par :

$$\widehat{\rho}_{\mathrm{CF}} = (\mathbf{U}_1^{\mathrm{t}} \mathbf{U}_1 + \mu \mathbf{I}_N)^{-1} \mathbf{U}_1^{\mathrm{t}} \widehat{\boldsymbol{\sigma}}_s \tag{3.22}$$

qui peut en pratique se calculer simplement par transformée de Fourier :

$$\widehat{\rho}_{\mathrm{CF}} = \mathscr{F}^{-1}\left(\frac{\mathscr{F}(\boldsymbol{u}_1)^* \odot \mathscr{F}(\widehat{\boldsymbol{\sigma}}_s)}{|\mathscr{F}(\boldsymbol{u}_1)|^2 + \mu} \right) \tag{3.23}$$

Cet estimateur, nommé RIM-CF car son expression (3.23) est une forme close, est comparé Fig. 3.3 à d'autres estimateurs peu coûteux, basé sur les statistiques d'ordre 2. Le premier estimateur est simplement l'écart-type brut des données, qui a par ailleurs été proposé par VENTALON et al. 2005 sous le nom de *Dynamic Speckle Imaging* (DSI) [12]. Le second est l'estimateur de déconvolution dérivé de (2.45), c'est-à-dire la

12. Cet estimateur cherche surtout à améliorer le sectionnement optique (voir chapitre 4), mais est également censé produire un gain de résolution transverse

racine carrée de la déconvolution de la variance par $\boldsymbol{h}^{\odot 2}$ qui est par exemple utilisé avec la méthode S-SOFI (MINKWAN et al. 2015). Cette déconvolution n'étant ici pas faite sous contrainte de positivité, les éventuelles valeurs négatives seront seuillées à avant de prendre la racine carrée. La présentation de cette déconvolution avant prise de racine carrée est également proposée.

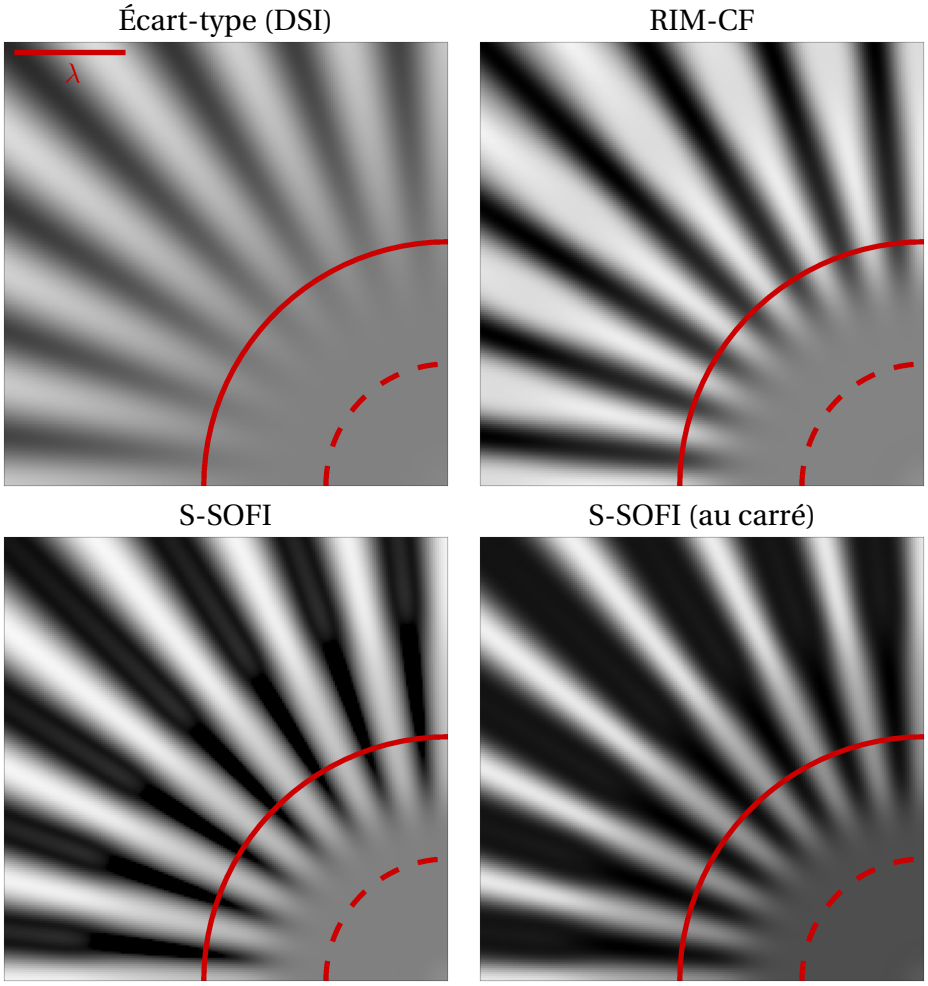


FIGURE 3.3. – Comparaison de différents estimateurs basés un traitement linéaire de la statistique d'ordre 2

La première chose que l'on remarque sur cette figure est que toutes les estimées permettent d'augmenter la résolution, en prolongeant les rayons de la mire au-delà de la limite observée en widefield. L'écart-type ne présente qu'un faible gain de résolution, ainsi qu'une forte perte de contraste, qui s'explique facilement avec l'approximation de l'écart-type (3.19), les hautes fréquences de l'objet restant fortement atténuées dans l'écart-type. Par conséquent, en déconvoluant cet écart-type par le noyau $\boldsymbol{u}_1$, on arrive à restaurer le contraste, et à obtenir une estimée quantitative de l'objet. Pour la reconstruction S-SOFI telle qu'implémentée ici, il est très difficile de garantir un bon gain de résolution. En effet, avec ce niveau de régularisation, la déconvolution de la

variance par $\boldsymbol{h}^{\odot 2}$, contient beaucoup de valeurs négatives dans ce qui devrait une estimation de la quantité positive $\boldsymbol{\rho}^{\odot 2}$. Ceci pose alors un problème lorsque l'on souhaite passer à une estimée quantitative en prenant la racine carrée de cette dernière estimation, puisque les valeurs négatives doivent être estimées à zéro. Réaliser la première déconvolution sous contrainte de positivité pourrait être une option pour limiter ces effets, mais introduirait des fréquences arbitrairement hautes, ce qui fausserait la comparaison.

Dans la section 3.2.2, il a été monté que le préfiltrage des images brutes permet d'améliorer les performances de reconstruction. Il semble donc naturel de vouloir également appliquer ce préfiltrage avec RIM-CF. Avant de tester cette approche, il est important de rappeler qu'elle ne s'accorde pas avec les résultats théoriques du chapitre 2, une des conditions nécessaires pour obtenir la proposition 1 menant à l'approximation linéaire de l'écart-type étant la positivité de la PSF. Le préfiltrage tel qu'introduit dans (3.18), transforme la PSF $\boldsymbol{h}$, en une autre PSF $\boldsymbol{h} \otimes \boldsymbol{g}$, dont le spectre est proche de l'indicatrice de Ω_{h}. Par conséquent, cette nouvelle PSF n'est plus positive, et on ne peut pas rigoureusement déduire l'approximation de rang 1 (2.35). Cependant, l'estimateur RIM-CF (3.23) reste calculable pour des données préfiltrées, et semble en pratique améliorer la qualité de la reconstruction (voir Fig. 3.4).

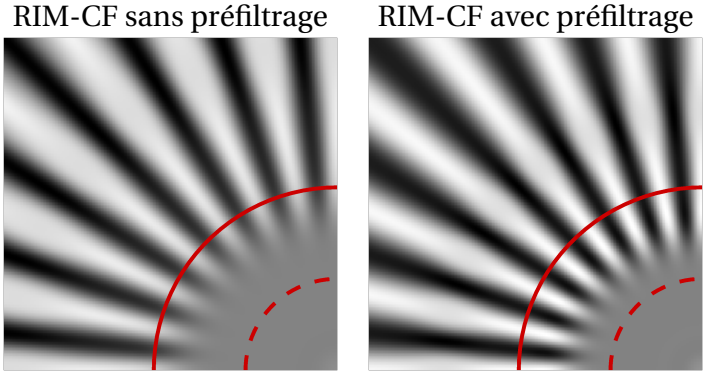


FIGURE 3.4. – Comparaison des reconstructions RIM-CF avec et sans préfiltrage sur la mire de résolution introduite Fig. 3.2

Si la perte de positivité induite par le préfiltrage rend une analyse précise de la méthode impossible, plusieurs éléments permettent de justifier au moins qualitativement l'intérêt de celui-ci, même pour l'approximation RIM-CF. Après préfiltrage, bien que la nouvelle PSF $\boldsymbol{u}_1$ ne soit plus positive, on constate (voir Fig. 3.5) que celle-ci est plus fine que le premier vecteur propre sans préfiltrage. De même, l'OTF associée est nettement plus sensible aux hautes fréquences lorsque l'on considère des images préfiltrées, ce qui facilite la reconstruction de ces fréquences. Enfin, on constate que l'approximation de rang 1 de la variance devient meilleure après ce préfiltrage (comparer Fig. 2.4 et Fig 3.1), l'explosion de l'erreur relative se produisant autour d'un facteur de super-résolution de l'ordre de 1.5, contre 1 sans préfiltrage. Ces arguments laissent supposer que l'on pourrait mieux inverser les hautes fréquences après le préfiltrage

des données.

En pratique, on pourrait construire des préfiltres adaptés, qui permettent d'accroître la sensibilité aux hautes fréquences tout en gardant la PSF positive. De tels préfiltres ont été testés en simulation, sans offrir de gain significatif rapport au simple préfiltrage définit en (3.18)

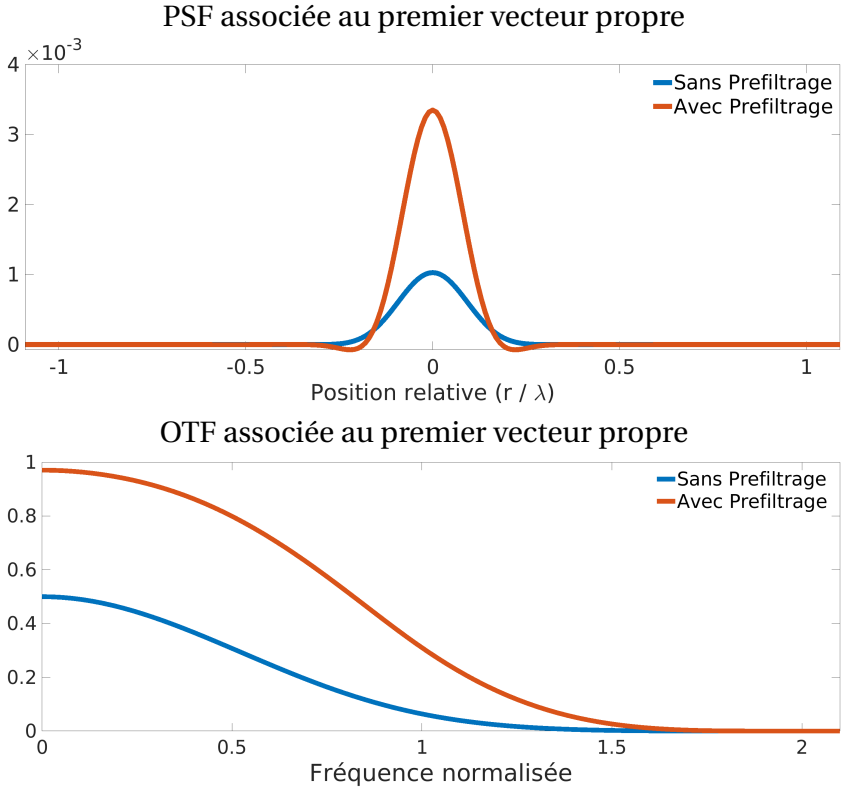


FIGURE 3.5. – Impact du préfiltrage sur le premier vecteur propre

Un dernier point que l'on peut noter, est qu'en pratique, cette déconvolution peut se faire de manière rigoureuse en considérant un problème inverse dont le modèle direct est :

$$\boldsymbol{\sigma} = |\mathbf{U}_1 \boldsymbol{\rho}| \tag{3.24}$$

On obtient alors une formulation classique des problèmes de reconstruction de phase (CANDÈS et al. 2015), ou plutôt de signe, car les quantités impliquées sont réelles. En pratique, à cause des valeurs absolues, le problème (3.24) ne possède pas une unique solution dans les conditions de RIM (BALAN et al. 2006), mais on pourrait quand même espérer avoir une bonne chance de le résoudre de manière unique en ajoutant une contrainte de positivité.

Cependant, les résultats sont suffisamment corrects en utilisant directement (3.23), pour préférer se contenter d'appliquer directement cette formule, plutôt que de passer par une approche plus complexe inspirée de la reconstruction de phase. Notons enfin qu'à cause de l'erreur de modèle, cet estimateur restera limité en termes de

capacité de résolution, et ne pourra par conséquent jamais atteindre le gain de résolution théorique maximal possible avec RIM. Ces limitations seront illustrées lors des comparaisons des algorithmes 3.5.

3.4. Nouvel algorithme itératif : RIM-STD

3.4.1. Nouvelle proposition de critère

Pour produire le niveau de super-résolution attendu en RIM, il est nécessaire de revenir à un modèle considérant plus de vecteurs propres dans le calcul de l'écart-type modèle $\boldsymbol{\sigma}$, défini en prenant simplement la racine carré dans (3.11) :

$$\boldsymbol{\sigma}(\boldsymbol{\rho}) := \boldsymbol{v}(\boldsymbol{\rho})^{\circ\frac{1}{2}} = \left(\sum_{k=1}^{K} (\mathbf{U}_k \boldsymbol{\rho})^{\circ 2} + \widehat{v}_\varepsilon \right)^{\circ\frac{1}{2}}. \tag{3.25}$$

Dans ce cas, on perd l'aspect problème inverse linéaire que l'on avait réussi à construire avec RIM-CF, et il faut revenir à un problème de minimisation de la forme (3.4). L'argument heuristique principal pour justifier ce changement de critère nous vient des problèmes de reconstructions de phase, qui présentent de nombreuses similarités avec RIM [13]. Pour ce type de problèmes, il est communément admis (ZHANG et al. 2017), même si, non théoriquement démontré, que l'utilisation d'un critère basé sur les amplitudes au lieu des intensités mène à des meilleures performances en termes de convergence. Dans le cas de RIM, cette approche est justement équivalente à minimiser un critère basé sur les écart-types plutôt que les variances. L'idée globale est qu'une fonction des moindres carrés associée aux écart-types est proche d'une fonction quadratique de l'échantillon, là où celle basée sur la variance est une fonctionnelle d'ordre 4. On propose donc le nouvel estimateur RIM-STD :

$$\widehat{\boldsymbol{\rho}}_{\mathrm{Std}} \in \arg\min_{\boldsymbol{\rho}} J_{\mathrm{Std}}(\boldsymbol{\rho}) \tag{3.26}$$

$$J_{\mathrm{Std}}(\boldsymbol{\rho}) = \left\| \widehat{\boldsymbol{\sigma}} - \boldsymbol{\sigma}(\boldsymbol{\rho}) \right\|^2 + \mu \left\| \boldsymbol{\rho} \right\|_2^2 \tag{3.27}$$

où $\widehat{\boldsymbol{\sigma}}$ l'écart-type empirique, s'obtenant en prenant la racine carré terme-à-terme de la variance définie (3.14).

3.4.2. Calcul du gradient et du Hessien du critère

Pour minimiser cette fonction, nous allons, comme pour RIM-VAR, construire un algorithme itératif, basé sur le gradient de la fonctionnelle (3.27)

13. Un lien précis entre ces deux types de problèmes est étudié dans le chapitre 5 consacré à l'extension de RIM à la microscopie cohérente, ainsi que dans l'annexe F

3.4.2.1. Calcul du gradient à partir des résidus

Une façon assez simple de dériver un gradient pour notre critère est de passer par la dérivée individuelle de chaque résidu. Plus précisément, pour un critère des moindres carrés, le gradient peut directement s'exprimer sous la forme (WRIGHT et al. 1999) :

$$\nabla J_{\text{Std}} = -2\mathbf{J}_{\boldsymbol{\sigma}}^{\text{t}}(\boldsymbol{\rho})\Big(\widehat{\boldsymbol{\sigma}} - \boldsymbol{\sigma}(\boldsymbol{\rho})\Big) + 2\mu\boldsymbol{\rho} \tag{3.28}$$

où $\mathbf{J}_{\boldsymbol{\sigma}}$ est la matrice jacobienne de la fonction objectif, donnée par :

$$\mathbf{J}_{\boldsymbol{\sigma}}(\boldsymbol{\rho}) = \begin{pmatrix} \nabla^{\text{t}}\sigma_1(\boldsymbol{\rho}) \\ \vdots \\ \nabla^{\text{t}}\sigma_i(\boldsymbol{\rho}) \\ \vdots \\ \nabla^{\text{t}}\sigma_N(\boldsymbol{\rho}) \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} \nabla^{\text{t}} j_1(\boldsymbol{\rho}) \\ \vdots \\ \nabla^{\text{t}} j_i(\boldsymbol{\rho}) \\ \vdots \\ \nabla^{\text{t}} j_N(\boldsymbol{\rho}) \end{pmatrix} \tag{3.29}$$

où σ_i est la notation allégée de $[\boldsymbol{\sigma}(\boldsymbol{\rho})]_i$ et j_i désigne les résidus :

$$j_i := [\widehat{\boldsymbol{\sigma}}]_i - \left(\boldsymbol{\rho}^{\text{t}}\mathbf{T}_i\boldsymbol{\rho} + \widehat{\sigma}^2_{\varepsilon;i}\right)^{\frac{1}{2}} \tag{3.30}$$

$$= \widehat{\sigma}_i - \sigma_i(\boldsymbol{\rho}) \tag{3.31}$$

pour lesquels on calcule aisément chaque gradient individuel :

$$\nabla j_i(\boldsymbol{\rho}) = -\frac{1}{\sigma_i(\boldsymbol{\rho})}\mathbf{T}_i\boldsymbol{\rho}. \tag{3.32}$$

Ce qui donne l'expression finale du gradient :

$$\begin{aligned} \nabla J_{\text{Std}} &= -2\sum_{i=1}^{N} \frac{j_i(\boldsymbol{\rho})}{\sigma_i(\boldsymbol{\rho})}\mathbf{T}_i\boldsymbol{\rho} + 2\mu\boldsymbol{\rho} \\ &= -2\sum_{i=1}^{N} \frac{[\widehat{\boldsymbol{\sigma}}]_i - \left(\boldsymbol{\rho}^{\text{t}}\mathbf{T}_i\boldsymbol{\rho} + \widehat{\sigma}^2_{\varepsilon;i}\right)^{\frac{1}{2}}}{\left(\boldsymbol{\rho}^{\text{t}}\mathbf{T}_i\boldsymbol{\rho} + \widehat{\sigma}^2_{\varepsilon;i}\right)^{\frac{1}{2}}}\mathbf{T}_i\boldsymbol{\rho} + 2\mu\boldsymbol{\rho}. \end{aligned} \tag{3.33}$$

Notons que dans cette expression, il est souhaitable que la variance estimée $\widehat{\sigma}^2_{\varepsilon;i}$ [14] du bruit additif ne soit nulle sur aucun des pixels de façon à assurer que les quantités $\sigma_i(\boldsymbol{\rho})$ soient non nulles, et que le gradient reste borné.

3.4.2.2. Implémentation numérique du gradient

Cette expression du gradient n'est malheureusement pas directement compatible avec l'implémentation de RIM basée sur les transformées de Fourier, qui demande de

14. Cette quantité est equivalente à la quantité $[\widehat{v}_\varepsilon]_i$ introduite (3.12)

remplacer les sommes sur les N pixels de l'image par K convolutions avec les matrices $\mathbf{U}_k$, comme cela à été fait pour le calcul de la variance (voir 3.11).

Pour faire apparaître ce type d'expression, il faut calculer explicitement la jacobienne à partir de la forme (3.25). Cette forme est la composition de la fonction racine avec la fonction variance, donc en utilisant la formule pour obtenir la jacobienne d'une composition de fonctions [15] on a :

$$\mathbf{J}_{\boldsymbol{\sigma}}(\boldsymbol{\rho}) = \frac{1}{2}\mathrm{Diag}\left(\frac{1}{\boldsymbol{\sigma}(\boldsymbol{\rho})}\right)\mathbf{J}_{v}(\boldsymbol{\rho}) \tag{3.34}$$

avec $\mathbf{J}_v$ la jacobienne de la fonction variance (3.11). Le calcul de cette seconde jacobienne est tout aussi direct, puisqu'il s'agit d'un somme de composition d'un simple produit matrice vecteur avec une mise au carré termes à termes :

$$\mathbf{J}_{v}(\boldsymbol{\rho}) = 2\sum_{k=1}^{K}\mathrm{Diag}(\mathbf{U}_k\boldsymbol{\rho})\mathbf{U}_k. \tag{3.35}$$

Les matrices $\mathbf{U}_k$ sont les matrices de convolution utilisées dans la définition de la variance modèle (3.11). On peut alors réinjecter les expressions (3.34) et (3.35) dans (3.28) pour obtenir le gradient de J_{Std} :

$$\begin{aligned}
\nabla J_{\mathrm{Std}} &= -2\mathbf{J}_{\boldsymbol{\sigma}}^{\mathrm{t}}(\boldsymbol{\rho})(\widehat{\boldsymbol{\sigma}} - \boldsymbol{\sigma}(\boldsymbol{\rho})) + 2\mu\boldsymbol{\rho} \\
&= -2\left(\mathrm{Diag}\left(\frac{1}{\boldsymbol{\sigma}(\boldsymbol{\rho})}\right)\sum_{k=1}^{K}\mathrm{Diag}(\mathbf{U}_k\boldsymbol{\rho})\mathbf{U}_k\right)^{\mathrm{t}}(\widehat{\boldsymbol{\sigma}} - \boldsymbol{\sigma}(\boldsymbol{\rho})) + 2\mu\boldsymbol{\rho} \\
&= -2\sum_{k=1}^{K}\mathbf{U}_k\mathrm{Diag}(\mathbf{U}_k\boldsymbol{\rho})\mathrm{Diag}\left(\frac{1}{\boldsymbol{\sigma}(\boldsymbol{\rho})}\right)(\widehat{\boldsymbol{\sigma}} - \boldsymbol{\sigma}(\boldsymbol{\rho})) + 2\mu\boldsymbol{\rho} \\
\nabla J_{\mathrm{Std}} &= -2\sum_{k=1}^{K}\mathbf{U}_k\left((\mathbf{U}_k\boldsymbol{\rho}) \odot \frac{\widehat{\boldsymbol{\sigma}} - \boldsymbol{\sigma}(\boldsymbol{\rho})}{\boldsymbol{\sigma}(\boldsymbol{\rho})}\right) + 2\mu\boldsymbol{\rho}
\end{aligned} \tag{3.36}$$

Avec cette expression, on conserve bien la complexité en $\mathcal{O}(KN\log(N))$. Les convolutions avec les matrices $\mathbf{U}_k$ sont les opérations les plus coûteuses, et se font par transformée de Fourier. Par ailleurs, rappelons que les expressions (3.36), et (3.33), sont égales, bien que le passage d'une expression à l'autre soit non trivial.

3.4.2.3. Calcul du Hessien

Une façon courante pour accélérer les algorithmes basés sur une recherche linéaire est de rajouter l'utilisation de l'information de la courbure locale de la fonction modèle. Cette courbure est représentée par la matrice Hessienne de la fonction objectif. Afin d'assurer une cohérence dans notre algorithme, il faudrait dériver la matrice hessienne à partir du gradient formulé dans (3.36), ce serait extrêmement calculatoire. Il peut être

15. $\mathbf{J}_{G\circ F}(\boldsymbol{x}) = \mathbf{J}_G(F(\boldsymbol{x}))\mathbf{J}_F(\boldsymbol{x})$

néanmoins intéressant d'étudier le Hessien en repartant de l'expression des résidus :

$$\nabla^2 J_{\text{Std}} = \mathbf{J}_\sigma^{\text{t}} \mathbf{J}_\sigma + \sum_{i=1}^{N} j_i(\boldsymbol{\rho}) \nabla^2 j_i(\boldsymbol{\rho}) + \mu \mathbf{I}_N \tag{3.37}$$

avec $\mathbf{I}_N$ la matrice identité de taille $N \times N$. Pour le premier terme, on a :

$$\mathbf{J}^{\text{t}}\mathbf{J} = \sum_{i=1}^{N} (\nabla j_i)(\nabla j_i)^{\text{t}} = \sum_{i=1}^{N} \frac{1}{\sigma_i(\boldsymbol{\rho})^2} \mathbf{T}_i \boldsymbol{\rho} \boldsymbol{\rho}^{\text{t}} \mathbf{T}_i \tag{3.38}$$

Certaines méthodes de type Gauss-Newton (ou Levenberg-Marquardt) (WRIGHT et al. 1999[Chap.10]) proposent de résoudre le problème des moindres carrés en utilisant la matrice $\mathbf{J}^{\text{t}}\mathbf{J}$ comme préconditonneur. Cependant, cette matrice dépend fortement du point courant d'estimation, et sa structure n'en permet pas une inversion facile, ce qui rend ces approches incompatibles avec la contrainte de complexité $\mathcal{O}(N\log(N))$ fixée pour la résolution du problème RIM. Pour la seconde partie du Hessien, il faut dériver une nouvelle fois le gradient, ce qui donne :

$$\nabla^2 j_i = -\frac{1}{\sigma_i^2(\boldsymbol{\rho})} \left(\sigma_i(\boldsymbol{\rho}) \mathbf{T}_i - \frac{1}{\sigma_i(\boldsymbol{\rho})} \mathbf{T}_i \boldsymbol{\rho} \boldsymbol{\rho}^{\text{t}} \mathbf{T}_i \right) \tag{3.39}$$

d'où, en remplaçant j_i par sa définition (3.30)

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^{N} j_i(\boldsymbol{\rho}) \nabla^2 j_i(\boldsymbol{\rho}) &= \sum_{i=1}^{N} (\widehat{\sigma}_i - \sigma_i(\boldsymbol{\rho})) \frac{1}{\sigma_i^2(\boldsymbol{\rho})} \left(-\sigma_i(\boldsymbol{\rho}) \mathbf{T}_i + \frac{1}{\sigma_i(\boldsymbol{\rho})} \mathbf{T}_i \boldsymbol{\rho} \boldsymbol{\rho}^{\text{t}} \mathbf{T}_i \right) \\ &= \sum_{i=1}^{N} \mathbf{T}_i - \frac{1}{\sigma_i^2} \mathbf{T}_i \boldsymbol{\rho} \boldsymbol{\rho}^{\text{t}} \mathbf{T}_i + \frac{\widehat{\sigma}_i}{\sigma_i(\boldsymbol{\rho})} \left(\frac{1}{\sigma_i^2(\boldsymbol{\rho})} \mathbf{T}_i \boldsymbol{\rho} \boldsymbol{\rho}^{\text{t}} \mathbf{T}_i - \mathbf{T}_i \right). \end{aligned}$$

Au final, on obtient l'expression suivante pour la matrice Hessienne :

$$\nabla^2 J_{\text{Std}} = \mathbf{S} + \mu \mathbf{I}_N + \sum_{i=1}^{N} \frac{\widehat{\sigma}_i}{\sigma_i} \left(\frac{1}{\sigma_i^2} \mathbf{T}_i \boldsymbol{\rho} \boldsymbol{\rho}^{\text{t}} \mathbf{T}_i - \mathbf{T}_i \right) \tag{3.40}$$

où $\mathbf{S} = \sum_i^N \mathbf{T}_i$ est par construction une matrice circulante. On propose donc d'utiliser la partie constante du Hessien $\mathbf{S} + \mu \mathbf{I}_N$ comme préconditionneur pour notre algorithme. Plusieurs points motivent ce choix :

— Ce préconditionneur correspond à la partie constante du Hessien, et ne dépend pas de l'échantillon. Il n'a donc qu'à être calculé une seule fois au début du processus de reconstruction.

— $\mathbf{S}$ est une matrice de convolution : $\mathbf{S} = \sum_{k=1}^{K} \mathbf{U}_k^{\text{t}} \mathbf{U}_k = \text{BCCB}(\boldsymbol{s})$ avec :

$$\widetilde{\boldsymbol{s}} = \sum_{k=1}^{K} |\widetilde{u}_k|^2 \tag{3.41}$$

et peut donc être calculée et inversée sans impacter la complexité en $\mathcal{O}(N\log(N))$

de l'algorithme. Cette propriété ne serait probablement pas vérifiée avec d'autres approximations de la matrice Hessienne.

— Ce préconditionneur peut également se dériver en construisant un algorithme par approximation majorante (voir Annexe B [16]). Il est également similaire au préconditionneur de l'algorithme PRIME (QIU et al. 2016), utilisé en reconstruction de phase.

3.4.3. Schéma final de gradient conjugué préconditionné

Pour trouver un minimiseur de la fonction objectif J_{Std}, nous allons utiliser un algorithme de descente avec recherche de pas. C'est à dire que l'on va construire une suite de points $(\boldsymbol{\rho}_k)_k \in \mathbb{N}$:

$$\begin{aligned} \boldsymbol{\rho}_0 &> 0, \boldsymbol{\rho}_0 \in \Omega_{\text{h}\gamma} \\ \boldsymbol{\rho}_{k+1} &= \boldsymbol{\rho}_k + \alpha_k \boldsymbol{d}_k \end{aligned} \tag{3.42}$$

telle que $J_{\text{Std}}(\boldsymbol{\rho}_{k+1}) < J_{\text{Std}}(\boldsymbol{\rho}_k)$. Notons qu'il est nécessaire que l'estimée initiale ne soit pas nulle, car le point $\boldsymbol{\rho} = \mathbf{0}$ est un maximum local de la fonction objectif [17].

La direction de descente $\boldsymbol{d}_k$ et le pas α_k à chaque itération seront choisis de façon à garantir que la suite $(\boldsymbol{\rho}_k)$ converge vers un minimum de la fonction J_{Std}. La direction retenue pour l'algorithme, est alors la direction du gradient conjugué préconditionné :

$$\boldsymbol{d}_k = \begin{cases} -(\mathbf{S} + \mu \mathbf{I}_N)^{-1} \boldsymbol{g}_k & \text{si } k = 0, \\ -(\mathbf{S} + \mu \mathbf{I}_N)^{-1} \boldsymbol{g}_k + \beta_k \boldsymbol{d}_{k-1} & \text{sinon} \end{cases} \tag{3.43}$$

avec $\boldsymbol{g}_k$ le gradient de J_{Std} au point $\boldsymbol{\rho}_k$, et où le coefficient de conjugaison β_k, est celui de Polak-Ribière+, adapté pour un problème avec préconditionnement :

$$\beta_k = \max\left(\frac{(\boldsymbol{g}_k - \boldsymbol{g}_{k-1})^{\text{t}} (\mathbf{S} + \mu \mathbf{I}_N)^{-1} \boldsymbol{g}_k}{\boldsymbol{g}_{k-1}^{\text{t}} (\mathbf{S} + \mu \mathbf{I}_N)^{-1} \boldsymbol{g}_{k-1}}, 0 \right). \tag{3.44}$$

Le schéma qui a été construit est donc un schéma de type gradient conjugué non-linéaire préconditionné. Afin de pouvoir compléter le schéma (3.42), il est nécessaire de spécifier le pas α_k que l'on va effectuer dans la direction de descente retenue. Idéalement, on aimerait trouver le pas α tel que la fonction auxiliaire

$$W_k(\alpha) = J_{\text{Std}}(\boldsymbol{\rho}_k + \alpha \boldsymbol{d}_k) \tag{3.45}$$

décrivant l'évolution du critère dans la direction de descente soit minimale. En pratique, le pas retenu n'a pas besoin d'être optimal, et on peut se contenter de simplement choisir un pas faisant baisser "suffisamment" la valeur de la fonction objectif. Cette notion se traduit au travers de la condition d'Armijo (WRIGHT et al.

16. En pratique, cette approche apporte une meilleure justification vis-à-vis de l'utilisation de ce préconditionneur, mais n'a pas été présentée ici, car elle souffre de problèmes de vitesse de convergence.

17. On vérifie facilement que le gradient (3.36) est nul pour $\boldsymbol{\rho} = \mathbf{0}$.

1999[Chap.3]) :

$$W_k(\alpha) \leqslant W_k(0) + c_1 \alpha W_k'(0), \tag{3.46}$$

où c_1 est une constante entre 0 et 1 (généralement de l'ordre de 0.1), et $W_k'(0)$ est simplement le produit scalaire $\boldsymbol{g}_k^{\mathrm{t}} \boldsymbol{d}_k$. Pour obtenir un tel pas, on procède par une approche de *backtracking* (WRIGHT et al. 1999[Chap.3]). L'idée est de partir d'un pas initial $\alpha_{k;0}$ pouvant ne pas respecter la condition (3.46), puis de le réduire de manière géométrique jusqu'à obtenir un nouveau pas vérifiant cette condition [18].

Il reste alors à choisir une valeur appropriée pour le pas initial $\alpha_{k;0}$. Si cette valeur est trop faible, alors le pas $\alpha_{k;0}$ sera toujours accepté, mais le critère pourrait ne pas descendre suffisamment, ce qui augmentera le nombre d'itérations à convergence. Des conditions comme la condition de Wolfe(ibid.[Chap.3]) pourraient permettre d'éviter ce type problème. À l'inverse, si le pas initial est trop grand, il faudra beaucoup d'itérations de *backtracking* pour revenir sur un pas qui sera accepté, ce qui augmentera le temps de calcul par itération. Il faut donc pouvoir estimer un pas qui a de grandes chances d'être accepté initialement sans pour autant risquer d'être trop faible.

Un candidat idéal serait alors le pas optimal minimisant W_k, qui vérifie $W_k'(\alpha_{k;0}) = 0$, ce qui transforme un problème de minimisation sur W_k en un problème de recherche de zéros sur W_k'. Cependant, la fonction J_{Std} et sa restriction W_k sont des fonctions assez complexes [19], et obtenir l'expression exacte d'un tel pas semble impossible. On peut cependant rapidement trouver un zéro de W_k' à partir d'une méthode de Newton. En pratique, comme on cherche une initialisation la procédure de *backtracking*, il n'est pas nécessaire de maner l'algorithme de Newton à termes, et on peut se contenter de la première itération l'algorithme de Newton, lancée à partir du point courant ($\alpha = 0$).

Ainsi, la procédure de *backtracking* sera initialisée par la première itération de Newton, dont l'expression est donnée par :

$$\alpha_{k;0} = \frac{W_k'(0)}{W_k''(0)}. \tag{3.47}$$

Les détails de ce calcul, assez lourds et peu intéressants, sont disponibles dans l'annexe C. Notons cependant qu'un tel calcul n'augmente pas la complexité de l'algorithme proposé. De plus, la fonction W_k étant un presque un polynôme d'ordre 2, le pas de Newton sera quasiment toujours accepté par la procédure de *backtracking*.

3.5. Comparatif des performances

3.5.1. Illustration sur un problème 1D

Afin d'étudier en détail les performances des différentes méthodes, commençons par considérer un problème unidimensionnel, asymptotique et sans bruit, c'est-à-dire

18. $\alpha_{k,p_k+1} = r\alpha_{k,p_k}$ avec $0 < r < 1$
19. Il s'agit du carré d'une somme de racine de polynôme d'ordre 2

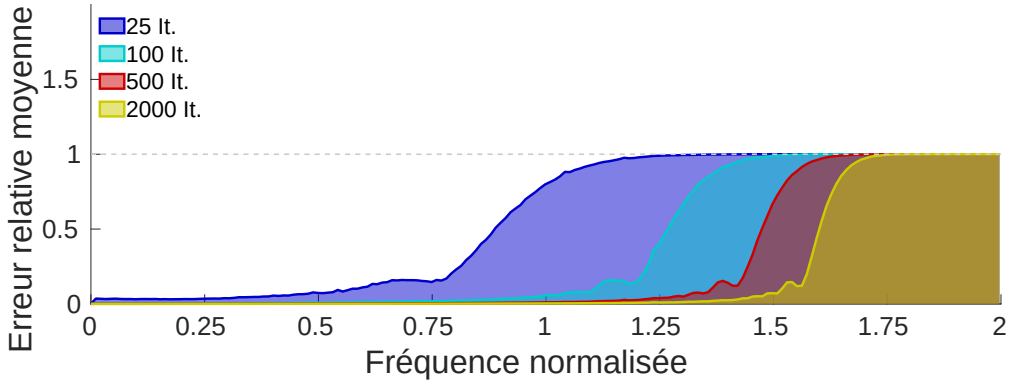
tel que la variance observée $\widehat{v}$ corresponde exactement à la variance modèle $v(\rho^\star)$. On choisit l'objet vrai $\rho^\star$ comme étant un bruit blanc filtré sur le domaine étendu, et rehaussé pour être positif. Pour estimer la qualité de la reconstruction, on trace la courbe d'erreur relative en fonction de la fréquence :

$$\epsilon(\boldsymbol{\nu}) = \frac{|\widehat{\rho}(\boldsymbol{\nu}) - \rho^\star(\boldsymbol{\nu})|}{|\rho^\star(\boldsymbol{\nu})|} \tag{3.48}$$

La moyenne de l'erreur en fréquence sur 2500 objets simulés est présentée Fig. 3.6, 3.7 et 3.8 pour les trois algorithmes présentés dans ce chapitre. Afin de souligner l'importance du préfiltrage, les algorithmes RIM-VAR et RIM-CF sont testés avec et sans préfiltrage. Pour RIM-STD, le préfiltrage est toujours utilisé, et c'est l'impact du préconditonneur qui est considéré.

Dans le cadre asymptotique, les méthodes itératives RIM-VAR et RIM-STD peuvent être inversées sans régularisation, les courbes représentent donc la reconstruction après différents nombres d'itérations. Pour la méthode RIM-CF, l'erreur de modèle nous force à appliquer une régularisation, même dans un cadre asymptotique sans bruit. À l'inverse, comme il n'y a pas d'itérations, les courbes représentent l'erreur pour différents paramètres de régularisation μ. Afin de comparer les algorithmes itératifs sur une même base, l'initialisation est choisie comme constante dans l'espace direct, de sorte à n'avoir aucune fréquence (donc aucune information a priori) dans l'espace de Fourier.

A.1) RIM-VAR (Sans Prefiltrage)



A.2) RIM-VAR

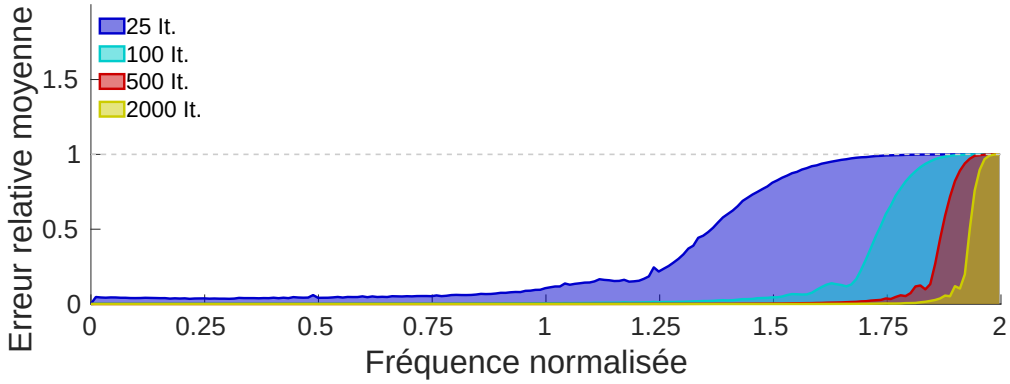
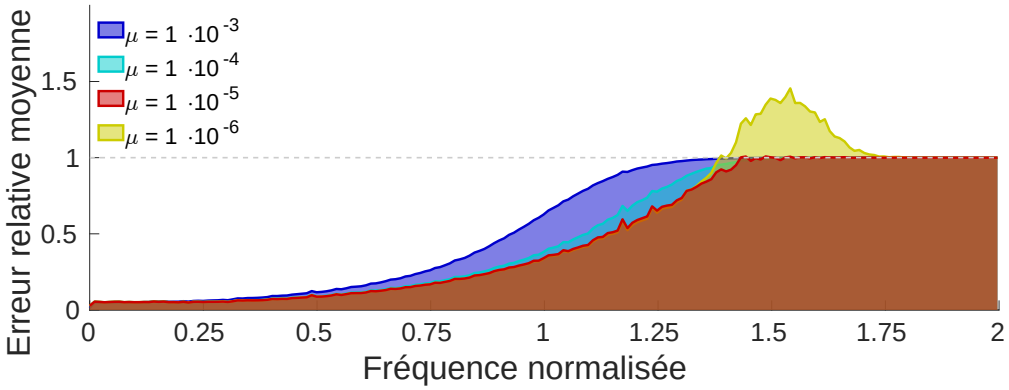


FIGURE 3.6. – Comparaison du gain de résolution de la méthode RIM-VAR avec et sans préfiltrage pour différents nombre d'itérations dans le cadre d'un problème 1D, asymptotique et sans bruit.

B.1) RIM-CF (Sans Prefiltrage)



B.2) RIM-CF

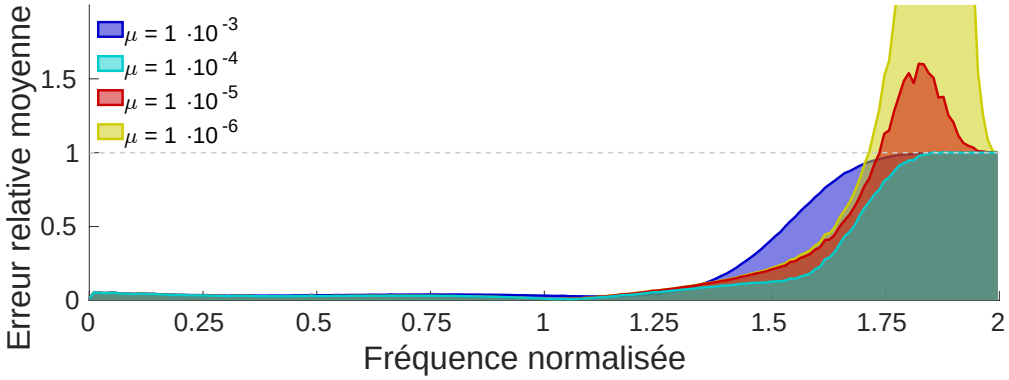
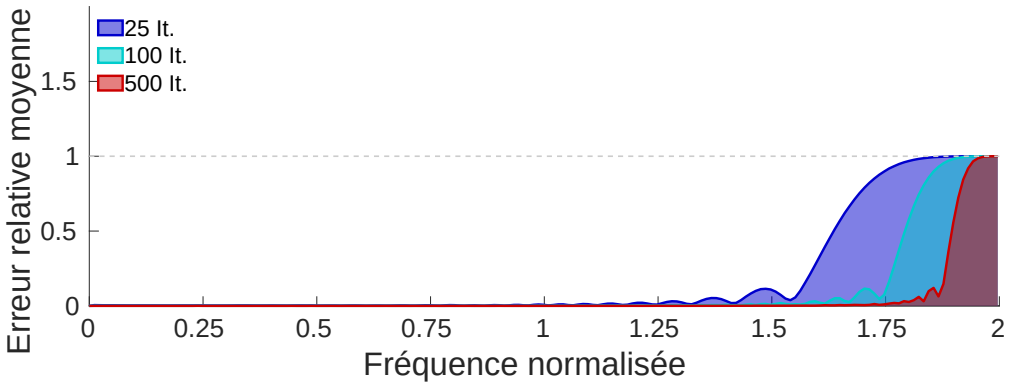


FIGURE 3.7. – Comparaison du gain de résolution de la méthode RIM-CF avec et sans préfiltrage pour paramètre de régularisation μ dans le cadre d'un problème 1D, asymptotique et sans bruit.

C.1) RIM-STD (Sans préconditionneur)



C.2) RIM-STD

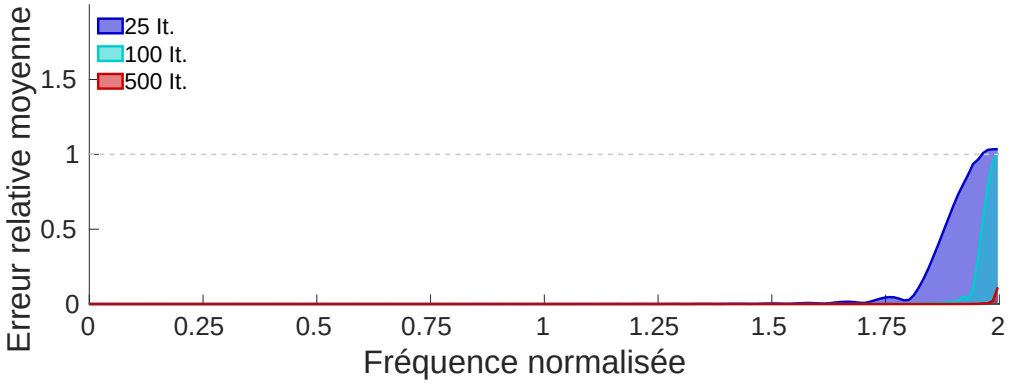


FIGURE 3.8. – Comparaison du gain de résolution de la méthode RIM-STD pour différents nombre d'itérations dans le cadre d'un problème 1D, asymptotique et sans bruit. Le préfiltrage est toujours appliqué et c'est l'impact du préconditionneur qui est testé ici.

La première chose que l'on peut remarquer, c'est que les méthodes itératives Fig. 3.6 et 3.8 reconstruisent les fréquences progressivement, en commençant par les basses fréquences, ce qui est un phénomène courant dans les algorithmes s'appuyant sur une direction de descente basée sur le gradient (BERTERO et al. 1997[Chap.5-6]). Ainsi, si les algorithmes sont interrompus avant d'avoir convergé, seules les basses fréquences sont correctement retrouvées. En pratique, cet arrêt prématuré peut être vu comme une manière de régulariser la reconstruction, les basses fréquences étant généralement plus robustes au bruit, car mieux transmises par l'OTF.

On constate aussi que la déconvolution des images brutes est primordiale pour avoir une reconstruction de bonne qualité. Pour la méthode RIM-VAR, après 2000 itérations, le facteur de super-résolution dépasse 1,8 après préfiltrage, alors qu'il n'atteint que 1.5 sans préfiltrage. De même pour RIM-CF, sans préfiltrage, on arrive difficilement à corriger les hautes fréquences, tout en ayant une erreur significative dans les basses fréquences. L'ajout de préfiltrage corrige la majorité de cette erreur,

et permet d'atteindre un facteur de super-résolution compris entre 1.4 et 1.6, ce qui correspond à une centaine d'itérations de RIM-VAR. Enfin, dans le cadre de la méthode RIM-STD on constate l'importance du préconditionnement. En comparant C.1) et A.2), on constate qu'une méthode RIM-STD sans préconditionnement est plus rapide que RIM-VAR lors des premières itérations, mais semble souffrir du même problème de stagnation pour la reconstruction des hautes fréquences, qui sont les plus difficiles à retrouver. Cette perte de vitesse n'est plus présente lorsque l'on active le préconditionneur.

Notons que le profil des reconstructions laisse penser que toutes les méthodes itératives auraient pu retrouver la totalité de l'échantillon sur le domaine de super-résolution, mais seul RIM-STD (avec préfiltrage et préconditionnement) y parvient avec les contraintes de nombre d'itérations (*i.e.*, de temps) retenues.

3.5.2. Cas des émetteurs isolés

3.5.2.1. Cas des sources isolées

Nous avons pressenti dans le chapitre précédent (section 2.4.1) que le cas des émetteurs isolés était problématique pour la méthode RIM-CF. Dans le cas d'une source unique, ou de deux émetteurs éloignés, on s'attend à ce que l'écart-type ne contienne aucun contenu haute fréquence. Par conséquent, la déconvolution de l'écart-type ne permettra pas de retrouver les hautes fréquences de l'objet. C'est ce qui est illustrée Fig. 3.9, ou l'on compare sur un problème 1D [20] asymptotique et sans bruit, l'estimée produite par la méthode RIM-CF, avec une simple déconvolution linéaire de l'image widefield. On constate alors que RIM-CF produit une tâche de diffraction plus large, que ce qui est obtenue avec l'image widefield déconvoluée.

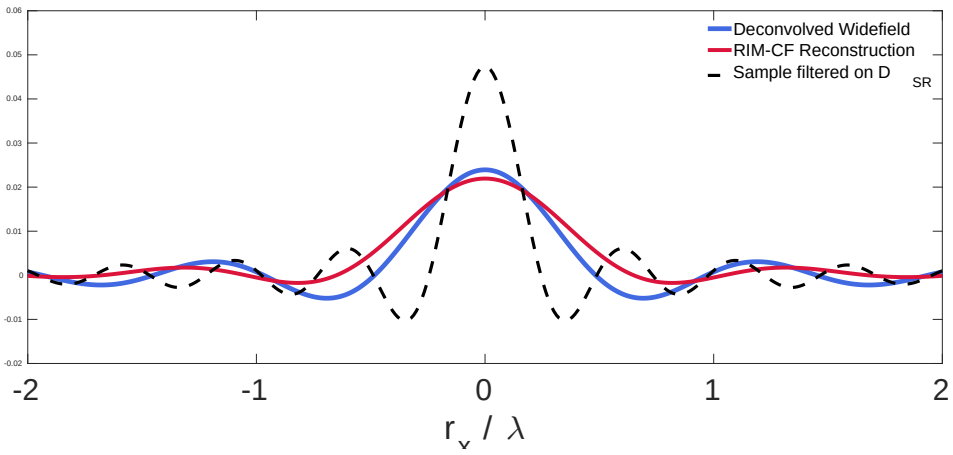


FIGURE 3.9. – Test de la méthode RIM-CF sans préfiltrage sur une source unique

Le cas d'émetteurs isolés n'est cependant pas particulièrement intéressant pour

20. L'OTF utilisée ici est une OTF dont le profil est la coupe selon l'axe k_x de l'OTF 2D, c'est-à-dire le profil présente Fig. 1.3

les méthodes par éclairements structurés, puisque les méthodes de localisation type STORM (BETZIG et al. 2006) offrent une précision de localisation bien supérieure à un facteur 2. Par ailleurs, les méthodes itératives RIM-VAR et RIM-STD ne sont pas affectées par ce type de problème, puisqu'elles se basent sur une modélisation plus précise de l'écart-type.

3.5.2.2. Cas des sources multiples

Dans le cas d'une paire de sources, nous avons vu dans le chapitre précédent (2.42), que l'interaction entre les sources commençait à être ressentie lorsque les sources sont proches de la limite de résolution du microscope. C'est précisément dans ce genre de configuration qu'il est nécessaire d'avoir de la super-résolution. À l'inverse quand les sources sont éloignées, il n'y a pas d'interaction et on se retrouve dans le cas d'émetteurs uniques sans gain de résolution. La comparaison RIM-CF, widefield déconvoluée pour trois distances différentes entre les sources, dans les mêmes conditions de simulations que celles Fig. 3.9 est proposée Fig. 3.10.

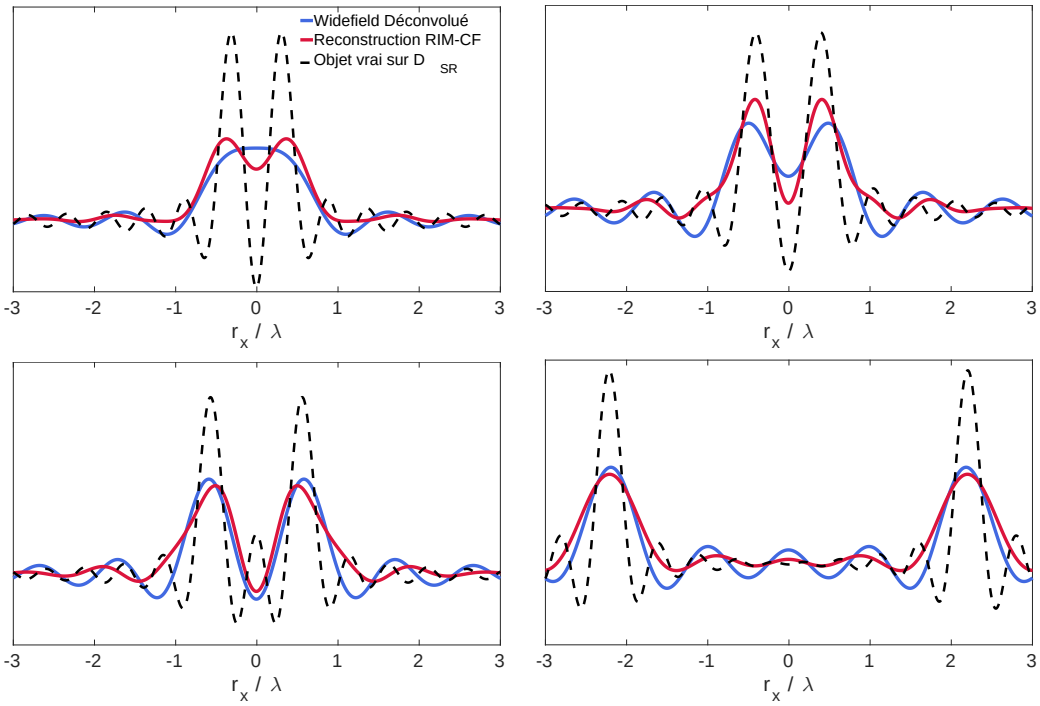


FIGURE 3.10. – Évolution des reconstructions de la méthode RIM-CF sans préfiltrage en fonction de la distance entre les sources

Dans ce cas, quand les sources sont à une distance de l'ordre de $\frac{\lambda}{2}$, elles ne sont plus séparables sur l'image widefield déconvoluée, mais restent séparables avec la méthode RIM-CF. Dès que cette distance réaugmente un peu, les sources redeviennent séparables dans l'image widefield déconvoluée, mais la méthode RIM-CF permet encore une fois de mieux les séparer. Cependant, les erreurs d'inversion dans les

hautes fréquences peuvent avoir des légers effets sur la localisation des sources, qui tend à les rapprocher les unes des autres et à leur donner une signature qui n'est plus symétrique. Si la distance augmente encore, on passe dans un régime où il n'y a plus d'interaction entre les sources, et dans lequel on retrouve les résultats sur des sources isolées.

Dans le cas d'une image 2D composée de multiples sources ponctuelles, la résolution de l'estimateur RIM-CF va donc dépendre localement de la densité de sources, avec une meilleure résolution dans les zones les plus denses. Ce phénomène est observé Fig. 3.11, montrant les reconstructions obtenues avec RIM-CF pour différents niveaux de densité de sources. Notons que dans ce cas, le niveau de résolution varie localement : sur la figure basse densité, les sources isolées produisent une tâche comparable à la tâche de l'image widefield, mais les sources rapprochées non séparables dans l'image widefield deviennent séparables avec l'estimateur RIM-CF. Le gain de résolution apporté par cet estimateur est particulièrement notable dans le cas d'un échantillon à forte densité. Notons une nouvelle fois que les méthodes itératives, illustrées avec la reconstruction RIM-STD, produisent la même résolution indépendamment de la densité.

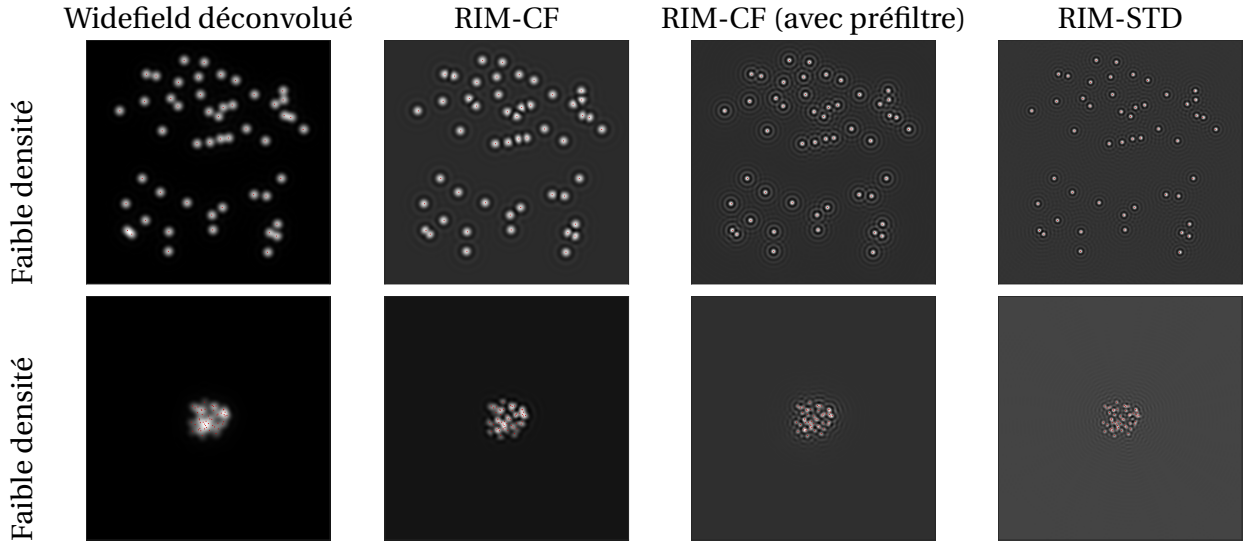


FIGURE 3.11. – Test de la méthode RIM-CF avec et sans préfiltrage et comparaison avec la méthode RIM-STD, sur différentes densités de sources.

Un dernier point à souligner est qu'après préfiltrage, même dans le cas d'émetteurs isolés, la méthode RIM-CF arrive à dépasser la résolution de l'image widefield déconvolué. Une étude théorique de ce point est cependant plus compliqué à cause de l'apparition d'une valeur absolue dans l'expression dans l'écart-type modèle associée à une bille unique.

3.5.2.3. Initialisation et autres minimas

L'étude asymptotique 1D de deux sources rapprochées est également un bon test vis-à-vis de la recherche de minima locaux, puisqu'elle permet de lancer des reconstructions avec de multiples initialisations, et de facilement comparer la signature estimée pour chaque bille. Le test réalisé ici est très simple, puisqu'il s'agit de lancer cinq reconstructions à partir d'initialisation aléatoires dont le support est restreint à $\Omega_{h\gamma}$, avec et sans contraintes de signe, et de regarder la reconstruction obtenue à convergence. Les cinq reconstructions pour une même contrainte d'initialisation sont alors présentés sur le même graphique Fig. 3.12.

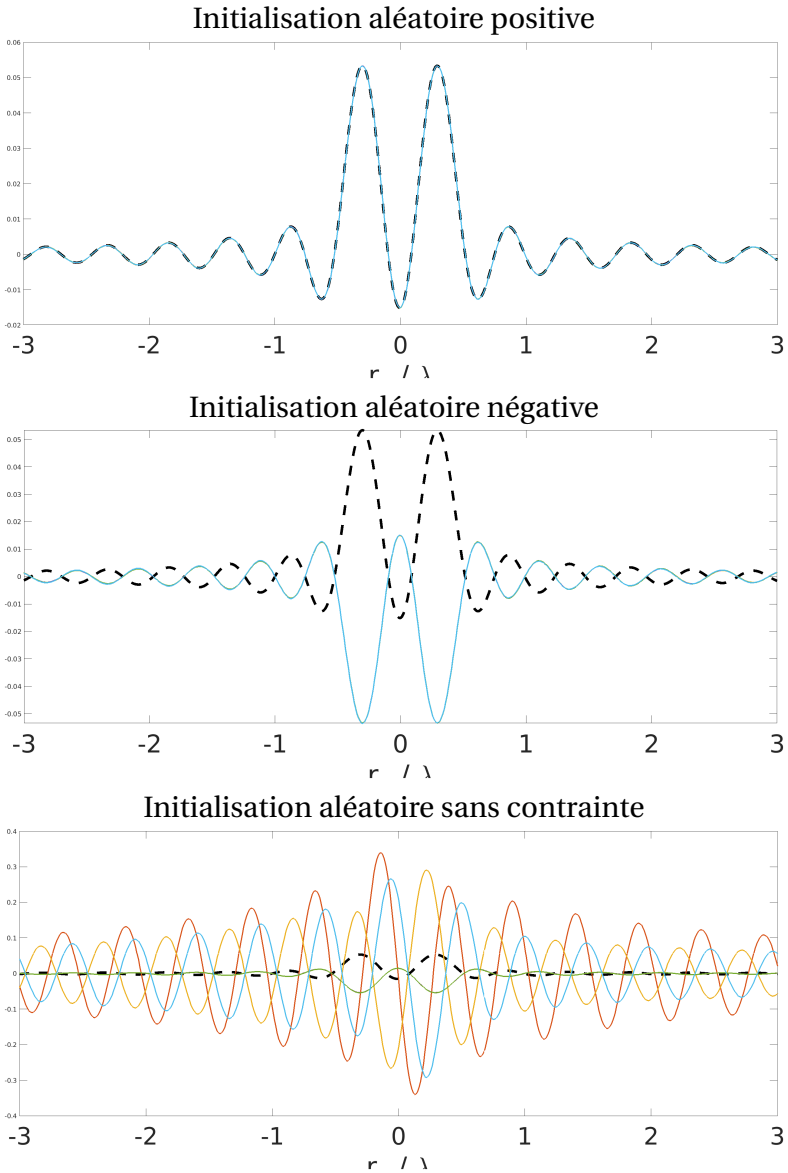


FIGURE 3.12. – Etude de l'impact du choix de l'estimée initiale dans la reconstruction RIM. Le tracé noir tireté correpond à l'objet vrai (deux billes) filtrés sur $\Omega_{h\gamma}$, tandis que chaque courbe en trait plein represente une reconstruction avec une intialisation différente. Dans le cas d'une initialisation avec un signe constant, les courbes sont superposées, et l'on retrouve toujours la même reconstruction à convergence, ce qui signifie que le choix de l'estimée initiale n'a pas d'impact. Cependant, si on choisit d'utiliser une estimée aléatoire de signe variable, on obtient des reconstructions qui sont des minimas locaux, et qui ne peuvent pas être associées à l'objet vrai.

On constate qu'avec une initialisation aléatoire de signe de constant, on obtient

une unique courbe, correspondant à l'objet filtré sur $\Omega_{h\gamma}$, ou son opposé si l'initialisation est négative. Ceci signifie qu'avec une initialisation aléatoire de signe constant, on retrouvera toujours l'objet vrai restreint à $\Omega_{h\gamma}$. À l'inverse, avec une initialisation aléatoire sans contraintes de signe, on obtient plusieurs reconstructions différentes à convergences. La majorité d'entre elles sont inexploitables puisque l'on ne retrouve plus la structure l'objet. On ne peut en pratique pas se risquer à utiliser une initialisation aléatoire de signe changeant. Dans la suite, nous veillerons donc à assurer que l'initialisation utilisée est positive.

3.5.3. Illustration sur des problèmes 2D

3.5.3.1. Données asymptotiques

L'importance du préfiltrage ayant été soulignée tout au long de ce chapitre, tous les traitements présentés à partir de maintenant se feront avec préfiltrage. Reprenons l'exemple de la mire de résolution, déjà utilisé précédemment, par exemple Fig. 3.2. Pour cette densité de fluorescence, la comparaison entre les méthodes RIM-CF, RIM-VAR et RIM-STD est présenté Fig. 3.13.

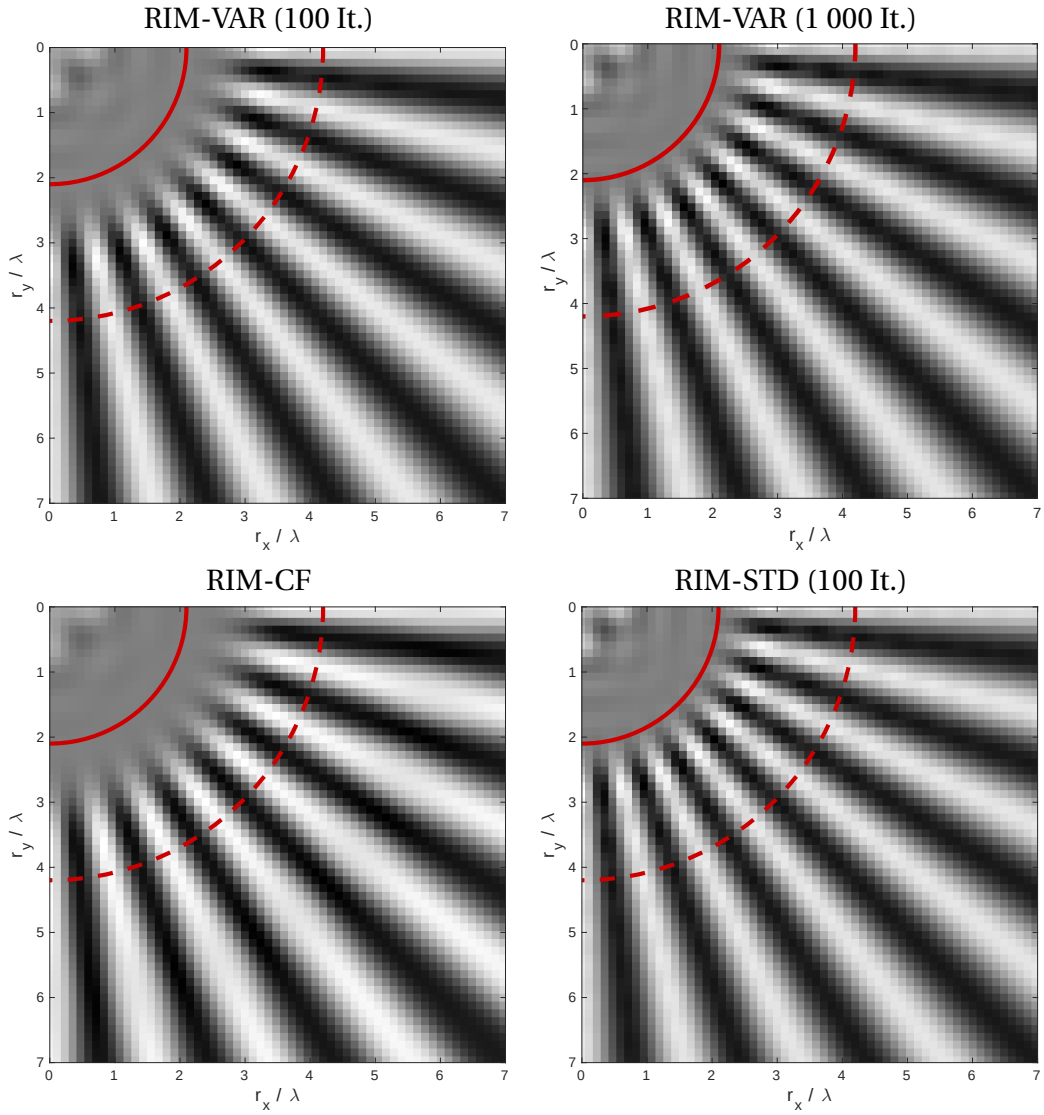


FIGURE 3.13. – Comparaison des différentes méthodes de reconstruction sur une mire de super-résolution à partir de l'écart-type asymptotique

On constate alors que la méthode RIM-STD arrive à atteindre la limite théorique de super-résolution en une centaine d'itérations, là où la méthode RIM-VAR n'atteint pas cette limite après 1000. Ainsi, dans des conditions asymptotiques pour lesquelles on peut obtenir un gain de résolution maximal, le nombre d'itérations nécessaire porter la méthode RIM-STD à convergence est plus d'un ordre de grandeur plus faible que ce qui est nécessaire avec la méthode RIM-VAR. Par ailleurs, du fait de la faible vitesse de convergence de la méthode RIM-VAR, la méthode RIM-CF arrive à produire des résultats comparables à une centaine d'itérations de RIM-VAR, mais avec un temps de calcul bien plus faible, aucune itération n'étant nécessaire.

3.5.3.2. Données à nombre de speckles fini

Les tests précédents restent cependant irréalistes, puisqu'il s'agit de problèmes asymptotiques et sans bruit, qui sont parfaitement inversibles. L'intérêt principal de ces simulations était de caractériser les capacités de reconstruction des différents algorithmes dans des conditions optimales. En particulier, dans ces conditions, nous avons pu vérifier que les méthodes itératives, permettent bien de retrouver la restriction à $\Omega_{h\gamma}$de la densité de fluorescence vraie.

Une première façon de se rapprocher des conditions expérimentales serait de travailler avec un nombre de speckle limité, mais toujours sans bruit. Dans ce cas, les reconstructions seront basées sur la variance ou l'écart-type empiriques tels que définit dans (3.14). L'écart-type empirique pour différents nombres de speckles est représenté Fig. 3.14.

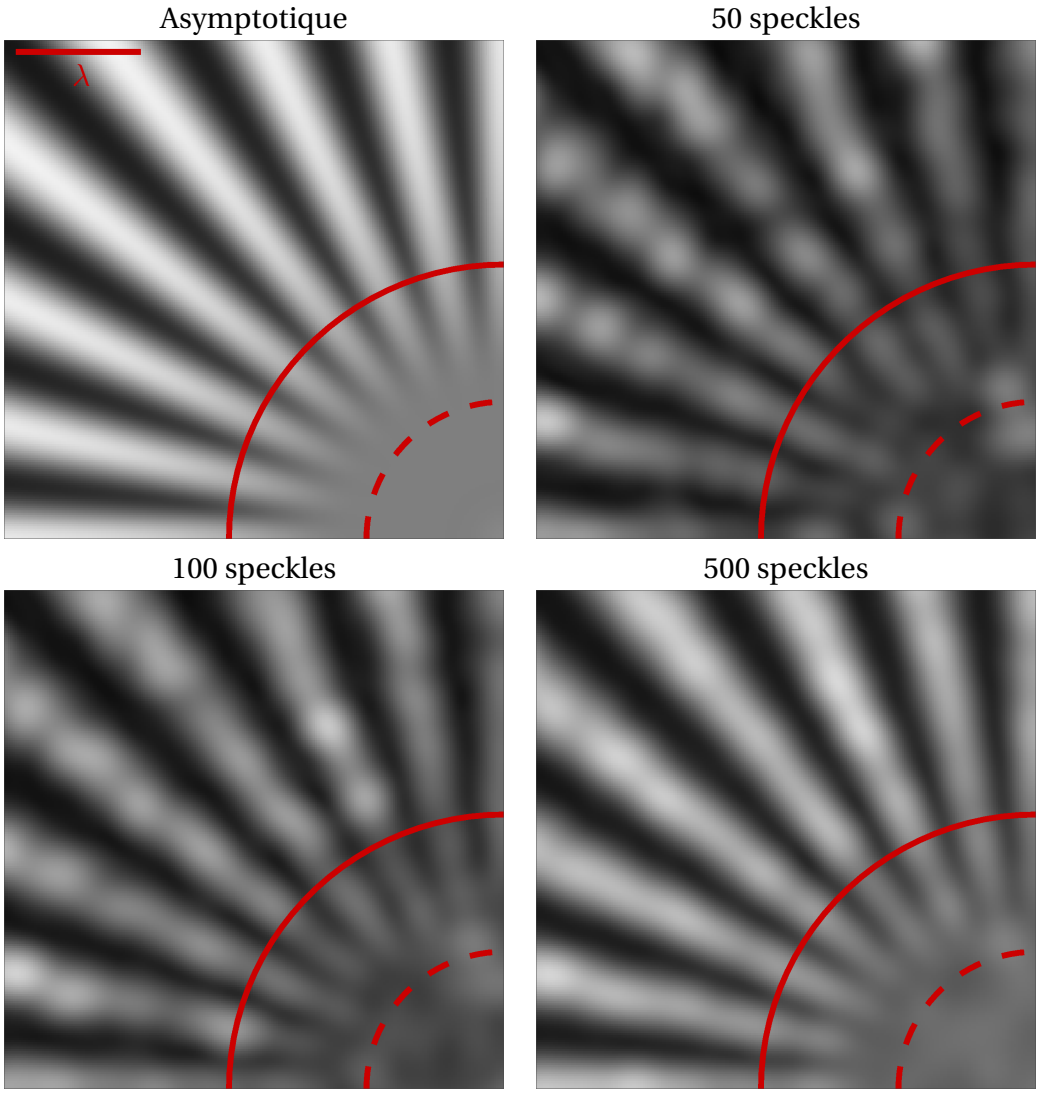


FIGURE 3.14. – Comparaison de entre l'écart-type modèle et l'écart-type emprique avec 50, 100, et 500 réalisations de speckles. La simulation est réalisée en épifluorescence ($h = \gamma$), et après préfiltrage des données.

Commençons par constater que sur ces figures, on retrouve l'effet de gain de résolution associé au calcul de l'écart-type. Cet effet, déjà discuté, se justifie à partir de (3.19), modélisant l'écart-type comme l'objet vrai filtré par une PSF super-résolue. Un autre point à constater est que la résolution de l'écart-type semble également s'améliorer lorsque le nombre d'images réalisées augmente. Nous considérerons par la suite des reconstructions à partir d'un écart-type (ou d'une variance) formée à partir de 500 images de speckles. Ces reconstructions sont visibles Fig. 3.15.

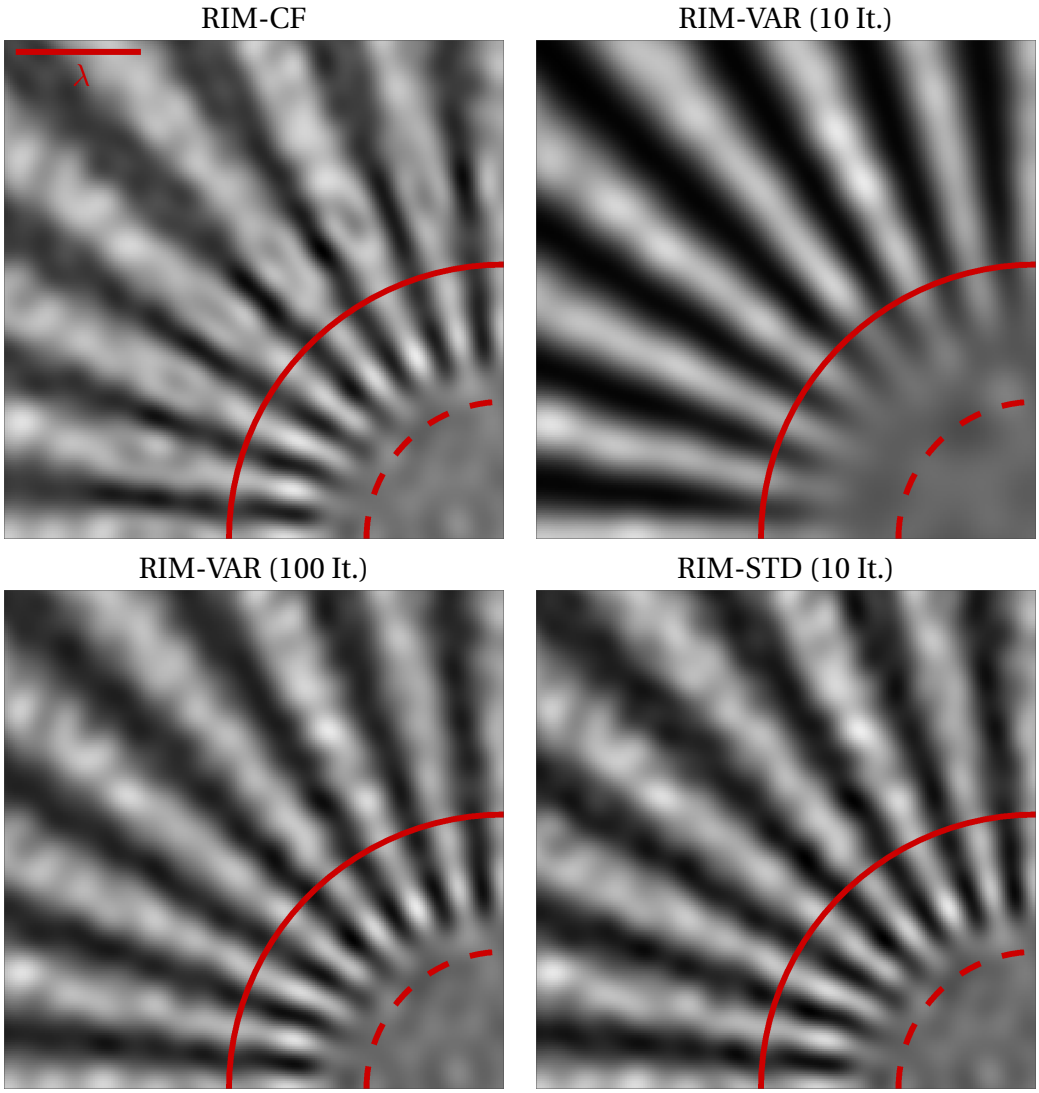


FIGURE 3.15. – Comparaison des différentes méthodes de reconstruction sur une mire de super-résolution à partir de l'écart-type formé à partir de 500 images de speckles

Le premier effet que l'on peut constater est que dans cette situation, l'estimateur RIM-CF produit une estimée avec une résolution comparable à celle des méthodes itératives RIM-VAR et RIM-STD. Ceci s'explique assez simplement, si l'on remarque Fig. 3.14, que les hautes fréquences convergent moins rapidement vers la fréquence asymptotique. Ce sont également ces fréquences qui sont le plus affectées par la troncature de rang 1. Ces fréquences étant donc déjà "perdues" à cause de l'erreur de modèle, la qualité de l'estimateur RIM-CF n'est que faiblement affectée, par la réduction du nombre de speckle. À l'inverse, pour les méthodes itératives, les fréquences qui peuvent être retrouvées asymptotiquement deviennent impossibles à reconstruire à cause du bruit induit par l'utilisation de statistiques non asymptotique n'ayant pas convergé. Cette perte de résolution maximale s'accompagne d'une réduction du

nombre d'itérations à convergence, puisqu'il n'est plus possible de reconstruire ces fréquences. Notons que même dans ces conditions, la méthode RIM-STD garde plus d'un ordre de grandeur d'avance sur la méthode RIM-VAR.

3.5.3.3. Simulation en présence de bruit

Avant de passer au traitement de données expérimentales, terminons par une analyse des méthodes d'inversion avec des images bruitées. Dans cette simulation, nous considérerons des expériences réalisées avec 500 speckles. Les réalisations bruitées $\boldsymbol{z}$ sont construites comme la somme de deux variables aléatoires $\boldsymbol{y}'$ et $\boldsymbol{\varepsilon}$. La première, définie par la loi $\boldsymbol{y}' \sim \mathscr{P}(\boldsymbol{y})$, avec $\boldsymbol{y}$ l'image modulée par le speckle, tel qu'introduit (3.2), s'obtient en tirant pour chaque pixel une valeur aléatoire suivant une loi de Poisson dont le paramètre est la valeur de $\boldsymbol{y}$ sur le pixel considéré. Ce tirage de Poisson sert à simuler le *shot noise* ou bruit de Grenaille modélisant le fait que l'on détecte des particules élémentaires (photons), et pas un flux lumineux continu. En plus de ce tirage de Poisson, on ajoute sur chaque image une contribution $\boldsymbol{\varepsilon}$ tirée selon une loi uniforme indépendante pour chaque pixel, simulant le bruit thermique de la caméra. Dans la suite de cette simulation, ce bruit sera un entier tiré de manière uniforme entre 0 et 8, analogue à un nombre supplémentaire de photons "détecté". Notons qu'avec ce formalisme, les données brutes sont indirectement quantifiées, puisqu'elles correspondent à un nombre de photons détectés sur chaque pixel, et sont donc entières.

La présence de bruit sur les images nous demande également d'introduire une mesure de la quantité de bruit par rapport à la quantité de signal. Cette quantité correspond au rapport signal sur bruit (RSB), dont il existe plusieurs définitions. Dans la suite, nous considérerons un RSB intégré sur les images défini comme :

$$\mathrm{RSB} = 10\log_{10}\left(\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}\frac{[\boldsymbol{z}]_i}{[\boldsymbol{z}]-[\boldsymbol{y}]_i}\right) \tag{3.49}$$

avec $\boldsymbol{z}$ l'image bruitée obtenue, et $\boldsymbol{y}$ l'image de la densité de fluorescence modulée par l'illumination, sans bruit. Le tableau 3.1, présente l'évolution du SNR en fonction du nombre de photons, tandis que les images brutes (modulées par le speckle, bruitées, et préfiltrées) ainsi que leurs statistiques (moyenne et écart-type) pour 500 images sont visibles Fig. 3.16.

I_0	RSB	RSB (après préfiltrage)
0.5	-25 dB	-20 dB
2	-13 dB	-8 dB
8	-2 dB	3 dB
30	9 dB	14 dB

Tableau 3.1. – Évolution du SNR avant et après préfiltrage pour différentes valeurs d'intensité moyenne du speckle I_0, définie (2.5). La normalisation de la PSF est $|\boldsymbol{h}| = 1$

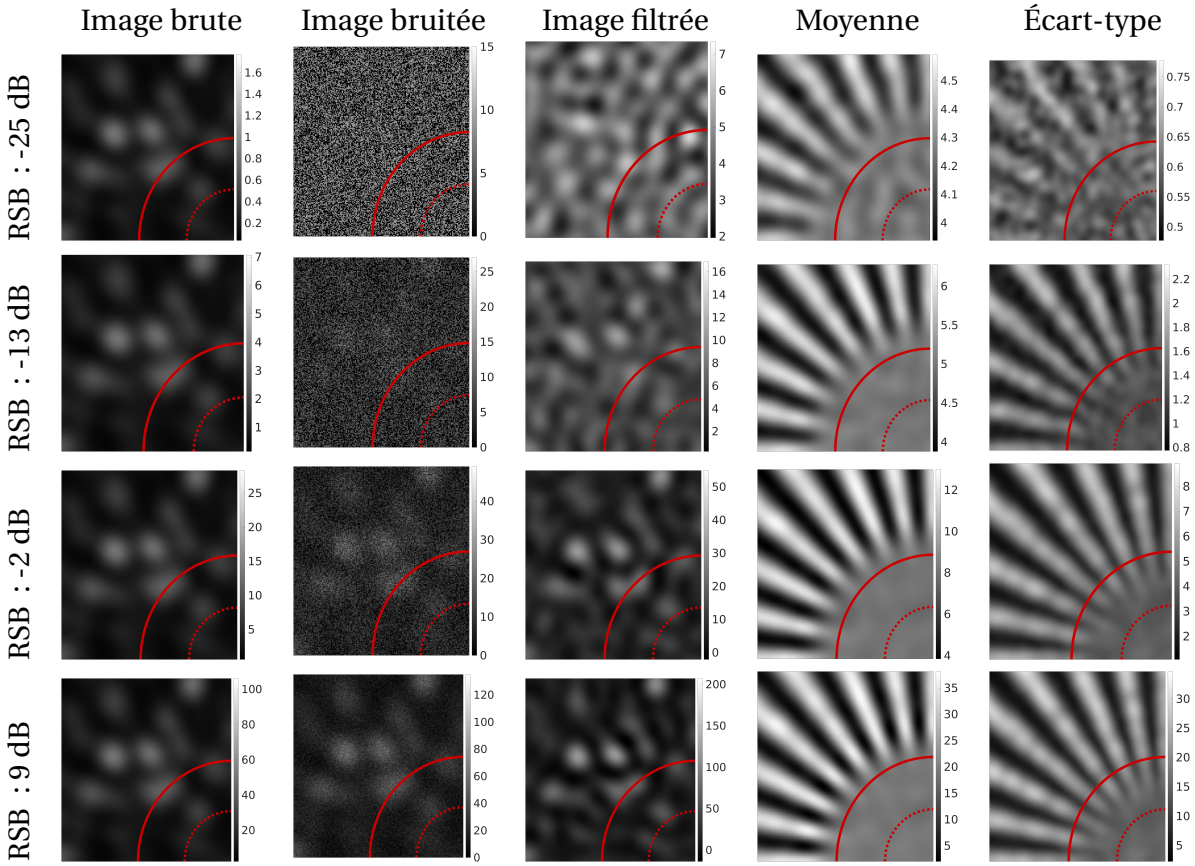


FIGURE 3.16. – Illustration des données brutes et de leurs moyennes, et de leurs écarts-types pour différents niveaux de RSB

Sur ces images les niveaux de gris correspondent à un nombre de photons détecté. Sur la première colonne, il s'agit du nombre moyen de photons détectés pour une réalisation particulière de speckle, sans bruit. La seconde image représente une acquisition pour ce motif de speckle, avec *shot noise* et bruit thermique de la caméra. Les mesures sont alors des nombres entiers, simulant un nombre de photons effectivement détecté. Les colonnes suivantes gardent une unité analogue à un nombre de photons, mais celui-ci n'est plus entier à cause des traitements numériques effectués.

En particulier, la première simulation avec un RSB de l'ordre de -25dB par image correspond à des images sur lesquelles le niveau du signal est nettement inférieur à celui du bruit thermique, qui est la seule contribution visible sur les images brutes. Néanmoins en combinant l'information des 500 images, et avec le préfiltrage de celles-ci, on arrive à retrouver une image moyenne analogue à une image widefield deconvoluée standard. Dans ce cas, on constate même que cette moyenne semble plus stable et mieux résolue que l'image d'écart-type, et on anticipe qu'un traitement numérique supplémentaire ne permettra pas de gain de résolution.

En revanche, dès que le niveau de signal augmente légèrement, et que l'on passe à un RSB de l'ordre de -13dB, pour lequel le signal reste à peine visible, l'écart-type se stabilise et devient mieux résolue que l'image de moyenne. À partir de là, il semble possible d'appliquer les traitements numériques de RIM pour améliorer la résolution. Le gain de résolution de l'écart-type par rapport à la moyenne, semble ensuite s'améliorer avec le RSB.

Pour ces différents niveaux de bruit, les reconstructions obtenues avec les différentes méthodes présentées dans cette section sont présentées Fig. 3.17.

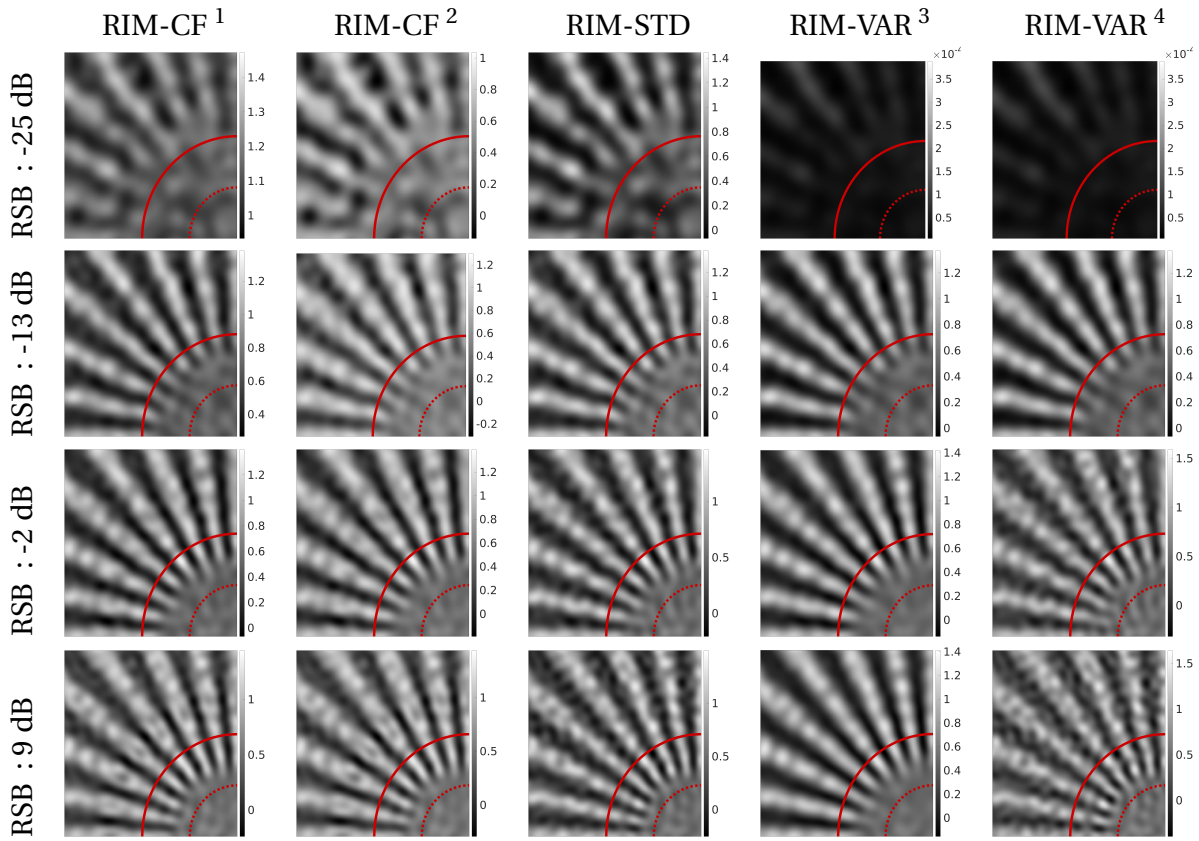


FIGURE 3.17. – Reconstruction obtenue à partir des différentes méthodes d'inversion. Pour RIM-CF, deux méthodes sont proposées selon l'intégration du bruit à la modélisation retenue (3.20). Dans le cas [1], ce bruit est simplement négligé, et dans le cas [2] la variance du bruit estimée est retranchée avant le calcul de l'écart-type. La méthode RIM-STD est exécutée jusqu'à convergence, et pour la méthode RIM-VAR, [3] utilise le même nombre d'itération que RIM-STD, tandis que [4], va jusqu'à convergence.

Dans le cas d'un RSB de -25dB, comme l'écart-type n'était pas exploitable (moins bien résolu que la moyenne), on retrouve qu'il est impossible d'obtenir une reconstruction correcte, et la moyenne des images reste un meilleur estimateur. Pour traiter ce genre de cas avec très peu de signal, une modification du critère utilisée incluant la moyenne des données serait une amélioration souhaitable.

Si l'on augmente le RSB, on retrouve cependant les conclusions déjà vues en asymptotiques, à savoir que l'estimateur RIM-STD converge bien plus vite RIM-VAR, et ceci à tous les niveaux de SNR. Notons quand même que plus le SNR est élevée, plus le gain de vitesse de convergence est important, et plus la résolution finale obtenue est importante. Ce phénomène est également vérifié avec l'estimateur RIM-CF, dont la résolution augmente avec le SNR. Ainsi, à faible SNR, l'estimée obtenue avec RIM-CF est de qualité comparable à celle obtenue avec les méthodes itératives, mais les méthodes itératives deviennent supérieures à fort SNR. On constate également que

dès que les données sont exploitables (SNR > -2dB), tenir compte de la variance du bruit d'instrument dans le modèle de l'écart-type au premier ordre (3.20) n'a que peu d'impact, et les reconstructions sont visuellement identique. A des niveaux de SNR plus bas (SNR < -13dB) on observe un léger biais si l'on ne retranche pas ce bruit, qui modifie les valeurs de la reconstruction mais ne change pas l'interprétation globale.

3.5.4. Traitement de données expérimentales

Depuis son implémentation, la méthode RIM-VAR a été régulièrement utilisée pour le traitement de données expérimentales (PORTES et al. 2022 ; JASNIN et al. 2022), et ce malgré les limitations de la méthode (le temps à convergence sur des données expérimentales 2D étant de quelques secondes). Les nouveaux algorithmes RIM-CF et RIM-STD, proposées ici devraient permettre de reproduire les résultats déjà obtenus avec la méthode RIM-VAR, mais plus rapidement. Pour vérifier cela, nous allons tester les nouveaux estimateurs sur deux échantillons biologiques.

3.5.4.1. Échantillon 2D de Vimentine

Le premier de ces échantillons est l'échantillon de vimentine utilisé dans l'article MANGEAT et al. 2021[Fig.2-A]. L'étude de cet échantillon permet confirmer les phénomènes constatés auparavant en simulation, et de vérifier l'applicabilité des nouvelles méthodes proposées sur des données expérimentales déjà publiées.

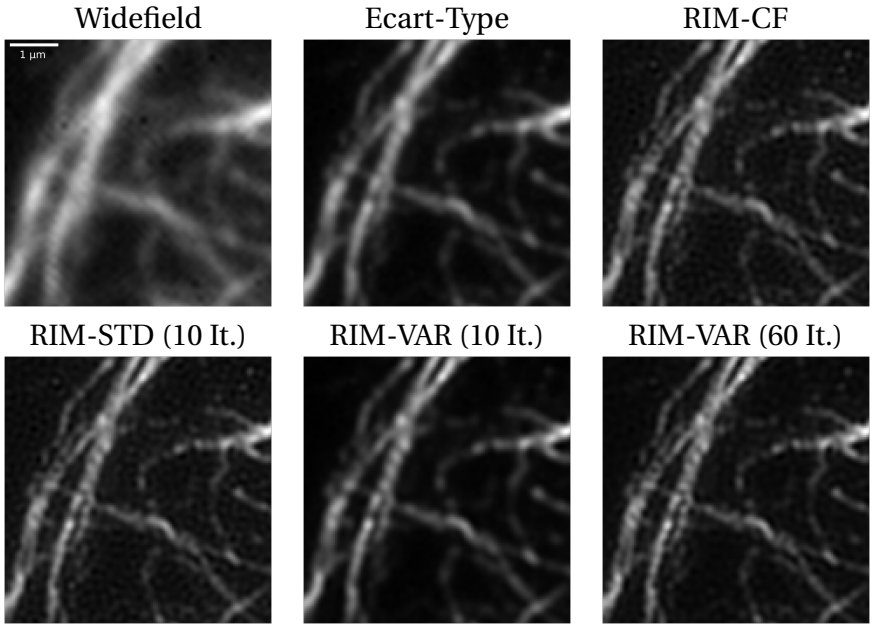


FIGURE 3.18. – Reconstruction 2D sur l'échantillon de vimentine présenté dans MANGEAT et al. 2021[Fig.2-A]

La première chose à remarquer, est qu'en termes de vitesse de reconstruction,

on retrouve les gains de vitesses des méthodes RIM-CF et RIM-STD par rapport à la méthode RIM-VAR. On retrouve également l'effet rencontré dans la simulation en présence de bruit, qui dégrade plus fortement les performances des méthodes itératives RIM-STD et RIM-VAR, que celles de la méthode approchée RIM-CF. Sur des données expérimentales, ce phénomène est encore plus marqué, car d'autres sources d'erreurs comme la non connaissance de la PSF et de la fonction d'auto-corrélation des éclairements, viennent s'ajouter au modèle. Si ces quantités peuvent être estimés ; la PSF ici ayant été estimée par la méthode STAR (DEBARNOT et al. 2021), il restera des imprécisions résultant en une erreur de modèle fondamentale ayant plus d'impact sur les modèles les plus précis (RIM-VAR et RIM-STD). Par conséquent, sur ce type d'échantillon, la reconstruction obtenue avec la méthode RIM-CF est bien plus proche des reconstructions itératives.

Un autre point concernant l'observation de données biologiques doit être fait ici. En effet, les reconstructions finales de RIM-CF, RIM-STD et RIM-VAR affichent toutes des oscillations de Gibbs qui sont la conséquence parfaitement normale d'une discontinuité dans le spectre de la reconstruction, liée à une égalisation des fréquences dans $\Omega_{h\gamma}$. Un expérimentateur pourrait donc préférer une inversion plus proche de celle de la méthode RIM-VAR avant convergence. En pratique, cette image correspond à une version plus régularisée (et donc moins résolue) de la reconstruction obtenue par troncature anticipée des itérations. Cette forme de régularisation s'explique en constatant Fig.3.6 que les basses fréquences sont reconstruites en premier. Ainsi, des résultats comparables pourraient également être obtenus avec les autres méthodes en augmentant le paramètre de régularisation μ. Si le choix final du réglage du paramètre de régularisation doit être laissé à l'expérimentateur, de futures améliorations dans les approches inverses peuvent être envisagée pour réduire ces phénomènes. Les approches les plus évidentes sont la mise en place d'une contrainte de positivité (le phénomène de Gibbs créant des valeurs négatives), ou l'implémentation de régularisation plus compliquée que la régularisation L_2. On pensera ici en particulier à la régularisation par variation totale (RUDIN et al. 1992), qui vise à favoriser des images avec des bords francs.

3.5.4.2. Image de l'intérieur d'une cellule

Pour finir, nous proposons d'imager l'intérieur d'une humaine U2OS, marquée avec un marquage *SYTOX green*. Cet échantillon est particulier puisqu'il s'agit d'un échantillon 3D dense qui ne vérifie plus l'hypothèse d'échantillon plan, introduite section 1.1.5.3 pour la microscopie 2D. Ainsi, expérimentalement, en plus de la fluorescence au niveau du plan d'intérêt (le plan focal), on enregistre également la fluorescence hors focus venue des autres plans. Cette fluorescence se traduit sur une grosse perte de contraste dans l'image moyenne (voir Fig. 3.19), que l'on modélise comme un bruit traité par l'estimateur de fond (LABOUESSE, IDIER, SENTENAC, MANGEAT et al. 2021).

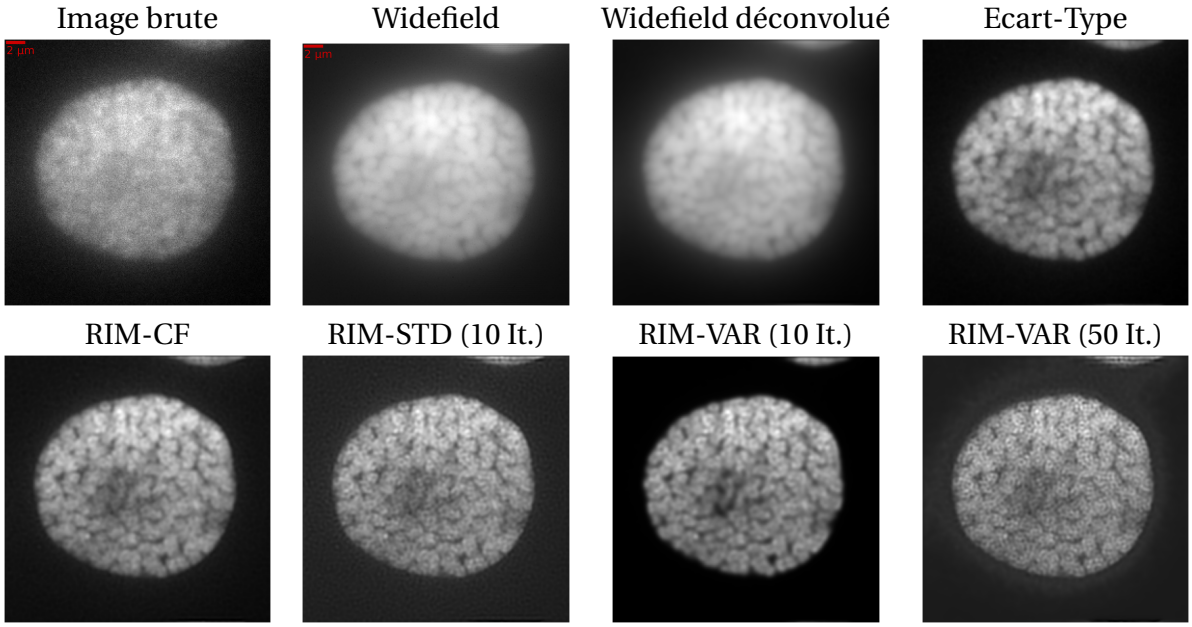


FIGURE 3.19. – Reconstruction 2D sur 400 images de speckles réalisées à l'intérieur d'un échantillon biologique épais. L'image widefield affiche une perte de contraste à cause de la fluorescence issues des plans hors focus qui est en partie corrigée lors du calcul de l'écart-type (DSI).

On constate alors que le contraste est restauré dès le calcul de l'écart-type, un phénomène déjà présenté avec la méthode du *Dynamic Speckle Imaging* (VENTALON et al. 2005). Ce gain de contraste est évidemment conservé lors des reconstructions, et le traitement RIM apporte en plus une amélioration de la résolution transverse. On observe alors les mêmes effets que précédemment, à savoir une convergence accélérée pour la méthode RIM-STD, et une méthode RIM-CF qui affiche des gains de résolution similaires aux méthodes itératives.

Pour les méthodes les mieux résolues, il y a cependant une apparition d'artefacts hautes fréquences liée à l'inversion du signal hors-focus. L'idéal pour éliminer ces artefacts, serait de pouvoir procéder à une inversion RIM sur des acquisitions 3D. Le traitement de telles acquisitions implique nécessairement une explosion de la taille des données, et des temps de calculs associés. C'est dans ce cadre que les méthodes rapides RIM-CF et RIM-STD présente leur intérêt. Il reste alors à étudier la mise en œuvre expérimentale de l'acquisition 3D afin de construire un schéma RIM consistant avec ce qui a été présenté dans le chapitre (2.1). Ces questions seront discutées dans le chapitre suivant.

4. Application à l'imagerie 3D

Sommaire

4.1. Spécificités de l'imagerie 3D . . . 110
4.1.1. Image d'une coupe transverse de l'échantillon . . . 110
4.1.2. Acquisition d'une image 3D . . . 111
4.1.2.1. Principe général . . . 111
4.1.2.2. Modélisation . . . 112
4.1.2.3. Application au cas de la translation . . . 113
4.1.2.4. Application au cas de *remote focusing* . . . 113
4.1.2.5. Cas du multifocus . . . 114
4.1.3. Retour en imagerie conventionnelle . . . 114
4.1.3.1. Observation de sources ponctuelles . . . 114
4.1.3.2. Cas d'un plan de fluorescence . . . 115
4.2. Super-résolution 3D . . . 116
4.2.1. Enjeux . . . 116
4.2.2. Méthodes par éclairements structurés . . . 116
4.2.3. Autres méthodes de super-résolution 3D . . . 119
4.2.3.1. SOFI . . . 119
4.2.3.2. Méthodes de localisation . . . 120
4.3. Mise en œuvre de RIM 3D . . . 120
4.3.1. Acquisition des images . . . 120
4.3.2. Calcul de la variance . . . 122
4.3.3. Discussion relative au préfiltrage . . . 124
4.4. Approches inverses pour RIM 3D . . . 126
4.5. Résultats . . . 127
4.5.1. Comparaison des méthodes en simulation numérique . . . 127
4.5.1.1. Simulation XZ . . . 127
4.5.2. Préfiltrage 3D sur des acquisitions sans *remote focusing* . . . 128
4.5.3. Simulation 3D . . . 130
4.5.4. Test sur données expérimentales . . . 132
4.5.4.1. Echantillon test . . . 133
4.5.4.2. Données biologiques . . . 134
4.6. Conclusion sur le fonctionnement de RIM 3D . . . 136

4.1. Spécificités de l'imagerie 3D

4.1.1. Image d'une coupe transverse de l'échantillon

Jusqu'à présent, nous nous sommes limités à l'étude de RIM dans le cadre de la microscopie 2D, où les échantillons sont contenus dans le plan focal objet du microscope. Cependant, dans un cadre général, les objets observés ne sont pas plans, mais s'étendent dans la direction de l'axe optique sur une distance de l'ordre de plusieurs longueurs d'onde, soit quelques micromètres au moins. On distingue alors deux régions de l'échantillon. Une région en focus, proche du plan focal, produisant une image consistante avec le modèle 2D étudié jusqu'à présent, et une région hors focus, contenant le reste des fluorophores. Dans le cadre de la microscopie en épifluorescence, tous les fluorophores sont éclairés en même temps, donc une image réalisée dans le plan focal image du microscope reflètera simultanément les contributions en focus (que l'on souhaite mesurer) et hors focus, ce qui se traduira par une perte de contraste sur l'image finale. Une illustration simple de ce phénomène est représentée Fig. 4.1, simulant l'observation d'une croix 2D placée à l'intérieur d'une sphère creuse.

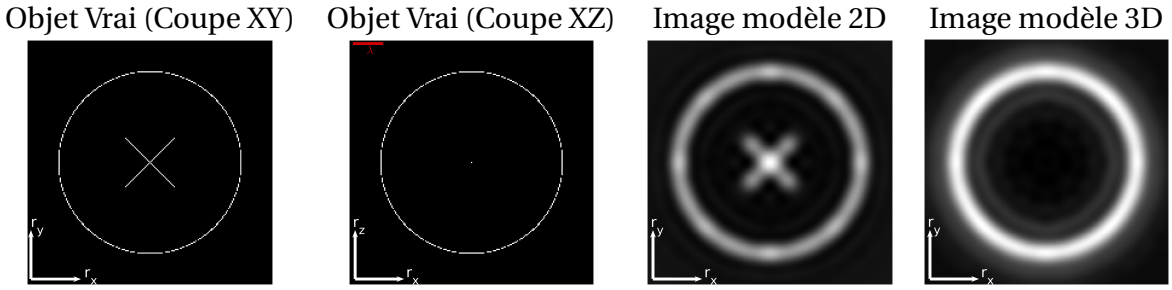


FIGURE 4.1. – Comparaison normalisée d'une image widefield du plan focal pour un objet 3D. Le plan focal se situe au centre de la sphère de la seconde image. Le modèle 2D qui ne prend pas en compte la fluorescence hors focus est significativement différent de ce que l'on observe avec le modèle 3D

Dans le cas d'une modélisation 2D, la PSF est 2D et l'échantillon est décrit uniquement par la densité de fluorescence au niveau du plan focal objet. Cela correspond à la croix et au cercle d'intersection entre la sphère et le plan focal. L'image 2D reproduit fidèlement ces deux structures malgré la perte de résolution induite par la diffraction. Cependant, si l'on modélise l'image du même échantillon en prenant en compte le caractère tri-dimensionnel de l'objet, de la PSF et de l'illumination, on constate que la croix n'est plus visible. Cette disparition résulte d'une perte de contraste induite par la fluorescence issue de la sphère qui entoure la croix. Cet exemple montre que la simple présence de fluorescence hors focus peut totalement occulter certains détails d'une observation.

Mathématiquement, le modèle de formation d'image au niveau du détecteur est

celui donné dans l'équation (1.17). Pour rappel, ce modèle est :

$$Y(\boldsymbol{x}) = \int h(\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_1, z_\mathrm{F} - z_1)\rho(\boldsymbol{x}_1, z_1) I_{3\mathrm{D}}(\boldsymbol{x}_1, z_1)\mathrm{d}\boldsymbol{x}_1\mathrm{d}z_1 \tag{4.1}$$

où $\boldsymbol{x}$ est une variable à deux dimensions décrivant les coordonnées transverses (perpendiculaires à l'axe optique), z_1 une variable scalaire décrivant la position le long de l'axe optique (dans l'espace objet), et z_F est la position du plan focal objet du microscope. La PSF d'observation h est la PSF 3D en intensité définie dans le chapitre 1, dont les coupes axiales et transverses sont présentées Fig. 4.2, avec l'OTF associée.

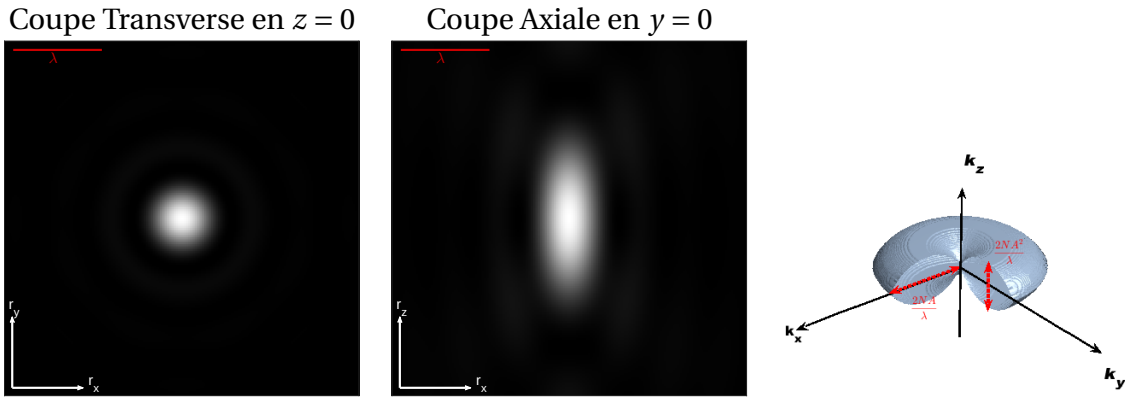


FIGURE 4.2. – Coupe Axiale et transverse de la PSF et support dans l'espace de Fourier

Pour rappel, cette OTF est l'auto-corrélation d'une calotte de sphère. La forme résultante est alors similaire à un tore, mais avec un rayon intérieur nul, c'est-à-dire sans trou (*Horn torus*), et avec des extrémités pointues. Le rayon extérieur vaut $\frac{2NA}{\lambda}$, ce qui correspond à la limite de diffraction classique pour la microscopie 2D. Dans la direction axiale, l'épaisseur maximale est $\frac{NA^2}{2\lambda}$. Il est alors impossible de définir une résolution axiale, puisque celle-ci va fortement dépendre de l'objet. Les deux exemples principaux (la bille et le plan de fluorescence) seront étudiés plus tard dans ce chapitre, mais une première analyse peut être faite à partir du support spectral de l'OTF. Les objets variant lentement dans la direction transverse auront des fréquences axiales proches du cône manquant qui ne seront que faiblement transmises et seront donc difficile à localiser.

4.1.2. Acquisition d'une image 3D

4.1.2.1. Principe général

Pour le moment, le modèle d'observation donné par l'équation (4.1) nous permet uniquement d'acquérir une image 2D de l'échantillon. Pour construire une image 3D, il est alors nécessaire d'empiler de multiples images 2D obtenues à différentes distances focales. Une façon naïve de construire une telle image 3D serait de déplacer la position du détecteur. Malheureusement, faire ceci reviendrait à changer la PSF

de l'équation (4.1), et le modèle résultant ne serait plus un modèle de convolution facilement exploitable [1].

Ainsi, pour réaliser une acquisition 3D convenable, les changements doivent s'opérer dans l'espace objet. Plus précisément, il est nécessaire de changer la position relative de l'échantillon par rapport au plan focal objet du microscope, ce qui se fait classiquement de deux manières. La première consiste à déplacer mécaniquement l'échantillon, par exemple avec un système piézo-électrique (GÖBEL et al. 2007), tout en gardant les plans focaux fixes. La seconde approche, dite "*remote focusing*" propose de déplacer la position du plan focal objet, sans toucher l'échantillon ou l'objectif. Ceci peut être fait en introduisant une lentille accordable sur le chemin de collection (BOTCHERBY et al. 2008).

Lorsqu'un éclairement non uniforme est utilisé, il y a une différence fondamentale entre les deux approches. En effet, comme illustré Fig. 4.3, la translation de l'échantillon change la position relative de l'échantillon par rapport à l'éclairement, ce qui n'est pas le cas avec un système de *remote focusing*. En conséquence, les modèles de formation d'images sont différents pour les deux modèles d'acquisitions.

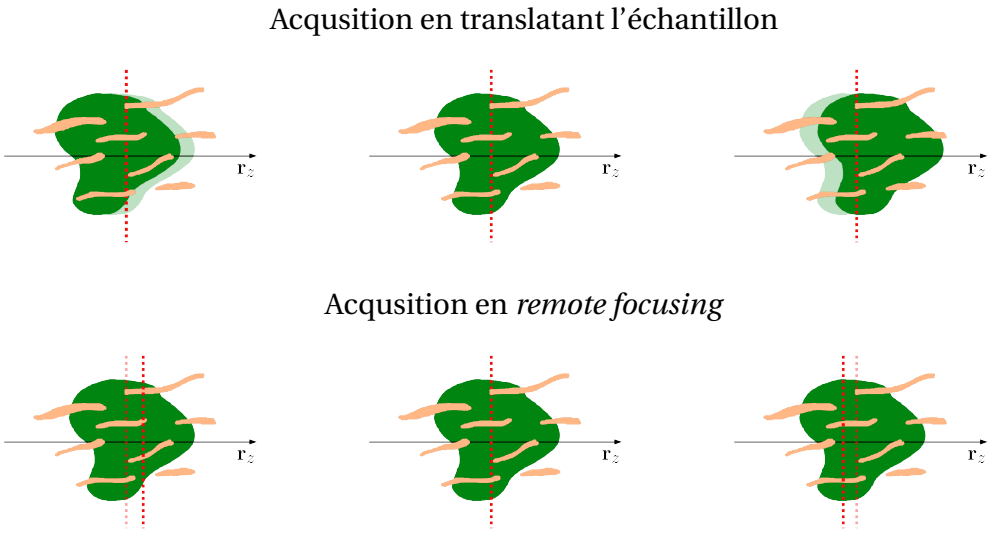


FIGURE 4.3. – Illustration de la différence entre la translation du plan focal et de l'échantillon dans le cadre d'une acquisition 3D avec un éclairement de speckle. On constate que l'illumination mesurée au niveau du plan focal diffère entre les deux approches.

4.1.2.2. Modélisation

En pratique, les plans d'observation sont acquis les uns à la suite des autres. Il est donc théoriquement possible d'utiliser une illumination différente pour chaque plan

1. Ce point est abordé plus en détail dans le chapitre 1, par exemple section 1.1.5.2

acquis. Supposons que l'échantillon soit déplacé d'une distance z_t. [2], L'image mesurée par la caméra est alors donné par :

$$Y_{\text{Plan}}(\boldsymbol{x}, z_t) = \int h_{\text{3D}}(\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_1, z_{\text{F}} - z_1)\rho(\boldsymbol{x}_1, z_1 - z_t)\mathscr{I}(\boldsymbol{x}_1, z_1, z_t)\mathrm{d}\boldsymbol{x}_1\mathrm{d}z_1 \tag{4.2}$$

$$Y_{\text{Plan}}(\boldsymbol{x}, z_t) = \int h_{\text{3D}}(\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_1, z_{\text{F}} + z_t - z_1)\rho(\boldsymbol{x}_1, z_1)\mathscr{I}(\boldsymbol{x}_1, z_1 - z_t, z_t)\mathrm{d}\boldsymbol{x}_1\mathrm{d}z_1 \tag{4.3}$$

Dans cette modélisation $\mathscr{I}(\cdot,\cdot,z_t)$ correspond à l'éclairement 3D qui a été utilisé lorsque l'échantillon a été translaté d'une quantité z_t. Le modèle d'observation obtenue n'est alors pas une convolution 3D, l'illumination $\mathscr{I}$ affichant une dépendance vis-à-vis de la variable z_t.

4.1.2.3. Application au cas de la translation

Pour se rapprocher d'un modèle de convolution, il suffit de ne pas changer l'illumination au cours de la translation de l'échantillon. Cette hypothèse est en fait très faible, puisqu'il n'y a pas de raison pratique à vouloir modifier l'illumination entre deux plans successifs. Dans ce cas, on a $\mathscr{I}(\cdot,\cdot,z_t) = \mathscr{I}(\cdot,\cdot,0) = I(\cdot,\cdot)$ pour toute valeur de z_t. L'expression (4.3) se simplifie alors pour donner le modèle formation de l'image 3D lorsque l'on translate l'échantillon, dans une même illumination.

$$Y_{\text{Trans}}(\boldsymbol{x}, z_t) = \int h_{\text{3D}}(\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_1, z_{\text{F}} + z_t - z_1)\rho(\boldsymbol{x}_1, z_1)I(\boldsymbol{x}_1, z_1 - z_t)\mathrm{d}\boldsymbol{x}_1\mathrm{d}z_1 \tag{4.4}$$

Notons ici que le modèle obtenu ne correspond pas tout à fait au produit de convolution $h \otimes (\rho I)$. On retrouve bien ce modèle vis-à-vis des variables transverses, mais pour la variable axiale, le modèle est de la forme $(hI_s) \otimes \rho$, avec I_s, une version symétrique de I.

4.1.2.4. Application au cas de *remote focusing*

Pour obtenir rigoureusement un modèle de convolution 3D, il faut que l'échantillon et l'illumination gardent la même position relative au cours de l'acquisition, ce qui se fait en modifiant la position du plan focal avec un système de *remote focusing*. Dans ce cas, c'est directement la position z_{F} qui est modifiée dans l'équation (4.1). Le modèle de formation de l'image 3D est alors directement donné par :

$$Y_{\text{Remote}}(\boldsymbol{x}, z_t) = \int h_{\text{3D}}(\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_1, z_{\text{F}} + z_t - z_1)\rho(\boldsymbol{x}_1, z_1)I(\boldsymbol{x}_1, z_1)\mathrm{d}\boldsymbol{x}_1\mathrm{d}z_1 \tag{4.5}$$

qui correspond effectivement à une convolution 3D de la forme $h \otimes (\rho I)$.

2. On trouverait un modèle équivalent en supposant un *remote focusing*, puisque l'on pourrait librement redéfinir E

4.1.2.5. Cas du multifocus

Une dernière possibilité pour réaliser une acquisition 3D de l'échantillon serait d'acquérir simultanément l'ensemble des plans d'intérêts, avec un système dit Multifocus (PRABHAT et al. 2004). Dans ce cas, plusieurs plans focaux sont conjugués avec le plan image, et tout se passe comme si l'on pouvait acquérir des images selon le modèle (4.1) mais pour plusieurs valeurs de z_F en une seule fois. Cependant, cette approche ne permet généralement pas d'acquérir suffisamment de plans pour permettre l'acquisition 3D complète en une seule fois. Il faut alors soit déplacer l'échantillon, soit les plans focaux afin de finir l'acquisition 3D, ce qui nous ramène sur le même type de modélisation que précédemment.

4.1.3. Retour en imagerie conventionnelle

Maintenant que l'on dispose d'un modèle d'acquisition 3D, regardons ce qui se passe dans le cadre l'imagerie 3D conventionnelle, sous illumination uniforme. Commençons par remarquer que dans ce cas, il n'y a pas de question à se poser vis-à-vis de la méthode d'acquisition, puisque les modèles (4.4) et (4.5) deviennent équivalents. Dans tous les cas on observe une image proportionnelle à la quantité $h \otimes \rho$, et on retrouve le modèle standard de convolution classique de l'image widefield, avec les pertes de fréquences induites par la convolution avec la PSF 3D.

4.1.3.1. Observation de sources ponctuelles

Considérons, par analogie avec le problème de limite de résolution 2D, un objet composé d'une paire de sources ponctuelles alignées le long de l'axe optique du microscope. Du fait de la convolution 3D, chacune des sources est remplacée par une PSF, ce qui leur donne une large extension dans la direction z. Les images obtenues pour différentes distances entre les billes sont représentées Fig. 4.4.

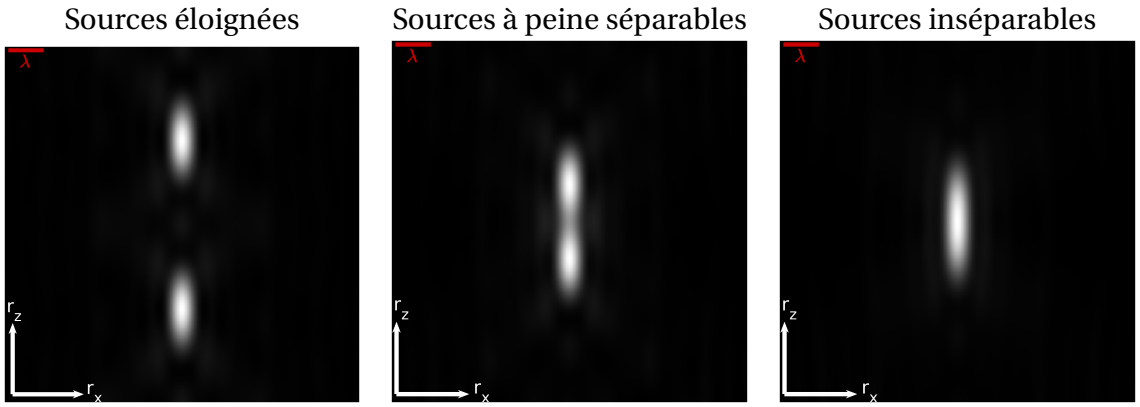


FIGURE 4.4. – Illustration de la capacité à séparer deux sources positionnées sur l'axe optique en fonction de leur distance.

On constate que la fluorescence hors focus produite par chaque source n'est ressentie qu'à une portée limitée, de l'ordre de $\frac{2\lambda}{NA^2}$, correspondant à l'inverse de la fréquence maximale transmise sur l'OTF. Comme dans le cas 2D, si les billes se rapprochent trop les unes des autres, il devient impossible de séparer leur contribution. Par analogie, on aimerait définir cette distance comme la capacité de résolution axiale du microscope. Une telle définition est cependant trompeuse, puisqu'elle ne s'applique qu'à de petits objets dont les fréquences spatiales couvrent un large domaine.

4.1.3.2. Cas d'un plan de fluorescence

Cependant, pour des objets étendus, lentement variables dans le plan transverse, dont le spectre en fréquence se concentre autour de l'origine, la capacité de résolution axiale est amoindrie. Typiquement, plus l'objet considéré est basse fréquence, plus la lumière hors focus sera ressentie à une distance importante, jusqu'à être infinie pour un plan de fluorescence uniforme infiniment étendu. Ce phénomène est illustré Fig. 4.5 avec un objet de plus en plus dense, c'est-à-dire une surface carrée placée perpendiculairement à l'axe optique, de plus en plus large.

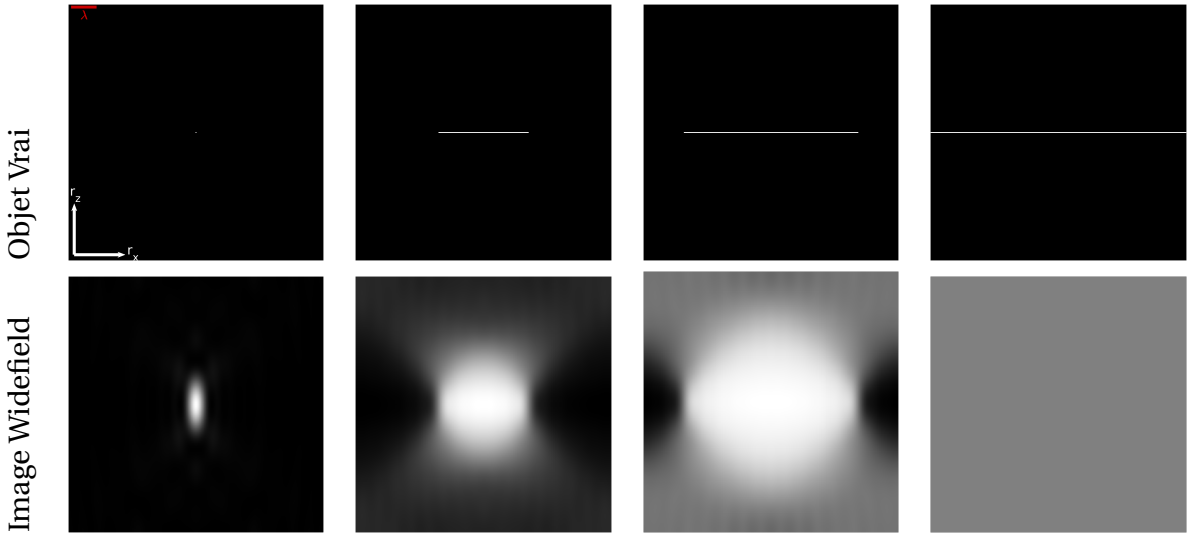


FIGURE 4.5. – Illustration du problème de sectionnement optique

On vérifie bien que plus le carré est large, plus la fluorescence hors focus est enregistrée de manière intense sur de longues distances, et dans le cas extrême d'un plan de fluorescence infini perpendiculaire à l'axe optique, l'image observée est uniforme. Dans ce cas, la transformée de Fourier de l'échantillon est localisée précisément dans le cône manquant de l'OTF. Seule la fréquence nulle est transmise et l'image enregistrée affiche une intensité spatialement uniforme. Il est alors impossible de localiser un plan de fluorescence. Par conséquent, il sera impossible de séparer, ni même de voir, deux plans perpendiculaires à l'axe optique, et ce, quelle que soit leur distance. Dans ce cas, on parle plus généralement de la capacité de sectionnement optique du microscope, qui est nulle dans le cas d'une image widefield conventionnelle. C'est cette

absence de sectionnement qui est à l'origine de la majorité de la perte de contraste induite par la fluorescence hors focus, comme illustré sur la Fig. 4.1.

4.2. Super-résolution 3D

4.2.1. Enjeux

Dans la section précédente, nous avons montré que l'image d'un échantillon 3D, sur un plan unique ou dans sa globalité après une acquisition 3D, subit, en plus de la perte de résolution liée à la diffraction, une perte de contraste liée à la fluorescence hors focus. Un objectif important de la microscopie super-résolue 3D est de rejeter cette fluorescence hors focus, si possible en conservant le gain de résolution transverse. Nous allons voir que toutes les stratégies de super-résolution 2D que nous avons présentées dans le chapitre 1 s'adaptent assez naturellement à l'imagerie 3D.

La stratégie principale des techniques d'imagerie 3D super-résolues est identique à celle déjà appliquée en 2D. Il s'agit de combiner l'information contenue dans de multiples images de l'échantillon obtenues en modifiant l'activation de la fluorescence. Un avantage significatif de cette approche en 3D est qu'en activant seulement une partie des fluorophores sur chaque image, on transforme un objet possiblement basse fréquence en objet présentant artificiellement des hautes fréquences transverses et dont les fréquences axiales peuvent alors être transmises.

4.2.2. Méthodes par éclairements structurés

Pour obtenir du sectionnement optique en microscopie 3D, la stratégie d'éclairement la plus simple à concevoir n'est plus basée sur des éclairements harmoniques, mais sur des éclairements focalisés. En effet, pour obtenir un meilleur sectionnement optique, il suffit de ne pas éclairer les fluorophores qui ne sont pas dans le plan focal, en restreignant l'illumination à ce dernier. Dans ce cas, on s'épargne également les considérations liées à la méthode d'acquisition des images puisque l'on se ramène à un modèle d'imagerie proche de l'imagerie 2D pour chaque plan. Il y a alors deux stratégies d'illumination classiques. La première est la microscopie Light-Sheet (KELLER et al. 2008), dans laquelle on éclaire seulement une tranche de l'échantillon de manière perpendiculaire, et l'on capte l'image de fluorescence sur une caméra. L'autre méthode est la microscopie confocale (PAWLEY 2015) où l'on scanne le plan focal avec un faisceau focalisé, c'est-à-dire un éclairement semblable à une PSF et on capte la fluorescence sur un détecteur unique placé à une position conjuguée à celle de l'éclairement focalisé. Cette dernière approche permet, en plus du gain en sectionnement, un doublement de la résolution transverse. En pratique, en prenant en compte le fait que l'éclairement ne puisse pas être focalisé de manière infiniment fine, on peut montrer que la microscopie confocale permet d'imager l'échantillon avec un PSF dont le support spectral est l'auto-corrélation de l'OTF 3D, qui est le maximum de résolution atteignable en microscopie linéaire, et qui correspond à un

"doublement de la résolution 3D".

Plusieurs techniques de microscopie 3D large champ exhibant du sectionnement optique ont aussi été développées avec des éclairements structurés de type grilles de lumière couplés à l'utilisation d'un algorithm de reconstruction adapté. Il a été proposé d'utiliser un motif périodique dans les directions transverses, mais invariant selon z (stratégie à deux faisceaux), ou d'utiliser un motif périodique dans les trois dimensions (stratégie à trois faisceaux). Si l'illumination deux faisceaux est plus facile à mettre en œuvre expérimentalement, elle demande un compromis entre la résolution transverse maximale réalisable et la capacité de sectionnement. En effet, si l'on privilégie la super-résolution avec des grilles ayant une fréquence proche de la fréquence maximale de l'OTF (SIM-SR), la capacité de sectionnement est quasiment nulle. Afin d'obtenir un SIM offrant du sectionnement optique (SIM-OS), il est nécessaire d'utiliser des grilles avec une fréquence plus faible, ce qui compromet les capacités de super-résolution (NEIL et al. 1997). Ces phénomènes surprenants s'expliquent facilement avec l'analyse du support spectral des illuminations présenté Fig. 4.6. L'illumination à trois faisceaux est plus compliquée, puisqu'elle demande de faire en sorte que l'échantillon "voit" une structure harmonique dans la direction axiale (Mats G.L. GUSTAFSSON et al. 2008). Une telle configuration permet d'avoir une illumination avec des composantes fréquentielles axiale non nulles, ce qui permet, avec plus d'illuminations, d'obtenir le même niveau de résolution et de sectionnement que la microscopie confocale.

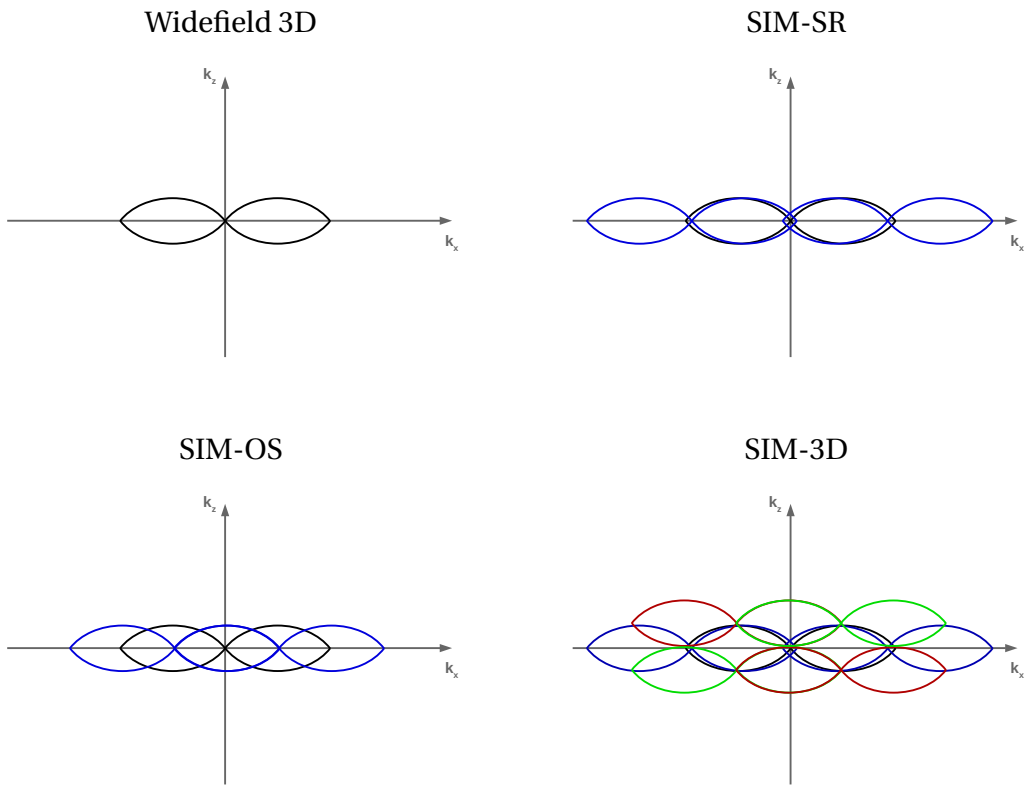


FIGURE 4.6. – Domaines de fréquences accessibles pour les différentes stratégies SIM 3D. Dans le cas du SIM deux faisceaux (SIM-SR et SIM-OS), l'illumination est invariante en z, et les pics de Dirac doivent nécessairement se situer dans le plan $\boldsymbol{k}_z = 0$. Lorsque la fréquence des pics est proche de la limite de diffraction (SIM-SR), on n'observe quasiment aucun gain de sectionnement optique. Il faut alors réduire la fréquence des pics et perdre en résolution transverse pour accroître la capacité de sectionnement (SIM-OS). Dans le cas de l'approche à trois faisceaux, l'éclairement présente des fréquences spatiales non nulles selon $\boldsymbol{k}_z$, ce qui permet d'agrandir le domaine de reconstruction en transverse et en axial.

L'illumination de speckle s'est aussi avérée très efficace pour obtenir du sectionnement optique. Le sectionnement optique est obtenu de manière très simple en formant l'écart-type des multiples images enregistrées sous différents speckles(VENTALON et al. 2005). Avec les résultats de RIM présentés dans le chapitre 2, on sait que :

— L'écart-type est similaire à l'objet filtré par une PSF super-résolue
— Cet écart-type peut être traité numériquement pour une meilleure estimation, afin de permettre une reconstruction quantitative des fréquences de l'objet sur un domaine correspondant à l'auto-corrélation de l'OTF (voit Fig. 4.7).

OTF en fluorescence Domaine de reconstruction RIM

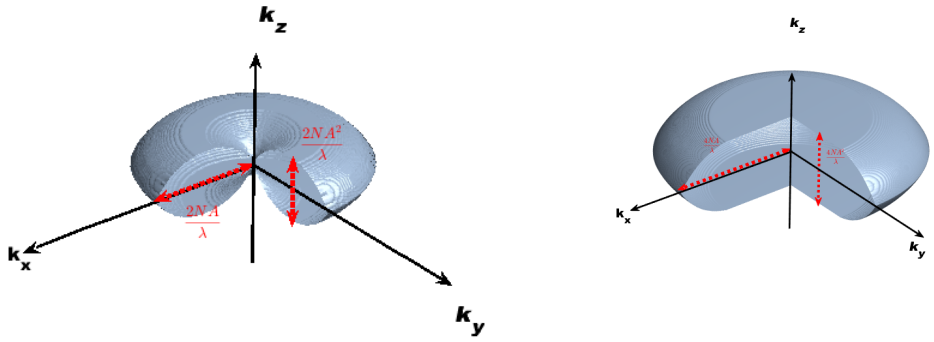


FIGURE 4.7. – Support de l'OTF du microscope et domaine de reconstruction théorique pour la méthode RIM 3D.

Une analyse de SIM-3D et de RIM-3D montre que ces méthodes d'éclairements structurés permettent, avec un traitement numérique approprié, de reconstruire les fréquences spatiales de l'objet sur un domaine correspondant au support du carré de la PSF (i.e. la résolution d'un confocal ideal), ce qui est le maximum possible en microscopie linéaire. Notons qu'en 3D, il n'y a plus de cône manquant dans le domaine super-résolu, et la fréquence nulle correspond cette fois à un maximum de fréquences transmises, ce qui démontre le gain de sectionnement des différentes méthodes proposées. Par ailleurs, les fréquences axiales sont maintenant transmises de manière quasiment uniforme, ce qui permet de mieux justifier une notion de résolution axiale.

4.2.3. Autres méthodes de super-résolution 3D

4.2.3.1. SOFI

La méthode SOFI passe de manière assez naturelle au 3D (DERTINGER et al. 2009), avec l'avantage de ne pas avoir à se soucier de la méthode d'acquisition, ce qui se justifie par le fait que l'illumination utilisée est uniforme, et que le scintillement des fluorophores est totalement décorrélé. Le principe présenté dans la section 1.4.2 s'applique directement en 3D, ce qui permet de comprendre aisément que cette méthode permet de gagner en capacité de sectionnement sans compromettre la résolution transverse. La méthode garde cependant les mêmes limitations que celles de la méthode 2D. Expérimentalement, seulement certains fluorophores ont des propriétés de scintillement compatible avec ce type de méthode. Le moment d'ordre n, dépend de la brillance du fluorophore à la puissance n, ce qui va éliminer le signal des fluorophores les moins brillants. Enfin, beaucoup d'images sont nécessaires pour obtenir une estimée stable du moment d'ordre n, et en pratique on se limite généralement seulement au moment d'ordre 2, ce qui limite les gains de résolution effectivement obtenus.

4.2.3.2. Méthodes de localisation

Pour les méthodes de localisation (PALM et STORM), le passage au 3D est encore plus simple (JONES et al. 2011), puisqu'il peut se faire en se basant sur des images 2D. En effet, l'image 2D d'un fluorophore est suffisante pour estimer à la fois sa position transverse (comme en 2D), mais également sa position axiale, en se basant sur le motif de dé-focalisation observé. Cependant, si la PSF d'observation est celle présentée Fig. 4.2, la symétrie par rapport au plan $z = 0$ laisse une ambigüité sur la localisation axiale. Pour la lever, il faut soit acquérir plusieurs plans de manière simultanée (JUETTE et al. 2008), soit casser la symétrie en z de la PSF par exemple en introduisant une lentille cylindrique dans le montage optique (B. HUANG et al. 2008).

Dans le cadre de la microscopie 3D, ces méthodes sont cependant confrontés à une nouvelle difficulté : le chevauchement de la signature de deux fluorophores. Dans le cas d'une image 3D, ce chevauchement peut avoir lieu, dès que les fluorophores ont des positions transverse proches, et ce indépendamment de leur distance axiale. Cette contrainte limite d'autant plus la densité des échantillons observable avec ce type de méthode.

4.3. Mise en œuvre de RIM 3D

4.3.1. Acquisition des images

Nous avons déjà vu que si les images étaient obtenues en *remote focusing*, on pouvait directement appliquer les techniques RIM développées dans les chapitres 2 et 3. Cependant les acquisitions 3D basées sur la translation de l'échantillon utilisent un montage expérimental bien plus simple et bien plus courant. Nous considérerons donc, en plus du modèle de *remote focusing*, deux méthodes d'acquisition basées sur la translation de l'échantillon, selon que l'on change l'illumination entre chaque translation ou non.

Ceci nous donne donc trois approches différentes pour les acquisitions d'images RIM en 3D, correspondant naturellement aux trois modèles de formation présentés dans la section 4.1.2, qui, du plus proche au moins proche d'un modèle de convolution 3D sont :

— L'acquisition RIM en *remote focusing*, associée au modèle (4.5). Dans cette approche, on réalise une série de scans 3D de l'échantillon en bougeant le plan focal avec un système de type *remote focusing* ; le speckle éclairant l'échantillon reste le même pendant toute la durée du scan.
— L'acquisition RIM en translation, associée au modèle (4.4). Dans cette approche, l'échantillon est translaté à travers l'illumination de speckle qui reste fixe.
— L'acquisition RIM "plan par plan" associée au modèle (4.3). On translate l'échantillon et on réalise différentes séries de speckle à chaque position.

Afin d'étudier les différences des trois modalités d'acquisition, nous procéderons

à des simulations XZ[3] dans lesquelles l'objet est une tranche très fine selon y présentant la même mire de résolution qu'utilisée jusqu'à présent mais cette fois dans le plan (x,z). L'image widefield ainsi qu'une référence correspondant à la densité de fluorescence vraie, filtrée sur $\Omega_{h\gamma}$sont représentées Fig. 4.8.

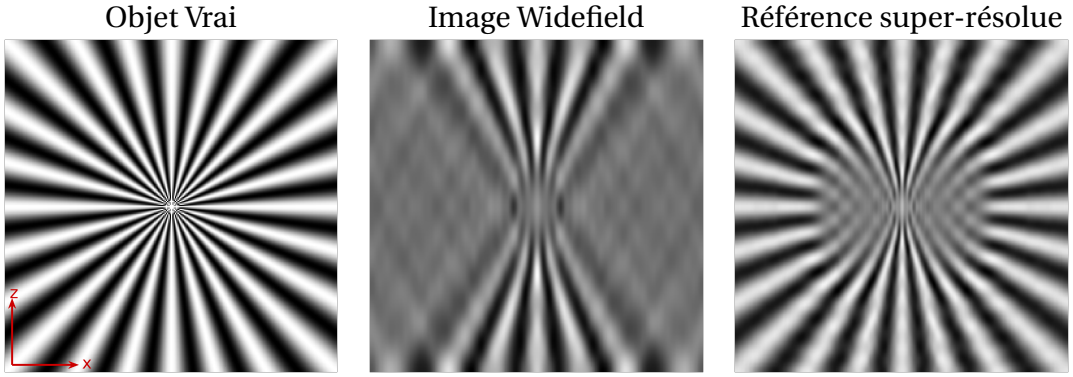


FIGURE 4.8. – De gauche à droite : objet de référence, image widefield et objet vrai filtré sur $\Omega_{h\gamma}$, correspondant à la reconstruction la plus résolue qu'il soit possible d'obtenir avec RIM.

Sur cette mire, on constate que l'image widefield perd une partie des raies, principalement celles qui sont presque parallèles à l'axe optique. Ceci se justifie assez simplement, ces zones étant associées à des basses fréquences transverses. Sur l'image super-résolue, on arrive cependant à récupérer la majorité du signal, et seules les zones avec des hautes fréquences axiales et transverses sont perdues. On note néanmoins encore une fois le caractère anisotrope de la PSF, même sur l'image super-résolue.

Une image non bruitée obtenue selon chacune des trois modalités est proposée Fig. 4.9. La méthode plan par plan affiche des artefacts à haute résolution dans la direction axiale. Ces artefacts sont une conséquence directe du changement d'illumination entre deux plans successifs, qui se traduit par une discontinuité de l'illumination apparente sur l'image 3D. À l'inverse, si l'on réalise les acquisitions en translatant l'échantillon, on a l'impression que l'illumination apparente est quasiment invariante dans la direction axiale. Dans ce cas, l'intensité perçue au niveau du plan focal est toujours la même, donc les zones lumineuses seront toujours aux mêmes positions transverses et c'est principalement la lumière hors focus qui sera modulée. Au final, seule la méthode en *remote focusing* semble garder la structuration XZ des speckles sur les images brutes.

3. *i.e.*, un problème dont la PSF est la coupe axiale de la PSF 3D présenté Fig. 4.2

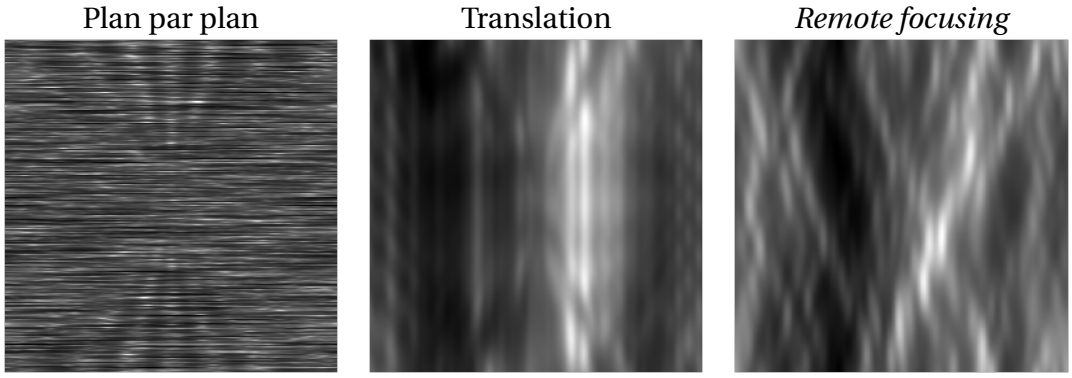


FIGURE 4.9. – Une image XZ tavelée obtenue pour les différente méthpdes d'acquisition proposées. De gauche à droite : acquisition plan par plan, acquisition en translatant l'échantillon et acquisition en *remote focusing*.

4.3.2. Calcul de la variance

La première étape nécessaire à la mise en œuvre des algorithmes de type RIM, est de calculer la variance modèle pour chacune des acquisitions. Le modèle d'observation plan par plan (4.3), pouvant englober à la fois les acquisitions en *remote focusing* et les acquisitions en translation, partons de celui-ci pour calculer la variance. Pour alléger la notation, on fixera de plus de manière arbitraire $z_\mathrm{F} = 0$, ce qui donne pour expression de la variance :

$$\mathrm{Var}(\boldsymbol{x}, z_t) = \iint \begin{array}{c} h(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_1, z_t - z_1)\rho(\boldsymbol{x}_1, z_1)\,\langle \mathscr{I}(\boldsymbol{x}_1, z_1; z_t)\mathscr{I}(\boldsymbol{x}_2, z_2; z_t)\rangle \\ \rho(\boldsymbol{x}_2, z_2)h(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_2, z_t - z_2)\mathrm{d}\boldsymbol{x}_1\mathrm{d}\boldsymbol{x}_2\mathrm{d}z_1\mathrm{d}z_2 \end{array} . \tag{4.6}$$

Quelle que soit la modalité d'acquisition, il est alors nécessaire de calculer la corrélation des illuminations afin de la réinjecter dans l'expression (4.6). Dans le cadre des acquisitions plan par plan, chaque illumination $\mathscr{I}(\cdot,\cdot,z_t)$ est un speckle 3D. Les speckles étant choisis aléatoirement et indépendamment pour chaque valeur de z_t, les illuminations sont décorrélées selon cette variable. Leur covariance est donc donnée par :

$$\gamma_{\mathscr{I}} = \langle \mathscr{I}(\boldsymbol{x}_1, z_1, z_t)\mathscr{I}(\boldsymbol{x}_2, z_2, z_t')\rangle = \gamma(\boldsymbol{x}_1 - \boldsymbol{x}_2, z_1 - z_2)\delta(z_t - z_t'), \tag{4.7}$$

avec γ la fonction de corrélation 3D du speckle, qui en épi-fluorescence est proportionnelle à la PSF. Pour les deux autres méthodes d'acquisition, en reprenant les expressions des illuminations utilisées dans les modèles (4.4) et (4.5), l'auto-corrélation des illuminations est donnée par :

$$\langle I(\boldsymbol{x}_1, z_1 - z_t)I(\boldsymbol{x}_2, z_2 - z_t')\rangle = \gamma(\boldsymbol{x}_1 - \boldsymbol{x}_2, z_1 - z_2 + z_t' - z_t) \tag{4.8}$$

$$\langle I(\boldsymbol{x}_1, z_1)I(\boldsymbol{x}_2, z_2)\rangle = \gamma(\boldsymbol{x}_1 - \boldsymbol{x}_2, z_1 - z_2) \tag{4.9}$$

respectivement pour les acquisitions en translation et en *remote focusing*. Quel que soit le modèle d'acquisition, la corrélation des illuminations s'exprime à partir de la

corrélation 3D des speckles γ, et éventuellement d'une dépendance en $z_t - z'_t$. Cependant, lors du calcul de la variance (4.6), on a toujours $z'_t = z_t$, et cette dépendance disparaît. Les équations (4.8), (4.9) et (4.7) deviennent toutes équivalentes puisqu'il ne reste que $\gamma(\boldsymbol{x}_1 - \boldsymbol{x}_2, z_1 - z_2)$. Ainsi, quelle que soit la modalité d'acquisition, la variance asymptotique est toujours donnée par :

$$\mathrm{Var}_{\mathrm{Remote}}(\boldsymbol{x}, z_t) = \iint \begin{array}{c} h(\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_1, z_t - z_1)\rho(\boldsymbol{x}_1, z_1)\gamma_{3\mathrm{D}}(\boldsymbol{x}_1 - \boldsymbol{x}_2, z_1 - z_2) \\ \rho(\boldsymbol{x}_2, z_2)h(\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_2, z_t - z_2)\mathrm{d}\boldsymbol{x}_1\mathrm{d}\boldsymbol{x}_2\mathrm{d}z_1\mathrm{d}z_2 \end{array} \tag{4.10}$$

Notons ici que l'on retrouve l'expression de la variance modèle (2.17) du chapitre 2, dérivée lorsque le modèle de formation d'image est une convolution, que l'on aurait également pu directement appliquer au cadre des acquisitions en *remote focusing*.

Ainsi, même si chaque méthode d'acquisition crée des structures en z particulières sur les images brutes, ces structures devraient s'uniformiser lors du calcul de la variance. Ce phénomène s'observe Fig. 4.10, où plus le nombre de speckles est élevé, plus les écarts-types sont similaires les uns aux autres. De plus, même avec un nombre limité de speckles tous les écarts-types offrent une meilleure capacité de sectionnement que l'image widefield simple.

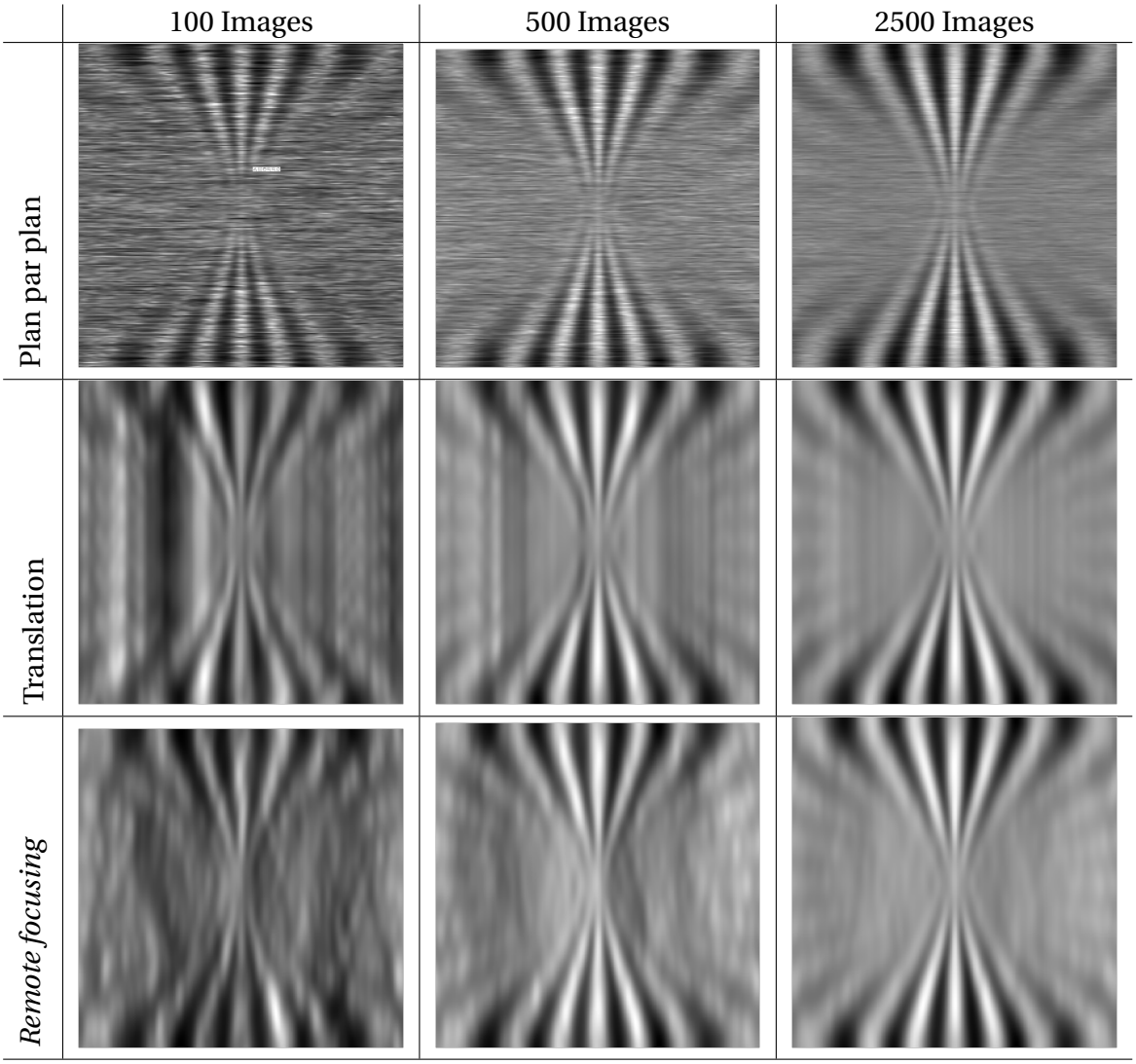


FIGURE 4.10. – Comparaison de l'écart-type 3D, pour 100, 500, et 2500 réalisations de speckle pour les 3 modalités d'acquisition 3D

Dans le cas où aucun prétraitement n'est appliqué sur les images brutes, et sous réserve d'avoir suffisamment d'images pour limiter les impacts du caractère non asymptotique de la variance, les 3 méthodes d'acquisition peuvent être utilisées avec les algorithmes RIM proposés dans le chapitre précédent.

4.3.3. Discussion relative au préfiltrage

Dans le chapitre 3, nous avons vu qu'un préfiltrage des données permettait de faciliter les traitements numériques, en offrant une meilleure sensibilité aux hautes fréquences de l'échantillon, ainsi qu'une suppression partielle du bruit. Si cette étape n'est pas obligatoire, elle permet néanmoins d'accroître la résolution atteignable pour la reconstruction non itérative RIM-CF, et de grandement réduire le temps de

convergence des méthodes itératives RIM-VAR et RIM-STD.

Cependant, le préfiltre est appliqué sur les images brutes dont les caractéristiques dépendent fortement de la méthode d'acquisition (au contraire de leur variance ou moyenne). Le préfiltre sera donc différent selon les méthodes d'acquisition. L'annexe D, détaille mathématiquement quel type de préfiltrage est adapté à chaque méthode.

Dans le cadre des acquisitions en *remote focusing*, nous avons déjà vu que tout le formalisme RIM déjà développé restait valide, par conséquent, n'importe quel préfiltre 3D peut être utilisé, et on peut conserver le filtre inverse régularisé de h proposé dans la section 3.2.2.

Dans les autres cas, les images ne sont plus des convolutions 3D, mais gardent leur aspect de convolution 2D vis-à-vis des variables transverses. Par conséquent, un préfiltre totalement 3D n'est directement utilisable, et il faut se limiter à l'utilisation d'un préfiltre 2D sur chacun des plans de l'acquisition. On choisit alors de préfiltrer chaque plan indépendamment par le filtre inverse associé à la PSF 2D, $h(\cdot,0)$, correspondant à la coupe transverse de la PSF h dans le plan $z = 0$. Ce type de préfiltrage ne permet pas d'améliorer la sensibilité axiale des images, et offre une moins bonne suppression du bruit, ce qui devrait se répercuter sur la qualité des reconstructions. Cette différence est notable lorsque l'on compare les écart-types préfiltrées pour les trois méthodes d'acquisition (Fig. 4.11), sur lesquels on constate une nette différence entre les préfiltrage 2D et 3D.

Méthode d'acquisition	Préfiltrage	PSF et auto-corrélation
Toutes	Aucun	3D
Remote focusing	3D	3D
Translation de l'échantillon	2D	3D
Plan par plan	2D	2D

Tableau 4.1. – Récapitulatif des différentes approches d'acquisition et de traitement pour RIM 3D

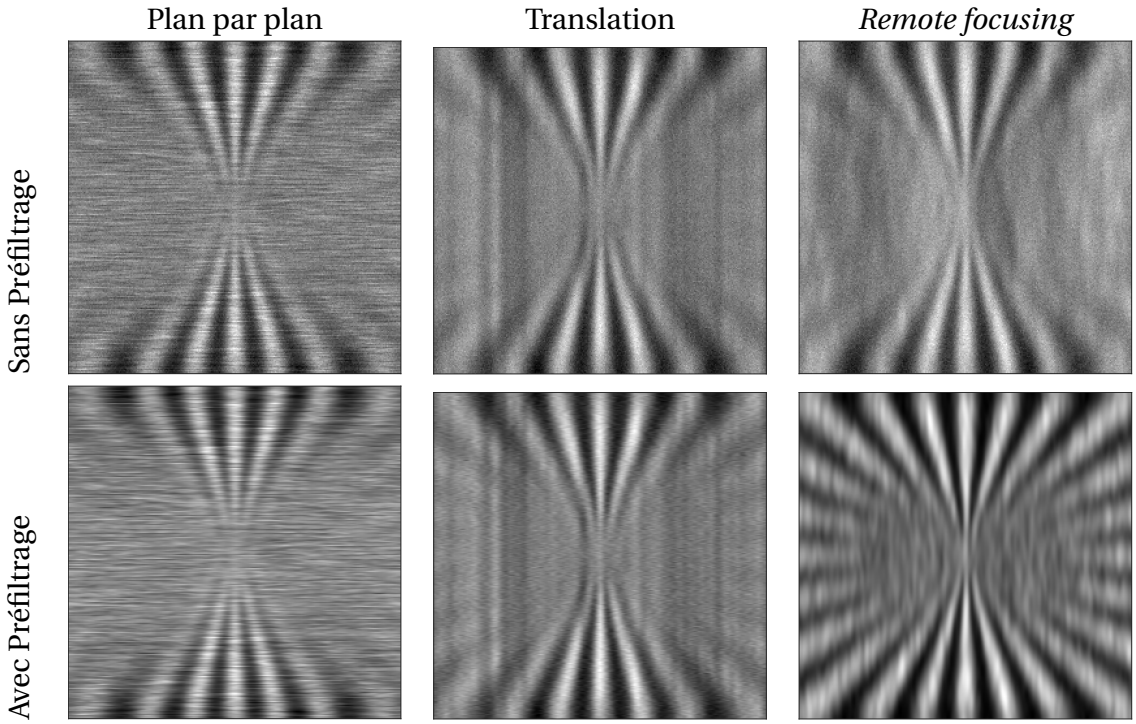


FIGURE 4.11. – Écart-type avant et après préfiltrage obtenu pour les différentes méthodes proposées. Le préfiltrage est 2D dans le cadre d'une acquisition plan par plan ou en translatant l'échantillon et 3D pour une acquisition en *remote focusing*.

4.4. Approches inverses pour RIM 3D

Pour reconstruire une vue super-résolue 3D de l'échantillon plusieurs approches sont possibles avec RIM. En l'absence de préfiltrage on peut considérer un modèle totalement 3D, (auto-corrélation 3D et PSF 3D) pour la reconstruction de l'échantillon, et ce quelle que soit la méthode d'acquisition. Cependant, dès que l'on veut introduire un préfiltrage, la méthode d'acquisition impose la façon dont les données doivent être préfiltrées. Ceci introduit certaines contraintes sur la façon dont les données doivent être traitées, qui sont résumées dans le tableau 4.1.

Notons que les acquisitions en *remote focusing* et en translation ne diffèrent que par le type de préfiltre qui est utilisé, mais permettent de conserver un traitement 3D du problème. Dans le cas de l'acquisition plan par plan, même s'il reste techniquement possible d'inclure la structure 3D du modèle et de travailler de la même manière qu'avec le modèle en translation, nous proposons ici un modèle de reconstruction plan par plan plus restrictif. Le traitement proposé consiste à reconstruire individuellement chacun des plans acquis avec l'approche RIM 2D présentée dans le chapitre 3. Cette approche est plus naturelle vis-à-vis de la stratégie d'acquisition, plus rapide puisqu'elle ne traite que des plans 2D, et correspond à ce qui a été proposé dans MANGEAT et al. 2021. Cette simplification aura cependant un impact négatif sur la résolution axiale finale, par rapport à une approche incluant le caractère 3D de la PSF et de la fonction d'auto-correlation des illuminations.

En plus des choix de la méthode d'acquisition, définissant le type de traitement devant être réalisé, il est nécessaire de choisir une méthode de reconstruction parmi les méthodes RIM-VAR, RIM-CF et RIM-STD proposées dans le chapitre 3. Étant donné que les méthodes RIM-VAR et RIM-STD permettent d'atteindre la limite théorique de résolution dans des conditions optimales, sauf mention contraire, les reconstructions seront obtenues avec la méthode RIM-STD qui est la plus rapide des deux.

4.5. Résultats

4.5.1. Comparaison des méthodes en simulation numérique

4.5.1.1. Simulation XZ

Reprenons les images ayant permis de calculer les écarts-types affichés Fig. 4.10, et appliquons le traitement RIM. On considère ici une acquisition de 500 images selon les trois méthodes, avec cette fois l'ajout d'un bruit Poisson simulé sous approximation gaussienne, c'est-à-dire que la valeur mesurée pour un pixel de valeur vraie y_0 est tirée selon une loi gaussienne $\mathcal{N}(y_0, y_0)$. Les écarts-types obtenus avec et sans préfiltrage pour chacune des méthodes considérées sont présentés Fig. 4.12 avec la reconstruction RIM-STD obtenue à partir du traitement de l'écart-type préfiltré associé.

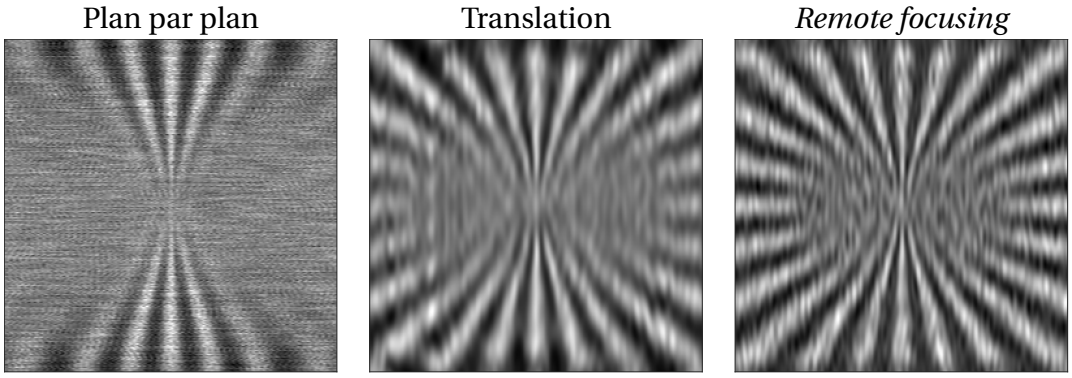


FIGURE 4.12. – Reconstruction obtenue avec la méthode RIM-STD basé sur les écart-types préfiltrés présentés Fig. 4.11.

Sans surprise, la méthode plan par plan n'incorporant aucune information 3D, elle ne permet pas d'accroître la capacité de sectionnement par rapport à ce qui est déjà obtenu en calculant l'écart-type. En revanche, on constate une nette amélioration dès que l'on incorpore l'information 3D, que ce soit avec des données acquises en translatant l'échantillon ou en *remote focusing*. Dans le cas des acquisitions avec translation de l'échantillon, on obtient un net gain de sectionnement optique par rapport aux reconstructions plan par plan. Ce gain est simplement dû au fait que l'on considère maintenant la nature 3D du problème (PSF et auto-corrélation du speckle) et que, par conséquent, le signal hors focus devient un signal utile. Théoriquement, en absence de bruit, le traitement de données consistant en un préfiltrage 2D suivi d'une reconstruction 3D (adapté à une acquisition d'images par translation d'échantillon) a la même capacité de résolution qu'une reconstruction 3D précédée d'un préfiltrage 3D (adaptée à l'acquisition par *remote focusing*). En pratique cependant, faire un préfiltrage 2D plutôt qu'un préfiltrage 3D, réduit la robustesse au bruit ainsi que la vitesse de convergence des fréquences en z. Ainsi, sur des données bruitées telles que présentées ici, l'acquisition en *remote focusing* permettant le préfiltrage 3D offre une reconstruction de meilleure qualité.

4.5.2. Préfiltrage 3D sur des acquisitions sans *remote focusing*

Dans le chapitre 3, nous avons montré que même si le préfiltrage était théoriquement incompatible avec la méthode RIM-CF, il permettait quand même une nette amélioration de la résolution de la méthode. Dans le cas de RIM, une approche similaire peut être considérée, en appliquant un préfiltrage 3D, qui est toujours mathématiquement défini, sur les images brutes, et ce, quelle que soit la modalité d'acquisition. Dans ce cas, même si la variance modèle calculée est légèrement erronée, une amélioration de la résolution de la reconstruction reste envisageable, par notamment par un meilleur rejet du bruit 3D. Les écarts-types et la reconstruction obtenue avec cette approche sont présentés Fig. 4.13.

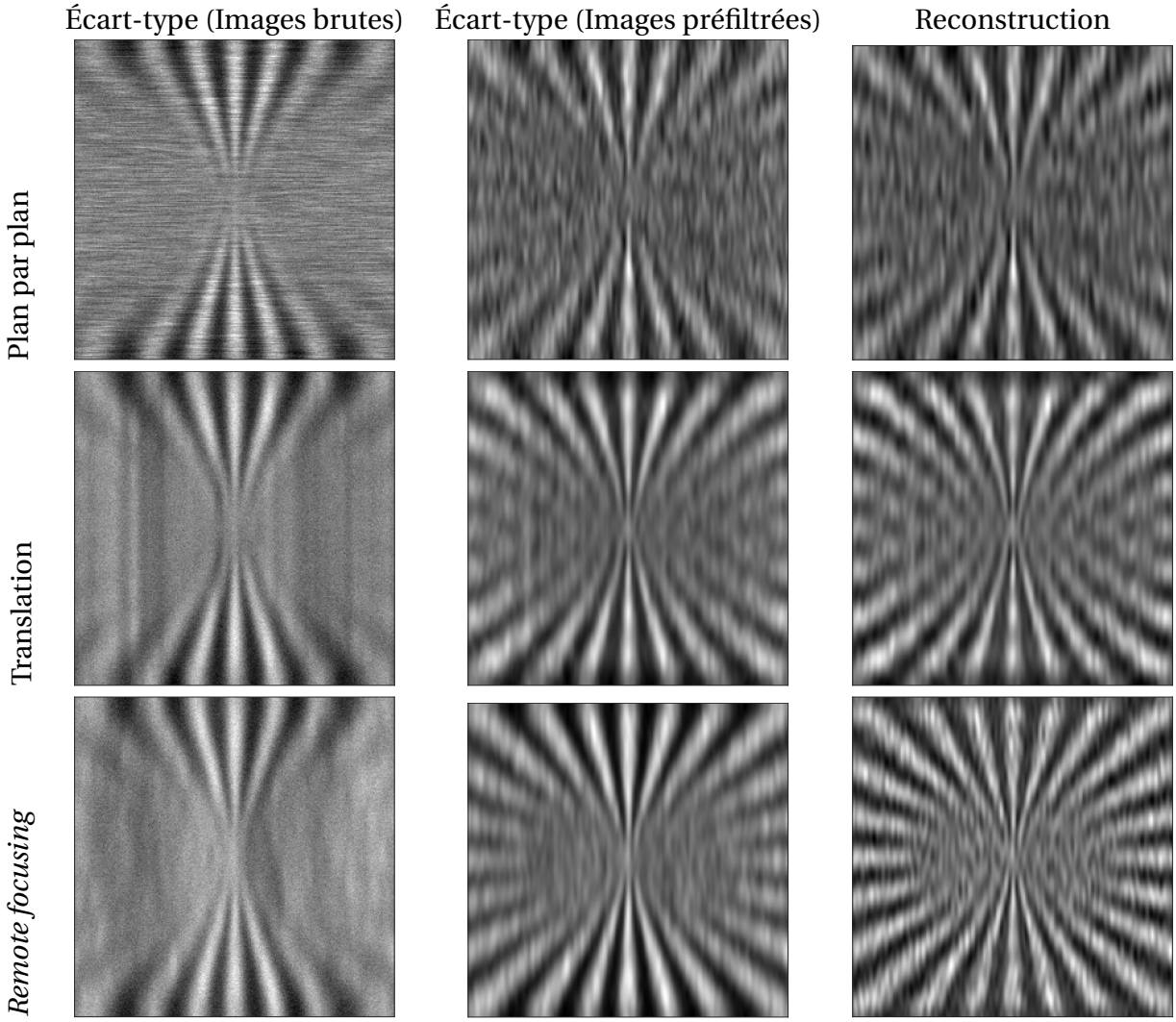


FIGURE 4.13. – Reconstruction obtenue avec la méthode RIM-STD basé sur les écart-types préfiltrés. Ici indépendamment de la modalité d'acquisition, le données sont inversée en 3D, en supposant que le modèle d'acquisition est celui du *remote focusing*. Dans le cas d'acquisition plan par plan, le préfiltrage 3D est légèrement meilleur que le préfiltrage 2D, mais laisse beaucoup d'artefact. Dans le cas d'acquisition en translatant l'échantillon, le niveau de résolution semble également augmenter au prix d'artefacts supplementaires (rayons de la mire dans la zone centrale).

Le rpéfiltrage 3D des données semble induire un légér gain de résolution par rapport ce qui a été obtenu précédement Fig. 4.12, déjà visible au niveau de l'écart-type. Ce gain reste cependant modéré, et s'accompagne d'un certain nombre d'artefacts causés par l'erreur de modèle. Dans tous les cas, on ne constate pas de perte de résolution avec ce traitement 3D.

Commençons par analyser la reconstruction obtenue avec une acquisition plan par plan. Dans ce cas, l'introduction de l'information 3D, de la PSF, ainsi que le préfiltrage 3D, permet de corriger le contraste au niveau des raies horizontales. Les erreurs de modèles restent cependant très importante, ce qui impose un niveau de régularisation élevé de la reconstruction pour limiter les artéfacts provenant de l'erreur de modèle. Cette régularisation se fait au prix de la résolution de la reconstruction, qui reste limitée. Ainsi, même si les acquisitions plan par plan permettent un net gain de résolution transverse, leur caractères intrinsèquement 2D limite la niveau de résolution axial qu'il est possible d'obtenir.

Pour ce qui est des acquisitions en translation, la qualité des reconstructions est extrêmement similaire entre un préfiltrage 2D et un préfiltrage 3D, ce qui signifie que l'erreur de modèle que l'on fait en effectuant un préfiltrage 3D reste suffisamment faible pour ne pas dégrader la qualité de la reconstruction. Ce constat est particulièrement intéressant, puisqu'il permet à un expérimentateur de ne pas trop devoir se soucier des différences de modèle entre les acquisitions réalisées en *remote focusing*, et celles obtenues en translatant l'échantillon, et d'appliquer un préfiltrage 3D dans les deux cas. Notons que dans tous les cas, les acquisitions en remote focusing offrent une résolution légèrement supérieure à celles obtenues avec en translatant l'échantillon.

4.5.3. Simulation 3D

Après avoir effectué nos tests sur la mire de super-résolution avec une PSF adaptée à la simulation axiale, nous pouvons passer à des simulations 3D à proprement parler. Nous utiliserons ici l'échantillon de SAGE et al. 2017, simulant des microtubules. Les reconstructions obtenues à partir de 500 images de speckles simulées, perturbées par un bruit Gaussien de la même manière que précédemment (RSB = 30 dB), sont présentées Fig. 4.14.

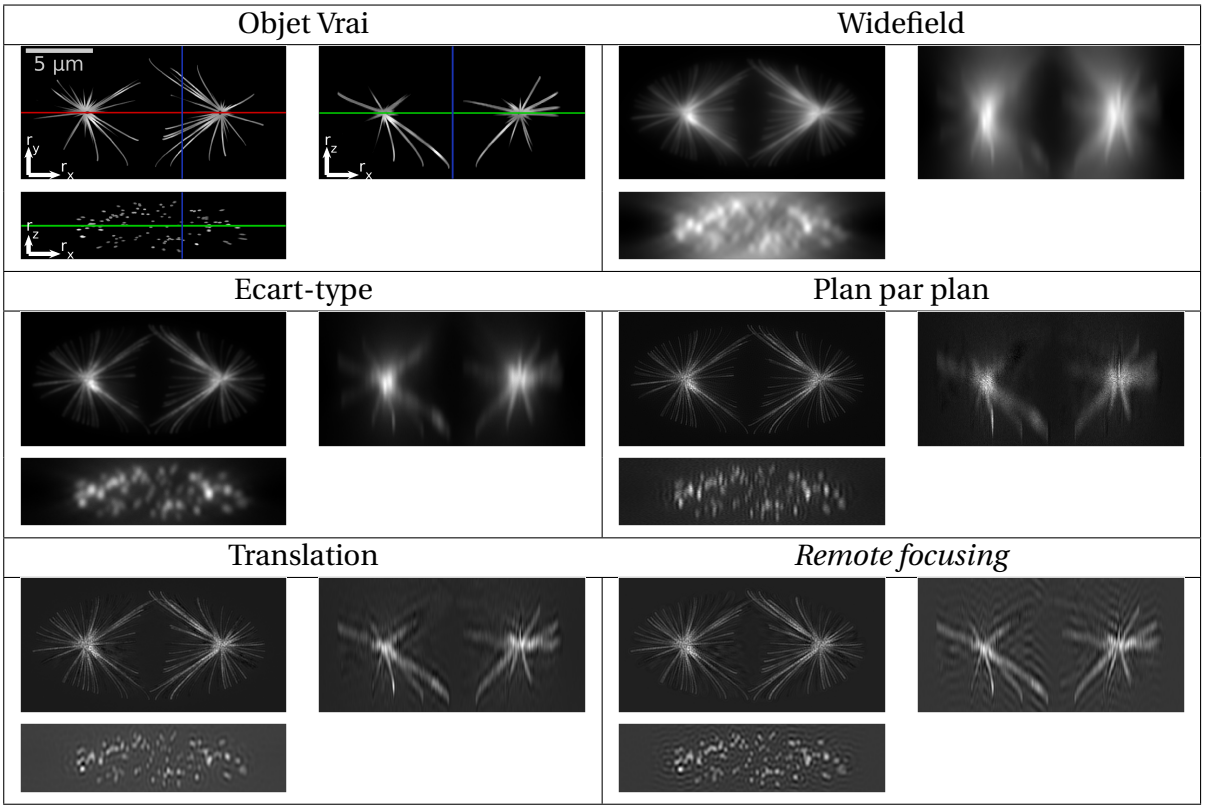


FIGURE 4.14. – Simulation sur un échantillon 3D simulant des microtubules. On retrouve que toutes les méthodes d'inversion proposées ici (suivant le protocole décrit dans le tableau 4.1) améliorent la reconstruction par rapport à l'écart-type, qui est lui même mieux résolu que le widefield. On retrouve alors l'effet précédemment observé sur la mire, qui est que les acquisition en remote offrent un meilleur sectionnement optique que celles en translation et en slice by slice. Cependant, à cause de l'appariation d'un phénomène de Gibbs dans la direction axiale, les méthodes avec un préfiltrage 2D semble mieux résolue au niveau transverse.

Cette simulation 3D généralise les observations déjà réalisées en XZ. On note tout d'abord le gain de résolution et de sectionnement optique lié au calcul de l'écart-type, expliqué par exemple avec la méthode *Dynamic Speckle Imaging* (VENTALON et al. 2005). Ensuite, le traitement RIM permet d'améliorer la résolution déjà obtenue avec l'écart-type, et ce quelque soit la méthode proposée.

Au niveau des reconstructions, on se retrouve confronté à un nouveau phénomène qui n'a pas encore été discuté, à savoir que la méthode plan par plan semble fournir une résolution transverse équivalente, voire légèrement meilleure que les méthodes basées sur le modèle 3D. Ceci s'explique de deux manières. La première découle directement de la régularisation d'une inversion 3D. Les fréquences de l'OTF en dehors du plan $k_z = 0$ étant plus faible, la sensibilité au bruit dans cette direction est accrue. Il

faut alors adapter le paramètre de régularisation pour limiter l'explosion du bruit en z, ce qui peut mener à une sur-régularisation dans les directions transverses et donc une perte de résolution. Par ailleurs on constate également l'apparition d'un phénomène de Gibbs dans la direction z, qui crée des artefacts visuels différents de ceux que l'on avait en 2D. Cependant, la différence de résolution axiale entre une reconstruction plan par plan et une reconstruction 3D reste significative, ce qui justifie de privilégier cette dernière. Au niveau des inversions 3D, on retrouve que la reconstruction obtenue avec des acquisitions en *remote focusing* est légèrement supérieure à celle obtenue avec des acquisitions en translation.

4.5.4. Test sur données expérimentales

Maintenant que nous avons vu qu'il était nécessaire d'utiliser un système de *remote focusing* pour maximiser les performances de RIM-3D, intéressons-nous à des reconstructions réalisées sur des données acquises expérimentalement avec cette méthode. Le *remote focusing* a été implémenté dans un microscope RIM standard, en ajoutant une lentille électro accordable dans un relais optique (voir Fig.4.15). Les acquisitions sont réalisées en changeant la position du plan focal par variation de la tension appliquée sur la lentille.

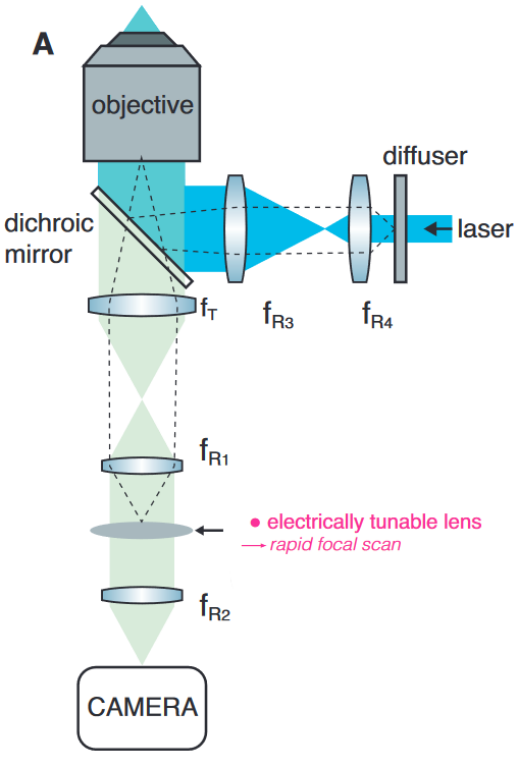


FIGURE 4.15. – Montage experimental pour le *remote focusing*

4.5.4.1. Echantillon test

Une première façon simple de tester RIM 3D dans un cas réel est de considérer un échantillon artificiel, créé en déposant une goutte de colle optique remplie de billes fluorescentes au dessus d'un substrat plan couvert d'un tapis homogène de ces mêmes billes. Pour chaque illumination de speckle, nous avons enregistré une image tri-dimensionnelle comportant 35 plans avec une distance de 150nm entre deux plans. Cet enregistrement fut répété 200 fois en variant l'illumination. On obtient ainsi un stack de 200 images tri-dimensionnelles, dont on peut former la variance.

Pour cette expérience *remote focusing*, nous avons étudié les performances des méthodes d'inversion du chapitre 3, RIM-CF, RIM-VAR et RIM-STD. Les différentes reconstructions sont proposées Fig. 4.16.

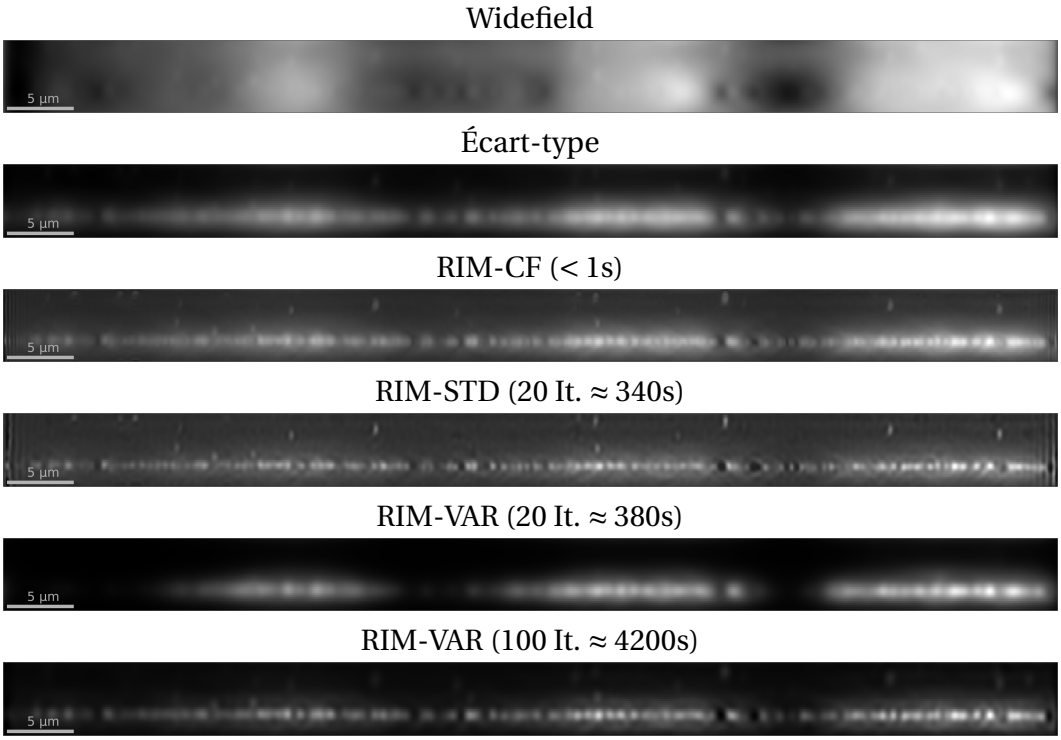


FIGURE 4.16. – Reconstruction d'un échantillon de bille au dessus d'un plan fluorescent, calculée à partir de 200 images expérimentales acquises en *remote focusing*.

Du fait de l'absence de capacité de sectionnement du microscope, un plan fluorescent est normalement invisible sur l'image widefield (voir Fig. 4.5). En pratique, le plan fluorescent expérimental n'est pas parfaitement homogène, et il est possible de le deviner sur l'image widefield. En revanche, la lumière hors-focus provenant des larges régions marquées est très importante et masque totalement le signal des billes fluorescentes au dessus d'elles.

Le sectionnement optique est obtenu dès le calcul de l'écart-type, puisque celui-ci

rend le plan de fluorescence parfaitement visible. L'application de RIM-CF permet d'améliorer cette capacité de sectionnement, en affinant l'image du plan, et en rendant les billes de fluorescence nettement plus visibles, et ceci pour un coût calculatoire inférieur à une seconde pour un échantillon de taille $1024 \times 1024 \times 70$.

L'approche RIM-STD permet une nouvelle fois d'améliorer la reconstruction obtenue avec RIM-CF. Cependant, le temps de calcul de RIM-STD (plusieurs minutes) peut rester un facteur fortement limitant, et montre tout l'intérêt de RIM-CF.

Si l'on laisse tourner l'algorithme RIM-VAR, pendant une durée comparable au temps de convergence de RIM-STD, on obtient une estimée très proche de l'écart-type (ou du DSI), bien moins résolue que les estimées RIM-CF et RIM-STD. Dans ce cas de figure, l'algorithme RIM-VAR perd énormément de temps à essayer de corriger la fluorescence dans les zones très intenses (dense), ce qui se traduit par une perte de contraste immédiate sur les reconstructions 3D. En laissant l'algorithme tourner suffisamment longtemps, il est possible de revenir à des reconstructions de qualité comparable à ce que l'on obtient avec RIM-STD, mais le temps de calcul se compte en heures plutôt qu'en minutes.

4.5.4.2. Données biologiques

Pour finir, nous proposons d'effectuer le traitement RIM 3D sur la totalité de la cellule présentée dans la section 3.5.4.2. Pour cet échantillon, toutes les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'un *remote focusing*. Nous avons comparé les reconstructions obtenues par la méthode plan par plan (préfiltrage 2D et traitement 2D), la méthode mixte adaptée à une technique d'acquisition par translation (préfiltrage 2D et reconstruction 3D) et la méthode 3D (préfiltrage 3D et reconstruction 3D) dans la table 4.1. Les reconstructions obtenues sont présentées Fig. 4.17

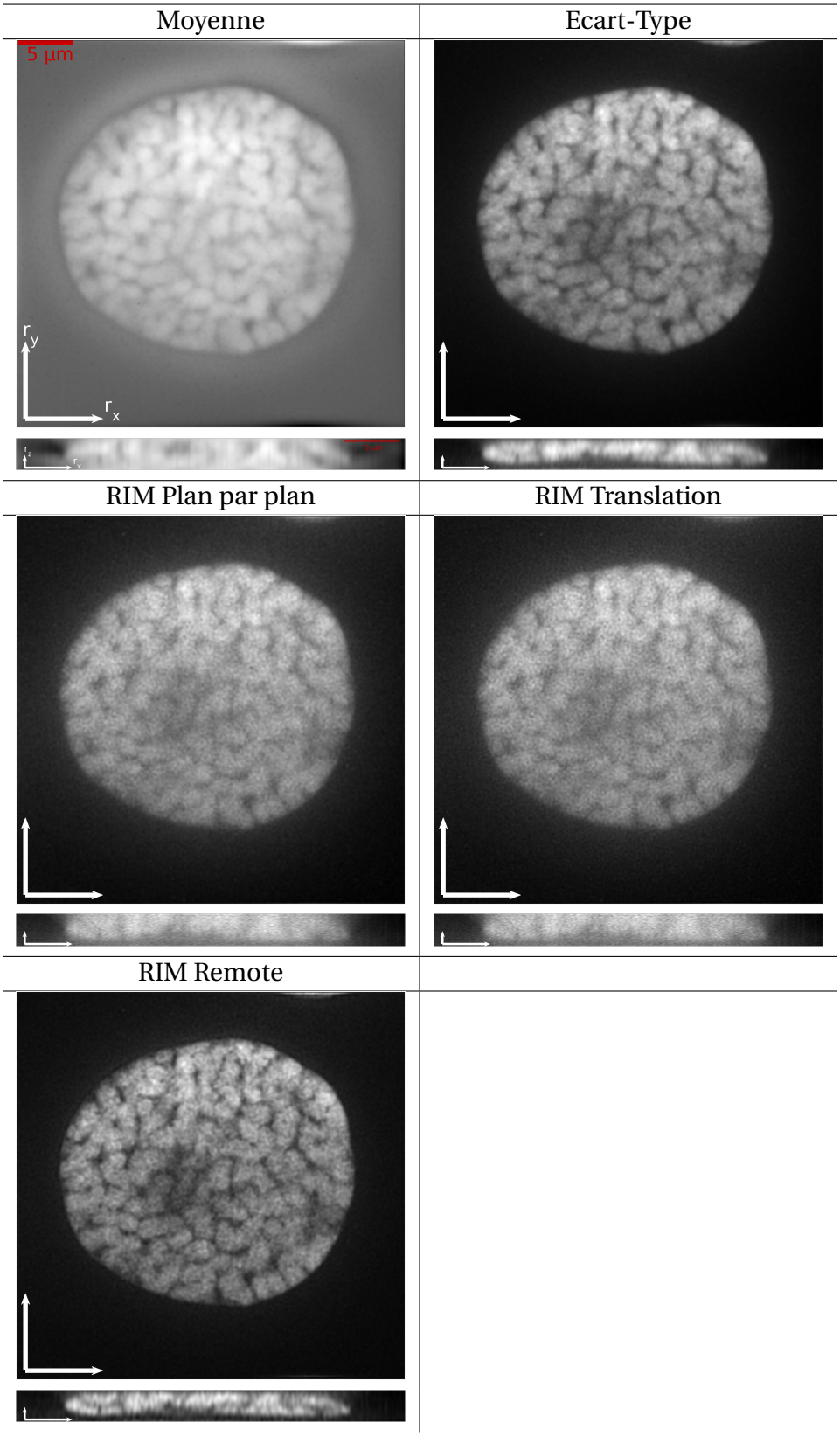


FIGURE 4.17. – Reconstruction 3D sur échantillon biologique

On retrouve globalement les mêmes conclusions que sur les simulations 3D. En particulier, les traitements numériques permettent toujours une amélioration de la résolution comparativement à l'écart-type, et l'on observe un gain de résolution et de sectionnement supplémentaire avec le traitement 3D complet. Nous avons cependant été étonné d'observer que la méthode mixte (*i.e.*, préfiltrage 2D, reconstruction 3D), n'améliore pas la résolution par rapport à la reconstruction plan par plan (préfiltrage 2D et reconstruction 2D). Nous suspectons que dans une expérience réaliste, le bruit de photons est tel que le préfiltrage (2D ou 3D) des images joue un rôle fondamental. Or, le préfiltrage 3D permet de supprimer bien plus de bruit que le préfiltrage 2D.

4.6. Conclusion sur le fonctionnement de RIM 3D

La méthode RIM s'adapte naturellement à l'imagerie tri-dimensionnelle. D'un point de vue algorithmique, il suffit de remplacer les convolutions 2D par des convolutions 3D, ce qui revient à remplacer des transformées de Fourier 2D par des transformées de Fourier 3D. La principale difficulté de RIM 3D réside dans la méthode d'acquisition des données, par *remote focusing* ou par translation de l'échantillon. Ces deux techniques d'acquisition produisent asymptotiquement la même image de variance. En revanche, elles imposent un préfiltrage spécifique des données brutes, préfiltrage 3D pour le *remote focusing* et préfiltrage 2D pour la translation. En pratique, la technique d'acquisition par remote focusing apparaît plus efficace pour traiter des images fort bruitées car le préfiltrage 3D enlève de manière optimale le bruit en dehors du support utile de la fonction de transfert optique (le tore). En utilisant les mêmes données expérimentales, nous avons observé une amélioration significative de la résolution axiale des reconstructions obtenues avec la méthode d'inversion 3D par rapport à la méthode classique plan par plan.

5. Extension de RIM pour l'imagerie cohérente

Sommaire

5.1. Principe de l'imagerie cohérente . . . 138
5.1.1. Montage en transmission . . . 138
5.1.1.1. Effet d'un échantillon sur le champ électrique . . . 139
5.1.1.2. Détection dans l'espace image . . . 140
5.1.2. Modèle *brightfield* . . . 141
5.1.3. Modèle *darkfield* . . . 142
5.1.4. Détection sur la caméra . . . 142
5.2. Liens avec la ptychographie . . . 145
5.2.1. Méthode de ptychographie de Fourier multiplexée . . . 146
5.3. Schéma numérique pour la reconstruction RIM cohérent . . . 147
5.3.1. Discrétisation des mesures . . . 147
5.3.2. Schéma itératif . . . 148
5.4. Reconstruction de l'échantillon complexe en simulation . . . 150
5.4.1. Simulation d'un problème de transmittance . . . 150
5.4.2. Simulation d'un problème darkfield . . . 154
5.5. Conclusion . . . 157

Jusqu'à présent, nous avons étudié RIM dans le cadre de la microscopie de fluorescence, où l'on observe directement des sources incohérentes. Dans ce cadre, la méthode RIM permet d'obtenir une estimée super-résolue de la densité de fluorescence à partir de la variance de multiples images réalisées sous différentes illuminations de speckle. Dans ce chapitre, nous allons adapter l'approche RIM à la microscopie standard, avec des échantillons non fluorescents. Dans ce cas, plutôt qu'être absorbée puis ré-émise par les molécules fluorescentes de l'échantillon, la lumière va simplement se propager au travers de celui-ci. Cette traversée va induire des modifications d'amplitude et de phase dans le champ électrique, à cause des phénomènes de diffusion et d'absorption (MERTZ 2019[Chap.9]). La grandeur d'étude est alors le contraste de permittivité relative de l'échantillon, défini à partir de la permittivité relative dans l'échantillon ϵ, et de celle du milieu d'observation ϵ_0 [1] :

$$\delta\epsilon(\boldsymbol{r}) = \epsilon(\boldsymbol{r}) - \epsilon_0, \tag{5.1}$$

qui gouverne l'interaction entre la lumière (le champ incident), et la matière (l'échantillon). Ce contraste est une grandeur complexe, dont la partie réelle caractérise la modification de la vitesse de l'onde au travers de l'échantillon, tandis que la partie imaginaire caractérise l'absorption du milieu.

L'objectif de ce chapitre est d'explorer les liens entre RIM et d'autres méthodes d'imagerie cohérente, et de proposer une étude préliminaire pour le développement d'une méthode d'imagerie cohérente quantitative basée sur les principes de RIM. Dans la suite, nous considérerons que l'indice du milieu d'observation ϵ_0 est égal 1, ce qui correspond à des observations réalisées dans l'air.

5.1. Principe de l'imagerie cohérente

5.1.1. Montage en transmission

Nous considérerons dans un premier temps, un montage optique en transmission, tel que présenté Fig. 5.1. Le champ incident produit par les sources (lampe, laser) est filtré par une première pupille $\widetilde{P}_{\text{Illu}}$, avant de rentrer dans l'espace objet. Ensuite, le champ transmis est collecté par un objectif de collection ayant une pupille $\widetilde{P}_{\text{Col}}$.

1. On a une définition équivalente à partir des indices optiques n et n_0 : $\delta\epsilon(\boldsymbol{r}) = n^2(\boldsymbol{r}) - n_0^2$

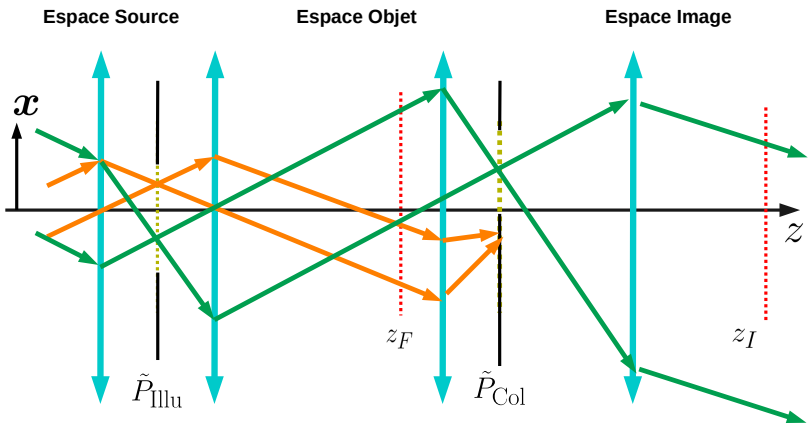


FIGURE 5.1. – Schéma d'un montage en transmission

En l'absence d'échantillon, certaines ondes planes du champ incident, comme l'onde orange, peuvent être coupées par la pupille de collection tandis que d'autres, comme l'onde plane verte, peuvent être transmises. Ainsi, contrairement à la microscopie de fluorescence, il est fréquent en microscopie cohérente en transmission, de détecter un champ électrique sur la caméra même en l'absence d'échantillon.

5.1.1.1. Effet d'un échantillon sur le champ électrique

Pour modéliser le lien entre le signal détecté et l'échantillon, il faut une nouvelle fois repartir de l'équation de Helmholtz (1.2) décrivant le champ électrique. En présence d'un échantillon de permittivité relative ϵ, le champ électrique vérifie l'équation :

$$\begin{aligned} (\Delta + \epsilon k_0^2)E &= S_{\text{Inc}} \\ \text{Ou bien} \quad (\Delta + k_0^2)E &= S_{\text{Inc}} - k_0^2 \delta\epsilon E \end{aligned} \tag{5.2}$$

où S_{Inc} représente les sources produisant le champ incident. Le champ solution de cette équation s'obtient directement à partir de la fonction de Green $\mathcal{G}$ définie en (1.9). Le champ total observé :

$$E(\boldsymbol{r}) = -\int \mathcal{G}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_0) S_{\text{Inc}}(\boldsymbol{r}_0)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_0 + \int \mathcal{G}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_0) k_0^2 \delta\epsilon(\boldsymbol{r}_0) E(\boldsymbol{r}_0)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_0 \tag{5.3}$$

se sépare alors en deux composantes : le champ incident

$$E_{\text{Inc}}(\boldsymbol{r}) = -\int \mathcal{G}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_0) S_{\text{Inc}}(\boldsymbol{r}_0)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_0, \tag{5.4}$$

qui serait le champ que l'on mesurerait en l'absence d'échantillon, et le champ diffracté

$$E_{\text{Dif}}(\boldsymbol{r}) = \int \mathscr{G}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_0) k_0^2 \delta\epsilon(\boldsymbol{r}_0) E(\boldsymbol{r}_0) \mathrm{d}\boldsymbol{r}_0, \tag{5.5}$$

résultant de l'interaction entre le champ électrique et l'échantillon. Le champ diffracté est dépendant du champ total, car la présence de l'échantillon modifie le champ interagissant avec ce même échantillon, ce qui rend le modèle difficilement exploitable. Une simplification courante est alors l'approximation de Born (BORN et al. 1999), qui suppose que le champ dans l'objet n'est pas modifié par l'objet, c'est-à-dire que :

$$E_{\text{Dif}}(\boldsymbol{r}) \approx \int \mathscr{G}(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_0) k_0^2 \delta\epsilon(\boldsymbol{r}_0) E_{\text{Inc}}(\boldsymbol{r}_0) \mathrm{d}\boldsymbol{r}_0. \tag{5.6}$$

Cette approximation suppose que le contraste de permittivité $\delta\epsilon$ reste suffisamment faible.

5.1.1.2. Détection dans l'espace image

Les équations vues jusqu'à présent décrivent uniquement le champ dans l'espace objet, c'est-à-dire en amont de l'objectif de collection. Pour obtenir le champ qui sera détecté sur la caméra, il faut faire des calculs similaires à ceux du chapitre 1 et utiliser la décomposition du champ au niveau d'un plan perpendiculaire à l'axe optique, placé après l'échantillon. Au niveau de ce plan, le champ incident et le champ diffracté se décomposent tous deux sous la forme d'une somme d'ondes planes (1.4) dont on ne garde que la contribution se propageant dans le sens des z positifs :

$$E_{\text{Inc}}(\boldsymbol{r}) = \int \widetilde{A}(\boldsymbol{k}_\perp) e^{i\boldsymbol{k}_\perp \cdot \boldsymbol{x}} e^{i\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)(z-z_F)} \mathrm{d}\boldsymbol{k}_\perp \tag{5.7}$$

$$E_{\text{Dif}}(\boldsymbol{r}) = \frac{i}{8\pi^2} \int \frac{1}{\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)} k_0^2 \delta\epsilon(\boldsymbol{r}_0) E_{\text{Inc}}(\boldsymbol{r}_0) \tag{5.8}$$
$$e^{i\boldsymbol{k}_\perp \cdot (\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_0)} e^{i\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)(z-z_F)+(z_F-z_0)} \mathrm{d}\boldsymbol{k}_\perp \mathrm{d}\boldsymbol{x}_0 \mathrm{d}z_0.$$

où $\boldsymbol{r} = (\boldsymbol{x}, z)$, $\widetilde{A}$ est la représentation du champ électrique dans l'espace objet, possédant un support en Fourier limité au domaine $\Omega_{P_{\text{Illu}}}$.[2] En rappelant l'action du microscope sur les ondes planes (grossissement et filtrage), et en se plaçant au niveau du plan focal image ($z = z_I$) on obtient de ces champs au niveau du détecteur :

$$E_{\text{Inc}}(\alpha\boldsymbol{x}) = \int \widetilde{P}_{\text{Col}}(\boldsymbol{k}_\perp) \widetilde{A}(\boldsymbol{k}_\perp) e^{i\boldsymbol{k}_\perp \cdot \alpha\boldsymbol{x}} \mathrm{d}\boldsymbol{k}_\perp = \int P_{\text{Col}}(\alpha\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}') E_{\text{Inc}}(\boldsymbol{x}', z_F) \mathrm{d}\boldsymbol{x}' \tag{5.9}$$

$$E_{\text{Dif}}(\alpha\boldsymbol{x}) = \frac{i k_0^2}{8\pi^2} \int \mathrm{d}\boldsymbol{k}_\perp \frac{\widetilde{P}_{\text{Col}}(\boldsymbol{k}_\perp)}{\gamma(\boldsymbol{k}_\perp)} e^{i(\boldsymbol{k}_\perp \cdot \alpha\boldsymbol{x} + \gamma(\boldsymbol{k}_\perp) z_F)} \tag{5.10}$$
$$\int \delta\epsilon(\boldsymbol{x}_0, z_0) E_{\text{Inc}}(\boldsymbol{r}') e^{-i(\boldsymbol{k}_\perp \cdot \boldsymbol{x}_0 + \gamma(\boldsymbol{k}_\perp) z_0)} \mathrm{d}\boldsymbol{x}_0 \mathrm{d}z_0.$$

2. Les termes des déphasages ne sont pas explicités ici, car inutiles dans la suite.

Reprenons l'expression du champ diffracté (5.10), et ajoutons-y les simplifications suivantes :

— $\gamma(\boldsymbol{k}_\perp) \approx \boldsymbol{k}_0$, c'est-à-dire que seuls les petits angles d'incidence sont transmis,

— l'échantillon peut se modéliser comme une fine tranche avec un contraste de permittivité constant, de sorte que $\delta\epsilon(\boldsymbol{r}) = \delta\epsilon(\boldsymbol{x})\text{Rect}(z_F - z/d)$, avec Rect la fonction porte, indicatrice de l'intervalle $[-0.5, 0.5]$, et d suffisamment petit pour considérer le champ incident constant sur toute l'épaisseur de l'échantillon.

Sous ces hypothèses, l'expression du champ diffracté se simplifie d'avantage :

$$E_{\text{Dif}}(\alpha\boldsymbol{x}) = \frac{1}{4\pi^2}\int \widetilde{P}_{\text{Col}}(\boldsymbol{k}_\perp)\Big(\int B(\boldsymbol{x}_0)E_{\text{Inc}}(\boldsymbol{x}_0, z_F)e^{-i\boldsymbol{k}_\perp\cdot\boldsymbol{x}_0}\mathrm{d}\boldsymbol{x}_0\Big)e^{i\boldsymbol{k}_\perp\cdot\alpha\boldsymbol{x}}\mathrm{d}\boldsymbol{k}_\perp \quad (5.11)$$

$$\text{avec,} \quad B(\boldsymbol{x}) = \frac{i}{2}k_0\delta\epsilon(\boldsymbol{x})d. \quad (5.12)$$

Le terme entre parenthèse dans (5.11) correspond simplement à la transformée de Fourier $\mathscr{F}\Big[B \times E_{\text{Inc}}(\cdot, z_F)\Big]$. Une fois cette substitution faite, on remarque que cette même équation décrit maintenant la transformée de Fourier inverse d'un produit. En repassant l'expression de toutes les fonctions dans le domaine direct on obtient l'expression du champ diffracté comme étant la convolution :

$$E_{\text{Dif}}(\alpha\boldsymbol{x}) = \int P_{\text{Col}}(\alpha\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_0)E_{\text{Inc}}(\boldsymbol{x}_0, z_F)B(\boldsymbol{x}_0)\mathrm{d}\boldsymbol{x}_0. \quad (5.13)$$

En combinant les expressions (5.9) et (5.13), on obtient l'expression du champ total au niveau de la caméra :

$$E(\alpha\boldsymbol{x}) = \int P_{\text{Col}}(\alpha\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_0)E_{\text{Inc}}(\boldsymbol{x}_0, z_F) + \int P_{\text{Col}}(\alpha\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_0)E_{\text{Inc}}(\boldsymbol{x}_0, z_F)B(\boldsymbol{x}_0)\mathrm{d}\boldsymbol{x}_0 \quad (5.14)$$

5.1.2. Modèle *brightfield*

On peut factoriser la convolution par P_{Col}, dans l'expression du champ total (5.14) pour obtenir :

$$E(\alpha\boldsymbol{x}) = \int P_{\text{Col}}(\alpha\boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_0)E_{\text{Inc}}(\boldsymbol{x}_0, z_F)(1 + B(\boldsymbol{x}_0))\mathrm{d}\boldsymbol{x}_0. \quad (5.15)$$

On arrive alors à un modèle d'observation similaire au modèle d'observation d'une image RIM tel que défini (2.1), mais en observant l'échantillon complexe :

$$T(\boldsymbol{x}) = 1 + B(\boldsymbol{x}) = 1 + ik_0\frac{\delta\epsilon}{2}d, \quad (5.16)$$

correspondant à la transmittance complexe de l'échantillon. Si la pupille laisse passer la fréquence nulle, la forme de transmittance en $1 + i\delta\epsilon$ produira une des images sur un fond lumineux uniforme issu du champ uniforme. Ces images sont principalement sensibles à la partie imaginaire du contraste de permittivité, qui apparaît sous

forme de taches sombres (MERTZ 2019, Chap.10). Plus généralement, le modèle (5.15) correspond à un modèle *brightfield* puisque la contribution du champ incident est toujours mesurée.

Même si ce modèle a été dérivé sous l'approximation de Born *i.e.*, en supposant $|B| << 1$, il peut également être obtenu pour de grandes valeurs de B en utilisant l'approximation de Rytov (CARMINATI 1997), et dans ce cas, B représente l'accumulation du retard de phase lors de la propagation au travers de l'échantillon.

5.1.3. Modèle *darkfield*

Une autre méthode pour retrouver un modèle de convolution est la microscopie *darkfield* qui permet de détecter uniquement le champ diffracté, en filtrant totalementla contribution du champ incident. Le principe de cette méthode consiste à travailler avec des pupilles d'illumination et de collection totalement disjointes, de sorte que :

$$\Omega_{P_{\text{Illu}}} \cap \Omega_{P_{\text{Col}}} = \varnothing. \tag{5.17}$$

Dans ce cas, ondes planes qui ont été transmises par l'objectif d'illumination seront toutes coupées par l'objectif de collection, et le champ incident n'atteindra jamais le détecteur. La convolution (5.7) est alors nulle, et le champ au niveau du détecteur est donné par :

$$E(\alpha \boldsymbol{x}) = \int P_{\text{Col}}(\alpha \boldsymbol{x} - \boldsymbol{x}_0) E_{\text{Inc}}(\boldsymbol{x}_0, z_F) B(\boldsymbol{x}_0) \mathrm{d}\boldsymbol{x}_0. \tag{5.18}$$

On retombe une nouvelle fois sur le modèle de formation d'une unique image RIM, avec l'échantillon complexe B, directement proportionnel au contraste de permittivité de l'échantillon observé. La microscopie *darkfield* se rencontre également dans les montages en réflexion, qui se modélisent en plaçant les sources lumineuses du même côté que l'espace image Fig. 5.1. Dans tous les cas, en l'absence d'échantillon, le champ incident n'atteigne pas l'espace image, et l'échantillon apparaît alors sur un fond noir.

5.1.4. Détection sur la caméra

Un dernier point sur la détection doit être abordé, puisque l'on ne mesure pas directement le champ total, mais seulement son intensité moyenne sur la période d'intégration d'un détecteur, typiquement de l'ordre de la milliseconde. Le signal mesuré sera donc de la forme :[3]

$$I(\boldsymbol{x}) = \langle E(\boldsymbol{x}) E^*(\boldsymbol{x}) \rangle, \tag{5.19}$$

ce qui nécessite de décrire les variations temporelles du champ incident sur une échelle de temps plus faible que ce temps d'intégration. On ne s'intéressera cependant

3. À partir de maintenant, pour alléger les notations, on supposera un grossissement unitaire $\alpha = 1$

pas aux variations harmoniques du champ, ayant lieu à des fréquences typiques de 10^{15} Hz, mais gardant une intensité moyenne constante dans le temps.

On considérera dans la suite que le champ incident est produit par une source thermique (*i.e.*, une lampe). Chaque atome de la source peut alors être vu comme une source élémentaire indépendante, suivant un modèle de phase interrompu (MERTZ 2019[Chap.7]). Le champ incident instantané sera alors décrit par une somme cohérente d'ondes planes de phases aléatoires, ce qui correspond à la définition d'un motif de speckle introduite dans le chapitre 2.

Par ailleurs, les changements de phases, et donc de motifs de speckle se font avec une période typique de l'ordre de 10^{-10} secondes. L'intensité mesurée sera donc une intensité moyennée des dizaines de milliers de réalisations de speckle. De plus, le champ total ayant une dépendance linéaire vis-à-vis du champ incident, sa moyenne (en champ) sera comme celle du champ incident égale à zéro (2.5). Ainsi, l'expression (5.19), correspond directement à la mesure de la variance du champ total, sur plusieurs dizaines de milliers de réalisations de speckle, assimilable à la variance asymptotique du champ total.

De plus, nous avons vu dans les équations (5.15) et (5.18), que le champ total instantané pouvait toujours se ré-exprimer comme une convolution compatible avec le modèle RIM (2.1), basé sur un échantillon complexe ρ (la transmittance T en *brightfield* et B en *darkfield*). L'expression de l'intensité du champ total, peut donc se dériver à partir du modèle de variance asymptotique RIM (2.17) :

$$I(\boldsymbol{x}) = \iint \mathscr{H}(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_1)\rho(\boldsymbol{x}_1)\gamma_E(\boldsymbol{x}_1-\boldsymbol{x}_2)\mathscr{H}^*(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_2)\rho^*(\boldsymbol{x}_2)\mathrm{d}\boldsymbol{x}_1\mathrm{d}\boldsymbol{x}_2 \tag{5.20}$$

avec $\mathscr{H}$ la PSF cohérente du microscope définie en (1.18), et γ_E la fonction d'auto-corrélation du champ incident. Le champ incident étant un champ de speckle pleinement développé, sa fonction d'auto-corrélation est connue, et sa transformée de Fourier s'obtient directement à partir de celle de la pupille d'illumination (2.6) :

$$\mathscr{F}(\gamma_E) = |\mathscr{F}(P_{\mathrm{Illu}})|^2. \tag{5.21}$$

Si les modèles *brightfield* et *darkfield* peuvent tous les deux se résumer à partir de l'équation (5.20), nous avons déjà discuté du fait que leur nature sont extrêmement différentes. Dans le cas d'une image *brightfield* la présence du champ incident (la partie en $1+\cdot$ de la transmittance), va produire un fond brillant uniforme. De plus, l'interaction avec le contraste de permittivité se faisant avec un terme en i, seule la partie imaginaire sera perçue. A l'inverse, pour une acquisition *darkfield*, les images seront sur un fond noir uniforme, et on observe de la même manière la partie réelle et la partie imaginaire du contraste de permittivité.

Ces caractéristiques sont illustrées sur Fig. 5.2, qui montre les deux acquisitions sur un échantillon constitué de billes de deux types différents. Les billes rouges sont correspondent à un contraste de permittivité réel de 0.1, et les bille vertes un contraste de permittivité imaginaire pur de 0.1i.

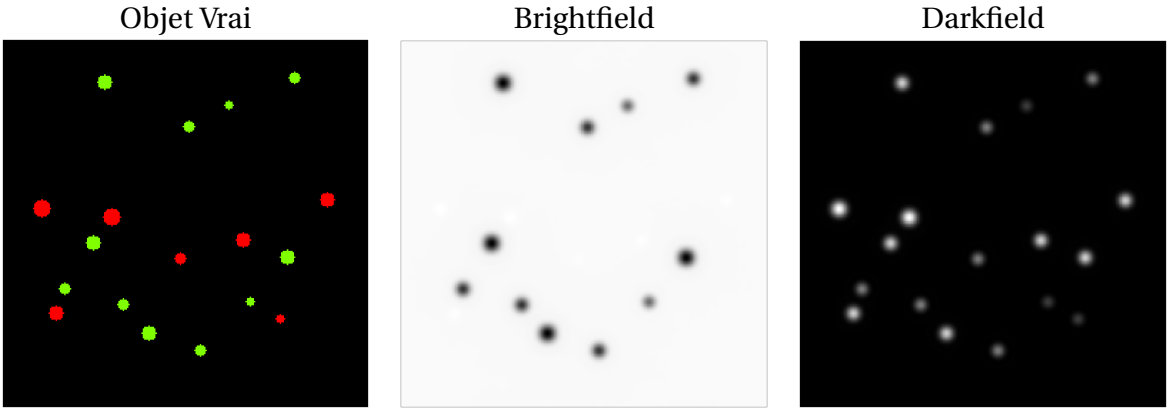


FIGURE 5.2. – Acquisitions *darkfield* et *brightfield* sur des billes de différentes nature. Les billes vertes sont absorbantes ($\delta\epsilon = 0.1i$), tandis que les rouges modifient simplement la vitesse de propagation ($\delta\epsilon = 0.1$). Sur l'image *brightfield*, seule les billes absorbantes ($\delta\epsilon$ imaginaire pur, couleur verte) sont détectables, sous forme de tâches sombre sur un fond brillant. Sur l'image *darkfield* toutes les billes sont visibles, mais la nature de leur contraste de permittivité ne peut pas être déduite.

Dans la suite, nous allons mener un raisonnement similaire à ce qui a été fait dans la section 2.3, et introduire le noyau t

$$t(\boldsymbol{x},\boldsymbol{x}') = \mathscr{H}(\boldsymbol{x})\gamma_E(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}')\mathscr{H}^*(\boldsymbol{x}') \tag{5.22}$$

pour la microscopie cohérente, qui sera cette fois un noyau hermitien. Le théorème spectral restant applicable, ce noyau reste décomposable sous la forme d'une somme de modes cohérents :

$$t(\boldsymbol{x}_1,\boldsymbol{x}_2) = \sum_{k\geqslant 1} \lambda_k \Psi_k(\boldsymbol{x})\Psi_k^*(\boldsymbol{x}') \tag{5.23}$$

avec $(\lambda_k)_{k\geqslant 1}$ une famille de réels positifs, décroissante et de limite nulle, et $(\Psi_k)_{k\geqslant 1}$ une famille de vecteurs orthogonaux et de norme unité. Comme pour l'équation (2.29), l'image observée est,

$$I(\boldsymbol{x}) = \sum_{k\geqslant 1} \lambda_k \left| \int \Psi_k(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_1)\rho(\boldsymbol{x}_1)\mathrm{d}\boldsymbol{x}_1 \right|^2. \tag{5.24}$$

Il est alors envisageable de traiter l'image obtenue, par exemple en effectuant une déconvolution par le premier vecteur propre Ψ_1. Cependant, dans la majorité des observations $\widetilde{P}_{\mathrm{Illu}} = \widetilde{P}_{\mathrm{Col}}$, sont toutes les deux des pupilles circulaires, et les vecteurs propres sont réels [4]. On réalisera alors la déconvolution d'une image réelle par un filtre réel et aucune information sur la phase de l'échantillon ne pourra en être extraite. Afin d'espérer retrouver une information complexe de l'échantillon, plusieurs images réalisées dans des conditions expérimentales différentes seront donc nécessaires.

4. On retombe dans le cadre des hypothèses utilisées en microscopie de fluorescence

5.2. Liens avec la ptychographie

L'objectif de l'approche RIM cohérente est de retrouver un échantillon complexe ρ (contraste de permittivité ou transmittance), à partir de M images réelles obtenues sous différentes conditions d'éclairement. Plus précisément, nous considérerons uniquement des changements de la pupille d'illumination entre deux images [5]. Ceci est totalement équivalent à changer la fonction d'auto-corrélation des illuminations, et on obtiendra donc M images réalisées selon le modèle (5.20), avec différentes fonctions d'auto-corrélation $(\gamma^{(m)})_{m\in[1,M]}$.

Commençons avec un cas simplifié où chaque illumination est une unique onde plane, associée à un vecteur d'onde transverse $\boldsymbol{k}_m$. Une telle illumination peut s'obtenir en posant $P^{(m)}_{\text{Illu}} = \delta(\boldsymbol{k}_\perp - \boldsymbol{k}_m)$, c'est-à-dire en utilisant une pupille correspondant à un unique trou extrêmement fin, ou plus simplement en plaçant une LED unique dans le plan de Fourier (ZHENG, KOLNER et al. 2011) de l'objectif d'illumination. L'expression des illuminations est alors donnée par :

$$E^{(m)}_{\text{Inc}}(\boldsymbol{x}) = E_m e^{i\boldsymbol{k}_m\cdot\boldsymbol{x}+\phi_m} \tag{5.25}$$

avec E_m l'amplitude réelle de l'onde et ϕ_m une phase aléatoire évoluant selon le modèle de phase interrompu. L'auto-corrélation d'une telle illumination est alors donnée par :

$$\gamma_m(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}') = E_m e^{-i\boldsymbol{k}_m\cdot(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}')}. \tag{5.26}$$

En réinjectant cette expression dans l'expression dans (5.20), on obtient une séparation immédiate des intégrales doubles, ce qui donne l'observation :

$$I_m(\boldsymbol{x}) = \left|\int \mathscr{H}(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_1)e^{-i\boldsymbol{k}_m\cdot(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_1)}\rho(\boldsymbol{x}_1)\mathrm{d}\boldsymbol{x}_1\right|^2. \tag{5.27}$$

On retrouve alors l'équation d'un problème déjà étudié en microscopie, puisqu'il s'agit de l'équation modèle de la microscopie par ptychographie de Fourier [6] telle que présentée dans ZHENG, HORSTMEYER et al. 2013. Dans ce cas, on sait qu'avec suffisamment d'ondes planes incidentes et en utilisant des algorithmes de reconstruction de phase comme la méthode de Gerchberg-Saxton (GERCHBERG 1971) ou un algorithme de gradient complexe (CANDÈS et al. 2015), il devient possible de retrouver l'échantillon complexe.

5. Nous aurions pu également nous placer dans différentes configurations de collection, ou un mélange des deux.

6. La ptychographie de Fourier est en fait totalement analogue à un autre problème classique en imagerie qui est la ptychographie (RODENBURG et al. 1992). Pour faire apparaître le parallèle entre ces deux méthodes, il est alors plus simple d'exprimer l'equation (5.27) avec une double dépendance en $\boldsymbol{x}$ et $\boldsymbol{k}$:

$$I(\boldsymbol{x},\boldsymbol{k}) = \left|\int \mathscr{H}(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_1)e^{i\boldsymbol{k}\cdot\boldsymbol{x}_1}\rho(\boldsymbol{x}_1)\mathrm{d}\boldsymbol{x}_1\right|^2. \tag{5.28}$$

Le modèle de ptychographie s'obtient en considérant que l'on mesure dans l'espace des $\boldsymbol{k}$, et que l'on peut changer la position $\boldsymbol{x}$ de la sonde $\mathscr{H}$, tandis que le modèle de ptychographie de Fourier suppose que l'on mesure l'espace des $\boldsymbol{x}$, et que l'on peut changer l'angle d'incidence de l'illumination.

Ainsi, en simplifiant le problème direct du RIM cohérent, on retrouve une technique d'imagerie bien connue, dont les applications pratiques ne sont plus à démontrer. Cependant, la microscopie par ptychographie de Fourier possède un certain nombre de contraintes liées à l'acquisition des données. La première est qu'un grand nombre d'ondes planes sont nécessaires pour couvrir la totalité de l'espace de Fourier, ce qui se traduit par un temps d'acquisition et de reconstruction accru. Par exemple, en ptychographie de Fourier avec une matrice de LEDs, chaque LEDs doit être individuellement allumée, c'est-à-dire que le nombre d'images est égal au nombre de LEDs (en général plusieurs centaines). De plus, un champ constitué d'une unique onde plane est généralement peu énergétique, et le temps d'exposition de la caméra doit être augmenté pour compenser le faible niveau du signal, ce qui augmente une nouvelle fois le temps d'acquisition.

5.2.1. Méthode de ptychographie de Fourier multiplexée

Pour pallier aux problèmes du nombre d'images et du temps d'acquisition rencontrés en ptychographie de Fourier, Tian, Li et al. 2014 introduit le concept de Microscopie par Ptychographie de Fourier Multiplexée (MPFM) qui propose d'allumer simultanément plusieurs LEDs. Ceci revient à éclairer l'échantillon avec une somme d'ondes planes arbitraire. Dans ce cas, pour l'illumination m, on aura K_m différentes LEDs allumées. Notons $\mathcal{K}_m = \{\boldsymbol{k}_1^{(m)}, \dots, \boldsymbol{k}_{K_m}^{(m)}\}$, les vecteurs d'ondes transverses associées aux LEDs allumées pour l'illumination m. Le champ incident produit par cet ensemble de LEDs est décrit par la somme d'ondes planes :

$$E_{\text{Inc}}(\boldsymbol{x}) = \sum_{\boldsymbol{k}\in\mathcal{K}_m} E_k e^{i\boldsymbol{k}\cdot\boldsymbol{x}+\phi_k} \tag{5.29}$$

avec E_j l'amplitude (réelle) associée à chaque onde plane, et ϕ_k sa phase, suivant toujours le modèle de phase interrompu. Chacune des ondes planes étant incohérente avec les autres, l'intensité totale peut s'écrire comme la somme des intensités provenant de chacune des ondes planes,

$$I_m(\boldsymbol{x}) = \sum_{\boldsymbol{k}\in\mathcal{K}_m} E_{\boldsymbol{k}} \left| \int \mathscr{H}(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_1)\rho(\boldsymbol{x}_1)e^{-i\boldsymbol{k}\cdot(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_1)}\mathrm{d}\boldsymbol{x}_1 \right|^2. \tag{5.30}$$

Ce modèle doit alors être comparé au modèle de formation d'image du RIM cohérent (5.24), puisqu'il s'agit une nouvelle fois d'une expression des images sous la forme d'une somme de modes incohérents :

$$\Phi_k^{(m)}(\boldsymbol{x}) = \sqrt{E_{\boldsymbol{k}}}\mathscr{H}(\boldsymbol{x})e^{i\boldsymbol{k}_k^{(m)}\cdot\boldsymbol{x}} \tag{5.31}$$

plutôt que sur sa base orthogonale de vecteurs propres Ψ. En fait, cette expression peut se retrouver à partir de l'expression de t_m (5.23), si l'on choisi d'injecter directement

l'expression de γ_m :

$$\gamma_m(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}') = \sum_{\boldsymbol{k}\in\mathcal{K}_m} E_{\boldsymbol{k}} e^{i\boldsymbol{k}\cdot(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}')} \tag{5.32}$$

plutôt que de faire la décomposition spectrale du noyau t_m dans sa globalité.

La différence entre le modèle RIM cohérent (5.20) et le modèle MPFM (5.30) réside donc dans la décomposition employée. En particulier, dans le cas où toutes les LEDs ont la même intensité, les poids $E_{\boldsymbol{k}}$ de la décomposition utilisée en MPFM ne décroissent pas, et cette décomposition ne peut être tronquée pour négliger une éventuelle redondance issue de l'éclairement de multiples LEDs voisines, chaque contribution ayant le même poids.

Dans le cadre de la MPFM, il est donc préférable d'éclairer avec des LEDs éloignées les unes autres. Dans ce cas, il est montré dans l'annexe E que lorsque les LEDs allumées sont toutes "éloignées" les unes des autres, la décomposition (5.30) devient une décomposition spectrale, et les méthodes RIM cohérent et MPFM deviennent rigoureusement identiques. On en déduit donc que la méthode RIM est intéressante avec un schéma d'illumination ayant un forte densité de LEDs, de façon à assurer la décroissance des valeurs propres $\lambda_k^{(m)}$ dans les décompositions (5.24), et de pouvoir automatiquement tronquer celle-ci pour enlever l'information redondante.

Avec une stratégie d'éclairement dense en illumination, RIM devrait donc permettre de sonder la totalité de l'espace de Fourier avec très peu d'images. Ensuite, la troncature du modèle RIM, permettra d'approximer correctement l'image modèle en supprimant automatiquement les informations redondantes, associées à des valeurs propres plus faibles.

Notons que si l'on choisit de ne pas tronquer le modèle RIM, les équations (5.24) et (5.30) sont équivalentes puisqu'elles correspondent à la décomposition exacte du même noyau t_m.

5.3. Schéma numérique pour la reconstruction RIM cohérent

5.3.1. Discrétisation des mesures

La première étape pour la réalisation d'un schéma numérique est la discrétisation des mesures. Dans la suite, nous noterons donc $y^2_{m,i}$ la mesure de l'intensité pour l'image m à la position du pixel i. Dans ce cas, en suivant le même schéma de discrétisation que celui de l'équation (3.9), on montre que les mesures RIM s'écrivent :

$$y^2_{m,i} = \boldsymbol{\rho}^\dagger \mathbf{T}_i^{(m)} \boldsymbol{\rho} \tag{5.33}$$

$$\text{avec,} \qquad \mathbf{T}_i^{(m)} = \mathrm{Diag}(\mathbf{P}^i \boldsymbol{h}) \mathbf{C}_m \mathrm{Diag}(\mathbf{P}^{-i} \boldsymbol{h}^*) \tag{5.34}$$

où $\boldsymbol{h}$ est une version discrétisée de la PSF cohérente $\mathscr{H}$, $\mathbf{C}_m = \mathrm{BCCB}(\boldsymbol{\gamma}_m)$ est une matrice hermitienne de convolution, et $\mathbf{P}^i$ est la matrice de permutation plaçant le pixel i à la position 0. On peut également discrétiser l'expression globale de l'image

(5.24) pour obtenir l'expression vectorielle :

$$\boldsymbol{y}_m^{\odot 2} = \sum_{k=1}^{N} \left| \mathbf{U}_k^{(m)} \boldsymbol{\rho} \right|^{\odot 2}, \tag{5.35}$$

$$\mathbf{U}_k^{(m)} = \mathrm{BCCB}(\boldsymbol{u}_k^{(m)}) \tag{5.36}$$

avec $\boldsymbol{u}_k^{(m)}$ les vecteurs propres de la matrice $\mathbf{T}_0^{(m)}$, normalisé de façon à ce que $\left|\boldsymbol{u}_k^{(m)}\right| = \sqrt{\lambda_k^{(m)}}$. Cette expression est analogue à l'expression du vecteur variance (3.8) dans le cadre de la microscopie de fluorescence.

5.3.2. Schéma itératif

À partir de là, pour retrouver la quantité complexe $\boldsymbol{\rho}$, nous allons adapter la méthode RIM-STD présentée dans la section 3.4, pour tenir compte des spécificités de la microscopie cohérente, tout en restant sur un problème de minimisation d'une fonction :

$$\widehat{\boldsymbol{\rho}} \in \arg\min_{\boldsymbol{\rho}} J_{\mathrm{Co}}(\boldsymbol{\rho}). \tag{5.37}$$

J_{Co} est une fonction mesurant la dissimilarité globale entre les différentes images modèles (5.24) et expérimentales.

Cette fonction nécessite de faire deux adaptations par rapport à la fonction J_{STD}, introduite à l'équation, (3.27). La première est de prendre en compte que l'échantillon $\boldsymbol{\rho}$ ainsi que les matrice $\mathbf{T}_i^{(m)}$ peuvent maintenant prendre des valeurs complexes. En pratique, pour notre problème l'adaptation est extrêmement simple, puisqu'il suffit de remplacer toutes les opérations de transposition par des opérations de transconjugaison dans les équations du chapitre 3, ces deux opérations étant équivalentes à un calcul d'adjoint pour des opérateurs linéaires réels et complexes respectivement. Cette adaptation est dérivée du schéma Wirtinger-Flow (Candès et al. 2015), généralisant le problème des moindres carrés aux vecteurs à valeurs complexes. La deuxième adaptation nécessite d'incorporer simultanément plusieurs images dans la fonction objectif au lieu de travailler sur une unique image de variance. L'adaptation est une nouvelle fois extrêmement simple, puisqu'il suffit de sommer les fonctions objectifs associées à chacune des images. La fonction à minimiser est alors donnée par :

$$J_{\mathrm{Co}}(\boldsymbol{\rho}) = \sum_{m=1}^{M} J_m(\boldsymbol{\rho}), \tag{5.38}$$

où J_m est la fonction d'adéquation aux données pour l'image m, correspondant à la fonction objectif d'un problème RIM-STD classique, basée sur la PSF $\boldsymbol{h}$ et la fonction

d'auto-corrélation $\boldsymbol{\gamma}_m$. Cette fonction peut s'exprimer comme :

$$J_{\mathrm{Co}}(\boldsymbol{\rho}) = \sum_{m=1}^{M}\sum_{i=1}^{N} |y_{m,i} - (\boldsymbol{\rho}^\dagger \mathbf{T}_i^{(m)} \boldsymbol{\rho})^{\frac{1}{2}}|^2, \tag{5.39}$$

$$\text{ou bien,} \qquad J_{\mathrm{Co}}(\boldsymbol{\rho}) = \sum_{m=1}^{M} \left\| \widehat{\boldsymbol{y}}_m - \left(\sum_{k=1}^{N} \left| \mathbf{U}_{m,k}^{(p)} \boldsymbol{\rho} \right|^{\odot 2} \right)^{\odot \frac{1}{2}} \right\|^2 . \tag{5.40}$$

On peut alors directement trouver la direction de descente du schéma numérique, en sommant les expressions des gradients des différentes fonctions J_m, que l'on récupère du chapitre 3. On obtient alors les expressions :

$$\begin{aligned} &\text{Pour (5.39), à partir de (3.33)} \quad \nabla J_{\mathrm{Co}} = -2\textstyle\sum_{m=1}^{M}\sum_{i=1}^{N} \frac{\widehat{y}_{m,i} - y_{m,i}(\boldsymbol{\rho})}{y_{m,i}(\boldsymbol{\rho})} \mathbf{T}_{m,i}\boldsymbol{\rho} + 2\mu\boldsymbol{\rho} \\ &\text{Pour (5.40), à partir de (3.36)} \quad \nabla J_{\mathrm{Co}} \textstyle\sum_{m=1}^{M}\sum_{k=1}^{K} \mathbf{U}_{m,k}^\dagger \left((\mathbf{U}_{m,k}\boldsymbol{\rho}) \odot \frac{\widehat{\boldsymbol{y}}_m - \boldsymbol{y}_m(\boldsymbol{\rho})}{\boldsymbol{y}_m(\boldsymbol{\rho})} \right) + 2\mu\boldsymbol{\rho} \end{aligned} \tag{5.41}$$

Notons que bien qu'elle n'ait pas été mentionnée pour alléger les notations de ce chapitre, la présence de bruit d'instrument dans le modèle est encore une fois essentielle pour garantir que le gradient du critère reste borné. De la même manière, on pourrait construire un préconditionneur pour ce schéma numérique, en sommant le préconditionneur dérivé de chacune des fonctions objectifs :

$$\mathbf{S}_{\mathrm{Co}} = \sum_{m=1}^{M}\sum_{k=1}^{K} \mathbf{U}_{m,k}^\dagger \mathbf{U}_{m,k} \tag{5.42}$$

mais son implémentation n'a pas encore été finalisée. Le schéma final que nous exploiterons sera donc un simple schéma itératif

$$\begin{aligned} \boldsymbol{\rho}_0 &\in \mathbb{C}^N \\ \boldsymbol{\rho}_{k+1} &= \boldsymbol{\rho}_k + \alpha_k \boldsymbol{d}_k. \end{aligned} \tag{5.43}$$

Contrairement au problème de fluorescence, le choix de l'estimée initiale $\boldsymbol{\rho}_0$ n'est ici pas anodin, mais ce point sera discuté lors des simulations numériques. La direction de descente retenue est une nouvelle fois donnée selon un schéma de gradient non conjugué non linéaire (WRIGHT et al. 1999[Chap.10]) :

$$\boldsymbol{d}_k = \begin{cases} \nabla J_{\mathrm{Co}}(\boldsymbol{\rho}_0) & \text{si } k = 0 \\ \nabla J_{\mathrm{Co}}(\boldsymbol{\rho}_k) + \beta_k \boldsymbol{d}_{k-1} & \text{sinon,} \end{cases} \tag{5.44}$$

avec β_k le coefficient de conjugaison de Polak-Ribière+, adapté aux vecteurs complexes :

$$\beta_k = \max\left(\frac{\mathrm{Re}\left((\boldsymbol{g}_k - \boldsymbol{g}_{k-1})^\dagger \boldsymbol{g}_k \right)}{\mathrm{Re}\left(\boldsymbol{g}_{k-1}^\dagger \boldsymbol{g}_{k-1} \right)}, 0 \right). \tag{5.45}$$

Le pas α_k à chaque itération est une nouvelle fois obtenue par une procédure de *backtracking*, avec une procédure similaire à ce qui est présenté dans le chapitre 3,

ainsi que dans l'annexe C. La condition d'Armijo, (3.46), doit également être modifiée pour faire intervenir $\mathrm{Re}(\boldsymbol{g}_k^\dagger \boldsymbol{d}_k)$.

Il reste alors une différence primordiale entre le problème RIM en microscopie de fluorescence, et RIM dans le cadre de la microscopie cohérente. Pour le premier, on a pu montrer qu'en nous restreignant à l'étude de quantités positives, l'obtention d'une solution unique était garantie. Pour le problème de reconstruction de phase en microscopie cohérente, nous n'avons pas ce type de garantie. L'algorithme risque alors de dériver vers des solutions ne représentant pas fidèlement l'objet, ou de se retrouver bloqué dans des minimas locaux. Par conséquent, l'utilisation d'une estimée initiale proche de la solution recherché risque de jouer un rôle important. Un tel prérequis n'est pas choquant, puisqu'une méthode d'initialisation précise, non adaptable au problème RIM, est également proposée avec le schéma du Wirtinger-Flow (CANDÈS et al. 2015).

5.4. Reconstruction de l'échantillon complexe en simulation

5.4.1. Simulation d'un problème de transmittance

Commençons par travailler dans le cadre d'un modèle en transmittance, avec un échantillon complexe de la forme $\rho(\boldsymbol{r}) = e^{i\phi(\boldsymbol{r})}$, tel qu'illustré Fig. 5.3. L'échantillon considéré est alors un échantillon de module unité, divisé en multiples régions dans lesquelles la phase a été tirée aléatoirement entre $[0, \frac{\pi}{2}]$, simulant un tapis de cellules. Deux images de références peuvent alors être construites à partir de cet échantillon. La première est l'image *brightfield*, calculée à partir du modèle (5.20), en prenant $\widetilde{P}_{\mathrm{Illu}} = \widetilde{P}_{\mathrm{Col}}$, qui est une image réelle pour laquelle il est difficile d'obtenir des informations concernant la phase de l'échantillon. La seconde correspond à la transmittance complexe filtrée par la pupille de collection. Cette image peut être obtenue expérimentalement à partir de méthodes interférentielles comme l'holographie hors axe avec une onde plane en incidence normale (CUCHE et al. 2000) ou la microscopie *Differential Interference Contrast* (ALLEN et al. 1969), qui remontent à la phase de la transmittance à partir du gradient de phase du champ diffracté.

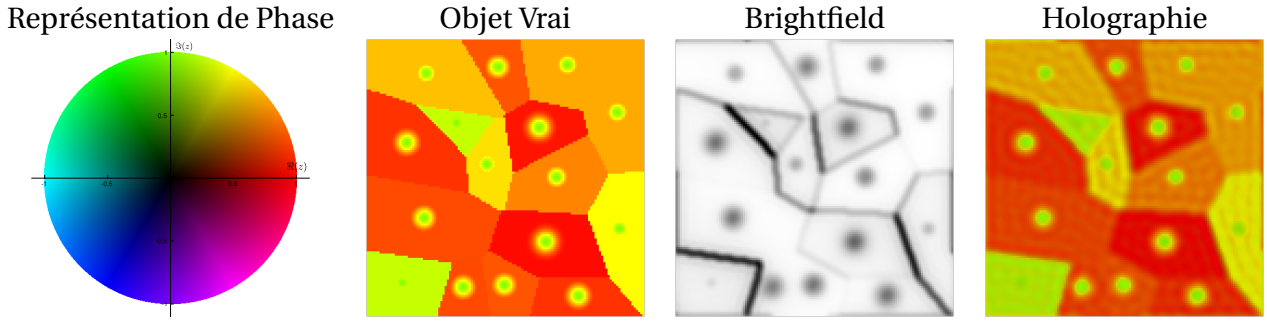


FIGURE 5.3. – Acquisitions sur un échantillon simulant un tapis de cellules. Les images en noir et blanc sont à valeur réelle, et celles en couleurs sont à valeur complexe, suivant la légende introduite ici.

Dans la suite, nous essaierons de reconstruire une image complexe, combinant les informations d'amplitude et de phase, mais sans passer par un montage interférentiel comme c'est le cas en holographie. Pour cela, nous utiliserons de multiples images réelles, similaires à l'image *brightfield*, mais obtenues avec des pupilles d'illuminations différentes. Plus précisément, nous supposerons que

— les images seront réalisées au travers d'une pupille de collection circulaire, correspondant à la fonction indicatrice d'un disque,
— et la diversité des mesures proviendra exclusivement de la fonction d'autocorrélation des éclairements, c'est-à-dire de la pupille d'illumination.

On admettra également que quatre images sont suffisantes pour permettre de retrouver correctement la phase de l'échantillon. Ce point n'est pas prouvé théoriquement, mais s'appuie sur les analogies que l'on peut faire entre l'approche RIM et les microscopes de phase (comme le *Differential Phase Contrast*) (TIAN et WALLER 2015). Ce nombre d'images peut également s'étudier sur un aspect plus mathématique en étudiant les liens entre le problème RIM cohérent et la reconstruction de phase, qui sont présentés dans l'annexe F.

Nous utiliserons une pupille de collection $\widetilde{P}_{\text{Col}}$ circulaire, et les différentes pupilles d'illuminations $\widetilde{P}^{(m)}_{\text{Illu}}$ seront des quarts de cercle de même rayon comme cela est illustré Fig. 5.4.

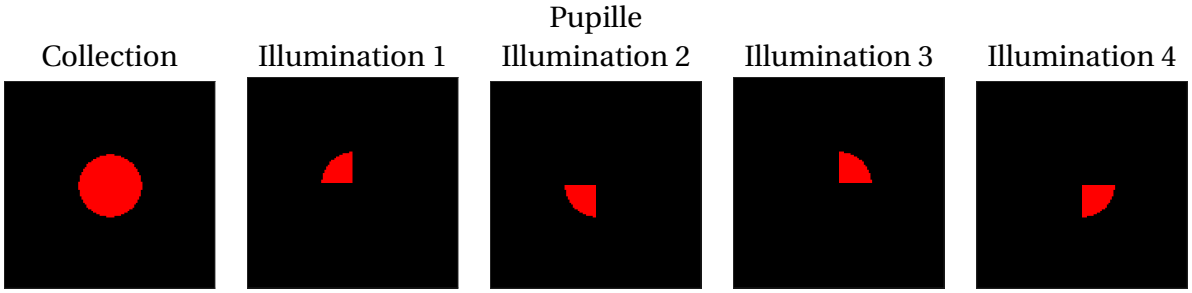


FIGURE 5.4. – Pupille du microscope considérée (identique pour les quatre images), ainsi que les quatre pupilles utilisées pour l'illumination.

Nous avons simulé quatre images selon le modèle (5.24) [7], à partir des pupilles présentées Fig. 5.4 et perturbées par un faible bruit gaussien (RSB ≈ 30 dB). Les quatre images observées sont proposées Fig.5.5.

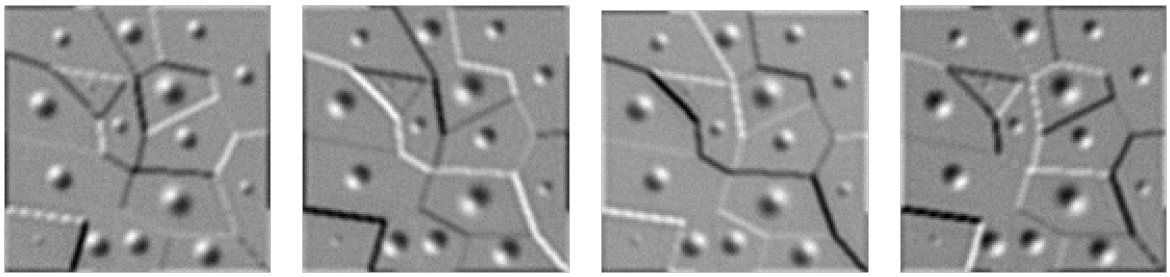


FIGURE 5.5. – Les 4 images réalisées dans le cadre du RIM cohérent

On constate alors que chaque image obtenue semble montrer le gradient de la phase selon une direction particulière, dépendante du type d'ouverture utilisée. Les méthodes par contraste de phase utilise cet effet pour à l'expression de la phase.

Avant de lancer l'inversion RIM, trois questions ont attiré notre attention. Tout d'abord, quelle sera la meilleure estimée initiale (pour être le plus proche possible de la solution et accélerer la convergence de l'algorithme). Idéalement, on aurait souhaité adapter l'estimée spectrale du Wirtinger-Flow (CANDÈS et al. 2015), mais celle-ci se base sur le caractère aléatoire des matrices d'observations, qui ne correspond pas au problème RIM. Nous avons tout d'abord considéré un objet constant, ce qui, pour cet échantillon, est équivalent au module de l'objet, puis une image facilement accessible, l'image *brightfield* de l'échantillon. Enfin, nous avons étudié une reconstruction basée sur une estimée aléatoire.

La deuxième question porte sur le domaine fréquentiel sur lequel on va chercher à reconstruire l'échantillon. En effet, en utilisant le même raisonnement que celui développé dans le chapitre 2, on peut montrer que chaque image est sensible aux fréquences de l'objet sur le domaine $\Omega_{\mathscr{H}\gamma^{(m)}}$. Cependant, au vu de la forme des différents domaines, il n'y a un recouvrement d'information que sur le domaine $\Omega_{\mathscr{H}}$ définit par la pupille de collection. Ce recouvrement est illustré Fig. 5.6.

7. calculé avec 50 vecteurs propres

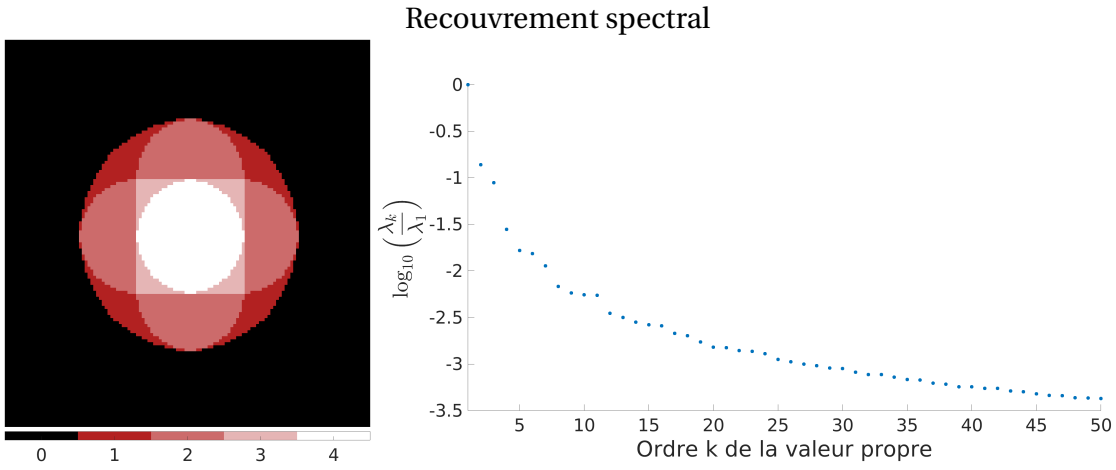


FIGURE 5.6. – Recouvrement des domaines $\Omega_{\mathcal{H}\gamma^{(m)}}$ pour $m = 1,\ldots,4$ dans l'espace de Fourier, et décroissance des valeurs propres. Les valeurs propres sont les mêmes pour chaque pupille d'illumination.

Ainsi, on peut choisir soit de restreindre l'information à la zone ayant un recouvrement maximal (*i.e.*, $\Omega_{\mathcal{H}}$), afin de limiter les éventuelles indéterminations de phase, soit choisir de reconstruire sur le support le plus large, avec une meilleure résolution, mais des possibles indéterminations sur la phase reconstruite. Les deux choix seront étudiés pour les reconstructions.

Enfin la troisième et dernière question concerne le nombre de vecteurs propres à considérer pour la reconstruction. Même si la vitesse de décroissance des valeurs propres est inférieure à celle observée en microscopie de fluorescence (voir Fig. 5.6), nous avons observé qu'utiliser les dix premiers vecteurs propres pour le calcul de la variance modèle est suffisant. Les reconstructions obtenues avec la méthode RIM pour les différentes estimées initiales et les différents domaines spectral de reconstruction sont présentées Fig. 5.7.

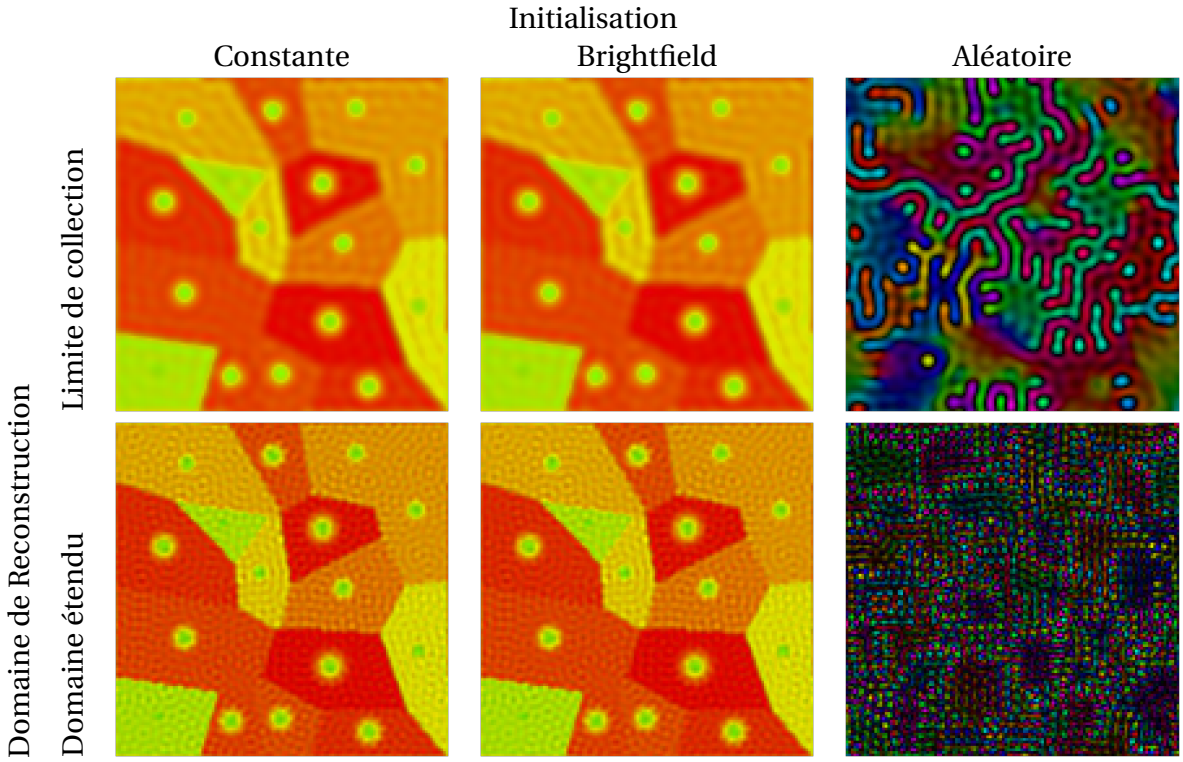


FIGURE 5.7. – Reconstruction RIM

On constate deux choses. La première est qu'avec une initialisation aléatoire, la méthode RIM cohérent (avec ces quatre mesures) ne semble pas converger, alors qu'avec une initialisation proche de la solution (en module), il est possible de reconstruire correctement l'échantillon. Il semble également que le fait de travailler sur un domaine élargi, avec plus de risque d'indétermination de phase, n'aie pas d'impact significatif si de bonnes initialisations sont utilisées. Ainsi, on peut a priori gagner en résolution tout en récupérant l'information de phase, comme c'est le cas en ptychographie. Ceci permet de vérifier le bon fonctionnement de la méthode RIM aux problèmes de l'imagerie en transmission par éclairement partiellement cohérent. Cependant, dans ce cas, RIM n'apporte pas un progrès significatif par rapport aux approches *Differential Phase Constrast*.

En fait, l'intérêt principal de RIM cohérent réside dans sa compatibilité avec les microscopes *darkfield*, pour lesquels il n'existe pas de méthodes de reconstruction de phase.

5.4.2. Simulation d'un problème darkfield

Une configuration de microscopie *darkfield* se caractérise par le fait que la caméra ne détecte aucun signal en l'absence d'échantillon. Pour cela, il faut soit avoir $\widetilde{P}^{(m)}_{\text{Illu}} \cap \widetilde{P}_{\text{Col}} = \varnothing$ pour tout m, soit considérer un montage en réflexion, ce que l'on fera dans la suite.

On choisit de travailler sur un objet constitué de multiples billes transparentes, de rayon variable et dont le contraste de permittivité $\delta\epsilon$ vaut soit 0.1, soit $0.1i$, tel que présenté Fig 5.8. Pour ce type d'échantillon, on peut commencer par regarder l'image *brightfield*,[8], et l'image *darkfield*[9], toute deux présentées sur cette même figure, avec l'image d'holographie.

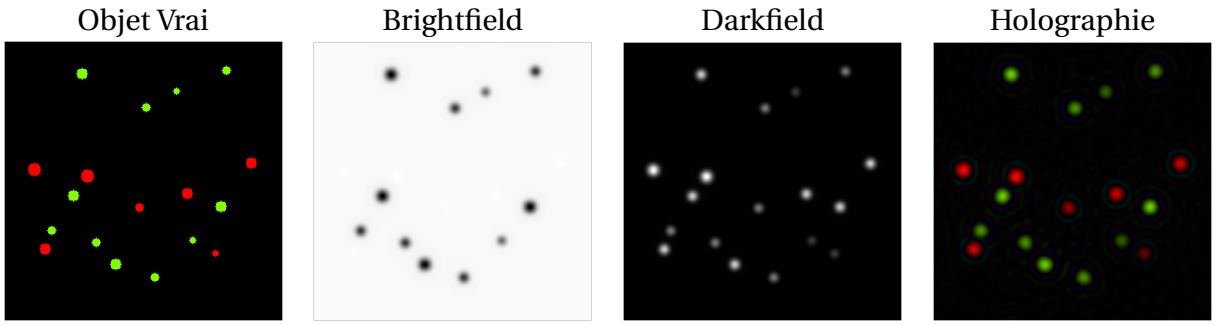


FIGURE 5.8. – Acquisitions sur un échantillon de billes transparentes. Les images en noir et blanc sont à valeurs réelles, et celles en couleurs sont à valeurs complexes, suivant la légende introduite Fig 5.3.

Ce type d'échantillon illustre bien les limites de l'imagerie *brightfield*, puisque les billes ayant un contraste de permittivité réel (rouge) sont tout simplement invisibles, alors qu'elles sont bien visibles sur l'image *darkfield*. Dans tous les cas, ni l'image *brightfield*, ni l'image *darkfield* ne permettent de retrouver la phase de l'échantillon, et il faut passer à des traitements numériques, comme la procédure RIM cohérent pour espérer retrouver la phase.

Nous passerons ici les considérations sur l'initialisation et le domaine de reconstruction, qui ont déjà été abordées dans la simulation précédente. Les reconstructions seront initialisées avec l'image *darkfield* et se feront sur le domaine de reconstruction étendu. On obtient alors la reconstruction présentée sur la Fig. 5.9 :

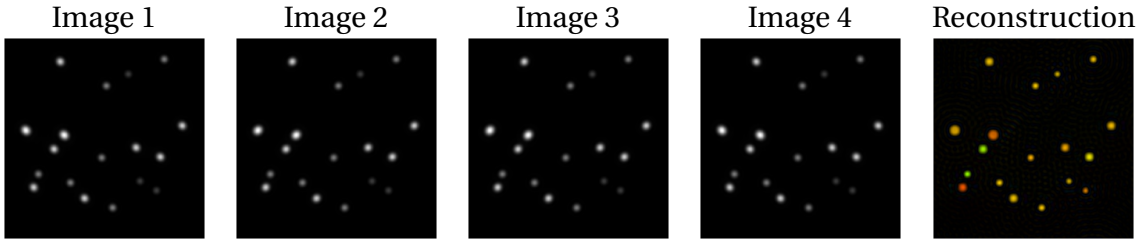


FIGURE 5.9. – Reconstruction RIM cohérente sur un échantillon de billes à images 1 à 4. Seulement une information de phase partielle, sur une zone limitée de l'échantillon a pu être retrouvée.

8. calculé à partir de la quantité complexe $\rho = 1 + i\delta\epsilon$
9. calculé à partir de la quantité complexe $\rho = \delta\epsilon$

Cette première inversion n'est pas très convaincante, puisque l'on arrive estimer une tendance de phase uniquement pour quatre billes, qui sont situées relativement proches les unes des autres. Ce type de résultat se rencontre également en ptychographie et est parfaitement explicable. Pour cela, il suffit de considérer un échantillon ayant deux éléments ponctuels, comme dans l'étude présentée dans la section 2.4.1. On s'intéressera ici directement au cas d'un échantillon complexe décrit par

$$\rho(\boldsymbol{r}) = \delta(\boldsymbol{r} - \frac{\boldsymbol{r}_0}{2})e^{i\phi_1} + \delta(\boldsymbol{r} + \frac{\boldsymbol{r}_0}{2})e^{i\phi_2} \tag{5.46}$$

avec ϕ_1 et ϕ_2 la phase respective des deux éléments considérés. En injectant cette expression dans le modèle de formation d'image (5.20), on obtient l'expression de l'image observée :

$$\begin{aligned} I^{(m)}(\boldsymbol{r}) = \quad & \gamma^{(m)}(0)\Big(|\mathscr{H}|^2(\boldsymbol{r} - \tfrac{\boldsymbol{r}_0}{2}) + |\mathscr{H}|^2(\boldsymbol{r} + \tfrac{\boldsymbol{r}_0}{2})\Big) \\ & +2\,\mathrm{Re}\Big(\gamma^{(m)}(\boldsymbol{r}_0)\mathscr{H}(\boldsymbol{r} - \tfrac{\boldsymbol{r}_0}{2})\mathscr{H}^*(\boldsymbol{r} + \tfrac{\boldsymbol{r}_0}{2})e^{i(\phi_1-\phi_2)}\Big) \end{aligned} \tag{5.47}$$

On retrouve trois termes dans l'image finale. Les deux premiers correspondent à l'intensité respective de chacune des sources, et ne sont évidemment pas sensibles à la phase de celles-ci. Seul le dernier terme, qui est un terme d'interaction entre ces deux sources, affiche une dépendance vis-à-vis de leur différence de phase. Ce terme est pondéré par $\gamma^{(m)}(\boldsymbol{r}_0)$, une fonction qui tend vers 0 lorsque $\boldsymbol{r}_0$ augmente. Par conséquent, plus les billes sont éloignées les unes des autres, moins l'image observée sera sensible à leur différence de phase.

Dans le cas de la microscopie cohérente telle que proposé ici, le choix des fonctions $\gamma^{(m)}$ est totalement libre, et l'on peut donc choisir des fonctions $\gamma^{(m)}$ qui décroissent moins rapidement. La façon la plus simple de le faire revient à réduire la taille de la pupille d'illumination $\widetilde{P}^{(m)}_{\mathrm{Illu}}$ dans le domaine de Fourier. Il semblerait alors que l'on doive réaliser un arbitrage entre résolution et sensibilité de phase, puisque réduire la taille de la pupille d'illumination réduit nécessairement le domaine des fréquences de l'objet qui peuvent être reconstruites.

On choisit alors d'utiliser quatre nouvelles acquisitions, dont les pupilles d'illuminations sont décrites avec des quarts de cercles dont le rayon est 5 fois plus petit que celui des pupilles présentées Fig 5.4. Les nouvelles images obtenues, ainsi que la reconstruction obtenue sont présentées Fig. 5.10.

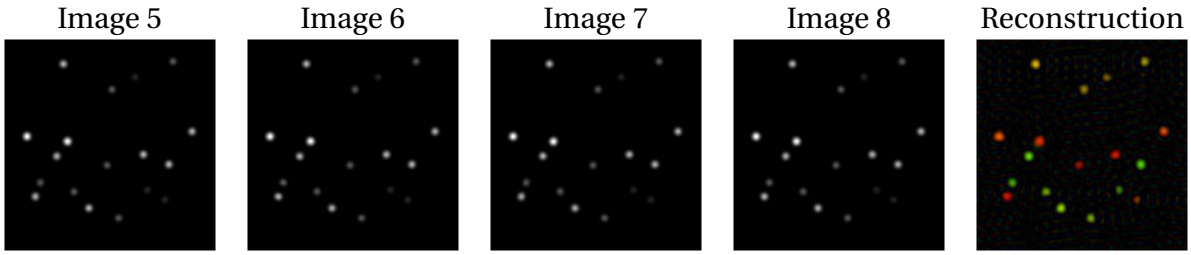


FIGURE 5.10. – Reconstruction RIM cohérente sur un échantillon de billes. Les images 5 à 8 correspondent à des éclairements de speckle beaucoup plus larges que ceux utilisées pour les images 1 à 4 Fig. 5.9. L'utilisation de speckles plus petit augmente la portée d'interaction et donc la sensibilité à la phase.

On constate alors que l'on arrive bien à augmenter le nombre billes correctement identifiées, ce qui était attendu avec l'analyse de l'équation (5.47), et ce sans compromettre la résolution finale [10]. Notons qu'il reste encore quelsues À ce niveau, il reste encore quelques de billes isolées qui sont restées non identifiables, parce qu'elles sont trop éloignées des autres. Notons néamoins que toutes ces billes sont estimées avec la même phase, ce qui est consistant avec ce l'objet vrai. La seule information manquante est le dephasage entre ce groupe de billes et celui qui a eté correctement indentifié. Notons que plus on réduit la taille des pupilles d'illumination, plus on s'approche d'éclairements en ondes planes et donc de la Ptychographie classique qui demande plus d'illuminations.

Cette étude préliminaire montre que si l'on trouve un bon compromis entre résolution et distance entre les billes, la méthode RIM cohérent permet de retrouver la phase à partir d'acquisition darkfield. Ce type d'imagerie pourrait par exemple être utilisé pour caractériser des contaminants dans sur un substrat. Cependant, il reste du travail pour améliorer la stabilité de la reconstruction et la robustesse au bruit.

5.5. Conclusion

Dans le cadre de la microscopie cohérente, le champ électrique au niveau de la caméra s'écrit comme la convolution d'une fonction d'appareil avec l'objet multiplié par le champ incident. On retrouve le modèle d'acquisition RIM utilisé en fluorescence, avec cependant un certain nombre de modifications : les fonctions d'intérêt sont maintenant complexes, et la caméra mesure directement la variance asymptotique (bruitée). La mesure étant réelle, une diversité d'images, obtenues par exemple en changeant la pupille d'illumination ou de collection, est nécessaire pour espérer retrouver l'objet complexe.

RIM se rapproche d'un schéma de ptychographie de Fourier multiplexée, ou chaque

10. Ceci est probablement du au fait que la structure de l'échantillon ne demande pas de super-résolution.

image est la somme incohérente des contributions de multiples ondes planes incidentes. L'approche RIM présente cependant un avantage non négligeable, puisqu'elle permet a priori d'utiliser des illuminations très denses dans l'espace de Fourier (typiquement des éclairements partiellement cohérents). On peut alors réduire le nombre d'illuminations tout en obtenant une reconstruction à haute résolution. Il devient possible de faire de la reconstruction de phase, dans les modalités *brightfield* et *darkfield*, avec moins de dix images.

Cependant, tout comme la ptychographie, la méthode est plus difficile à utiliser sur des échantillons parcimonieux. L'identification de la différence de phase entre deux émetteurs ponctuels requiert que la distance les séparant soit de l'ordre de la taille de la PSF et de la fonction d'auto-corrélation de l'éclairement. Les stratégies d'acquisition et de reconstruction doivent alors être optimisées pour combiner des images basses résolution (riches en information de phase), et des images hautes résolution. Une analyse détaillé des impacts de la taille de la PSF et de la fonction d'auto-corrélation, n'a cependant pas pu être réalisée dans le cadre de cette thèse.

Conclusion et perspectives

Une approche courante pour augmenter la résolution des microscopes de fluorescence consiste à éclairer l'échantillon avec des motifs qui ne sont pas spatialement uniformes (grilles de lumière, faisceau focalisé). La reconstruction haute résolution de l'échantillon est alors obtenues en combinant, généralement de manière linéaire, les images basse résolution. Cette combinaison requiert la connaissance de chaque motif d'illumination.

La microscopie RIM s'inscrit dans le cadre des microscopies super-résolues à éclairement structuré. Son originalité réside dans sa technique de reconstruction qui utilise uniquement la variance des images pour former une image super-résolue de l'objet. Cette approche est particulièrement intéressante, car elle supprime la nécessité de connaître ou d'estimer les motifs d'illuminations. Seule la connaissance *a priori* des statistiques des illuminations est nécessaire. Les illuminations de speckles sont alors un choix idéal puisque leurs statistiques sont parfaitement connues (Joseph W. GOODMAN 2007).

Jusqu'à présent, la densité de fluorescence était estimée avec la méthode RIM-VAR (LABOUESSE, IDIER, SENTENAC, ALLAIN et al. 2021), basée sur la minimisation de l'erreur au sens des moindres carrés entre la variance théorique d'un échantillon quelconque et la variance empirique des images réalisées. Si cette méthode permet en théorie d'obtenir un gain de résolution égal à ce que l'on peut espérer avec les autres méthodes par éclairements structurés, elle reste limitée par sa vitesse de convergence. Ce problème a été résolu an proposant deux nouveaux estimateurs (Chap. 3) RIM-CF et RIM-STD. Le premier est un estimateur basé sur la déconvolution linéaire par un filtre approprié de l'écart-type des différentes images mesurées.

Cet estimateur repose sur une modélisation approchée de l'écart-type des images. Il permet un gain de résolution d'un facteur proche de x1.5, pour un coût calculatoire minime de quelques transformées de Fourier. Pour améliorer la reconstruction, nous avons aussi développé un estimateur RIM-STD reposant sur une modélisation rigoureuse de l'écart-type. La densité de fluorescence est estimée de manière itérative de manière à minimiser l'erreur entre l'écart-type expérimental et théorique. L'utilisation de l'écart-type à la place de la variance nous a permis d'introduire un préconditionneur adapté, ne changeant pas au cours des itérations, qui fait gagner un à deux ordres de grandeurs sur la vitesse de convergence, tout en obtenant le même gain de résolution que la méthode RIM-VAR à convergence.

Les nouvelles méthodes d'inversion RIM accélérées sont aussi particulièrement intéressantes si l'on veut faire de l'imagerie tri-dimensionnelle. En effet, l'imagerie 3D repose sur un nombre de données important dont le traitement peut rapidement devenir fastidieux. Dans ce cas, le gain de temps des nouveaux algorithmes de recons-

truction est significatif, puisque le temps pris par la reconstruction d'un échantillon de 100 millions de voxels passe de plusieurs dizaines de minutes avec l'approche RIM-VAR à seulement quelques minutes avec RIM-STD, et quelques secondes avec l'approche RIM-CF. Ce sont donc des briques clés pour atteindre l'objectif de fournir des images super-résolues en temps réel.

En 3D, la méthode RIM est théoriquement capable de produire des images avec une résolution et un sectionnement optique comparable à ce qui est obtenu avec un microscope confocal idéal. J'ai montré que des acquisitions réalisées avec un dispositif de *remote focusing*, conservant la position relative de l'échantillon et de l'illumination lors de la construction de l'image, sont directement compatibles avec le formalisme de RIM. L'autre méthode d'acquisition, basée sur une translation de l'échantillon, permet également un gain de résolution et de sectionnement optique lorsqu'elles sont combinées au traitement RIM. Cependant, les performances sont moindres que celles obtenues avec des acquisitions en *remote focusing*, particulièrement si le budget de photon est limité.

Enfin, ce travail a aussi permis d'adapter la technique RIM à l'imagerie de diffraction. Il est ainsi possible de reconstruire de manière quantitative la permittivité complexe d'échantillon à partir d'images obtenues sous divers éclairements partiellement cohérents. L'approche RIM apporte également à une nouvelle vue sur les microscopies à champ brillant, à champ sombre et par ptychographie de Fourier. En particulier dans le cas de cette dernière, elle permet de diminuer le nombre d'images nécessaires à la reconstruction un échantillon de phase.

Du fait de la simplicité de son implémentation expérimentale (un diffuseur pour faire des speckles, peu de contrôle sur les illuminations) et de son traitement numérique (faire l'écart-type des images) les perspectives pour RIM sont nombreuses. Plusieurs techniques d'imagerie utilisant les algorithmes que j'ai développés sont déjà implémentées ou sont en cours de réalisation.

Par exemple, RIM a été introduit dans un microscope de fluorescence dont la profondeur de champ a été étendu sur plusieurs microns grâce à une rapide translation du plan focal avec une lentille accordable (MAZZELLA et al. 2024). Ce microscope permet d'obtenir une projection de l'échantillon sur le plan transverse. Il est particulièrement adapté à l'étude d'échantillons présentant une surface ondulante (comme un épithélium). RIM a été implémenté dans un microscope à deux photons [11]. dans lequel la fluorescence est reliée au carré de l'intensité de l'illumination.

D'un point de vue algorithmique, il suffit simplement de modifier l'expression de la PSF de collection et de la fonction d'auto-correlation du speckle. Cette dernière doit cependant être étudiée précisément pour chaque modalité, mais peut toujours se dériver à partir de la fonction de correlation 3D d'un speckle classique.

De manière plus surprenante, RIM a aussi été adapté à la microscopie CARS (FANTUZZI et al. 2023). La microscopie CARS est normalement une méthode d'imagerie cohérente, mais la configuration expérimentale a été adaptée pour rendre les images compatibles avec le formalisme RIM développé pour la microscopie de fluorescence. RIM permet

11. Les résultats ne sont pas encore publiés

alors d'obtenir le module au carré de la susceptibilité non linéaire de l'échantillon. Cependant, les résultats prometteurs de RIM cohérent pour estimer la permittivité complexe de l'échantillon permettent d'envisager une extension de CARS-RIM pour retrouver la partie imaginaire de la susceptibilité non-linéaire. Cela permettrait d'être moins pollué par le fond non résonnant du signal CARS qui correspond à la partie réelle de cette dernière.

La faiblesse principale de la méthode RIM par rapport aux microscopies par éclairements structurés conventionnelles (nécessitant la connaissance des illuminations) est l'augmentation du nombre d'images. Afin de pouvoir obtenir des statistiques empiriques stables, plusieurs centaines d'images sont nécessaires contre seulement une dizaine (M. G. L. GUSTAFSSON et al. 2000) lorsque les éclairements sont connus. Il est évidemment possible dans RIM de diminuer le temps d'intégration de chacune des images brutes par rapport à celui des microscopes SIM classiques. Toutes les comparaisons entre RIM et SIM ont d'ailleurs été faites avec le même budget de photons (MANGEAT et al. 2021).

Cependant, lorsque les images brutes deviennent fortement polluées par le bruit électronique de la caméra, la reconstruction RIM n'est plus possible. Cela est le cas si le budget de photons est très limité (pour des raisons de toxicité en particulier). Dans ce genre cas, on aimerait réduire le nombre d'images pour augmenter la quantité de photons par image. Le formalisme de RIM n'imposant aucune hypothèse *a priori* sur les illuminations, si ce n'est la connaissance de leur covariance, on peut envisager un méthode au second ordre avec des éclairements connus. Dans ce cas, on peut donc envisager d'optimiser des éclairements de telle sorte que leur covariance empirique converge plus vite vers la covariance asymptotique. Cette approche est en cours d'étude et permettrait de réduire le nombre d'illuminations tout en limitant les artefacts liés à l'utilisation d'une variance non asymptotique dans la reconstruction. Même si les illuminations devront être optimisées et donc contrôlées, il est probable qu'une technique d'imagerie ne nécessitant que la connaissance de la covariance des illuminations soit plus robuste aux aberrations (induites par des désalignements ou par la traversée de l'échantillon) qu'une reconstruction basée sur la connaissance de chaque motif d'illumination.

Bibliographie

[Aff+23] Kévin AFFANNOUKOUÉ, Simon LABOUESSE, Guillaume MAIRE et al. « Super-resolved total internal reflection fluorescence microscopy using random illuminations ». In : *Optica* 10.8 (2023), p. 1009-1017. DOI : 10.1364/OPTICA.487003. URL : https://opg.optica.org/optica/abstract.cfm?URI=optica-10-8-1009 (cf. p. 64).

[ADN69] R. D. ALLEN, G. B. DAVID et G. NOMARSKI. « The zeiss-Nomarski differential interference equipment for transmitted-light microscopy ». In : *Zeitschrift fur wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik* (1969) (cf. p. 150).

[Ayu+13] R. AYUK, H. GIOVANNINI, A. JOST et al. « Structured illumination fluorescence microscopy with distorted excitations using a filtered blind-SIM algorithm ». In : *Opt. Lett* 38.22 (2013), p. 4723-4726. DOI : 10.1364/OL.38.004723. URL : http://ol.osa.org/abstract.cfm?URI=ol-38-22-4723 (cf. p. 45).

[BCE06] Radu BALAN, Pete CASAZZA et Dan EDIDIN. « On signal reconstruction without phase ». In : *Appl. Comput. Harmon. Anal.* 20.3 (2006), p. 345-356. ISSN : 1063-5203. DOI : https://doi.org/10.1016/j.acha.2005.07.001. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063520305000667 (cf. p. 81, 189, 191).

[BC12] G. BECK et H.S.M. COXETER. *The Real Projective Plane*. Springer New York, 2012. ISBN : 9781461227342. URL : https://books.google.fr/books?id=uz3aBwAAQBAJ (cf. p. 193).

[BB97] Mario BERTERO et Patrizia BOCCACCI. *Introduction to inverse problems in imaging*. Institute of Physics Publishing, 1997 (cf. p. 91).

[Bet+06] Eric BETZIG, George H. PATTERSON, Rachid SOUGRAT et al. « Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution ». In : *Science* 313.5793 (2006), p. 1642-1645. DOI : 10.1126/science.1127344. URL : https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1127344 (cf. p. 39, 93).

[Bor+99] Max BORN, Emil WOLF, A. B. BHATIA et al. *Principles of Optics : Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*. 7e éd. Cambridge University Press, 1999 (cf. p. 140).

[Bot+08] E.J. BOTCHERBY, R. JUŠKAITIS, M.J. BOOTH et al. « An optical technique for remote focusing in microscopy ». In : *Optics Communications* 281.4 (2008), p. 880-887. ISSN : 0030-4018. DOI : https://doi.org/10.1016/j.optcom.2007.10.007. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003040180701005X (cf. p. 112).

[Bum98] Daniel BUMP. *Automorphic Forms and Representations*. Cambridge University Press, 1998 (cf. p. 173).

[CLS13] Emmanuel CANDES, Xiaodong LI et Mahdi SOLTANOLKOTABI. *Phase Retrieval from Coded Diffraction Patterns*. 2013. arXiv : 1310.3240 [cs.IT] (cf. p. 188).

[CL12] Emmanuel J. CANDES et Xiaodong LI. *Solving Quadratic Equations via PhaseLift when There Are About As Many Equations As Unknowns*. 2012. arXiv : 1208.6247 [cs.IT]. URL : https://arxiv.org/abs/1208.6247 (cf. p. 188-190).

[CLS15] Emmanuel J. CANDÈS, Xiaodong LI et Mahdi SOLTANOLKOTABI. « Phase Retrieval via Wirtinger Flow : Theory and Algorithms ». In : *IEEE Trans. on Information Theory* 61.4 (2015), p. 1985-2007. DOI : 10.1109/TIT.2015.2399924 (cf. p. 81, 145, 148, 150, 152, 188).

[Car97] R CARMINATI. « Phase properties of the optical near field ». In : *Physical Review E* 55.5 (1997), R4901 (cf. p. 142).

[CS21] Rémi CARMINATI et John C. SCHOTLAND. *Principles of Scattering and Transport of Light*. Cambridge University Press, 2021 (cf. p. 23, 25).

[Cha+16] Thomas CHAIGNE, Jérôme GATEAU, Marc ALLAIN et al. « Super-resolution photoacoustic fluctuation imaging with multiple speckle illumination ». In : *Optica* 3.1 (jan. 2016), p. 54-57. DOI : 10.1364/OPTICA.3.000054. URL : https://opg.optica.org/optica/abstract.cfm?URI=optica-3-1-54 (cf. p. 65).

[Cha+15] Nadya CHAKROVA, Rainer HEINTZMANN, Bernd RIEGER et al. « Studying different illumination patterns for resolution improvement in fluorescence microscopy ». In : *Optics Express* 23 (nov. 2015), p. 31367. DOI : 10.1364/OE.23.031367 (cf. p. 18, 44).

[CMD00] Etienne CUCHE, Pierre MARQUET et Christian DEPEURSINGE. « Spatial filtering for zero-order and twin-image elimination in digital off-axis holography ». In : *Appl. Opt.* 39.23 (août 2000), p. 4070-4075. DOI : 10.1364/AO.39.004070. URL : https://opg.optica.org/ao/abstract.cfm?URI=ao-39-23-4070 (cf. p. 150).

[Deb+21] Valentin DEBARNOT, Paul ESCANDE, Thomas MANGEAT et al. « Learning Low-Dimensional Models of Microscopes ». In : *IEEE Transactions on Computational Imaging* 7 (2021), p. 178-190. DOI : 10.1109/TCI.2020.3048295 (cf. p. 107).

[Dei85] K. DEIMLING. *Nonlinear Functional Analysis*. Springer, 1985 (cf. p. 56, 61, 173).

[Der+09] T. DERTINGER, R. COLYER, G. IYER et al. « Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.52 (2009), p. 22287-22292. DOI : 10.1073/pnas.0907866106 (cf. p. 18, 40, 119).

[Fan+23] Eric FANTUZZI, Sandro HEUKE, Simon LABOUESSE et al. « Wide-field coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy using random illuminations ». In : *Nature Photonics* 17 (sept. 2023), p. 1-8. DOI : 10.1038/s41566-023-01294-x (cf. p. 160).

[Ger71] Ralph W GERCHBERG. « Phase determination from image and diffraction plane pictures in the electron microscope ». In : *Optik* 34 (1971), p. 275-284 (cf. p. 145).

[Gir+23] Guillaume GIROUSSENS, Simon LABOUESSE, Marc ALLAIN et al. « Fast super-resolved reconstructions in fluorescence random illumination microscopy (RIM) ». 2023 (cf. p. 61).

[GKH07] Werner GÖBEL, Björn M KAMPA et Fritjof HELMCHEN. « Imaging cellular network dynamics in three dimensions using fast 3D laser scanning ». In : *Nature Methods* 4.5904 (2007), p. 73-79. DOI : 10.1038/nmeth989 (cf. p. 112).

[Goo96] J. W. GOODMAN. *Introduction to Fourier Optics*. 2nd. McGraw-Hill, 1996 (cf. p. 23, 39, 52).

[Goo07] Joseph W. GOODMAN. *Speckle Phenomena in Optics : Theory and Applications*. Coberts & Co, 2007. ISBN : 9780974707792. URL : https://books.google.fr/books?id=TynXEcS0DncC (cf. p. 18, 49, 50, 159).

[GS97] David GOTTLIEB et Chi-Wang SHU. « On the Gibbs Phenomenon and Its Resolution ». In : *SIAM Review* 39.4 (1997), p. 644-668. DOI : 10.1137/S0036144596301390. eprint : https://doi.org/10.1137/S0036144596301390. URL : https://doi.org/10.1137/S0036144596301390 (cf. p. 36).

[GS61] G. GOUBAU et F. SCHWERING. « On the guided propagation of electromagnetic wave beams ». In : *IRE Transactions on Antennas and Propagation* 9.3 (1961), p. 248-256. DOI : 10.1109/TAP.1961.1144999 (cf. p. 57).

[GE19] Ingo GREGOR et Jörg ENDERLEIN. « Image scanning microscopy ». In : *Current Opinion in Chemical Biology* 51 (2019). Chemical Genetics and Epigenetics • Molecular Imaging, p. 74-83. ISSN : 1367-5931. DOI : https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.05.011. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593119300456 (cf. p. 42).

[GAS00] Mats G. L. GUSTAFSSON, David A. AGARD et John W. SEDAT. « Doubling the lateral resolution of wide-field fluorescence microscopy using structured illumination ». In : *Proc. SPIE* 3919 (2000), p. 141-150. DOI : 10.1117/12.384189. URL : http://dx.doi.org/10.1117/12.384189 (cf. p. 42, 161).

[Gus+08] Mats G.L. GUSTAFSSON, Lin SHAO, Peter M. CARLTON et al. « Three-Dimensional Resolution Doubling in Wide-Field Fluorescence Microscopy by Structured Illumination ». In : *Biophys. J.* 94.12 (2008), p. 4957-4970. ISSN : 0006-3495. DOI : http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.120345 (cf. p. 117).

[Gus05] Mats GL GUSTAFSSON. « Nonlinear structured-illumination microscopy : wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.37 (2005), p. 13081-13086 (cf. p. 43).

[Hae+10] O. HAEBERLÉ, K. BELKEBIR, H. GIOVANINNI et al. « Tomographic diffractive microscopy : basics, techniques and perspectives ». In : *Journal of Modern Optics* 57.9 (2010), p. 686-699. DOI : 10.1080/09500340.2010.493622. eprint : http://dx.doi.org/10.1080/09500340.2010.493622. URL : http://dx.doi.org/10.1080/09500340.2010.493622 (cf. p. 48).

[HNO06] P. HANSEN, J. NAGY et D. O'LEARY. *Deblurring Images*. SIAM, 2006. DOI : 10.1137/1.9780898718874 (cf. p. 68).

[Hay82] M. HAYES. « The reconstruction of a multidimensional sequence from the phase or magnitude of its Fourier transform ». In : *IEEE Transactions on Acoustics, Speech, and Signal Processing* 30.2 (1982), p. 140-154. DOI : 10.1109/TASSP.1982.1163863 (cf. p. 189).

[HC99] Rainer HEINTZMANN et Christoph G. CREMER. « Laterally modulated excitation microscopy : improvement of resolution by using a diffraction grating ». In : *Proc. SPIE* 3568 (1999), p. 185-196. DOI : 10.1117/12.336833. URL : http://dx.doi.org/10.1117/12.336833 (cf. p. 42).

[HW94] SW HELL et J WICHMANN. « Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. » In : *Optics letters* (1994). DOI : 10.1364/ol.19.000780 (cf. p. 39).

[Hua+08] B HUANG, Wang W, M BATES et al. « Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy ». In : *Science* (2008) (cf. p. 120).

[Hua+21] Meng HUANG, Yi RONG, Yang WANG et al. « Almost everywhere generalized phase retrieval ». In : *Appl. Comput. Harmon. Anal.* 50 (2021), p. 16-33. ISSN : 1063-5203. DOI : https://doi.org/10.1016/j.acha.2020.08.002. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063520320300634 (cf. p. 190, 193).

[HL04] David R. HUNTER et Kenneth LANGE. « A Tutorial on MM Algorithms ». In : *The American Statistician* 58.1 (2004), p. 30-37. ISSN : 00031305. URL : http://www.jstor.org/stable/27643496 (visité le 08/04/2024) (cf. p. 178).

[Idi08] Jérôme IDIER, éd. *Bayesian Approach to Inverse Problems*. ISTE Ltd et John Wiley & Sons Inc, 2008 (cf. p. 35, 38).

[Idi+18] Jérôme IDIER, Simon LABOUESSE, Marc ALLAIN et al. « On the Superresolution Capacity of Imagers Using Unknown Speckle Illuminations ». In : *IEEE Trans. on Computational Imaging* 4.1 (2018), p. 87-98. DOI : 10.1109/TCI.2017.2771729 (cf. p. 46, 52, 53, 69).

[Jas+22] Marion JASNIN, Jordan HERVY, Stéphanie BALOR et al. « Elasticity of podosome actin networks produces nanonewton protrusive forces ». In : *Nat. Commun.* 13 (2022). ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/s41467-022-30652-6. URL : https://doi.org/10.1038/s41467-022-30652-6 (cf. p. 106).

[Jon+11] Sara A. JONES, Sang-Hee SHIM, Jiang HE et al. « Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells ». In : *Nature Methods* (2011). DOI : 10.1038/nmeth.1605 (cf. p. 120).

[Jue+08] Manuel F JUETTE, Travis J GOULD, Mark D LESSARD et al. « Three-dimensional sub–100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples ». In : *Nature Methods* (2008). DOI : 10.1038/nmeth.1211 (cf. p. 120).

[Kel+08] Philipp J. KELLER, Annette D. SCHMIDT, Joachim WITTBRODT et al. « Reconstruction of Zebrafish Early Embryonic Development by Scanned Light Sheet Microscopy ». In : *Science* 322.5904 (2008), p. 1065-1069. DOI : 10.1126/science.1162493. eprint : https://www.science.org/doi/pdf/10.1126/science.1162493. URL : https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1162493 (cf. p. 116).

[Ken09] Fish N. KENNETH. « Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy ». In : *Current Protocols in Cytometry* (2009). DOI : 10.1002/0471142956.cy1218s50 (cf. p. 23).

[Kha+19] Samira KHADIR, Patrick C CHAUMET, Guillaume BAFFOU et al. « Quantitative model of the image of a radiating dipole through a microscope ». In : *JOSA A* 36.4 (2019), p. 478-484 (cf. p. 24).

[Lab+24] Simon LABOUESSE, Jérôme IDIER, Marc ALLAIN et al. « Superresolution capacity of variance-based stochastic fluorescence microscopy : From random illumination microscopy to superresolved optical fluctuation imaging ». In : *Phys. Rev. A* 109 (3 mar. 2024), p. 033525. DOI : 10.1103/PhysRevA.109.033525. URL : https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevA.109.033525 (cf. p. 40, 52, 54).

[Lab+21a] Simon LABOUESSE, Jérôme IDIER, Anne SENTENAC, Marc ALLAIN et al. « Proof of the resolution-doubling of Random Illumination Microscopy using the variance of the speckled images ». In : *29th EUSIPCO*. 2021, p. 1159-1162. DOI : 10.23919/EUSIPCO54536.2021.9616038 (cf. p. 46, 52, 54, 159).

[Lab+21b] Simon LABOUESSE, Jérôme IDIER, Anne SENTENAC, Thomas MANGEAT et al. « Random Illumination Microscopy from Variance Images ». In : *28th EUSIPCO*. 2021, p. 785-789. DOI : 10.23919/Eusipco47968.2020.9287651 (cf. p. 46, 48, 56, 58, 67, 72, 73, 107).

[Lab+17] Simon LABOUESSE, Awoke NEGASH, Jérôme IDIER et al. « Joint reconstruction strategy for structured illumination microscopy with unknown illuminations ». In : *IEEE Transactions on Image Processing* 26.5 (2017), p. 1-14. DOI : 10.1109/TIP.2017.2675200. URL : http://arxiv.org/abs/1512.06260 (cf. p. 45).

[LSX16] Amit LAL, Chunyan SHAN et Peng XI. « Structured Illumination Microscopy Image Reconstruction Algorithm ». In : *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* (2016) (cf. p. 44).

[Mai+18] Sébastien MAILFERT, Jérôme TOUVIER, Lamia BENYOUSSEF et al. « A theoretical high-density nanoscopy study leads to the design of UNLOC, a parameter-free algorithm ». In : *Biophysical journal* 115.3 (2018), p. 565-576 (cf. p. 40).

[Man+21] Thomas MANGEAT, Simon LABOUESSE, Marc ALLAIN et al. « Super-resolved live-cell imaging using random illumination microscopy ». In : *Cell Rep. Meth.* 1.1 (2021), p. 100009. ISSN : 2667-2375. DOI : https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100009. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667237521000096 (cf. p. 18, 46, 67, 73, 106, 127, 161).

[Maz+24] Lorry MAZZELLA, Thomas MANGEAT, Guillaume GIROUSSENS et al. « Extended-depth of field random illumination microscopy, EDF-RIM, provides super-resolved projective imaging ». In : *bioRxiv* (2024). DOI : 10.1101/2023.10.30.564754 (cf. p. 64, 160).

[Mer19] J. MERTZ. *Introduction to Optical Microscopy*. 2nd. Cambridge University Press, 2019. ISBN : 9781108428309. URL : https://books.google.fr/books?id=2DCdDwAAQBAJ (cf. p. 17, 23, 28, 48, 138, 142, 143, 173).

[MS87] Michael I. MILLER et D. L. SNYDER. « The Role of Likelihood and Entropy in Incomplete-Data Problems : Applications to Estimating Point-Process Intensities and Toeplitz Constrained Covariances ». In : 75.7 (juil. 1987), p. 892-906 (cf. p. 69).

[Min+15] Kim MINKWAN, ChungHyun PARK, Christophe RODRIGUEZ et al. « Superresolution imaging with optical fluctuation using speckle patterns illumination ». In : *Scientific Reports* (2015). DOI : 10.1038/srep16525. URL : https://doi.org/10.1038/srep16525 (cf. p. 45, 79).

[Mud+12] Emeric MUDRY, Kamal BELKEBIR, J. GIRARD et al. « Structured illumination microscopy using unknown speckle patterns ». In : *Nat. Photonics* 6.5 (2012), p. 312-315 (cf. p. 42, 45).

[Mül+98] J. MÜLLER-QUADE, H. AAGEDAL, Th. BETH et al. « Algorithmic design of diffractive optical systems for information processing ». In : *Physica D : Nonlinear Phenomena* 120.1 (1998). Proceedings of the Fourth Workshop on Physics and Consumption, p. 196-205. ISSN : 0167-2789. DOI : https://doi.org/10.1016/S0167-2789(98)00055-4. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167278998000554 (cf. p. 70).

[MOJ83] D.C. MUNSON, J.D. O'BRIEN et W.K. JENKINS. « A tomographic formulation of spotlight-mode synthetic aperture radar ». In : *Proceedings of the IEEE* 71.8 (1983), p. 917-925. DOI : 10.1109/PROC.1983.12698 (cf. p. 48).

[NJW97] M. A. A. NEIL, R. JUŠKAITIS et T. WILSON. « Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope ». In : *Opt. Lett.* 22.24 (déc. 1997), p. 1905-1907. DOI : 10.1364/OL.22.001905. URL : https://opg.optica.org/ol/abstract.cfm?URI=ol-22-24-1905 (cf. p. 117).

[ORW04] Raimund J OBER, Sripad RAM et E. Sally WARD. « Localization accuracy in single-molecule microscopy ». In : *Biophysical journal* (2004) (cf. p. 39).

[Paw01] Yudi PAWITAN. *In all Likelihood : Statistical Modelling and Inference Using Likelihood*. Oxford Science Publications, 2001 (cf. p. 45).

[Paw15] James B. PAWLEY. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 2e éd. Springer New York, NY, 2015 (cf. p. 39, 116).

[Pea36] Karl PEARSON. « Method of moments and method of maximum likelihood ». In : *Biometrika* 28.1/2 (1936), p. 34-59 (cf. p. 45, 68).

[Por+22] Marion PORTES, Thomas MANGEAT, Natacha ESCALLIER et al. « Nanoscale architecture and coordination of actin cores within the sealing zone of human osteoclasts ». In : *eLife* 11 (2022). Sous la dir. de Maria GRANO, Mone ZAIDI et L Shannon HOLLIDAY, e75610. ISSN : 2050-084X. DOI : 10.7554/eLife.75610. URL : https://doi.org/10.7554/eLife.75610 (cf. p. 106).

[Pra+04] Prashand PRABHAT, Sripad RAM, E. Sally WARD et al. « Simultaneous imaging of different focal planes in fluorescence microscopy for the study of cellular dynamics in three dimensions ». In : *IEEE Trans. Nanobioscience* (2004). DOI : 10.1109/tnb.2004.837899 (cf. p. 114).

[Pra+22] Kirti PRAKASH, Benedict DIEDERICH, Rainer HEINTZMANN et al. « Super-resolution microscopy : a brief history and new avenues ». In : *Phil. Trans. R. Soc. A.* 380 (2022), p. 20210110 (cf. p. 40).

[QBP16] Tianyu QIU, Prabhu BABU et Daniel P. PALOMAR. « PRIME : Phase Retrieval via Majorization-Minimization ». In : *IEEE Trans. on Signal Processing* 64.19 (oct. 2016), p. 5174-5186. DOI : 10.1109/tsp.2016.2585084 (cf. p. 86, 178).

[Ric72] William Hadley RICHARDSON. « Bayesian-based iterative method of image restoration ». In : *JoSA* 62.1 (1972), p. 55-59 (cf. p. 38).

[RB92] J. M. RODENBURG et R. H. T. BATES. « The theory of super-resolution electron microscopy via Wigner-distribution deconvolution ». In : *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A : Physical and Engineering Sciences* 339 (1655 juin 1992). DOI : https://doi.org/10.1098/rsta.1992.0050 (cf. p. 145).

[Rod13] Paul RODRIGUEZ. « Total variation regularization algorithms for images corrupted with different noise models : a review ». In : *Journal of Electrical and Computer Engineering* 2013.1 (2013), p. 217021 (cf. p. 38).

[ROF92] Leonid I. RUDIN, Stanley OSHER et Emad FATEMI. « Nonlinear total variation based noise removal algorithms ». In : *Physica D : Nonlinear Phenomena* 60.1 (1992), p. 259-268. ISSN : 0167-2789. DOI : https://doi.org/10.1016/0167-2789(92)90242-F. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016727899290242F (cf. p. 107).

[RBZ06] Michael J RUST, Mark BATES et Xiaowei ZHUANG. « Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) ». In : *Nat. Meth.* 3 (2006), p. 793-796. DOI : 10.1038/nmeth929. URL : https://doi.org/10.1038/nmeth929 (cf. p. 39).

[Sag+17] Daniel SAGE, Lauréne DONATI, Ferréol SOULEZ et al. « DeconvolutionLab2 : An open-source software for deconvolution microscopy ». In : *Methods* 115 (2017). Image Processing for Biologists, p. 28-41. ISSN : 1046-2023. DOI : https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.12.015. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202316305096 (cf. p. 38, 130).

[Say52] D. SAYRE. « Some implications of a theorem due to Shannon ». In : *Acta Crystallographica* 5.6 (nov. 1952), p. 843. DOI : 10.1107/S0365110X52002276. URL : https://doi.org/10.1107/S0365110X52002276 (cf. p. 188).

[Sch+19] Lothar SCHERMELLEH, Alexia FERRAND, Thomas HUSER et al. « Super-resolution microscopy demystified ». In : *Nat. Cell Biol.* 21.1 (jan. 2019), p. 72-84. ISSN : 1465-7392. DOI : 10.1038/s41556-018-0251-8 (cf. p. 41).

[Sch+21] Roman SCHMIDT, Tobias WEIHS, Christian A. WURM et al. « MINFLUX nanometer-scale 3D imaging and microsecond-range tracking on a common fluorescence microscope ». In : *Nature Communications* (2021). DOI : 10.1038/s41467-021-21652-z (cf. p. 39).

[Sha49] Claude E. SHANNON. « Communication in the presence of noise ». In : *Proceedings of the Institute of Radio Engineers* 37.1 (1949) (cf. p. 67).

[She+15] Y. SHECHTMAN, Y.C. ELDAR, O. COHEN et al. « Phase Retrieval with Application to Optical Imaging ». In : *IEEE Signal Processing Magazine* 32.3 (2015), p. 87-109. DOI : 10.1109/MSP.2014.2352673 (cf. p. 189, 190).

[SKL14] Colin J. R. SHEPPARD, Shan Shan KOU et Jiao LIN. « The Green-function transform and wave propagation ». In : (2014). arXiv : 1401.4557 [physics.optics] (cf. p. 25).

[SFW09] Sapna A SHROFF, James R FIENUP et David R WILLIAMS. « Phase-shift estimation in sinusoidally illuminated images for lateral superresolution ». In : *JOSA A* 26.2 (2009), p. 413-424 (cf. p. 44).

[Tan77] William J. TANGO. « The circle polynomials of Zernike and their application in optics ». In : *Applied physics* 13 (1977). DOI : 10.1007/BF00882606 (cf. p. 57).

[Tia+14] Lei TIAN, Xiao LI, Kannan RAMCHANDRAN et al. « Multiplexed coded illumination for Fourier Ptychography with an LED array microscope ». In : *Biomed. Opt. Express* 5.7 (juil. 2014), p. 2376-2389. DOI : 10.1364/BOE.5.002376. URL : https://opg.optica.org/boe/abstract.cfm?URI=boe-5-7-2376 (cf. p. 146).

[TW15] Lei TIAN et Laura WALLER. « Quantitative differential phase contrast imaging in an LED array microscope ». In : *Opt. Express* 23.9 (mai 2015), p. 11394-11403. DOI : 10.1364/OE.23.011394. URL : https://opg.optica.org/oe/abstract.cfm?URI=oe-23-9-11394 (cf. p. 151).

[Tik+77] A. N. TIKHONOV, A. V. GONCHARSKY, V. V. STEPANOV et al. *Numerical Methods for the Solution of Ill-Posed Problems*. 1977. DOI : https://doi.org/10.1007/978-94-015-8480-7 (cf. p. 37, 74, 78).

[VF03] P.M. VAN DEN BERG et J.T. FOKKEMA. « Removal of undesired wavefields related to the casing of a microwave scanner ». In : *IEEE Trans. on Microwave Theory and Techniques* 51.1 (2003), p. 187-192 (cf. p. 48).

[VM05] Cathie VENTALON et Jerome MERTZ. « Quasi-confocal fluorescence sectioning with dynamic speckle illumination ». In : *Opt. Lett.* 30.24 (2005), p. 3350-3352. DOI : 10.1364/OL.30.003350. URL : http://ol.osa.org/abstract.cfm?URI=ol-30-24-3350 (cf. p. 45, 62, 78, 108, 118, 131).

[Vic+07] Nathalie B VICENTE, Javier E Diaz ZAMBONI, Javier F ADUR et al. « Photobleaching correction in fluorescence microscopy images ». In : *Journal of Physics : Conference Series*. T. 90. 1. IOP Publishing. 2007, p. 012068 (cf. p. 32).

[WX19] Yang WANG et Zhiqiang XU. « Generalized phase retrieval : Measurement number, matrix recovery and beyond ». In : *Appl. Comput. Harmon. Anal.* 47.2 (2019), p. 423-446. ISSN : 1063-5203. DOI : https://doi.org/10.1016/j.acha.2017.09.003 (cf. p. 190).

[WW49] G. D. WASSERMANN et Emil WOLF. « On the Theory of Aplanatic Aspheric Systems ». In : *Proceedings of the Physical Society. Section B* 62.1 (1949), p. 2. DOI : 10.1088/0370-1301/62/1/302. URL : https://dx.doi.org/10.1088/0370-1301/62/1/302 (cf. p. 23).

[Wic+13] Kai WICKER, Ondrej MANDULA, Gerrit BEST et al. « Phase optimisation for structured illumination microscopy ». In : *Optics Express* 21.2 (2013), p. 2032-2049. DOI : 10.1364/OE.21.002032. URL : http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=oe-21-2-2032 (cf. p. 44).

[Wol82] Emil WOLF. « New theory of partial coherence in the space–frequency domain. Part I : spectra and cross spectra of steady-state sources ». In : *J. Opt. Soc. Am.* 72.3 (mar. 1982), p. 343-351. DOI : 10.1364/JOSA.72.000343. URL : https://opg.optica.org/abstract.cfm?URI=josa-72-3-343 (cf. p. 57).

[WN99] Stephen WRIGHT et Jorge NOCEDAL. *Numerical Optimization*. 2nd. Springer, 1999 (cf. p. 73, 83, 85-87, 149, 180).

[Zen+17] Zhi-ping ZENG, Hao XIE, Long CHEN et al. « Computational methods in super-resolution microscopy ». In : *Frontiers of Information Technology & Electronic Engineering* (2017). DOI : https://doi.org/10.1631/FITEE.1601628 (cf. p. 38).

[Zha+17] Huishuai ZHANG, Yi ZHOU, Yingbin LIANG et al. « A Nonconvex Approach for Phase Retrieval : Reshaped Wirtinger Flow and Incremental Algorithms ». In : *J. Mach. Learn. Res.* 18.1 (jan. 2017), p. 5164-5198. ISSN : 1532-4435 (cf. p. 82).

[ZHY13] Guoan ZHENG, Roarke HORSTMEYER et Changhuei YANG. « Wide-field, high-resolution Fourier ptychographic microscopy ». In : *Nature photonics* 7.9 (2013), p. 739-745 (cf. p. 145).

[ZKY11] Guoan ZHENG, Christopher KOLNER et Changhuei YANG. « Microscopy refocusing and dark-field imaging by using a simple LED array ». In : *Optics letters* 36.20 (2011), p. 3987-3989 (cf. p. 145).

ANNEXES

A. Preuve de la Proposition 1

A.1. Rappels sur RIM

Un élément clé dans le cadre de RIM est l'expression de la variance à partir du noyau d'un opérateur intégral t, défini comme

$$t(\boldsymbol{r},\boldsymbol{r}') = h(\boldsymbol{r})\gamma(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}')h(\boldsymbol{r}) \tag{.1}$$

Avec h la PSF du microscope et γ la fonction d'auto-corrélation des illuminations. En microscopie de fluorescence, ces deux fonctions sont supposées positives, intégrable et de carré intégrable MERTZ 2019. Par ailleurs, ce noyau vérifie :

$$\iint |t(\boldsymbol{r},\boldsymbol{r}')|^2 \mathrm{d}\boldsymbol{r}\mathrm{d}\boldsymbol{r}' < \infty \tag{.2}$$

un résultat qui se vérifie aisément, utilisant le fait que γ soit bornée[1]. Le noyau t, peut être canoniquement associé à l'opérateur intégral :

$$\begin{array}{rll} T & : \mathscr{L}_2(\mathbb{R}^d) & \to \mathscr{L}_2(\mathbb{R}^d) \\ & \Phi & \mapsto \int t(\cdot,\boldsymbol{r}')\Phi(\boldsymbol{r}')\mathrm{d}\boldsymbol{r}' \end{array} \tag{.3}$$

La condition (.2), nous permet par ailleurs d'affirmer que l'opérateur T est un opérateur intégral de Hilbert-Schmidt (BUMP 1998). Cet opérateur est donc un endomorphisme continu et compact. De plus, le noyau t étant symétrique, le théorème spectral nous garanti que ce noyau est séparable sous la forme :

$$t(\boldsymbol{r},\boldsymbol{r}') = \sum_{k\geqslant 1} \lambda_k \Psi_k(\boldsymbol{r})\Psi_k(\boldsymbol{r}') \tag{.4}$$

Avec $(\lambda_k)_{k\geqslant 1}$ une suite de réels positifs, décroissante, et de limite nulle, et $(\Psi_k)_{k\geqslant 1}$ les fonctions fonctions propres de l'opérateur T. Rigoureusement, les quantités $(\lambda_k)_{k\geqslant 1}$ et $(\Psi_k)_{k\geqslant 1}$ sont les éléments propres de l'opérateur T, mais nous les appellerons également, par extension, les éléments propres du noyau t.

Dans cette section, nous prouverons que sous les hypothèses standard en microscopie de fluorescence présentées dans le chapitre 2, principale h et γ, sont des fonctions positives et intégrables sur $\mathbb{R}^d$, la fonction u_1 est positive, avec un support en Fourier de correspondant exactement $\Omega_{h\gamma}$, la convolution des domaines Ω_h et Ω_γ.

A.2. Positivité de u_1

Afin de prouver la positivité du vecteur propre principal u_1 nous allons donc nous baser sur le théorème de Krein-Rutman tel que donné dans DEIMLING 1985[Th.19.2]. Ce théorème s'énonce (après traduction en français) :

1. On a par exemple $\forall \boldsymbol{r} |\gamma(\boldsymbol{r})| \leqslant \gamma(\boldsymbol{0})$

Théorème 3 *Soit X un espace de Banach, et $K \subseteq X$ un cône convexe tel que $K \ominus K$ soit dense dans X (On dit que K est un cône total). Soit $T : X \to X$ un opérateur compact positif $T(K) \subseteq K$, avec un rayon spectral positif $r(T)$. Alors $r(T)$ est une valeur propre de T et le vecteur propre associé appartient à $K \setminus \{0\}$.*

Pour prouver la positivité de u_1, il suffit de vérifier que l'opérateur T introduit (.3), vérifie effectivement les conditions d'application du théorème. Dans la suite nous nous placerons donc dans l'espace $X = L_2(\mathbb{R}^d)$ de carré intégrable, muni de la norme :

$$|f|^2 = \langle f|f\rangle\,,$$
$$\text{avec,} \qquad \langle f|g\rangle = \int f(\boldsymbol{x})g^*(\boldsymbol{x})\mathrm{d}\boldsymbol{x},$$

le produit scalaire usuel pour les fonctions. Enfin, nous considèrerons le cône K des fonctions à valeur non négatives :

$$K = \{f \in X \,|\, \forall \boldsymbol{x} \in \mathbb{R}^d, f(\boldsymbol{x}) \geqslant 0\} \tag{.5}$$

Dans ce cas :

1. Il est clair que K est un cône total puisque toute fonction $f \in X$ peut s'écrire comme $f = f^+ - f^-$ avec $f^+ = \max(0, f)$ et $f^- = -\min(f, 0)$, qui sont toutes les deux des fonctions non négatives.
2. L'opérateur T étant un opérateur de Hilbert-Schmidt, il s'agit d'un endomorphisme compact.
3. Le noyau t étant non négatif, on en déduit par positivité de l'intégrale que T est un opérateur positif (*i.e.*, $\forall u, \langle u|Tu\rangle \geqslant 0$).
4. Le rayon spectral de T est alors λ_1, qui est non nul dès que t est non nul.

Ceci garanti que l'opérateur T vérifie le théorème de Krein-Rutman. Par conséquent, son vecteur propre principal Ψ_1, et sa version normée $u_1 = \sqrt{\lambda}\Psi_1$, sont tous deux des éléments K, et par conséquent, non-négatifs.

A.3. Preuve du support spectral Ω_{u_1}

La démonstration précédente permet d'obtenir une façon de linéariser l'écart-type modèle, en utilisant une décomposition tronquée à l'ordre 1, dont détaillé dans la section 2.3.3. Le modèle linéarisé (2.35) étant un problème convolution, le support spectral du vecteur u_1 est alors requis pour déterminer les fréquences de l'objet qui seront éventuellement retrouvables après une déconvolution.

Avant de commencer la démonstration à proprement parler, remarquons, en passant dans le domaine de Fourier, que les transformées de Fourier $\widetilde{u}_k$ des fonctions propres de T, sont toutes des fonctions propres d'un autre opérateur intégral $\widetilde{T}$. En

effet, pour tout entier k, on a :

$$\begin{aligned}
\lambda_k u_k(\boldsymbol{x}) &= \int h(\boldsymbol{x}) h^*(\boldsymbol{x}') \gamma_E(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}') u_k(\boldsymbol{x}') \mathrm{d}\boldsymbol{x}' \\
\lambda_k \int u_k(\boldsymbol{x}) e^{i\boldsymbol{k}\cdot\boldsymbol{x}} \mathrm{d}\boldsymbol{x} &= \int h(\boldsymbol{x}) h^*(\boldsymbol{x}') \gamma_E(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}') u_k(\boldsymbol{x}') e^{i\boldsymbol{k}\cdot\boldsymbol{x}} \mathrm{d}\boldsymbol{x}' \mathrm{d}\boldsymbol{x} \\
\lambda_k \widetilde{u}_k(\boldsymbol{k}) &= \iint \widetilde{h}(\boldsymbol{k}_1) \widetilde{h^*}(\boldsymbol{k}_2) \widetilde{\gamma}(\boldsymbol{k}3) \widetilde{u}_k(\boldsymbol{k}') e^{i\boldsymbol{x}\cdot(\boldsymbol{k}-\boldsymbol{k}_1-\boldsymbol{k}_3)} e^{-i\boldsymbol{x}'\cdot(\boldsymbol{k}'+\boldsymbol{k}_2-\boldsymbol{k}_3)} \mathrm{d}\boldsymbol{k}_{1,2,3} \mathrm{d}\boldsymbol{k}' \mathrm{d}\boldsymbol{x} \mathrm{d}\boldsymbol{x}' \\
\lambda_k \widetilde{u}_k(\boldsymbol{k}) &= \iint \widetilde{h}(\boldsymbol{k}_1) \widetilde{h^*}(\boldsymbol{k}_2) \widetilde{\gamma}(\boldsymbol{k}3) \widetilde{u}_k(\boldsymbol{k}') \delta(\boldsymbol{k}-\boldsymbol{k}_1-\boldsymbol{k}_3) \delta(\boldsymbol{k}'+\boldsymbol{k}_2-\boldsymbol{k}_3) \mathrm{d}\boldsymbol{k}_{1,2,3} \mathrm{d}\boldsymbol{k}' \\
\lambda_k \widetilde{u}_k(\boldsymbol{k}) &= \int \Big(\int \widetilde{h}(\boldsymbol{k}-\boldsymbol{k}_3) \widetilde{h^*}(\boldsymbol{k}_3-\boldsymbol{k}') \widetilde{\gamma}(\boldsymbol{k}3) \mathrm{d}\boldsymbol{k}_3 \Big) \widetilde{u}_k(\boldsymbol{k}') \mathrm{d}\boldsymbol{k}' \\
\lambda_k \widetilde{u}_k(\boldsymbol{k}) &= \int \widetilde{t}(\boldsymbol{k},\boldsymbol{k}') \widetilde{u}_k(\boldsymbol{k}') \mathrm{d}\boldsymbol{k}' \qquad (.6)
\end{aligned}$$

où $\widetilde{t}(\boldsymbol{k},\boldsymbol{k}')$ est le noyau de l'opérateur intégral $\widetilde{T}$ donné par :

$$\widetilde{t}(\boldsymbol{k},\boldsymbol{k}') = \int \widetilde{h}(\boldsymbol{k}-\boldsymbol{\xi}) \widetilde{h^*}(\boldsymbol{\xi}-\boldsymbol{k}') \widetilde{\gamma}(\boldsymbol{\xi}) \mathrm{d}\boldsymbol{\xi} \qquad (.7)$$

$$\widetilde{t}(\boldsymbol{k},\boldsymbol{k}') = \int \widetilde{h}(\boldsymbol{k}-\boldsymbol{\xi}) \widetilde{h}^*(\boldsymbol{k}'-\boldsymbol{\xi}) \widetilde{\gamma}(\boldsymbol{\xi}) \mathrm{d}\boldsymbol{\xi}. \qquad (.8)$$

Remarquons de plus qu'avec les hypothèses de pupilles non aberrées, les fonctions $\widetilde{h}$ et $\widetilde{\gamma}$ sont réelles et non-négatives. En utilisant un raisonnement similaire à celui présenté précédemment, on peut une nouvelle fois appliquer le théorème de Krein-Rutman pour montrer que $\widetilde{u}_1$ est non-négatif. Il reste donc alors à déterminer le domaine sur lequel $\widetilde{u}_1$ est non nul.

A.3.1. Résultats intermédiaires

Reprenons tout d'abord l'expression du noyau (.8), et introduisons

$$\widetilde{f}_{\boldsymbol{k}} : \boldsymbol{k}' \mapsto t(\boldsymbol{k},\boldsymbol{k}') \qquad (.9)$$

$$\widetilde{g}_{\boldsymbol{k}'} : \boldsymbol{\xi} \mapsto \widetilde{\gamma}_E(\boldsymbol{\xi}) \widetilde{h}^*(\boldsymbol{k}-\boldsymbol{\xi}) \qquad (.10)$$

de manière que $\widetilde{f}_{\boldsymbol{k}}$ soit la convolution entre les fonctions $\widetilde{h}$ et $\widetilde{g}'_{\boldsymbol{k}}$. On a alors par construction

$$\begin{aligned}
\Omega_{g_{\boldsymbol{k}'}} &= \Omega_\gamma \cap \big(\{\boldsymbol{k}\} \ominus \Omega_\mathrm{h} \big), \qquad (.11) \\
\Omega_{f_{\boldsymbol{k}}} &= \Omega_{g_{\boldsymbol{k}'}} \oplus \Omega_\mathrm{h}
\end{aligned}$$

ce qui nous permet de déduire le corollaire suivant :

Corollaire 1 *On a :*

— *(i)* $\forall \boldsymbol{k} \notin \Omega_{\mathrm{h}\gamma}$, $\Omega_{f_{\boldsymbol{k}}} = \varnothing$. *La justification est immédiate en remarquant que* $\Omega_{g_{\boldsymbol{k}}}$ *est également vide.*

— *(ii) Lorsque* $\Omega_\gamma \subseteq \Omega_{\mathrm{h}}$*, ce qui correspond aux d'applications en épi-fluorescence, on a* $\Omega_{g_0} = \Omega_\gamma$ *et* $\Omega_{f_0} = \Omega_{\mathrm{h}\gamma}$.

que nous utiliserons pour notre démonstration. Enfin, puisque $\widetilde{u}_1$ est un vecteur propre de l'opérateur $\widetilde{T}$, associée à la valeur propre λ_1, on a :

$$\forall \boldsymbol{k}, [\widetilde{T}\widetilde{u}_1](\boldsymbol{k}) = \lambda_1 \widetilde{u}_1(\boldsymbol{k}) = \int t(\boldsymbol{k},\boldsymbol{k}')\widetilde{u}_1(\boldsymbol{k}')\mathrm{d}\boldsymbol{k}'. \tag{.12}$$

Ce qui donne en utilisation la définition (.9) :

$$\forall \boldsymbol{k}, \widetilde{u}_1(\boldsymbol{k}) = \frac{1}{\lambda_k}\int \widetilde{f}_{\boldsymbol{k}}(\boldsymbol{k}')\widetilde{u}_1(\boldsymbol{k}')\mathrm{d}\boldsymbol{k}'. \tag{.13}$$

En particulier, pour toute fréquence $\boldsymbol{k}_0$ hors du support spectral de u_1 on a :

$$\boldsymbol{k}_0 \notin \Omega_{u_1} \iff \frac{1}{\lambda_1}\int \widetilde{f}_{\boldsymbol{k}_0}(\boldsymbol{k}')\widetilde{u}_1(\boldsymbol{k}')\mathrm{d}\boldsymbol{k}' = 0, \tag{.14}$$

Les deux fonctions étant non négatives $\widetilde{f}_{\boldsymbol{k}_0}$ par les hypothèses de la microscopie de fluorescence, et $\widetilde{u}_1$ par l'application du théorème de Krein-Rutman, (voir Th.3), on en déduit que les deux fonctions doivent avoir un support disjoint pour tout $\boldsymbol{k}_0 \notin \Omega_{u_1}$. Cette condition nous permet de montrer par double inclusion que

$$\Omega_{u_1} = \Omega_{\mathrm{h}\gamma}. \tag{.15}$$

A.3.2. $\Omega_{u_1} \subseteq \Omega_{\mathrm{h}\gamma}$

Commençons par l'inclusion la plus intuitive : $\Omega_{u_1} \subseteq \Omega_{\mathrm{h}\gamma}$. Cette inclusion est la plus intuitive, car nous avons déjà montré (section 2.2.3), que la variance ne dépend pas des composantes fréquentielles de l'échantillon au-delà de $\Omega_{\mathrm{h}\gamma}$.

Considérons une fréquence $\boldsymbol{k}_0 \notin \Omega_{\mathrm{h}\gamma}$. En utilisant le corollaire 1(i), on en déduit que la fonction $\widetilde{f}_{\boldsymbol{k}_0}$ est uniformément nulle. On a alors immédiatement :

$$\int \widetilde{f}_{\boldsymbol{k}_0}(\boldsymbol{k}')\widetilde{u}_1(\boldsymbol{k}')\mathrm{d}\boldsymbol{k}' = 0, \tag{.16}$$

et en appliquant l'équivalence (.14), on a immédiatement $\boldsymbol{k}_0 \notin \Omega_{u_1}$. Ceci montre

$$\Omega_{u_1} \subseteq \Omega_{\mathrm{h}\gamma}.$$

A.3.3. $\Omega_{\mathrm{h}\gamma} \subseteq \Omega_{u_1}$

Pour la seconde inclusion, choisissons une fréquence $\boldsymbol{k}_0 \in \Omega_{\mathrm{h}\gamma}$, et supposons $\widetilde{u}_1(\boldsymbol{k}_0) = 0$. En utilisant l'équation (.14), on en déduit que la fonction $\widetilde{u}_1$ doit être uniformément nulle sur le domaine $\Omega_{f_{\boldsymbol{k}_0}}$. Nous allons montrer qu'une telle annulation est impossible dans le cas où $\Omega_\gamma \subseteq \Omega_{\mathrm{h}}$, et que par conséquent, il n'existe aucune fréquence dans $\Omega_{\mathrm{h}\gamma}$ telle que $\widetilde{u}_1(\boldsymbol{k}_0) = 0$.

Pour cela, utilisons la définition de $\Omega_{h\gamma}$, pour trouver deux fréquences qu'il existe des fréquences $\boldsymbol{\xi}_1 \in \Omega_h$ et $\boldsymbol{\xi}_2 \in \Omega_\gamma$ telles que :

$$\boldsymbol{k}_0 = \boldsymbol{\xi}_1 - \boldsymbol{\xi}_2 \quad i.e., \quad \mathbf{0} = (\boldsymbol{k}_0 - \boldsymbol{\xi}_1) + \boldsymbol{\xi}_2 \tag{.17}$$

À partir de là, notons les trois points suivants :

— a. $(\boldsymbol{k}_0 - \boldsymbol{\xi}_1) \in \big(\{\boldsymbol{k}_0\} \ominus \Omega_h\big)$, par définition de ce domaine.

— b. $(\boldsymbol{k}_0 - \boldsymbol{\xi}_1) \in \Omega_\gamma$. Ce point est moins immédiat, mais il s'obtient en remarquant que $(\boldsymbol{k}_0 - \boldsymbol{\xi}_1) = -\boldsymbol{\xi}_2$, et en utilisant la symétrie de Ω_γ, car γ est réelle en microscopie de fluorescence.

— c. $\boldsymbol{\xi}_2 \in \Omega_\gamma \subseteq \Omega_h$

Les points a. et b. permettent d'obtenir $(\boldsymbol{k}_0 - \boldsymbol{\xi}_1) \in \widetilde{g}_{\boldsymbol{k}_0}$, et en ajoutant le point c. on obtient l'implication suivante :

$$\forall \boldsymbol{k}_0 \in \Omega_{h\gamma}, \widetilde{u}_1(\boldsymbol{k}_0) = 0 \implies \mathbf{0} \in \Omega_{f_{\boldsymbol{k}_0}} \tag{.18}$$

En particulier, ceci signifie que s'il existe un $\boldsymbol{k}_0$ tel que $\widetilde{u}_1(\boldsymbol{k}_0) = 0$, la fonction u_1 sera de moyenne nulle. Ceci contredit la démonstration précédente, que u_1 est un vecteur positif non uniformément nul. On en déduit par l'absurde qu'il n'existe pas de fréquence dans $\Omega_{h\gamma}$ telle que $\widetilde{u}_1(\mathbf{0}) = 0$. Ceci revient à affirmer que $\Omega_{h\gamma} \subseteq \Omega_{u_1}$, ce qui termine la preuve de la proposition 2.

B. Approche par algorithme MM (Minimize Majoration) pour RIM-STD

B.1. Construction d'un schéma par approximation majorante

Pour justifier le changement de fonctionnelle, nous avons utilisé une analogie entre RIM et les problèmes de reconstruction de phase, tous deux des problèmes quadratiques. Les liens entre RIM et la reconstruction de phase seront plus largement détaillées dans le chapitre 5 où une proposition d'extension de RIM autorisant les quantités à être complexe sera étudiée, ainsi que dans l'annexe F. Pour les problèmes de reconstruction de phase, QIU et al. 2016 propose différentes variations d'un algorithme (PRIME), basés sur la construction d'un algorithme MM. Nous allons ici étudier un schéma par similaire pour le problème RIM.

Les méthodes MM HUNTER et al. 2004 sont des schémas d'optimisation numérique permettant de minimiser [2] une fonction objectif J. L'idée est de construire une suite de points $(\boldsymbol{\rho}_k)_{k\geqslant 0}$ selon le schéma :

$$\begin{aligned} \boldsymbol{\rho}_0 &> 0 \\ \boldsymbol{\rho}_{k+1} &= \arg\min_{\boldsymbol{\rho}} Q_{\boldsymbol{\rho}_k}(\boldsymbol{\rho}) \end{aligned} \tag{.19}$$

Pour garantir la décroissance du critère à chaque étape, les fonctions auxiliaires $Q_{\boldsymbol{\rho}_k}$ doivent vérifier les deux conditions suivantes :

— La fonction $Q_{\boldsymbol{\rho}_k}$ majore la fonction J, *i.e.*, $\forall \boldsymbol{\rho}$, $Q_{\boldsymbol{\rho}_k}(\boldsymbol{\rho}) \geqslant J(\boldsymbol{\rho})$.

— La fonction $Q_{\boldsymbol{\rho}_k}$ est tangente à la fonction J au point courant $\boldsymbol{\rho}_k$, *i.e.*, $\boldsymbol{\rho}$, $Q_{\boldsymbol{\rho}_k}(\boldsymbol{\rho}_k) = J(\boldsymbol{\rho}_k)$.

L'idée de cette approche est que la minimisation des fonctions auxiliaires $Q_{\boldsymbol{\rho}_k}$ est généralement plus simple qu'une étape de recherche linéaire dans le cadre d'un algorithme de direction de descente. Le cas idéal correspond au cas où l'on construit une approximation majorante quadratique, pour laquelle on dispose alors d'une expression directe de $\boldsymbol{\rho}_{k+1}$.

Dans le cas de RIM-STD, la fonction objectif (3.27) s'exprime à partir de ses résidus :

$$J_{\text{Std}}(\boldsymbol{\rho}) = \sum_{i=1}^{N} j_i(\boldsymbol{\rho})^2 + \mu \left\|\boldsymbol{\rho}\right\|_2^2, \tag{.20}$$

$$j_i(\boldsymbol{\rho}) = \widehat{\sigma}_i - \sigma_i(\boldsymbol{\rho}), \tag{.21}$$

$$f_i(\boldsymbol{\rho}) = (\boldsymbol{\rho}^{\text{t}}\mathbf{T}_i\boldsymbol{\rho} + \sigma_\varepsilon)^{\frac{1}{2}}. \tag{.22}$$

Pour alléger la notation, on considère ici un bruit gaussien de variance σ_ε^2 uniforme sur chaque pixel. Pour construire une approximation majorante de J_{Std}, il suffit de

2. L'approche existe aussi pour maximiser

construire une approximation majorante pour chaque terme :

$$j_i^2(\boldsymbol{\rho}) = \boldsymbol{\rho}^{\mathrm{t}}\mathbf{T}_i\boldsymbol{\rho} - 2\sigma_i(\boldsymbol{\rho})[\widehat{\boldsymbol{\sigma}}]_i + \sigma_\varepsilon + \widehat{\sigma}_i^2. \tag{.23}$$

Chaque matrice $\mathbf{T}_i$ étant définie non négative, on peut minorer chaque fonction σ_i à partir de leur tangente, ce qui donne :

$$\forall \boldsymbol{\rho}, \boldsymbol{\rho}_k : \sigma_i(\boldsymbol{\rho}) \geqslant \sigma_i(\boldsymbol{\rho}_k) + (\boldsymbol{\rho} - \boldsymbol{\rho}_k)^{\mathrm{t}}\nabla\sigma_i(\boldsymbol{\rho}_k), \tag{.24}$$

avec $\nabla\sigma_i$ le gradient des fonctions σ_i donné par :

$$\nabla\sigma_i(\boldsymbol{\rho}) = \frac{1}{\sigma_i(\boldsymbol{\rho})}\mathbf{T}_i\boldsymbol{\rho}. \tag{.25}$$

Notons ici qu'en présence de bruit instrumental, la fonction σ_i n'est jamais nulle, et ce gradient est toujours défini. En réinjectant la minoration de σ_i dans l'équation (.23), on obtient cette fois-ci une fonction $q_{i;\boldsymbol{\rho}_k}$ majorant la fonction j_i^2 :

$$q_{i;\boldsymbol{\rho}_k}(\boldsymbol{\rho}) = \widehat{\sigma}_i^2 - 2\widehat{\sigma}_i\left(\sigma_i(\boldsymbol{\rho}_k) + \frac{1}{\sigma_i(\boldsymbol{\rho}_k)}(\boldsymbol{\rho} - \boldsymbol{\rho}_k)^{\mathrm{t}}\mathbf{T}_i\boldsymbol{\rho}_k\right) + \boldsymbol{\rho}^{\mathrm{t}}\mathbf{T}_i\boldsymbol{\rho} + \sigma_\varepsilon \tag{.26}$$

L'approximation majorante globale de la fonction J_{STD} est alors donnée simplement la somme de chacune des approximations majorantes. On a alors :

$$\forall \boldsymbol{\rho}_k, \boldsymbol{\rho} : J_{\mathrm{STD}}(\boldsymbol{\rho}) \leqslant Q_{\boldsymbol{\rho}_k}(\boldsymbol{\rho}), \tag{.27}$$

avec

$$\begin{aligned} Q_{\boldsymbol{\rho}_k} &= \sum_{i=1}^{N} q_{i;\boldsymbol{\rho}_k} + \mu\left\|\boldsymbol{\rho}\right\|_2^2 \\ &= \sum_{i=1}^{N} \widehat{\sigma}_i^2 - 2\widehat{\sigma}_i\left(\sigma_i(\boldsymbol{\rho}_k) + \frac{1}{\sigma_i(\boldsymbol{\rho}_k)}(\boldsymbol{\rho} - \boldsymbol{\rho}_k)^{\mathrm{t}}\mathbf{T}_i\boldsymbol{\rho}_k\right) + \boldsymbol{\rho}^{\mathrm{t}}\mathbf{T}_i\boldsymbol{\rho} + \sigma_\varepsilon \qquad (.28) \\ &= \boldsymbol{\rho}^{\mathrm{t}}(\mathbf{S} + \mu\mathbf{I})\boldsymbol{\rho} - 2\boldsymbol{\rho}^{\mathrm{t}}\boldsymbol{w}_k + C_k \qquad (.29) \end{aligned}$$

où les quantités $\mathbf{S}$, $\boldsymbol{w}_k$ et C_k sont respectivement définies par :

$$\mathbf{S} = \sum_{i=1}^{N} \mathbf{T}_i, \tag{.30}$$

$$\boldsymbol{w}_k = \sum_{i=1}^{N} \frac{\widehat{\sigma}_i}{\sigma_i(\boldsymbol{\rho}_k)}\mathbf{T}_i\boldsymbol{\rho}_k, \tag{.31}$$

$$C_k = N\sigma_\varepsilon + \sum_{i=1}^{N} \widehat{\sigma}_i^2 - 2\widehat{\sigma}_i\left(\sigma_i(\boldsymbol{\rho}_k) - \frac{1}{\sigma_i(\boldsymbol{\rho}_k)}\boldsymbol{\rho}_k^{\mathrm{t}}\mathbf{T}_i\boldsymbol{\rho}_k\right). \tag{.32}$$

La fonction Q étant quadratique en $\boldsymbol{\rho}$, on arrive alors, en combinant à l'expression

(.19), et (.29) à une formule explicite de calcul des itérés successifs :

$$(\mathbf{S}+\mu\mathbf{I}_n)\boldsymbol{\rho}_{k+1} = \boldsymbol{w}_k, \tag{.33}$$

où $\boldsymbol{w}_k$ la quantité $\boldsymbol{w}_k$ dépend de l'itéré courant $\boldsymbol{\rho}_k$. Cependant, le calcul de vecteur $\boldsymbol{w}_k$ n'est par possible de manière directe et efficace à cause des coefficients modulant le produit $\mathbf{T}_n\boldsymbol{\rho}$, ce qui empêche l'implémentation directe de ce schéma MM.

B.2. Lien avec le préconditionneur de RIM-STD

Il existe cependant une autre façon de calculer le vecteur $\boldsymbol{w}_k$, basée sur le gradient de la fonction J_{STD}. En effet, à cause du caractère tangent de l'approximation majorante, on a au point courant $\boldsymbol{\rho}_k$:

$$\frac{\partial Q_{\boldsymbol{\rho}_k}}{\partial \boldsymbol{\rho}}(\boldsymbol{\rho}_k) = \frac{\partial J_{\text{STD}}}{\partial \boldsymbol{\rho}}(\boldsymbol{\rho}_k) = \boldsymbol{g}_k, \tag{.34}$$

où $\boldsymbol{g}_k$ est le gradient calculé au point $\boldsymbol{\rho}_k$ à partir de l'expression (3.36). Ce gradient, peut également s'exprimer à partir de l'expression de l'approximation majorante (.29), évaluée en $\boldsymbol{\rho}_k$:

$$\boldsymbol{g}_k = 2(\mathbf{S}+\mu\mathbf{I})\boldsymbol{\rho}_k - 2\boldsymbol{w}_k. \tag{.35}$$

On peut alors isoler l'expression de $\boldsymbol{w}_k$

$$\boldsymbol{w}_k = (\mathbf{S}+\mu\mathbf{I})\boldsymbol{\rho}_k - \frac{1}{2}\boldsymbol{g}_k \tag{.36}$$

et la réinjecter dans le schéma de mise à jour de l'algorithme MM (.33)

$$(\mathbf{S}+\mu\mathbf{I}_n)\boldsymbol{\rho}_{k+1} = \boldsymbol{w}_k, \tag{.37}$$

$$(\mathbf{S}+\mu\mathbf{I}_n)\boldsymbol{\rho}_{k+1} = (\mathbf{S}+\mu\mathbf{I})\boldsymbol{\rho}_k - \frac{1}{2}\boldsymbol{g}_k, \tag{.38}$$

$$\boldsymbol{\rho}_{k+1} = \boldsymbol{\rho}_k - \frac{1}{2}(\mathbf{S}+\mu\mathbf{I})^{-1}\boldsymbol{g}_k. \tag{.39}$$

$$\tag{.40}$$

On trouve que le schéma de mise à jour MM est équivalent à un algorithme de gradient préconditionné (WRIGHT et al. 1999) par la matrice $\mathbf{S}+\mu\mathbf{I}$, avec un pas fixe de $\frac{1}{2}$. En pratique, en testant ce schéma, on constate que le pas fixe de $\frac{1}{2}$ est parfois largement sous-estimé, ce qui ralenti fortement la convergence de l'approche MM. L'algorithme RIM-STD reprend alors le préconditionneur obtenu à l'aide de l'approche MM, mais l'utilise dans un schéma ayant de meilleures propriétés de convergence, à savoir un gradient conjugué avec recherche linéaire.

C. Calcul du pas pour l'algorithme RIM-STD

L'algorithme RIM-STD se basant sur une recherche linéaire, le choix du pas initial dans la procédure de *backtracking* est primordial. Un pas trop faible n'entraînera aucune décroissance du critère, tandis qu'un pas trop élevé demandera beaucoup d'itérations de *backtracking* pour retrouver la solution. Une fois la direction de descente $\boldsymbol{d}$ choisie, le problème de recherche de pas correspond en pratique à la recherche d'un minimum pour une fonction de la variable réelle :

$$W(\alpha) := J_{\mathrm{STD}}(\boldsymbol{\rho} + \alpha \boldsymbol{d}), \tag{.41}$$

avec $\boldsymbol{\rho}$ le point courant de l'algorithme pour l'itération courante. En développant à partir de l'expression des résidus (3.30), cette fonction peut s'écrire sous une forme très proche d'un polynôme de degré 2 :

$$W(\alpha) = A\alpha^2 + 2B\alpha - 2\sum_{i=1}^{N} \widehat{\sigma}_i p_i(\alpha) + C' \tag{.42}$$

avec

$$\begin{aligned} A &= \boldsymbol{d}^{\mathrm{t}}(\mathbf{S} + \lambda \mathbf{I})\boldsymbol{d} = \sum_i \boldsymbol{d}^{\mathrm{t}}\mathbf{T}_i\boldsymbol{d} + \lambda \boldsymbol{d}^{\mathrm{t}}\boldsymbol{d} = \sum_i A_i + \lambda \boldsymbol{d}^{\mathrm{t}}\boldsymbol{d}, \\ B &= \boldsymbol{d}^{\mathrm{t}}(\mathbf{S} + \lambda \mathbf{I})\boldsymbol{\rho} = \sum_i \boldsymbol{d}^{\mathrm{t}}\mathbf{T}_i\boldsymbol{\rho} + \lambda \boldsymbol{d}^{\mathrm{t}}\boldsymbol{\rho} = \sum_i B_i + \lambda \boldsymbol{d}^{\mathrm{t}}\boldsymbol{\rho}, \\ p_i(\alpha) &= \sigma_i(\boldsymbol{\rho} + \alpha \boldsymbol{d}) = \left(A_i\alpha^2 + 2B_i\alpha + C_i\right)^{1/2}, \end{aligned}$$

où

$$A_i = \boldsymbol{d}^{\mathrm{t}}\mathbf{T}_i\boldsymbol{d}, \tag{.43}$$

$$B_i = \boldsymbol{d}^{\mathrm{t}}\mathbf{T}_i\boldsymbol{\rho}, \tag{.44}$$

$$C_i = \boldsymbol{\rho}^{\mathrm{t}}\mathbf{T}_i\boldsymbol{\rho} + \sigma_\varepsilon^2 = \sigma_i(\boldsymbol{\rho})^2. \tag{.45}$$

Notons que ces coefficients peuvent en pratique se calculer de manière extrêmement rapide, puisque le vecteur des A_n, est la variance associée à la direction de descente, et le vecteur des B_n est une sorte de variance 'hybride' se calculant à partir de la formule :

$$B = \sum_k \mathbf{U}_k\boldsymbol{d} \odot \mathbf{U}_k\boldsymbol{\rho}$$

Par définition, le pas optimal minimisant la fonction W annulera sa dérivée W'. On peut alors rechercher les zéros de W' en utilisant une méthode de Newton, construisant la suite de pas :

$$\alpha_{n+1} = \alpha_i - \frac{W'(\alpha_i)}{W''\alpha_i}. \tag{.46}$$

En pratique, il n'est pas nécessaire de minimiser précisément W, mais seulement de faire décroître la fonction objectif suffisamment. W étant proche d'une fonction

quadratique, il est très probable, que la première itération de la méthode de Newton soit déjà suffisamment proche du pas optimal pour être accepté par la procédure de *backtracking*. Le pas retenu à la première itération est alors donné par :

$$\alpha = -\frac{W'(0)}{W''(0)}. \tag{.47}$$

Il ne reste plus qu'à calculer les dérivées de W, et à les évaluer en 0 pour obtenir le pas de Newton. Ces dérivées vont faire apparaître les dérivées première et seconde des fonctions p_i données par :

$$p_i'(\alpha) = \frac{A_i\alpha + B_i}{p_i(\alpha)} \tag{.48}$$

$$\begin{aligned} p_i''(\alpha) &= \frac{A_i p_i(\alpha) - (A_i\alpha + B_i)p_i'(\alpha)}{p_i^2(\alpha)} \\ &= \frac{A_i p_i(\alpha) - (A_i\alpha + B_i)\frac{A_i\alpha+B_i}{p_i(\alpha)}}{p_i^2(\alpha)} \\ p_i''(\alpha) &= \frac{A_i p_i^2(\alpha) - (\alpha^2 A_i^2 + 2\alpha A_i B_i + B_i^2)}{p_i^3(\alpha)} \end{aligned} \tag{.49}$$

avec leurs évaluations en 0 :

$$p_i(0) = \sqrt{C_i} = \sigma_i \tag{.50}$$

$$p_i'(0) = \frac{B_i}{p_i(0)} = \frac{B_i}{\sigma_i} \tag{.51}$$

$$p_i''(0) = \frac{A_i p_i^2(0) - B_i^2}{p_i^3(0)} = \frac{A_i\sigma_i^2 - B_i^2}{\sigma_i^3}. \tag{.52}$$

Pour la fonction W, les dérivées première et seconde sont données par :

$$\begin{aligned} W'(\alpha) &= 2A\alpha + 2B - 2\sum_i \widehat{\sigma}_i p_i'(\alpha) \\ W''(\alpha) &= 2A - 2\sum_i \widehat{\sigma}_i p_i''(\alpha). \end{aligned}$$

Le pas retenu pour la procédure itérative est alors

$$\begin{aligned}
\alpha_{\text{Newton}} &= -\frac{W'(0)}{W''(0)} \\
&= -\frac{B - \sum_i \widehat{\sigma}_i p_i'(0)\Phi(\boldsymbol{\rho})}{A - \sum_i \widehat{\sigma}_i p_i''(0)} \\
&= -\frac{B - \sum_i B_i \frac{\widehat{\sigma}_i}{\sigma_i}}{A - \sum_i \frac{\widehat{\sigma}_i}{\sigma_i} \frac{A_i\sigma_i^2 - B_i^2}{\sigma_i^2}} \\
&= -\frac{\sum_i B_i + \lambda \boldsymbol{d}^{\mathrm{t}}\boldsymbol{\rho} - \sum_i B_i \frac{\widehat{\sigma}_i}{\sigma_i}}{\sum_i A_i + \lambda \boldsymbol{d}^{\mathrm{t}}\boldsymbol{d} - \sum_i \frac{\widehat{\sigma}_i}{\sigma_i}\left(A_i - \frac{B_i^2}{\sigma_i^2}\right)} \\
\alpha_{\text{Newton}} &= -\frac{\sum_i B_i (1 - \frac{\widehat{\sigma}_i}{\sigma_i}) + \lambda \boldsymbol{d}^{\mathrm{t}}\boldsymbol{\rho}}{\sum_i A_i - \frac{\widehat{\sigma}_i}{\sigma_i}\left(A_i - \frac{B_i^2}{\sigma_i^2}\right) + \lambda \boldsymbol{d}^{\mathrm{t}}\boldsymbol{d}}
\end{aligned} \tag{.53}$$

dont le calcul s'implémente sans affecter la complexité globale de l'algorithme.

D. Modélisation du préfiltrage 3D

Repartons du modèle général d'acquisition d'une image 3D Y (4.3), et introduisons le préfiltrage par un préfiltre 3D g quelconque. L'image préfiltrée est alors donnée par :

$$\begin{aligned} Y_{\mathrm{PF}}(\boldsymbol{r},z) &= \int g(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1,z-z_1)\,Y(\boldsymbol{r}_1,z_1)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1\mathrm{d}z_1 \\ &= \int \mathrm{d}\boldsymbol{r}_2\mathrm{d}z_2\rho(\boldsymbol{r}_2,z_2)\int h(\boldsymbol{r}_1-\boldsymbol{r}_2,z_1-z_2)g(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r}_1,z-z_1)\mathscr{I}(\boldsymbol{r}_2,z_2,z_1)\mathrm{d}\boldsymbol{r}_1\mathrm{d}z_1. \end{aligned} \tag{.54}$$

Dans ce cadre, les problèmes liés au préfiltrage vont uniquement porter sur la variable axiale, à cause de la dépendance simultanée des "illumination généralisée" $\mathscr{I}$ selon les variables z_1, et z_2. Par conséquent, dans la suite, pour alléger les écritures, nous n'écrirons que les dépendances selon la variable axiale. La variance des images préfiltrées s'écrit alors :

$$\mathrm{Var}_{\mathrm{PF}}(z) = \iint \rho(z_2)\rho(z_4)K(z-z_2,z-z_4)\mathrm{d}z_2\mathrm{d}z_4 \tag{.55}$$

ce qui correspond à une double intégrale de convolution faisant intervenir le noyau

$$K(z-z_2,z-z_4) = \iint \begin{matrix} g(z_1)h(z-z_2-z_1) \\ g(z_3)h(z-z_4-z_3) \end{matrix} \gamma_{\mathscr{I}}(z_2-z_4,z_1-z_3) \begin{matrix} \mathrm{d}z_1 \\ \mathrm{d}z_3 \end{matrix}. \tag{.56}$$

Ce noyau intégral joue un rôle similaire au noyau de convolution t introduit (2.25). Pour retrouver un modèle de variance calculable avec les méthodes introduites dans le chapitre 3, notamment basée sur l'implémentation optimisée du noyau intégral t tel que proposée dans l'algorithme 1, il est nécessaire que le noyau K puisse se réexprimer sous la forme :

$$K(z-z_2,z-z_4) = h_{\mathrm{PF}}(z-z_2)\gamma(z_2-z_4)h_{\mathrm{PF}}(z-z_4)$$

où h_{PF} serait une fonction équivalente à une PSF transformée par l'effet du préfiltrage, et γ une fonction équivalente à la fonction d'auto-corrélation du speckle.

D.1. Cas du préfiltrage sur des acquisitions en *remote focusing*

Dans le cas d'acquisitions en *remote focusing*, la variance des illuminations est donnée par l'équation (4.9). Dans ce cas, la dépendance selon les variables $z_1 - z_3$ de la fonction $\gamma_{\mathscr{I}}$ disparaît naturellement de l'expression du noyau intégral, ce qui

permet de simplifier son expression :

$$K(z-z_2,z-z_4) = \gamma(z_2-z_4)\Big(\int g(z_1)h(z-z_2-z_1)\mathrm{d}z_1\Big)\Big(g(z_3)h(z-z_4-z_3)\mathrm{d}z_3\Big)$$
$$K(z-z_2,z-z_4) = h_{\mathrm{PF}}(z-z_2)\gamma(z_2-z_4)h_{\mathrm{PF}}(z-z_4) \tag{.57}$$

On retrouve alors une décomposition de la forme, et le préfiltrage 3D est directement compatible avec des acquisitions réalisées en remote focusing. Ceci est cohérent avec le fait que les acquisitions en remote focusing préservent le modèle de convolution sur lequel la théorie de RIM a été développée.

D.2. Cas du préfiltrage sur des acquisitions en translatant l'échantillon

Dans le cas d'acquisitions en translatant l'échantillon dans un speckle stationnaire, la covariance des illuminations généralisée $\mathscr{I}$ affiche une dépendance en $z_1 - z_3$ (4.8). Le noyau K devient :

$$K(z-z_2,z-z_4) = \iint \begin{matrix} g(z_1)h(z-z_2-z_1) \\ g(z_3)h(z-z_4-z_3) \end{matrix} \gamma_{\mathscr{I}}(z_2-z_4+z_3-z_1) \begin{matrix} \mathrm{d}z_1 \\ \mathrm{d}z_3 \end{matrix} \tag{.58}$$

Et l'intégrale ne se simplifie plus comme précédemment. Afin de retrouver un modèle de convolution compatible avec RIM, il faut imposer un préfiltre de la forme $g(z) = \delta(z)$, ce qui revient à n'appliquer aucun préfiltrage dans la direction axiale. Rappelons ici que cet effet concerne uniquement les variables axiales, et que l'on peut conserver le préfiltrage dans les directions transverses, qui ne sont pas détaillées ici.

D.3. Cas du préfiltrage sur des acquisitions plan par plan

Un problème similaire ce produit dans le cas d'acquisition plan par plan, pour lesquelles le noyau k devient après injection de la formule de corrélation des illuminations (4.7) :

$$K(z-z_2,z-z_4) = \iint \begin{matrix} g(z_1)h(z-z_2-z_1) \\ g(z_3)h(z-z_4-z_3) \end{matrix} \gamma_{\mathscr{I}}(z_2-z_4)\delta(z_3-z_1) \begin{matrix} \mathrm{d}z_1 \\ \mathrm{d}\boldsymbol{r}_3\mathrm{d}z_3 \end{matrix}$$
$$K(z-z_2,z-z_4) = \iint g(z_1)h(z-z_2-z_1)g(z_1)h(z-z_4-z_1)\gamma_{\mathscr{I}}(z_2-z_4)\mathrm{d}z_1 \tag{.59}$$

que l'on doit une nouvelle fois simplifier en imposant un préfiltre de la forme $g(z) = \delta(z)$, ce qui revient une nouvelle fois à enlever les effets du préfiltrage dans la direction axiale.

E. Cas d'équivalence entre les décompositions RIM et MPFM

Nous avons vu que le formalisme existant en microscopie par ptychographie de Fourier multiplexée (MPFM), et en RIM ne différent que par la décomposition du noyau t qui est utilisée. L'objectif ici est d'étudier dans quelle condition la décomposition spectrale proposée par RIM est équivalente à la décomposition sur des ondes planes proposées en (MPFM). Pour cela, repartons d'un noyau t de la forme :

$$t(\boldsymbol{x},\boldsymbol{x}') = \mathscr{H}(\boldsymbol{x})\gamma(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}')\mathscr{H}^*(\boldsymbol{x}'), \tag{.60}$$

avec γ le noyau invariant par translation de faible rang :

$$\gamma_m(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}') = \sum_{k=1}^{K} E_k e^{\boldsymbol{k}_m\cdot(\boldsymbol{x}'-\boldsymbol{x})}, \tag{.61}$$

que l'on décompose sous la forme proposée en (MPFM) :

$$t_m = \sum_{k=1}^{K} E_k \Phi_i(\boldsymbol{x})\Phi_i^*(\boldsymbol{x}') \tag{.62}$$

$$\text{avec} \quad \Phi_i(\boldsymbol{x}) = \mathscr{H}(\boldsymbol{x})e^{-\boldsymbol{k}_m\cdot\boldsymbol{x}}. \tag{.63}$$

Pour que la décomposition (.62), soit la même que celle obtenue en RIM, il suffit de savoir s'il s'agit ou non d'une décomposition spectrale, ce qui revient à étudier l'orthogonalité des différentes fonctions Φ_i. Nous montrerons la proposition suivante :

Proposition 3 *Soit $\mathscr{K} = \{\boldsymbol{k}_1,\dots,\boldsymbol{k}_K\}$ les vecteurs d'ondes transverses (distinct) des ondes planes générant le noyau t, défini par les équations (.60) et (.61). La décomposition de ce noyau sous la forme (.62), est une décomposition spectrale si et seulement si :*

$$\forall (i,j)\in[1,K],\ i\neq j \implies \boldsymbol{k}_j-\boldsymbol{k}_i \notin \Omega_{|\mathscr{H}|^2} \tag{.64}$$

La démonstration de cette proposition est relativement simple en exploitant le lemme suivant :

Lemme 1 *Deux fonctions Φ_i et Φ_j associées aux vecteurs d'ondes $\boldsymbol{k}_i$ et $\boldsymbol{k}_j$, sont orthogonales si et seulement si $\boldsymbol{k}_i-\boldsymbol{k}_j \notin \Omega_{|\mathscr{H}|^2}$,*

dont la démonstration s'obtient en calculant le produit scalaire :

$$\begin{aligned}\langle\Phi_i|\Phi_j\rangle &= \int \Phi_i(\boldsymbol{x})\Phi_j^*(\boldsymbol{x})\mathrm{d}\boldsymbol{x} \\ &= \int \mathscr{H}(\boldsymbol{x})\mathscr{H}^*(\boldsymbol{x})e^{i(\boldsymbol{k}_j-\boldsymbol{k}_i)\cdot\boldsymbol{x}}\mathrm{d}\boldsymbol{x} \\ &= \int |\mathscr{H}(\boldsymbol{x})|^2 e^{i(\boldsymbol{k}_j-\boldsymbol{k}_i)\cdot\boldsymbol{x}}\mathrm{d}\boldsymbol{x} \\ \langle\Phi_i|\Phi_j\rangle &= \mathscr{F}\left[|\mathscr{H}|^2\right](\boldsymbol{k}_j-\boldsymbol{k}_i). \end{aligned} \tag{.65}$$

Ce produit scalaire correspond simplement à la transformée de Fourier de la fonction $|\mathscr{H}|^2$, évaluée en $\boldsymbol{k}_i - \boldsymbol{k}_j$. Les fonctions Φ_i et Φ_j sont orthogonales lorsque le produit scalaire (.65) est nul, c'est-à-dire lorsque la différence $\boldsymbol{k}_i - \boldsymbol{k}_j$ n'est pas dans le domaine $\Omega_{|\mathscr{H}|^2}$. Ceci démontre le lemme 1.

Montrons maintenant la proposition 3. Supposons tout d'abord que la décomposition selon la famille des (Φ_i) soit une décomposition spectrale. Dans ce cas, le théorème spectral nous garanti que les vecteurs propres de t sont orthogonaux. Par conséquent, en appliquant le lemme 1, la condition (.64) est nécessairement vérifiée.

Inversement, supposons que la condition (.64) soit vérifiée. On vérifie alors que les fonctions Φ_i sont bien vecteurs propres de l'opérateur intégral associé au noyau t_m. On a

$$\begin{aligned}\int t(\boldsymbol{x},\boldsymbol{x}')\Phi_i(\boldsymbol{x}')\mathrm{d}\boldsymbol{x}' &= \int \sum_{k=1}^{K} E_k\Phi_k(\boldsymbol{x})\Phi_k^*(\boldsymbol{x}')\Phi_i(\boldsymbol{x}')\mathrm{d}\boldsymbol{x}' \\ &= \sum_{k=1}^{K} E_k\Phi_k(\boldsymbol{x}) \int \Phi_k^*(\boldsymbol{x}')\Phi_i(\boldsymbol{x}')\mathrm{d}\boldsymbol{x}' \\ &= \sum_{k=1}^{K} E_k\Phi_k(\boldsymbol{x}) \langle\Phi_k(\boldsymbol{x}')|\Phi_i(\boldsymbol{x}')\rangle \\ &= E_i \|\mathscr{H}\|^2 \Phi_i(\boldsymbol{x})\end{aligned}$$

et Φ_i est bien un vecteur propre associée à la valeur propre $E_i\|\mathscr{H}\|^2$. Le passage de l'avant-dernière à la dernière ligne s'obtient en exploitant la condition (.64) ainsi que l'équation (.65). La décomposition (.62) est donc bien une décomposition spectrale, ce qui prouve la proposition (3).

F. Lien entre RIM et la reconstruction de phase

Le but de cette annexe est de faire le lien entre le problème RIM discret et les problèmes de reconstructions de phase d'un point de vue théorique, les aspects algorithmique étant déjà mis en pratique dans le chapitre 5

F.1. Rappel sur la reconstruction de phase

F.1.1. Modélisation du problème direct

Le problème de reconstruction de phase se présente classiquement CANDÈS et al. 2015 comme la recherche de la reconstruction d'un [3] vecteur $\boldsymbol{\rho} \in \mathbb{C}^N$ à partir de P mesures en intensité :

$$y_p^2 = |\boldsymbol{a}_p^\dagger \boldsymbol{\rho}|^2 \tag{.66}$$

avec $(\boldsymbol{a}_p)_p \in [1, P]$ une famille de vecteurs complexes, et † la notation désignant la trans-conjugaison d'un vecteur.

En fonction de la structure de famille de vecteurs $(\boldsymbol{a}_p)$, on peut classer les problèmes de reconstruction de phase en différentes catégories. Historiquement, les problèmes de reconstruction de phases ont été introduits sur des problème de cristallographie (SAYRE 1952) dans lesquels la caméra mesure directement la densité spectrale de puissance. La base famille des vecteurs d'observation est alors directement les vecteurs de la base de Fourier, c'est-à-dire dont le j-ième coefficient $[\boldsymbol{a}_p]_j$ est donné par :

$$[\boldsymbol{a}_p]_j = e^{2i\pi \frac{pj}{N}}. \tag{.67}$$

A l'opposée, une autre grande famille de bases rencontrées en reconstruction de phase, sont les bases de vecteurs aléatoires (E. J. CANDES et al. 2012), qui sont particulièrement intéressante du point de vues de garanties théoriques qu'elles peuvent apporter.

Entre ces deux familles, il reste possible d'utiliser une base d'observation arbitraire qui n'est pas directement la base de Fourier. Par exemple, dans le cas de l'imagerie diffractive encodée [4] (E. CANDES et al. 2013), les vecteurs de mesures sont les vecteurs de Fourier, mais multipliées par un masque binaire, avec l'idée de se rapprocher de la reconstruction de phase avec des vecteurs aléatoire afin d'en obtenir les 'bonnes' propriétés algorithmiques.

F.1.2. Condition d'identifiabilité

La question principale de la reconstruction de phase consiste à savoir si l'objet observé est l'unique objet donnant les observations y_i. Commençons par remarquer

3. En pratique, on peut choisir de travailler sur le corps des nombres réels, et le problème devient un problème de recherche de signe.
4. *Coded Diffraction Pattern*

de manière évidente, que si $\boldsymbol{\rho}$ est solution du problème de phase, alors $e^{i\phi}\boldsymbol{\rho}$, la multiplication de par $\boldsymbol{\rho}$ par un scalaire de module unité donnera les même mesures et sera également solution. Par conséquent, on ne recherche plus une solution unique, mais une classe de solution à un terme de phase près. Cette incertitude est dite triviale, tous les objets la vérifiant étant équivalents à une phase près. Dans le cas particulier de la reconstruction de phase sur la base de Fourier, on rencontre d'autres incertitudes triviales qui sont la translation de l'objet $\mathbf{P}^i\boldsymbol{\rho}$, et la conjugaison de l'objet, qui ne modifient pas la densité spectrale d'énergie de l'échantillon (SHECHTMAN et al. 2015).

Pour le problème de reconstruction de phase (.66), avec des vecteurs de mesure quelconques, BALAN et al. 2006 conjecture une condition nécessaire sur nombre de mesures afin de garantir l'unicité de la reconstruction. Dans le cas de vecteurs complexes [5] cette condition est :

$$P \geqslant 4N - 4. \tag{.68}$$

En pratique, on sait maintenant que ce nombre peut parfois être légèrement réduit, mais reste de l'ordre de $4N-4$. Par ailleurs, cette condition est uniquement une condition nécessaire, et ne garantie pas qu'une famille de vecteurs contenant quelconque contenant plus de $4N-4$ permette une reconstruction unique. Un contre exemple trivial serait d'utiliser une famille de mesure répétant un même vecteur. Pour garantir l'unicité de la solution à une phase près pour une famille de vecteurs d'observation donnée, une étude *ad hoc* est souvent nécessaire, comme par exemple (HAYES 1982), pour des mesures avec la base de Fourier en dimension 2. Si la famille considérée est composée de vecteurs aléatoires, il est possible de donner une probabilité d'unicité de la solution uniquement à partir du nombre de vecteurs dans la famille (E. J. CANDES et al. 2012).

F.2. Le problème RIM

F.2.1. Problème de phase généralisé

Pour faire le lien entre le problème de RIM cohérent et la reconstruction de phase, le plus simple est de repartir de l'expression des coefficient de la variance sur un pixel donné (5.33) :

$$y_p^2 = \boldsymbol{\rho}^\dagger \mathbf{T}_p \boldsymbol{\rho}, \tag{.69}$$

où $\mathbf{T}_p$ est une matrice à coefficients complexes, hermitienne, définie non négative et de rang faible. Le lien entre les équations (.66) et (.69), se fait en remarquant que ces deux expressions sont en fait des normes subordonnés à une certaine matrice. Plus précisément en développant l'expression (.66) on obtient :

$$y_p^2 = |\boldsymbol{a}_p^\dagger \boldsymbol{\rho}|^2 = \boldsymbol{\rho}^\dagger \boldsymbol{a}_p^\dagger \boldsymbol{a}_p \boldsymbol{\rho} = \boldsymbol{\rho}^\dagger \mathbf{A}_p \boldsymbol{\rho} \tag{.70}$$

5. Pour un problème de signe avec des vecteurs réels la condition est $P \geqslant 2N-1$

avec $\mathbf{A}_p := \boldsymbol{a}_p^\dagger \boldsymbol{a}_p$ une matrice définie non négative de rang 1. Ainsi, le problème de reconstruction de phase est simplement un cas particulier du problème RIM cohérent, avec une contrainte plus forte sur le rang des matrices d'observations.

Dans la suite de ce manuscrit, nous décrirons le problème du RIM cohérent (.69), par le terme problème de phase généralisé, en référence à l'article WANG et al. 2019. Notons qui ce terme n'est pas acté dans la littérature, et d'autres articles (E. J. CANDES et al. 2012, SHECHTMAN et al. 2015) utilisent le terme *Generalized Phase Retrival* pour par du problème (.66) avec une famille de vecteurs d'observations quelconque par opposition au *Fourier Phase Retrival*.

Contrairement à la reconstruction de phase classique, pour laquelle de multiples exemple pratiques peuvent être rencontrés, les articles traitant du problème de reconstruction de phase généralisé, le font principalement dans un cadre mathématique, sans se rattacher à un problème d'inversion pratique. La méthode RIM complexe, et par extension les méthodes de ptychographie mulitplexée, constitueraient donc l'une des premières applications pratiques de ce type de problème.

F.2.2. Questions d'unicité

Une question qu'il faut se poser est alors de savoir comment la relaxation de la contrainte de rang dans un problème de reconstruction de phase généralisée impacte la possible unicité de la solution. L'article M. HUANG et al. 2021, donne une condition nécessaire de $P > 2N$, qui est nettement plus faible que la condition (.68). Cette condition semble cependant venir non pas de la contrainte de rang, mais plutôt du fait que les auteurs s'autorisent des matrices d'observation avec des valeurs propres négatives, incompatible avec le problème RIM. Cet article donne cependant, une autre condition plus formelle et suffisante est pour garantir l'unicité de la reconstruction, requérant une étude de la base de mesure. Cette étude est très proche de ce qui a été fait dans le chapitre 2 pour démontrer l'unicité de la reconstruction en microscopie de fluorescence, demande d'étudier le noyau d'un opérateur bilinéaire à valeur dans $\mathbb{C}^N$. Une telle extension de ce résultat reste cependant hors d'atteinte pour l'instant.

Nous pouvons néanmoins utiliser notre intuition géométrique dans le cas d'un problème de reconstruction de phase à valeur réelle (*i.e.*, reconstruction de signe), pour montrer qu'à priori la condition nécessaire (.68), reste valide, et que l'on peut espérer qu'un nombre de mesure de l'ordre de $4N$ soit suffisant pour garantir l'identifiabilité de l'objet, aux incertitudes triviales près. la suite, nous nous baseront principalement sur la condition pour justifier notre approche.

F.3. Illustration géométrique sur un problème de signe

Afin de justifier que la contrainte de rang sur les matrices d'observation n'affecte pas le nombre d'équations nécessaire à la reconstruction d'un objet unique, nous nous appuierons sur une heuristique géométrique. Le raisonnement que nous ferons se limite à l'étude d'un problème de recherche de signe, dans $\mathbb{R}^N$. Fixons nous un vecteur $\boldsymbol{\rho}^\star$ ainsi qu'une famille de vecteurs d'observation $(\boldsymbol{a}_p)_{p\in[1,P]}$. Considérons

tout d'abord l'équation dont l'information de signe (ou de phase) n'a pas été perdue, et que l'on dispose des mesures :

$$\begin{aligned} \boldsymbol{a}_p^\dagger \boldsymbol{\rho} &= d_p, \\ \text{avec,} \quad d_p &:= \boldsymbol{a}_p^\dagger \boldsymbol{\rho}^\star. \end{aligned} \tag{.71}$$

Chacune mesure définit alors un hyperplan de $\mathbb{R}^N$ dans laquelle la solution doit se trouver. Tout vecteur $\boldsymbol{\rho}$, solution d'un système de P équations de la forme (.71), se retrouve doit être dans l'intersection de ces P hyperplans. Ainsi, si ces P équations sont linéairement indépendantes, l'espace des solution sera de dimension $N-M$. On retrouve ici le résultat classique de l'algèbre linéaire, demandant N équations linéairement indépendantes pour retrouver l'unique solution $\boldsymbol{\rho}^\star$.

Sur un problème de reconstruction de phase de la forme (.66), les équations d'observation deviennent :

$$|\boldsymbol{a}_p^\dagger \boldsymbol{\rho}| = |d_p| \iff \boldsymbol{a}_p^\dagger \boldsymbol{\rho} \begin{cases} \boldsymbol{a}_i^\dagger \boldsymbol{\rho} = d_i \\ \text{ou} \quad \boldsymbol{a}_i^\dagger \boldsymbol{\rho} = -d_i \end{cases}. \tag{.72}$$

Ces mesures définissent cette fois une paire d'hyperplans parallèles. Si l'on se donne maintenant N équations linéairement indépendantes de la forme (.72), on peut, pour chacune d'entre elle, choisir l'équation positive, ou l'équation négative. Pour chaque combinaison de choix on obtiendra une solution différente pour le problème de reconstruction de phase. Il y a alors 2^N solutions différentes, et le problème n'a pas de solution unique au signe près. Il faut alors rajouter de nouvelles équations pour éliminer des solutions incompatibles. Chaque nouvelle équation pouvant diviser par deux le nombre de solution admissible, on comprends qu'il faut rajouter $N-1$ équations pour retrouver seulement les deux solutions admissibles qui sont $\boldsymbol{\rho}^\star$ et $\boldsymbol{\rho}^\star$. Ceci nous donne un total de $2N-1$ équation pour retrouver l'objet, ce qui est cohérent avec le résultat démontré mathématiquement dans BALAN et al. 2006. Notons ici que rien ne garanti que l'ajout d'une équation spécifique réduise effectivement le nombre d'équation, et l'analyse présentée donne une condition nécessaire dans un cadre optimal.

Pour illustrer ce point, nous représenterons un problème de reconstruction de signe dans l'espace $\mathbb{R}^2$, dans lequel les hyperplans seront décris par des droites parallèles (voir Fig. .1). On voit alors que l'intersection de deux paires de droites parallèles, forme $2^2 = 4$ points, et qu'il existe deux solutions n'appartenant pas à $\{-\boldsymbol{\rho}^\star, \boldsymbol{\rho}^\star\}$. L'ajout d'une troisième paire d'hyperplan permet d'isoler cette unique pair de solution. On retrouve le résultat précédent de $M = 2N-1 = 3$ équations nécessaires. Notons que la définition du problème impose toujours qu'une des deux droites de chaque paire passe par $\boldsymbol{\rho}^\star$ et que l'autre passe par $-\boldsymbol{\rho}^\star$.

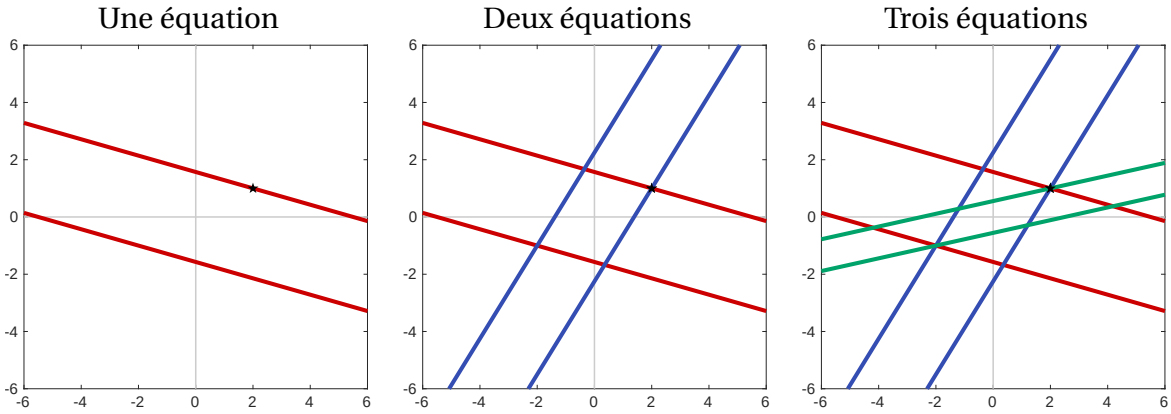


FIGURE .1. – Illustration géométrique des solutions sur un problème de reconstruction de signe de la forme (.72), sur l'espace $\mathbb{R}^2$. Le point solution $\boldsymbol{\rho}^\star = \begin{pmatrix} 2 \\ 1 \end{pmatrix}$ est représenté par une étoile noire, et les vecteurs d'observations sont $\boldsymbol{a}_1 = \begin{pmatrix} 0.2 \\ 0.7 \end{pmatrix}$, $\boldsymbol{a}_2 = \begin{pmatrix} -1.3 \\ 0.8 \end{pmatrix}$ et $\boldsymbol{a}_3 = \begin{pmatrix} 0.2 \\ -0.9 \end{pmatrix}$.

Pour un problème de reconstruction de phase généralisée, les équation d'observation deviennent cette fois-ci des équation des la forme :

$$\boldsymbol{\rho}^\dagger \mathbf{A}_i \boldsymbol{\rho} = d_i \tag{.73}$$

qui, pour un problème de dimension 2 décrivent des coniques. Plus précisément, dans le cas où les matrices $\mathbf{A}_i$ sont symétriques et définies non négatives, l'équation (.73) devient précisément l'équation d'une ellipse. Dans ce cas, la solution d'un problème composé de M équations de la forme (.73), sera à l'intersection de M ellipses. La forme de cet espace est généralement plus compliquée à décrire car les outils d'algèbre linéaire ne s'appliquent plus, mais semble suivre les même règles que sur un problème de reconstruction de phase classique. En particulier, en dimension 2 (voir Fig. .2), l'intersection de deux ellipses est une nouvelle fois 4 points, et il faut rajouter une troisième équation d'ellipse afin lever l'ambiguïté sur la paire de points que l'on veut retrouver. Par ailleurs, on peut remarquer que les droites parallèles sont simplement une forme dégénérée d'ellipse ayant un demi-grand axe de longueur infinie. Les deux courbes produisant le même nombre d'intersections, il semble que le rang de la matrice d'observation n'ait pas d'impact sur le nombre d'équations nécessaires afin d'obtenir une solution unique. Cette intuition semble se généraliser en dimension supérieure, ce qui laisse penser que le fait de passer d'un problème de phase à un problème de phase généralisé n'affecte pas le nombre de mesures nécessaire à garantir l'unicité de la solution, ni en bien ni en mal.

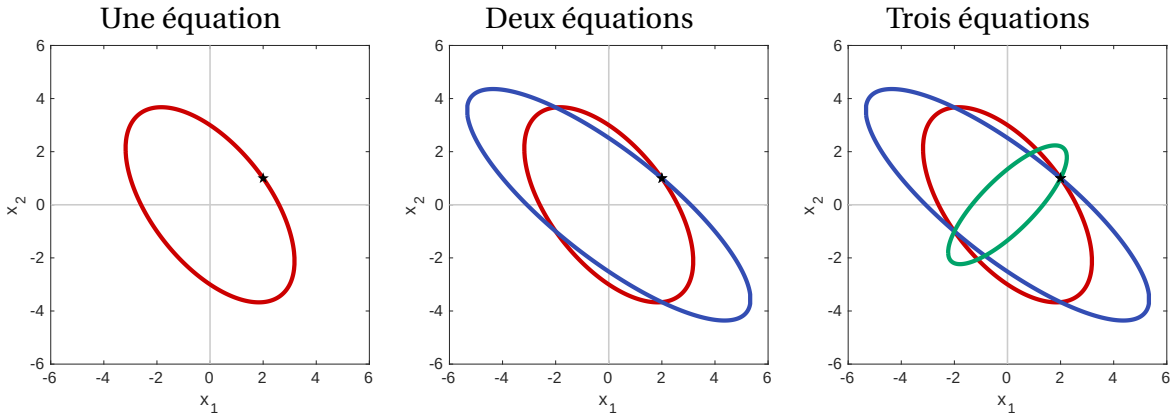


FIGURE .2. – Illustration géométrique des solutions sur un problème de reconstruction de signe de la forme (.72), sur l'espace $\mathbb{R}^2$. Le point solution $\boldsymbol{\rho}^\star = \begin{pmatrix} 2 \\ 1 \end{pmatrix}$ est représenté par une étoile noire, et les vecteurs d'observations sont $\mathbf{A}_1 = \begin{pmatrix} 2 & 1 \\ 1 & 1.5 \end{pmatrix}$, $\mathbf{A}_2 = \begin{pmatrix} 2 & 2 \\ 2 & 3 \end{pmatrix}$ et $\mathbf{A}_3 = \begin{pmatrix} 1 & -0.8 \\ -0.8 & 1 \end{pmatrix}$.

Notons que l'analyse menée ici sur la reconstruction de signe, correspond directement à la question d'unicité d'une reconstruction basée sur la variance en microscopie de fluorescence. On constate alors qu'avec N équations et N, on ne devrait pas obtenir une telle garantie, et les hypothèse d'une densité de fluorescence positive et d'épi-fluorescence, ainsi que les relation de permutation entre les matrices $\mathbf{T}_i$ sont nécessaire pour rejeter toutes les autres solutions.

Une dernière remarque doit être faite sur cette analyse vis-à-vis d'un exemple donné dans M. HUANG et al. 2021, proposant une famille de $P = 2N$ vecteurs permettant de résoudre le problème de signe. Cet exemple n'est pas contradictoire avec le raisonnement précédent, puisqu'il se base sur la présence de matrices à valeur propres négatives pour trouver une telle solution. On peut par exemple proposer la paire de matrice de mesure

$$\mathbf{A}_1 = \begin{pmatrix} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix}, \quad \mathbf{A}_2 = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \end{pmatrix}, \tag{.74}$$

dont les courbes sont représentée Fig. .3. On constate alors que la matrice $\mathbf{A}_1$, à valeur propre négative, défini une hyperbole, et non une ellipse. Dans ce cas là, si $\mathbf{A}_2$ est judicieusement choisie, on arrive éliminer 2 points d'intersection [6].

6. Dans le formalisme de la géométrie projective, ces points d'intersections seraient à l'infini (BECK et al. 2012).

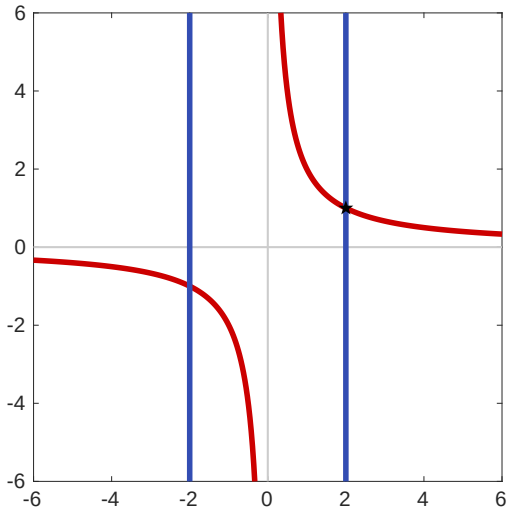


FIGURE .3. – Illustration géométrique des solutions sur un problème de reconstruction de phase généralisée avec les deux matrices (.74). Dans ce cas, on constate qu'il n'y a qu'une paire de point d'intersection, dues à la présence de valeurs propres négatives dans la matrice $\mathbf{A}_1$

L'interprétation géométrique dans le cas complexe est beaucoup plus compliqué, puisque les équations de la forme (.72), ne peuvent plus se décomposer de manière discrète. On supposera cependant que comme pour le cas réel, la reconstruction de phase généralisée suit les même contraintes d'unicité que la reconstruction de phase classique, lorsque les matrices d'observation sont définies non négatives. On considèrera donc qu'un minimum de $4N$ mesures sont nécessaire pour garantir l'existence d'une solution unique à une phase près, ce qui est appliqué dans les simulation numériques de la section 5.4