

**AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ**  
**INSTITUT FRESNEL**  
**ECOLE DOCTORALE 352**

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Discipline : Physique et Sciences de la Matière  
Spécialité : Optique, Photonique et Traitement d'Image

**Simon LABOUESSE**

Titre de la thèse : Imagerie à éclairements structurés inconnues

Soutenue le 06/11/2017 devant le jury composé de :

**Laure BLANC-FÉRAUD**

I3S (UMR 7271), Sophia Antipolis

Rapporteur

**Olivier HAEBERLÉ**

MIPS (EA 2332 de l'Université de Haute-Alsace), Mulhouse

Rapporteur

**Sandrine LEVÈQUE-FORT**

Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay (UMR 8214), Orsay

Examinatrice

**Laurent CONDAT**

GIPSA Lab (UMR 5216), Grenoble

Examinateur

**Anne SENTENAC**

Institut Fresnel (UMR 7249), Marseille

Directrice de thèse

**Marc ALLAIN**

Institut Fresnel (UMR 7249), Marseille

Co-encadrant de thèse

---

Numéro national de thèse/suffixe local : 2017AIXM0001/001ED62

This document was typeset using  $\text{\LaTeX}$ .

# Table des matières

<b>Table des matières</b>	<b>iii</b>
<b>Notations</b>	<b>v</b>
0.1 Scalaires, Matrices, Operateurs . . . . .	v
0.2 Notations imageurs optiques . . . . .	v
<b>Table des figures</b>	<b>vii</b>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1 Imageurs actifs et super-résolution</b>	<b>5</b>
1.1 Système linéaire invariant . . . . .	5
1.2 Modélisation des fluctuations perturbant la mesure . . . . .	7
1.3 Éclairements structurés et super-résolution . . . . .	8
<b>2 Microscopie de fluorescence et super-résolution</b>	<b>13</b>
2.1 Illuminations structurées : de l’harmonique connue au speckle inconnue	14
2.1.1 Microscopie de fluorescence à éclairement uniforme . . . . .	14
2.1.2 Microscopie à éclairements structurés harmoniques (SIM) . . . . .	18
2.1.3 Microscopie à éclairements structurés aveugle (Blind-SIM) . . . . .	22
2.2 Techniques de super résolution concurrentes . . . . .	23
2.2.1 Microscopie à balayage : Confocal, Simulated emission depletion microscopy (STED) . . . . .	24
2.2.2 <i>Super-resolution optical fluctuation imaging</i> (SOFI) . . . . .	25
2.2.3 <i>Stochastic optical reconstruction microscopy</i> (STORM), <i>Photoac-</i> <i>tivated localization microscopy</i> (PALM) . . . . .	26
<b>3 Origine de la super-résolution en éclairements aléatoires</b>	<b>29</b>
3.1 Capacité de super résolution intrinsèque induite par des éclairements aléatoires <sup>1</sup> . . . . .	30
3.1.1 Information du premier ordre . . . . .	32
3.1.2 Information du second ordre . . . . .	32
3.1.3 Exemples d’applications . . . . .	35
3.2 Estimation par critère de contraste . . . . .	39
3.2.1 Critère de contraste à optimiser . . . . .	40

---

1. Les résultats présentés dans cette partie sont actuellement soumis dans la revue IEEE TCI.  
<https://arxiv.org/pdf/1512.06260.pdf>

3.2.2	Exemples d'applications . . . . .	44
3.3	Conclusion . . . . .	46
<b>4</b>	<b>Estimation en microscopie à éclairements structurés<sup>2</sup></b>	<b>47</b>
4.1	Critère joint à optimiser . . . . .	48
4.1.1	Illuminations harmoniques régulières et distordues . . . . .	53
4.1.2	Illuminations de speckles . . . . .	53
4.2	Algorithme joint . . . . .	58
4.2.1	Itération proximale standard et version accélérée . . . . .	59
4.2.2	Problème générique . . . . .	59
4.2.3	Solution du $m$ -ème problème Blind-SIM joint . . . . .	60
4.2.4	Pré-conditionnement et séparation primal-dual . . . . .	60
4.2.5	Résolution du sous problème Blind-SIM joint . . . . .	63
4.3	Conclusion . . . . .	67
<b>5</b>	<b>Résultats expérimentaux</b>	<b>69</b>
5.1	Montage expérimental . . . . .	69
5.2	Estimation du fond . . . . .	70
5.3	Capacité de super-résolution sur données réelles . . . . .	72
5.4	Comparaison SIM harmonique et Blind-SIM speckle . . . . .	77
5.5	Conclusion . . . . .	78
	<b>Perspectives et conclusions</b>	<b>81</b>
<b>A</b>	<b>Annexe</b>	<b>83</b>
A.1	Statistiques des illuminations de speckle . . . . .	83
A.1.1	Lois instantanées . . . . .	83
A.1.2	Moments statistiques d'ordre deux . . . . .	84
A.2	Statistiques des mesures . . . . .	85
A.2.1	Statistiques des mesures sans bruit d'instrument . . . . .	86
A.2.2	Statistiques des mesures avec bruit d'instrument . . . . .	86
A.3	Problème joint sans contrainte de positivité . . . . .	87
A.4	Démonstration de la propriété 3 . . . . .	88
A.5	Gradient de la divergence de Kullback-Leibler . . . . .	90
A.6	Démonstration de la convergence uniforme de $J_M(\boldsymbol{\theta})$ vers $J(\boldsymbol{\theta}^*, \boldsymbol{\theta})$ . . . . .	91
	<b>Bibliographie</b>	<b>93</b>

---

2. Les résultats présentés dans cette partie sont publiés dans la revue IEEE TIP [1].

# Notations

## 0.1 Scalaires, Matrices, Operateurs

$x$	variables scalaires ou fonction fonction à valeur dans $\mathbb{R}$
$\mathbf{x}$	vecteurs
$\mathbf{X}$	matrices
$X_{i,j}$	élément de la matrice $\mathbf{X}$ à la ligne $i$ et à la colonne $j$
$[\mathbf{X}]_{i,j}$	élément de la matrice $\mathbf{X}$ à la ligne $i$ et à la colonne $j$
$x^*$	conjugué de $x$
$\mathbf{X}^\dagger$	conjugué transpose de $\mathbf{X}$
$\mathbf{X}^t$	transposé de $\mathbf{X}$
$\mathbf{X}^+$	pseudo inverse de $\mathbf{X}$
$\odot$	produit termes à termes $[\mathbf{X} \odot \mathbf{Y}]_{i,j} = \mathbf{X}_{i,j} \times \mathbf{Y}_{i,j}$
$\otimes$	convolution $(h \otimes \rho)(\vec{r}) = \int_{\Omega} h(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \rho(\mathbf{r}') d\mathbf{r}'$
$\sim$	Transformée de Fourier discrète $\tilde{x}(\mathbf{k}) = \int_{\mathbb{R}} x(\mathbf{r}) e^{-i2\pi\mathbf{r}^t\mathbf{k}} d\mathbf{r}$ $\tilde{\mathbf{x}}_j = \sum_{k=1}^N x_k e^{-i2\pi k \times j/N}$
$\delta(x)$	opérateur de kronecker $\delta(x) = 0$ si $x \neq 0$ , $\delta(x) = 1$ sinon
$\text{Diag}(\mathbf{x})$	Matrice diagonal $[\text{Diag}(\mathbf{x})]_{i,j} = x_i * \delta(i - j)$
$\text{diag}(\mathbf{X})$	diagonal de la Matrice $\mathbf{X}$ , $[\text{diag}(\mathbf{X})]_i = X_{i,i}$

## 0.2 Notations imageurs optiques

$\rho$	objet d'intérêt (concentration de fluorophores, Permittivité, indice optique ... )
$h$	Point Spread Function (PSF), réponse impulsionnel de l'imageur
$\tilde{h}$	Optical Transfert Function (OTF), transformée de Fourier de la PSF
$x$	Sortie d'un imageur optique sans bruit
$y$	Sortie d'un imageur optique avec bruit



# Table des figures

1.1	<b>Partie gauche :</b> Module de l'OTF représentant une propagation en champ libre entre deux plans parallèles distants de $z$ mètres, pour une longueur d'onde $\lambda_1$ ( $\lambda_2$ ) en vert trait continue (respectivement en rouge pointillés) avec $\lambda_1 < \lambda_2$ . <b>Partie droite :</b> Schéma représentant la propagation d'un champ unidimensionnel entre deux plans parallèles distants de $z$ mètres. Le champ en entrée $E(x, y, 0)$ est représenté en bleu trait plein et le champ après propagation $E(x, y, z)$ est représenté en rouge trait pointillé. La relation entre ces deux champs peut être modélisée comme un système linéaire invariant : $E(x, y, z) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} h(x - x', y - y') E(x', y', 0) dx' dy'$ avec $h$ définie selon (1.1.5). Le module de l'OTF utilisée est représenté en partie gauche en rouge trait pointillés. . . . .	7
1.2	Représentation dans le domaine fréquentiel des fréquences de l'objet accessibles : le cercle noir correspond au domaine accessible avec un éclairement $E(\mathbf{r}) = 1$ , le cercle bleu en trait pointillé correspond au domaine accessible avec un éclairement $E(\mathbf{r}) = e^{2\pi i \mathbf{k}_E^t \mathbf{r}}$ . . . . .	9
1.3	<b>Partie haute :</b> Les deux graphiques représentent le domaine de Fourier, à gauche projeté dans le plan $k_x, k_y$ et à droite dans le plan $k_x, k_z$ . En trait plein noir, les limites du domaine de l'OTF, $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ sont représentées. En trait pointillé bleu, les limites du domaine des fréquences identifiables de l'objet dans le cas de la tomographie et de l'holographie digital à illuminations de speckle est représentée. <b>Partie basse :</b> La partie gauche représente l'OTF 3D pour le champ électromagnétique du microscope utilisé. La partie droite représente le contenu fréquentiel identifiable de l'objet dans le cas de la tomographie classique et dans le cas de l'holographie digitale à illumination de speckles. . . . .	10
2.1	Montage en <i>epi</i> -fluorescence d'un microscope de fluorescence en champ large. . . . .	14
2.2	Schéma d'un microscope composé de deux lentilles conjuguées $L1, L2$ et d'une pupille $P$ dans le plan focal des lentilles, l'axe optique correspond à un axe de symétrie du système, le plan perpendiculaire à l'axe optique passant par la pupille est appelé plan de Fourier. Le plan focal situé à gauche de la lentille $L1$ est appelé plan objet, celui à droite de la lentille $L2$ , plan image. Les rayons lumineux passant par l'axe optique et le plan objet peuvent atteindre le plan image sans être arrêtés par la pupille si il ne dépassent pas un angle $\alpha$ avec l'axe optique. . . . .	15

2.3	<p>Au préalable, une tache d’Airy est simulée en utilisant (2.1.1) avec une longueur d’onde de 510 nm et une ouverture numérique de 1,4. Puis, dans chacune de ces figures, deux taches d’Airy ou PSF sont représentées en bleu (pointillé). La somme de ces deux taches d’Airy est tracée en rouge. (A) Les deux PSF sont espacées de 171 nm soit de <math>d = \frac{0.61\lambda}{NA}</math>, cette distance correspond au critère de <i>Rayleigh</i>, le maximum de la première tache d’Airy est placé au dessus du premier minimum de la deuxième tache d’Airy. (B) Les deux PSF sont espacées de 182 nm soit de <math>d = \frac{0.5\lambda}{NA}</math>, cette distance correspond au critère de <i>Abbe</i>, on peut toujours distinguer un creux sur la somme des deux PSF. Cette distance correspond à la plus petite période d’un objet harmonique discernable après convolution avec la PSF. (C) Les deux PSF sont espacées de 171 nm soit de <math>d = \frac{0.47\lambda}{NA}</math>, cette distance correspond au critère de <i>Sparrow</i>, à partir de cette distance, le creux entre les deux PSF disparaît. Ce critère est notamment utilisé en astronomie car il est fréquent d’avoir à localiser deux objets ponctuels. . . . .</p>	16
2.4	<p><b>Partie gauche</b> : Domaine fréquentiel accessible en microscopie de fluorescence 2D avec une illumination uniforme. <b>Partie droite</b> : Optical Transfert Function (OTF) 2D, la limite du support de l’OTF notée <math>\mathcal{D}_{PSF}</math> est indiquée en bleu. . . . .</p>	16
2.5	<p><b>Partie haute</b> : Domaine fréquentiel accessible en microscopie de fluorescence 3D avec une illumination uniforme. A gauche dans le plan <math>(k_x, k_y)</math>, a droite dans le plan <math>(k_x, k_z)</math>. <b>Partie basse</b> : Optical Transfert Function (OTF) 3D, la limite du support de l’OTF notée <math>\mathcal{D}_{PSF}</math> est indiquée en bleu foncé (correspond à la plus petite iso-valeur tracée). . . . .</p>	17
2.6	<p>Montage d’un microscope de fluorescence en champ large à éclairements harmoniques. . . . .</p>	18
2.7	<p><b>Partie gauche</b> : Le domaine <math>\mathcal{D}_{PSF}</math> est représenté en trait plein noir dans le plan <math>(k_x, k_y)</math>. L’ensemble des cercles de cette figure forment le domaine accessible en utilisant un jeu de 9 illuminations harmoniques composées de trois orientations distinctes <math>\theta := \tan^{-1}(k_y/k_x) \in \{0, 2\pi/3, 4\pi/3\}</math>, et pour chacune d’elles trois incréments différents de phases d’un tiers de période sont effectués. La fréquence des illuminations est égale à 90% du rayon de <math>\mathcal{D}_{PSF}</math>. Les paires de cercles de couleur indiquent le domaine des fréquences identifiables de l’objet en n’utilisant que la direction d’illumination correspondante. <b>Partie droite</b> : Schéma d’un microscope de fluorescence avec illumination harmonique, R est un réseau de diffraction, les autres éléments sont décrits en Fig. 2.2. Une onde plane illumine le réseau de diffraction, des ondes planes appelées ordres sortent alors de celui-ci. Seules les ordres 1,0 et -1 sont représentés respectivement en bleu (pointillé), en violet et en vert (tireté). Au niveau du plan de Fourier, un filtre basse fréquence est utilisé pour supprimer l’ordre 0, ainsi seuls les ordres 1 et -1 arrivent au niveau du plan image, ces deux ondes planes interfèrent et forment une illumination harmonique (2.1.3). . . . .</p>	19

2.8 Dans le cas 3D, utiliser des illuminations harmonique de type (2.1.3) permet d'identifier le contenu fréquentiel de l'objet sur un domaine étendue. L'étendue et la forme de ce domaine dépend de la période choisie pour l'illumination harmonique. Les deux figures représentent le domaine fréquentiel dans le plan  $(k_x, k_z)$ , le domaine  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  est représenté en trait noir. Le contenu fréquentiel des illuminations (2.1.4) est indiqué avec des croix. A gauche la fréquence des illuminations harmonique est de 90% de la fréquence de coupure, a droite elle est de 45%. Dans le premier cas on peut voir grâce aux domaines représentés en traits bleu (pointillés) que la résolution latérale est améliorée d'un facteur proche de deux, cependant le «cône manquant» est toujours présent indiquant un mauvais sectionnement optique. A l'opposé dans le cas représenté à droite, le facteur de super-résolution latérale est proche de 1,5, mais le «cône manquant» est comblé. Il y a un compromis entre super-résolution et sectionnement optique à spécifier pour régler la période des illuminations harmoniques utilisées. . . . . 21

2.9 **Partie gauche** : Le domaine  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  est représenté en trait noir dans le plan  $(k_x, k_z)$ . Le contenu fréquentiel d'une des illuminations est indiqué avec des croix. L'ensemble des domaines représentés forment le contenu fréquentiel identifiable de l'objet. On peut remarquer que celui-ci est environ deux fois plus grand latéralement et axialement, ce qui correspond à un facteur de super-résolution de deux, de plus le « cone manquant » est comblé indiquant un meilleur sectionnement optique. **Partie droite** : Schéma d'un microscope de fluorescence avec illumination harmonique, R est un réseau de diffraction, les autres éléments sont décrits en Fig. 2.2. Une onde plane illumine le réseau de diffraction, des ondes planes appelées ordres sortent alors de celui-ci. Seules les ordres 1,0 et -1 sont représentés respectivement en bleu (pointillé), en violet et en vert (tiretés). Au niveau du plan image, les trois ondes planes interfèrent et forment l'illumination. . . . . 22

2.10 Montage d'un microscope de fluorescence en champ large à éclairements de speckle. . . . . 23

2.11 On suppose que la PSF d'illumination est égale à la PSF de détection,  $h_{\text{det}} = h_{\text{illu}}$ . **Partie haute** : Domaine fréquentiel accessible en microscopie de fluorescence 3D avec une illumination uniforme en bleu traits pointillés et dans le cas confocal en rouge traits pleins. A gauche dans le plan  $(k_x, k_y)$ , a droite dans le plan  $(k_x, k_z)$ . **Partie basse** : Limites du domaine de la fonction de transfert optique (OTF) 3D  $\tilde{h}_{\text{det}}$  en bleu (surface intérieure) ainsi que de la pseudo fonction de transfert optique  $\tilde{h}_{\text{con.f}}$  en rouge (surface extérieure). . . . . 24

3.1	Illustration des propriétés 2 et 3 quand $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ et $\mathcal{D}_{\text{spec}}$ sont des disques centrés de rayon respectifs $\nu_{\text{PSF}}$ et $\nu_{\text{spec}}$ (on suppose aussi $\mu_E \neq 0$ ). La fréquence de coupure $\nu_{\text{PSF}}$ est fixée, alors que la fréquence spatial maximal de l'illumination $\nu_{\text{spec}}$ varie le long de l'axe des abscisses. L'évolution des rayons pour lesquels les composantes fréquentielles sont identifiables et celui pour lesquels les composantes sont non identifiables sont représentés selon l'axe des ordonnées. . . . .	37
3.2	(a) Le quart inférieur droit de l'objet utilisé ou vérité terrain ( $80 \times 80$ pixels), similaire à celui utilisé dans [2]. (b) Objet filtré à deux fois la fréquence de coupure de l'OTF. (c) Image <i>widefield</i> déconvoluée (illumination constante) (d,e) Estimation de $\rho$ obtenue par minimisation de la pseudo distance KDL pénalisée 3.2.9 avec $M = 100$ (d) avec $M = 1000$ (e) illumination de speckle; le paramètre de régularisation est réglé à $\beta = \beta_0/M$ avec $\beta_0 = 100$ . (f) Estimateur de $\rho$ obtenu par minimisation de la pseudo distance KDL en utilisant les statistiques asymptotiques $\hat{\mu} = \mu^*$ and $\hat{\Gamma} = \Gamma^*$ . L'unité de distance sur l'axe horizontal et vertical sont en longueur d'onde $\lambda$ . Le pas d'échantillonnage des images pour toutes les simulations est de $\lambda/20$ . La ligne en trait plein (respectivement en pointillé) correspond à la fréquence spatiale limite transmise par l'OTF ( respectivement deux fois la fréquence spatiale limite transmise). . . . .	43
3.3	Résultats obtenus à partir d'images 2D simulées de tomographie de diffraction, l'otf utilisée est une pupille de rayon égal à celui du support de l'otf dans le cas de la microscopie de fluorescence. L'objet utilisé est représenté dans l'image (a) de la figure 3.2. (a) Moyenne des 1000 images simulées, on peut voir que dans le cas de la tomographie aucune information n'est contenue dans la moyenne des champs électromagnétiques enregistrés. (b) Reconstruction obtenue en utilisant l'algorithme marginal 3.2. . . . .	45
4.1	[ <i>Ligne du haut</i> ] Quart bas droit de la mire de fluorescence servant de vérité terrain ( $160 \times 160$ pixels) considérée dans [2] (à gauche) et la déconvolution de l'image champ large correspondante (à droite) La ligne pointillée (respectivement pleine) correspond aux fréquences spatiales transmises par le support de l'OTF (respectivement deux fois le support de l'OTF). [ <i>Ligne du bas</i> ] Reconstruction à partir d'illuminations connues : (gauche) $M = 9$ illuminations harmoniques et (droite) $M = 200$ illuminations de speckle. Les unités de distances des axes sont en longueur d'onde $\lambda$ . . . . .	50
4.2	[ <i>Ligne A</i> ] Une image produit $q_m = \mathbf{vect}(\rho_n \times E_{m;n})$ construite à partir d'une des 200 illuminations utilisée pour générer les données : (gauche) une constante positive est ajoutée aux illuminations de speckle standard de telle sorte que la plus petite valeur soit beaucoup plus grande que zero ; (droite) une constante positive est soustraite des illuminations de speckle standard, les valeurs négatives sont mises à zero. [ <i>Ligne B</i> ] Reconstruction de l'image produit $q_m$ correspondante à celle montrée ci-dessus. [ <i>Ligne C</i> ] Reconstruction finale $\hat{\rho}$ achevée grâce à l'ensemble des illuminations. . . . .	51

4.3	<b>Illuminations Harmoniques</b> : [Ligne A] Une illumination $E_m$ extraite de l'ensemble des illuminations harmoniques régulières (gauche) et distordues (droite) [Ligne B] Reconstructions Blind-SIM joint pénalisé correspondant [Ligne C] (gauche) Réduire le nombre de phases par orientation de 6 à 3 fait apparaître des artefacts dans la reconstruction, voir (B-gauche) pour comparaison. (droite) Augmenter la fréquence de modulation $\ \nu\ $ des illuminations harmoniques au delà de la fréquence de coupure de l'OTF empêche l'apparition de toute super-résolution. [Ligne D] Image basse résolution $y_m$ extraite de l'ensemble des illuminations dont la fréquence de modulation est à l'intérieur (gauche) à l'extérieur (droite) du domaine de l'OTF – voir Sec. 4.1.1 pour plus de détails. . . .	54
4.4	<b>Illuminations de speckle</b> : [Ligne A] une illumination de speckle telle que $NA_{\text{ill}} = NA$ (gauche) et sa contrepartie « deux photons » (droite). [Ligne B] Reconstructions Blind-SIM joint pénalisé à partir de $M = 1000$ illuminations de speckle (gauche) et d'illuminations « deux photons » (droite). . . . .	55
4.5	<b>Illuminations de speckle (suite)</b> : Reconstructions Blind-SIM joint pénalisé à partir d'illumination de speckle standard (gauche) et d'illuminations de speckle « deux photons » (droite). Le nombre d'illuminations considéré pour ces reconstructions est $M = 10$ (A), $M = 200$ (B) et $M = 10000$ (C). . . . .	56
4.6	<b>Illuminations de speckle (suite)</b> : La taille de corrélation des illuminations aléatoires de speckle et de speckle « au carré » influence le niveau de super-résolution des reconstructions Blind-SIM pénalisé : [Ligne A] reconstruction avec $M = 10000$ speckle, $NA_{\text{ill}} = 0.5 NA$ (gauche) et avec les speckles « au carré » correspondants (droite). [Ligne B] <i>idem</i> avec $NA_{\text{ill}} = 2 NA$ . [Ligne C] <i>idem</i> avec des illuminations spatialement décorrelées. . . . .	57
4.7	Reconstruction d'une cible fluorescente à partir de données Blind-SIM en éclairage de speckles, réalisé en minimisant le critère (4.1.5) avec 10, 50 ou 1000 itérations FISTA (abc) ou PPDS(def). Pour toutes ces simulations, l'estimée initiale est $q^{(0)} = \mathbf{0}$ et les paramètres ont pour valeurs ( $\alpha = 0.3, \beta = 10^{-6}$ ). Les itérations PPDS utilisent le pré-conditionneur donné en (4.2.19) avec $C = H^t H$ et $a = 1$ , (voir Sec 4.2.5 pour plus de détail). . . . .	61
4.8	Domaine admissible pour $(\tau, \sigma)$ assurant la convergence globale des itérations PPDS avec $\theta \in (0; 1)$ , voir relation (4.2.15). . . . .	63
4.9	Valeur du critère (graphique du haut) et distance au minimiseur (graphique du bas) en fonction du nombre d'itérations PPDS pour le problème de reconstruction considéré pour la Fig. 4.7. L'estimée initial choisi est $q^{(0)} = \mathbf{0}$ pour les variables primales et $\omega^{(0)} = -\nabla g(q^{(0)})$ pour les variables dual. Le paramètre du pré-conditionneur prend pour valeur $a = 1$ et $(\theta, \tau, \sigma)$ sont réglés selon la règle (4.2.16). Pour être complet, les courbes concernant les itérations FISTA et PDS ( <i>i.e.</i> , algorithme PPDS avec pour pré-conditionner la matrice identité $B = I_d$ ) sont aussi tracées. . . . .	66

5.1	Microscope de fluorescence pouvant fonctionner avec 4 longueurs d'onde d'excitation différentes grâce à un bloc laser Oxixius. Un SLM QXGA-3DM est utilisé pour structurer l'illumination au niveau de l'échantillon permettant ainsi de générer des illuminations de speckle ou des illuminations harmoniques. Différents objectifs sont utilisés sur ce montage. Ce montage à été réalisé par Thomas Mangeat, ingénieur de recherche au LBCMCP en se basant sur le montage présenté dans une publication de Lu-Walther [3]. . . . .	70
5.2	Histogramme de $[\mathbf{H}^+ \mathbf{y}_m]_i$ à partir de données réelles (mire Argolight L) tracé en ligne continue bleu et tracé de la densité de probabilité $\mathcal{EMG}$ à partir des paramètres estimés $\hat{\mu}_n$ , $\hat{\sigma}$ et $\hat{\tau}_n$ en trait pointillé rouge. . . . .	72
5.3	Les images présentées sont obtenues en simulant 500 illuminations de speckle pleinement développé de corrélation égale à la PSF du microscope simulé. A partir de cet ensemble d'illuminations, des images de microscopie sont simulées en utilisant la mire présentée Fig. 3.2(a) comme échantillon de fluorescence. Sur ces données basse résolution, on ajoute un fond basse fréquence (avec un domaine fréquentiel limité à 0,4 fois la fréquence de coupure) aux images. Ces images sont ensuite bruitées avec un bruit de Poisson de tel sorte que le SNR soit de 30 dB (on multiplie par un facteur l'image avant de procéder au tirage aléatoire). (A) Fond basse fréquence ajouté aux images (vérité terrain) (B) Estimation du fond à partir de l'estimateur 5.2.4. (C) Estimation du fond filtrée à 0,4 fois la fréquence de coupure. (D) Simulation d'une image en sortie de microscope. Cette image est la somme du fond simulé avec la convolution de la PSF et du produit objet fois illumination, cette image est ensuite bruitée avec un bruit de grenaille. (E) Moyenne des images simulées en présence de fond perturbant la mesure. (D) Moyenne des images simulées en présence de fond perturbant la mesure après soustraction du fond estimé (B). . . . .	73
5.4	Les images présentées sont obtenues à partir d'un microscopie de fluorescence (voir montage 5.1), l'objet observé est un élément d'une mire Argolight appelé pattern L. L'objectif utilisé est un X100 avec une ouverture numérique de 1,49 et une huile dont l'indice optique est de 1,515. L'indice optique du milieu de montage est de 1,49 et la longueur d'onde d'excitation est de 405 nanomètres celle de collection est de 520 nanomètres. (A) Moyenne des images basse résolution à base d'illuminations de speckle. (B) Déconvolution de Wiener de l'image (A). La PSF utilisée a été simulée à partir des caractéristiques expérimentales en utilisant le modèle optique de Gibson & Lanni implémenté dans le <i>plug-in PSF Generator</i> de ICY [4]. (C) Reconstruction Blind-SIM produite par l'algorithme d'estimation jointe (voir le pseudo-code 1) à partir de 900 illuminations de speckle. (D) <i>Idem</i> en soustrayant au préalable l'estimée du fond aux acquisitions. . . . .	74
5.5	Distance minimum de séparation des lignes pour chaque images présentée en figure 5.4. . . . .	75

5.6	Coupes verticales extraites des images (B) et (D) de la figure 5.4 respectivement en ligne pointillée et en trait plein. L'abscisse indique la distance estimée entre les lignes. . . . .	75
5.7	Les images présentées sont obtenues à partir d'un microscope de fluorescence (voir montage 5.1), l'objet observé est composé de billes de diamètre 100 nanomètres. L'objectif utilisé est un X100 avec une ouverture numérique de 1,49 et une huile dont l'indice optique est de 1,515. L'indice optique du milieu de montage est de 1,49 et la longueur d'onde d'excitation est de 488 nanomètres celle de collection est de 520 nanomètres. (A) Moyenne des images basse résolution à base d'illuminations de speckles. (B) Déconvolution de Wiener de l'image (A). La PSF utilisée a été simulée à partir des caractéristiques expérimental en utilisant le modèle optique de Gibson & Lanni implémenté dans le <i>plug-in PSF Generator</i> de ICY [4]. (C) Reconstruction Blind-SIM produite par l'algorithme d'estimation jointe (voir le pseudo-code 1) à partir de 900 illuminations de speckle. (D) <i>Idem</i> en soustrayant au préalable l'estimée du fond aux acquisitions. . . . .	76
5.8	Coupes extraites des images (B) et (D) de la figure 5.4 respectivement en ligne pointillée et en trait plein. . . . .	77
5.9	Les images présentées sont obtenues à partir d'un microscope de fluorescence (voir montage 5.1), l'objet observé est composé de podosomes dont l'anneau d'adhésion est marqué avec des fluorophores Alexa Fluor 488. L'objectif utilisé est un X60 avec un NA de 1,40 et une huile à 1,515. Le milieu de montage est de 1,49. La longueur d'onde d'excitation est de 488 nm, celle de collection est de 520 nm. (A) Image obtenue avec une illuminations harmonique, 30 images de ce type sont acquises avec 5 phases et 6 directions différentes. (B) Image obtenue avec une illumination de speckle, 800 illuminations de ce type sont utilisées. (C) Image widefield obtenue en sommant l'ensemble des images à base de speckles. (D) Image widefield précédente déconvoluée à l'aide d'un filtre de Wiener. (E) Reconstruction Blind-SIM utilisant le pseudo code 1 à partir des images à illumination de speckle, une estimation du fond (5.2.5) est soustraite aux images avant reconstruction. (F) Reconstruction SIM à illumination connues (2.1.6) à partir des images à illuminations harmoniques. On peut voir une amélioration de la qualité visuelle des images en allant de l'image (C) à (F). On retrouve les nouvelles structures apparaissant grâce à la super-résolution dans l'image Blind-SIM (E) dans l'image (F), ceci nous conforte dans l'idée que ces nouveaux éléments ne sont pas des artefacts. . . . .	79
A.1	gauche : Distribution de probabilité en un point spatial dans le cas d'une illumination de speckle pleinement développé, en trait plein pour l'amplitude, en pointillé pour l'intensité et en trait interrompu pour l'intensité au carre droite : densité spectral d'une illumination de speckle pleinement développé 1D en échelle logarithmique , en trait plein pour l'amplitude, en pointillé pour l'intensité et en trait interrompu pour l'intensité au carre	85



# Introduction

Pour la plupart des systèmes imageurs actifs, les données enregistrées  $y$  peuvent être modélisées par une convolution avec une réponse impulsionnelle appelée PSF (pour *point spread function*) notée  $h$  du produit objet  $\rho$  fois éclairé  $E$ , le tout perturbé par un bruit de mesure :

$$y = h \otimes [\rho \times E] + \epsilon \quad (0.2.1)$$

avec  $\otimes$  l'opérateur de convolution et  $\epsilon$  un bruit de mesure dans les images de sortie de l'imageur. Cette simple modélisation peut être appliquée à des configurations d'imagerie aussi diverses que les scanners à micro-ondes [5], la télédétection radar [6] ou la microscopie de fluorescence [7].

La PSF  $h$  contient toute l'information sur la géométrie de l'imageur utilisé telle que l'ouverture numérique (NA) d'un objectif de microscopie ou la taille du réseau d'antennes en imagerie radar. La propagation d'onde entre l'objet et le détecteur est aussi prise en compte. Souvent, la propagation en espace libre empêche les hautes fréquences spatiales d'atteindre le détecteur. En conséquence,  $h$  a nécessairement un support borné dans l'espace de Fourier, support qui sera noté  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ . Par exemple, pour un scanner micro-Ondes idéal,  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  est une sphère de rayon  $1/\lambda$  (avec  $\lambda$  la longueur d'onde de l'illumination) quand le champ diffracté par l'échantillon est enregistré pour toutes les directions de l'espace, ou une calotte de sphère quand les observations sont effectuées seulement sur un angle solide réduit [8]. De manière similaire, pour la microscopie de fluorescence en deux dimensions,  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  est un disque de rayon  $2\text{NA}/\lambda$  [7].

Quand l'éclairage est homogène à l'intérieur de l'objet, seules les fréquences spatiales de l'objet appartenant à  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  peuvent être restaurées à partir des données, ce qui limite fondamentalement la résolution de l'image. Pour améliorer cette résolution, l'imagerie de synthèse utilisant différents éclairages a été développée. Le principe général est d'utiliser différents éclairages connus (0.2.1) et non homogènes  $E_m$ ,  $m = 1, \dots, M$ , pour sonder l'objet. L'interaction entre  $E_m$  et  $\rho$ , permet de moduler les hautes fréquences spatiales de l'objet à l'intérieur du support  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ . En utilisant un algorithme adapté, des fréquences de l'objet en dehors de  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  peuvent être retrouvées, amenant ainsi à une meilleure résolution. Cette idée est au cœur de beaucoup de configurations d'imagerie, le radar à synthèse d'ouverture (SAR) [6], la tomographie de diffraction [9], et la microscopie de fluorescence à éclairages structurés (SIM) [10],[11] parmi d'autres.

Dans toutes ces modalités d'imageries, le processus numérique ou analogique permettant d'obtenir l'image super-résolue à partir de l'ensemble d'images basses résolutions, pré-suppose la connaissance précise des différentes illuminations  $E_m$  utilisées et donc leur contrôle précis. La capacité de super-résolution de ces modalités d'imageries est

en pratique ainsi que théoriquement démontrée. Néanmoins, la nécessité de contrôler les éclaircissements utilisés qui est une contrainte majeure pour l'implémentation expérimentale se révèle dans certains cas impossible. C'est pourquoi, certains groupes ont développés des algorithmes de reconstruction pouvant gérer des imprécisions sur les éclaircissements [12, 13, 14, 15]. Certains suivent une option plus radicale encore en préconisant l'utilisation d'éclaircissements totalement incontrôlés de type figure de tavelure ou speckle [16]. Cette approche aveugle (*Blind-SIM*) qui simplifie grandement les implémentations expérimentales a déjà été mise en place en microscopie optique [2, 17, 18, 19] et en imagerie photo-acoustique [20, 21]. Grâce à des algorithmes d'inversion utilisant des *a priori* sur les statistiques des éclaircissements ou sur l'objet lui-même, les images basses résolutions permettent de reconstruire une image de l'objet avec une résolution significativement meilleure que celle possible en utilisant un éclaircissement uniforme [2, 17, 18, 19]. Cependant, beaucoup de questions restent ouvertes, notamment sur la résolution théoriquement atteignable en fonction des statistiques des éclaircissements utilisés.

Les deux premiers chapitres sont des chapitres introductifs, dans le premier nous présentons la modélisation des imageurs actifs et l'impact des éclaircissements structurés sur la résolution de l'imageur. Le deuxième chapitre introduit de manière spécifique des techniques de microscopie de fluorescence, notamment SIM [10],[11] et *Blind-SIM* [2, 17, 18, 19]. Ces techniques serviront d'exemples d'application de nos résultats dans les parties suivantes. La microscopie de fluorescence voit naître énormément de techniques « concurrentes » de super-résolution. Certaines de ces techniques sont présentées afin de mieux cerner l'état de l'art et de pouvoir positionner les techniques *Blind-SIM* par rapport à ces autres techniques.

Dans le troisième chapitre nous proposons, à notre connaissance, la première évaluation mathématique de la capacité de super-résolution d'un imageur de synthèse utilisant des illuminations aléatoires inconnues. Cette analyse est très générale et peut être appliquée dès lors que la modélisation (0.2.1) est valide avec  $\rho > 0$ . L'application de cette étude mathématique à des modalités d'imagerie couramment utilisées a de nombreuses implications importantes, notamment dans le cas de la microscopie de fluorescence et de l'holographie digitale. Ces résultats motivent la création d'estimateurs permettant d'accéder à cette information de super-résolution sur l'objet. Dans cette perspective, nous distinguons ici deux techniques d'estimations, l'estimation jointe telle que les illuminations et l'objet sont conjointement estimés et l'estimation marginale par critère de contraste telle que seul l'objet est estimé. À la fin du chapitre trois, un estimateur marginal asymptotiquement consistant qui permet d'estimer l'objet à partir des moments empiriques du second ordre des mesures est proposé. Des résultats de simulation en microscopie de fluorescence et en holographie digitale permettent d'illustrer la capacité de cet algorithme à créer une reconstruction super-résolue de l'objet à partir d'un nombre limité d'images basses résolutions issues d'illuminations de speckle. La complexité algorithmique de cet estimateur en  $\mathcal{O}(N^3)$  est cependant trop importante pour pouvoir l'utiliser sur des images de taille réaliste.

Pour pallier à ce problème, un estimateur joint basé sur des *a priori* de positivité et de parcimonie est proposé dans le quatrième chapitre. Celui-ci est applicable dès lors que l'objet et les illuminations sont réels positifs, les illuminations n'étant pas nécessairement aléatoires. Un algorithme de déconvolution sous contrainte de positivité et

*a priori* de parcimonie appelé PPDS a notamment été développé afin d'accélérer très sensiblement la vitesse de convergence. L'utilisation de cet algorithme (que nous avons appelé PPDS) ne se limite pas à la microscopie de fluorescence et son champ d'application est beaucoup plus large que celui présenté dans ce manuscrit. D'autre part, si il est à notre connaissance impossible d'évaluer théoriquement la capacité de super-résolution de l'estimateur *Blind-SIM*, la vitesse de convergence de l'algorithme PPDS nous permet d'étudier son comportement en simulant de nombreuses configurations. Ceci a permis d'évaluer de manière empirique les performances de cet estimateur joint.

Dans une cinquième partie, le traitement de données réelles est décrit. Ces images contiennent un fond lumineux pouvant provenir de plan hors focus ou d'un mauvais contraste des illuminations utilisées. Ce fond empêche dans de nombreux cas aux *a priori* de parcimonie et de positivité d'être pleinement opérationnels, *i.e.*, ce fond empêche l'émergence de la super-résolution de l'estimateur joint. Nous proposons donc dans ce chapitre un estimateur de ce fond lumineux, dédié aux techniques *Blind-SIM* à éclairagements de speckles. Enfin, nous présentons des résultats de reconstructions super-résolues, à partir de données réelles de microscopie de fluorescence. Une mire de calibration et un échantillon composé de billes nous ont permis d'estimer à environ 1,7 le facteur de super-résolution atteint. Nous avons également comparé les reconstructions obtenues avec une technique SIM à illuminations harmoniques connues et la stratégie *Blind-SIM* jointe à illuminations de speckle. En utilisant un objet biologique non parcimonieux (composé de podosomes), on a pu observer que des structures fines (invisibles en utilisant un éclairage uniforme) apparaissent dans les deux reconstructions SIM et *Blind-SIM* jointe. On considère que ceci est un bon indice de la présence de super-résolution en *Blind-SIM* mais cela ne nous permet pas de quantifier celle-ci.

Ces résultats sont le fruit du travail collaboratif de Jérôme Idier, Sébastien Bourguignon et Penghuan Liu du LS2N (Nantes) ainsi que de Anne Sentenac, Marc Allain, Awoke Negash et moi même de l'Institut Fresnel (Marseille). Les données réelles présentées en fin de manuscrit ont été acquises aux LBCMCP (Toulouse) par Thomas Mangeat. Trois doctorants ont travaillé sur la thématique *Blind-SIM* avec différentes approches. Awoke Negash a entre autre étudié la partie expérimentale et la partie 3D de notre problématique *Blind-SIM*. Liu Penghuan a quant à lui étudié la possibilité de créer un algorithme marginal de plus faible complexité.



# Chapitre 1

## Imageurs actifs et super-résolution

Un imageur est un dispositif qui permet de former à distance une représentation d'un objet, généralement en enregistrant une onde (optique, acoustique, *etc.*) provenant de la cible. Dans le cas le plus simple, l'objet émet une onde et un détecteur capte cette onde. Généralement, les mesures du détecteur sont une représentation imparfaite de l'objet lui-même. Ainsi si l'objet est ponctuel, l'image obtenue est une tache appelée réponse impulsionnelle (*point spread function* en anglais ou PSF). Si deux objets ponctuels très proches sont imagés, il n'est plus possible de les distinguer dans l'image obtenue en dessous d'une certaine distance<sup>1</sup>, il y a donc une limite de résolution. Plusieurs critères permettent de définir cette limite de résolution en fonction de la forme de la PSF, on y reviendra plus tard.

Le plus souvent l'objet n'émet pas de signal spontanément et il est nécessaire d'éclairer la scène pour imager l'objet. On est alors en présence d'un imageur actif. L'interaction entre l'éclairement et l'objet permet de remonter à la mesure d'une propriété du milieu traversé en utilisant un imageur. Par ailleurs, il est possible de structurer l'éclairement (*i.e.*, de contrôler ou connaître une caractéristique de cet éclairement), et ainsi d'améliorer la résolution de l'imageur.

L'objectif de cette thèse est de développer à la suite des travaux de E. Mudry [2] des techniques d'imagerie utilisant des éclairagements structurés inconnus, en particulier à base de figures de tavelures (appelées speckles par la suite). Nous allons notamment montrer le bien-fondé de cette approche en utilisant des arguments de théorie, de simulation et d'expérimentation.

### 1.1 Système linéaire invariant

Les techniques d'imagerie abordées dans cette thèse seront modélisées par des systèmes linéaires. Pour un imageur l'entrée du système est une propriété physique de l'objet que l'on cherche à observer, par exemple une densité de fluorophore, l'indice de réfraction de l'objet, *etc.* On supposera donc que la réponse de l'imageur est linéaire par rapport à cette propriété. Dans l'ensemble des systèmes linéaires, il existe un sous

---

1. En théorie, en l'absence de bruit l'objet étant de support fini, il est possible de distinguer les deux points quelque soit leur distance respective par prolongement analytique [22, 6.6]. En pratique, la présence de bruit dans les mesures ne permet pas de séparer les deux points en utilisant un prolongement analytique.

ensemble appelé système linéaire invariant, ils ont une réponse indépendante de la position de l'objet en entrée du système. On supposera par la suite que les imageurs considérés appartiennent idéalement à cette classe. Notons que dans le cas des microscopes optiques, les objectifs et les lentilles tubes utilisés sont construits pour être le plus proche possible d'un système linéaire invariant (*i.e.*, condition des sinus d'Abbe<sup>2</sup>). Les systèmes linéaires invariants peuvent être modélisés par une équation de convolution [24, p. 21].

Il est fréquent d'avoir à éclairer l'objet avant de collecter grâce à un imageur la réponse de cet objet à l'éclairement. On considère maintenant que les entrées du système imageur sont conjointement l'objet imagé et l'éclairement utilisé. Dans le cadre des hypothèses décrites au paragraphe ci-dessus, la modélisation du système imageur est :

$$x(\mathbf{r}) = [h \otimes (\rho \times E)](\mathbf{r}) \quad (1.1.1)$$

$$= \int_{\mathbb{R}^d} h(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \rho(\mathbf{r}') E(\mathbf{r}') d\mathbf{r}' \quad (1.1.2)$$

où  $\mathbf{r} \in \mathbb{R}^d$  et  $\mathbf{r}' \in \mathbb{R}^d$  représentent des coordonnées spatiales,  $\otimes$  est un opérateur de convolution,  $\rho \in \mathbb{C}$  est l'objet à observer.  $h \in \mathbb{C}$  est la PSF du système considéré,  $E \in \mathbb{C}$  est l'éclairement. La sortie de l'imageur  $x(\mathbf{r})$  correspond au signal mesuré en l'absence de bruit. Sans prendre en compte le bruit, les imageurs vus dans ce manuscrit peuvent tous être modélisés par (1.1.2). Si l'hypothèse d'une réponse linéaire à l'illumination n'est pas vérifiée, une illumination effective peut alors être utilisée, l'important étant de garder une réponse linéaire du système par rapport à  $\rho$ . Pour simplifier la modélisation, l'ensemble des constantes de proportionnalité (*i.e.*, efficacité quantique, section efficace d'absorption...) des systèmes n'apparaîtront pas et seront considérées comme faisant partie de l'objet. L'éclairement  $E$  peut représenter une onde sonore, un champ électromagnétique ou bien une intensité lumineuse (par la suite l'éclairement sera noté  $I$  dans le cas d'une intensité lumineuse). Dans le domaine de Fourier (dans le  $k$ -space), l'équation (1.1.2) devient :

$$\tilde{x}(\mathbf{k}) = \int_{\mathbb{R}^d} x(\mathbf{r}) \times e^{-i2\pi\mathbf{r}^t\mathbf{k}} d\mathbf{r} \quad (1.1.3)$$

$$= \left[ \tilde{h} \times \left( \tilde{\rho} \otimes \tilde{E} \right) \right](\mathbf{k}) \quad (1.1.4)$$

En optique, la fonction  $\tilde{h}$  est appelée *Optical Transfert Function* (OTF) et son support est limité dès que l'acquisition est obtenue en champ lointain ; par la suite, le support borné sur  $\mathbb{R}^d$  de cette fonction sera noté  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ . Ce domaine  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  définit la résolution de l'imageur, en effet puisqu'on accède en sortie du système uniquement aux fréquences incluses dans  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ , il y a donc perte d'information au travers du système imageur. Notamment, dans le cas d'un éclairement uniforme, le contenu fréquentiel de l'objet ne peut être identifié qu'à l'intérieur de  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ .

---

2. La condition des sinus d'Abbe est l'expression mathématique de l'aplanétisme d'un système optique. Si cette condition est vérifiée, alors un objet étendu perpendiculaire à l'axe optique forme une image perpendiculaire à l'axe optique en sortie de l'imageur [23].

### Propagation libre

Pour donner un exemple, sous certaines hypothèses, la propagation dans le vide d'un champ électromagnétique monochromatique d'un plan  $E(x, y, 0)$  à un deuxième plan parallèle au premier  $E(x, y, z)$  avec  $z \gg \lambda$  peut être vu comme un système linéaire invariant, [24, p. 60] dont l'OTF s'écrit :

$$\tilde{h}(\mathbf{k}) = \begin{cases} e^{i2\pi\frac{z}{\lambda}\sqrt{1-\lambda^2\|\mathbf{k}\|^2}} & \text{si } \mathbf{k} \in \mathcal{D}_{\text{PSF}} \\ 0 & \text{sinon.} \end{cases} \quad (1.1.5)$$

$$\mathcal{D}_{\text{PSF}} = \left\{ \mathbf{k} \in \mathbb{R}^d \mid \|\mathbf{k}\| < \frac{1}{\lambda} \right\} \quad (1.1.6)$$

$\lambda$  étant la longueur d'onde du champ se propageant.

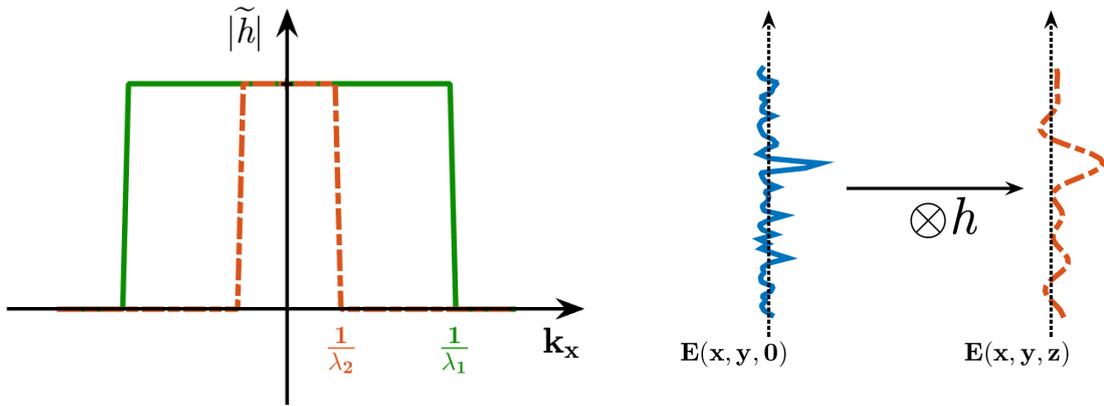


FIGURE 1.1 – **Partie gauche** : Module de l'OTF représentant une propagation en champ libre entre deux plans parallèles distants de  $z$  mètres, pour une longueur d'onde  $\lambda_1$  ( $\lambda_2$ ) en vert trait continu (respectivement en rouge pointillés) avec  $\lambda_1 < \lambda_2$ . **Partie droite** : Schéma représentant la propagation d'un champ unidimensionnel entre deux plans parallèles distants de  $z$  mètres. Le champ en entrée  $E(x, y, 0)$  est représenté en bleu trait plein et le champ après propagation  $E(x, y, z)$  est représenté en rouge trait pointillé. La relation entre ces deux champs peut être modélisée comme un système linéaire invariant :  $E(x, y, z) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} h(x - x', y - y') E(x', y', 0) dx' dy'$  avec  $h$  définie selon (1.1.5). Le module de l'OTF utilisée est représenté en partie gauche en rouge trait pointillés.

Par une simple propagation libre du champ, de l'information est perdue, les hautes fréquences en dehors de  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  étant complètement filtrées (voir Fig. 1.1-Partie gauche). Physiquement, il y a perte d'information par diffraction, cette perte d'information correspond à la notion d'ondes évanescentes [24, partie 3.10.4].

## 1.2 Modélisation des fluctuations perturbant la mesure

Dans le cas idéal, nous avons vu précédemment la modélisation reliant l'objet imagé aux données mesurées (1.1.2). Cependant, les capteurs utilisés pour mesurer la sortie

$x(\mathbf{r})$  ne sont pas parfaits. La mesure n'est effectuée qu'en quelques points spatiaux,  $x(\mathbf{r})$  est donc échantillonnée spatialement. On a vu que  $x(\mathbf{r})$  est à support fréquentiel fini contenu dans  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ , il est donc possible d'échantillonner sans perte en respectant le théorème de Shannon [25] et on supposera par la suite que l'on est dans ce cas de figure. D'autre part, la mesure est effectuée sur un domaine fini, mais on négligera par la suite les effets de cette troncature. Enfin, la mesure est entachée de bruit. En particulier, quand la mesure consiste à compter un nombre de particules émises par une source, la physique quantique nous indique que la mesure peut être modélisée par une réalisation d'une distribution aléatoire de Poisson. Ainsi, même dans le cas d'un capteur « parfait », la mesure peut être entachée d'un bruit.

Un modèle plus réaliste de l'image est alors :

$$y(\mathbf{r}) \sim \mathcal{T}(x(\mathbf{r}); \boldsymbol{\theta}(\mathbf{r})) \quad (1.2.1)$$

avec  $\mathcal{T}$  une loi statistique modélisant le bruit dans les images de sortie de l'imageur et  $\boldsymbol{\theta}$  les paramètres de cette loi. Le bruit peut être séparé en deux types, suivant s'il dépend ou non de la mesure  $x(\mathbf{r})$ .

- La partie du bruit non liée à  $x(\mathbf{r})$  provient de plusieurs sources : le bruit thermique, l'amplification électronique, *etc.* Cette partie est souvent modélisée par une loi normale  $\mathcal{N}(\mu(\mathbf{r}), \sigma^2(\mathbf{r}))$  de moyenne  $\mu(\mathbf{r})$  et de variance  $\sigma^2(\mathbf{r})$ . La modélisation peut évidemment être beaucoup plus fine et dépend du capteur en question. Pour des caméras optiques, la modélisation sera différente selon le type de capteur (CCD, CMOS, sCMOS ...) et cette partie du bruit peut aussi être négligée dans le cas EMCCD par exemple.
- La partie du bruit liée à  $x(\mathbf{r})$ , appelée en optique bruit de grenaille, provient du caractère aléatoire de l'émission d'un photon ainsi que d'une probabilité de détection le long de la chaîne de traitement. Ce bruit suit une loi de Poisson  $\mathcal{P}(x(\mathbf{r}))$ . La variance d'une loi de Poisson est égale à sa moyenne. Si  $x(\mathbf{r})$  correspond à un nombre élevé de photons alors la loi de Poisson peut être approximée par une loi Normal [26].

### 1.3 Éclairements structurés et super-résolution

On a vu précédemment que dans le cas d'un éclairage uniforme, on peut en théorie identifier le contenu fréquentiel de l'objet sur le support de l'OTF,  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ . Lorsque l'éclairage est structuré, la réponse de l'objet à cet éclairage est alors modulée. Cette réponse passe ensuite au travers de l'imageur (1.2.1). Prenons le cas d'un éclairage de la forme  $E(\mathbf{r}) = e^{2\pi i \mathbf{k}_E^t \mathbf{r}}$ , la transformée de Fourier de cet éclairage étant  $\tilde{E}(\mathbf{k}) = \delta(\mathbf{k} - \mathbf{k}_E)$ , on en déduit que le spectre de la mesure non bruitée s'écrit  $\tilde{x}(\mathbf{k}) = \tilde{h}(\mathbf{k}) \times \tilde{\rho}(\mathbf{k} - \mathbf{k}_E)$  et on peut donc identifier de nouvelles composantes fréquentielles de l'objet  $\rho$ . Si l'on est capable de générer un éclairage avec  $\mathbf{k}_E$  quelconque, il devient possible d'identifier vignette par vignette tout le contenu fréquentiel de l'objet  $\rho$ .

En pratique, le contenu fréquentiel de l'éclairage est souvent physiquement limité.

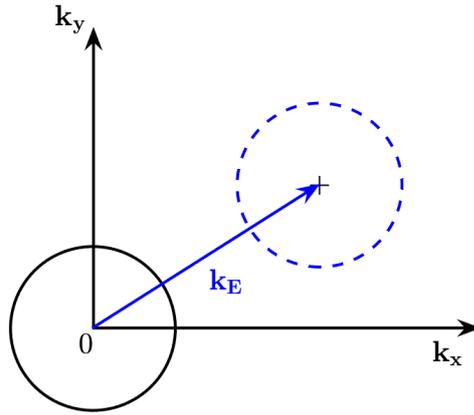


FIGURE 1.2 – Représentation dans le domaine fréquentiel des fréquences de l’objet accessibles : le cercle noir correspond au domaine accessible avec un éclairage  $E(\mathbf{r}) = 1$ , le cercle bleu en trait pointillé correspond au domaine accessible avec un éclairage  $E(\mathbf{r}) = e^{2\pi i \mathbf{k}_E^t \mathbf{r}}$ .

Par exemple dans le cas d’un éclairage électromagnétique, on a vu qu’une simple propagation en espace libre de ce champ limite son contenu fréquentiel (1.1.6). On notera par la suite  $\mathcal{D}_{\text{spec}}$  le support fréquentiel de l’éclairage. Grâce à cet exemple, on peut voir qu’il est possible d’augmenter le domaine fréquentiel identifiable de l’objet et donc la résolution théorique de l’imageur en utilisant un éclairage structuré. Le domaine accessible (*i.e.*, l’ensemble des fréquences identifiables de l’objet) dépend de  $\mathcal{D}_{\text{spec}}$  et de  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ . Ce domaine accessible est dans notre exemple la différence de Minkowski de ces deux ensembles :

$$\mathcal{D}_{\text{PSF}} \ominus \mathcal{D}_{\text{spec}} = \{\mathbf{u} - \mathbf{v}, \mathbf{u} \in \mathcal{D}_{\text{PSF}}, \mathbf{v} \in \mathcal{D}_{\text{spec}}\}.$$

Il est important de noter que le domaine fréquentiel accessible de l’imageur n’est pas le seul critère à prendre en compte pour déterminer les performances. En effet en présence de bruit de mesures, la variance d’estimation de chaque composante fréquentielle est différente selon l’imageur et l’éclairage considéré.

### Tomographie de diffraction

Considérons maintenant l’exemple de la tomographie de diffraction (TDM) [27]. La tomographie de diffraction est une technique d’imagerie cohérente [28, section 3.7 et 3.11], où l’on cherche à reconstruire l’indice de réfraction d’un objet 3D. Le champ électromagnétique diffracté par l’objet éclairé est mesuré pour différentes ondes d’excitations en utilisant une technique d’holographie. Il est ensuite possible de reconstruire une image 3D de l’indice de réfraction en utilisant un algorithme dédié, par exemple de rétro-propagation filtré [27], [9].

En réalité, les capteurs optiques sont sensibles à l’intensité du champ optique et l’information de phase du champ incident n’est pas directement accessible. L’holographie permet de faire une mesure de cette phase. Il existe de nombreuses techniques d’holographie, hors-axe [29], sur l’axe [30, 31, 32] par diffraction sur un réseau [33]. Sous

approximation de Born [34], on peut modéliser par (1.1.2) la relation entre  $x$  l'image du champ diffracté et  $h$  la PSF du système optique,  $\rho$  l'indice de réfraction et  $E$  le champ incident.

On peut donc remarquer que comme dans l'exemple précédent, l'utilisation d'une onde plane d'excitation permet de translater dans l'espace de Fourier les composantes fréquentielles accessibles de l'objet. L'opposé du vecteur d'onde de l'onde plane  $-\mathbf{k}_E$  correspond au vecteur de la translation du domaine accessible. En pratique, la norme du vecteur  $\mathbf{k}_E$  est égale à  $k_0 = 2\pi/\lambda$  avec  $\lambda$  la longueur d'onde utilisée. De plus l'angle de cette onde est le plus souvent limité. Le domaine fréquentiel de l'éclairage  $\mathcal{D}_{\text{spec}}$  est donc limité à une calotte de sphère (voir Fig. 1.3). Dans le cas où  $\mathcal{D}_{\text{spec}} = \mathcal{D}_{\text{PSF}}$ , on peut voir en Fig. 1.3 le domaine fréquentiel accessible de l'objet  $\rho$  lorsqu'on utilise différentes illuminations en onde plane d'angle incident différents.

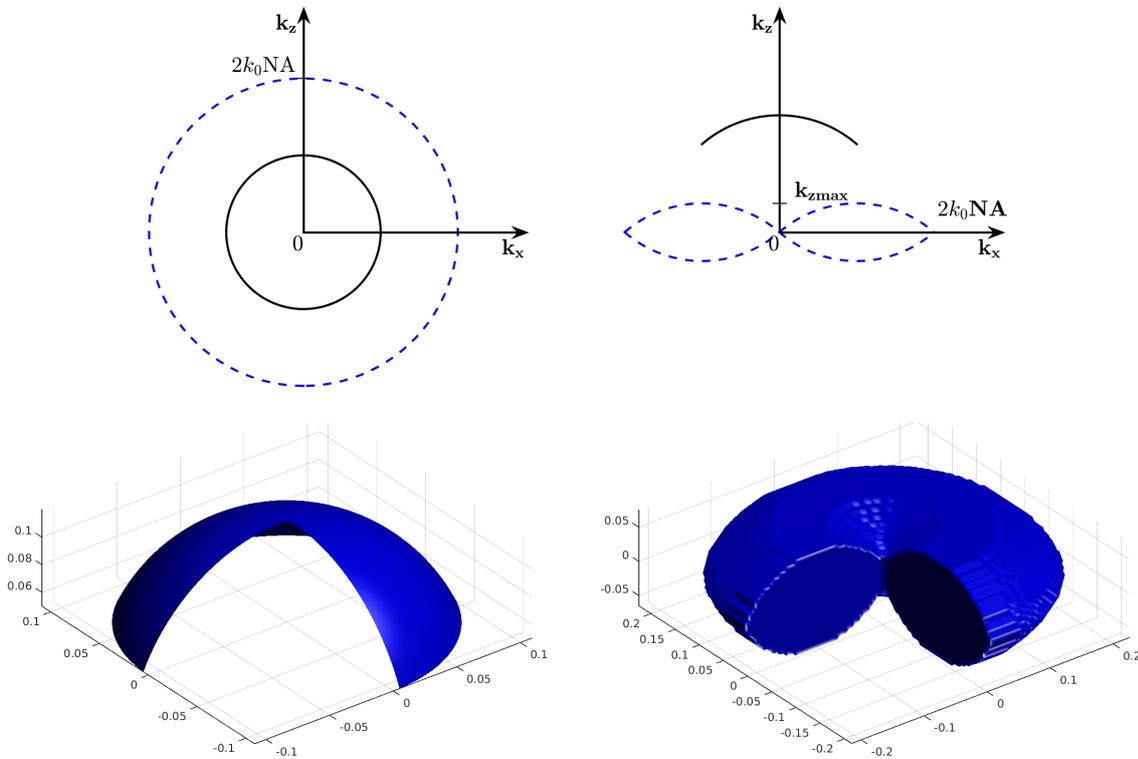


FIGURE 1.3 – **Partie haute** : Les deux graphiques représentent le domaine de Fourier, à gauche projeté dans le plan  $k_x, k_y$  et à droite dans le plan  $k_x, k_z$ . En trait plein noir, les limites du domaine de l'OTF,  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  sont représentées. En trait pointillé bleu, les limites du domaine des fréquences identifiables de l'objet dans le cas de la tomographie et de l'holographie digitale à illuminations de speckle est représentée. **Partie basse** : La partie gauche représente l'OTF 3D pour le champ électromagnétique du microscope utilisé. La partie droite représente le contenu fréquentiel identifiable de l'objet dans le cas de la tomographie classique et dans le cas de l'holographie digitale à illumination de speckles.

Il n'est pas toujours physiquement possible d'utiliser un éclairage de type  $E(\mathbf{r}) = e^{2\pi i \mathbf{k}_E^t \mathbf{r}}$ , comme dans le cas de la tomographie. La transformée de Fourier de l'éclairage est souvent plus complexe, par exemple une somme de Dirac (c'est le cas pour un éclairage harmoniques, voir Sec. 2.1.2), ou bien une fonction aléatoire dont le

spectre est limité au domaine  $\mathcal{D}_{\text{spec}}$  (pour un éclairage de speckles, voir Sec. 2.1.3). L'information fréquentielle de l'objet est alors déplacée et mélangée. Il est donc nécessaire de démoduler l'information fréquentielle par un algorithme dédié pour créer une image super-résolue de l'objet.

Certaines techniques de super-résolution reposent donc sur des algorithmes de reconstruction qui nécessitent souvent la connaissance des éclairages pour pouvoir démoduler l'information : il faut alors s'assurer du contrôle précis de ces éclairages. C'est le cas pour le radar à synthèse d'ouverture (SAR) [6], la tomographie de diffraction [9] et la microscopie de fluorescence à éclairages structurés (SIM) [10],[11].

Une autre approche possible est de considérer que seules certaines caractéristiques des éclairages sont contrôlées [12, 14, 15], par exemple on suppose que l'éclairage est harmonique mais on ne connaît pas la phase et/ou l'amplitude de cet éclairage [13], ou bien on peut supposer que les éclairages sont aléatoires inconnus mais que l'on connaît certaines de leurs statistiques (statistique ponctuelle, moyenne, corrélation spatiale) [2, 17, 18, 19, 20, 21].

L'objectif de cette thèse est de caractériser les imageurs à éclairages structurés inconnus, une attention toute particulière étant portée aux éclairages aléatoires. Nous allons maintenant utiliser pour exemple la microscopie de fluorescence pour laquelle de nombreuses techniques utilisant des éclairages structurés ont été développées.



## Chapitre 2

# Microscopie de fluorescence et super-résolution

La plupart de nos résultats seront illustrés dans ce manuscrit à l'aide de la microscopie de fluorescence. Cette partie permet donc de faire une brève introduction de cette modalité, puis d'introduire des exemples d'utilisation d'éclairages structurés.

Un émetteur fluorescent interagit avec un ou des photons et voit ainsi son niveau d'énergie changer. Dans le cas où une molécule absorbe un photon, son énergie est augmentée de  $h\nu$ , avec  $h$  le constante de Planck et  $\nu$  la fréquence de l'onde en hertz. Cette énergie est retransmise, par la combinaison d'une relaxation non radiative (par vibrations) ainsi que d'une émission de photon d'énergie  $h\nu_e < h\nu$  dans le cas de la fluorescence. En utilisant la relation  $\nu = c/\lambda$ , où  $c$  est la vitesse de la lumière et  $\lambda$  la longueur d'onde en mètres, on peut voir que la longueur d'onde émise en fluorescence est plus grande que celle de l'onde incidente [35].

L'intensité lumineuse émise par un objet fluorescent est fonction de trois paramètres principaux : l'intensité lumineuse reçue, la concentration d'émetteurs et leur nature et leur environnement (définissant leur efficacité quantique, section efficace, *etc.*). Les processus de fluorescence considérés ici seront incohérents, ce qui signifie qu'il n'y a pas interférence des ondes émises, les intensités lumineuses de chaque émetteur fluorescent s'ajoutent [28, section 3.7 et 3.11]. On considérera de plus que l'intensité lumineuse émise est proportionnelle à la densité d'émetteurs fluorescents, le coefficient de proportionnalité dépendant principalement de l'efficacité quantique. Dans le cas d'une interaction avec un seul photon, sous hypothèse qu'il n'y a pas de saturation, la réponse des émetteurs fluorescents est souvent supposée proportionnelle à l'intensité lumineuse d'excitation [36].

Il est aussi possible d'avoir une fluorescence liée à l'absorption de deux photons [37], la réponse peut alors être supposée proportionnelle au carré de l'intensité d'excitation [37], de même pour  $n$  photons [38] la réponse peut être supposée proportionnelle à l'intensité à la puissance  $n$ . La réponse du système reste néanmoins linéaire par rapport à la densité de fluorophore  $\rho$ .

La possibilité de fixer des marqueurs fluorescent appelés fluorophore, à des endroits bien précis d'un élément biologique ou de rendre la fluorescence dépendante d'un phénomène biologique, ouvre de nombreuses possibilités pour étudier le vivant. Dans un microscope à fluorescence, l'échantillon  $\rho$  préalablement marqué est éclairé par une illu-

mination  $E$  de longueur d'onde adaptée et un filtre permet de détecter uniquement la lumière à la longueur d'onde de fluorescence. L'image obtenue à partir d'un fluorophore unique supposé ponctuel correspond à la PSF du système  $h$ . L'image sans bruit d'instrument de fluorescence produite par le microscope peut être modélisée par l'équation (1.1.2) que nous redonnons ici  $x(\mathbf{r}) = [h \otimes (\rho \times E)](\mathbf{r})$ .

## 2.1 Illuminations structurées : de l'harmonique connue au speckle inconnue

Nous allons introduire dans cette partie des techniques d'illuminations structurées appelée SIM (structured illumination microscopy) permettant d'améliorer la capacité de résolution d'un microscope de fluorescence. Enfin, la technique appelé Blind-SIM sera présentée, où des illuminations structurées inconnues sont utilisées. Afin de présenter plus en détails le microscope de fluorescence, nous allons commencer par le cas d'une illumination uniforme.

### 2.1.1 Microscopie de fluorescence à éclairage uniforme

Un montage couramment utilisé de microscope à *epi*-fluorescence est présenté en figure 2.1 et en figure 2.2. Celui-ci est composé de deux lentilles, la première est un objectif optique avec une distance focal courte (L1 en Fig. 2.2), la deuxième est une lentille tube de distance focal plus longue (L2 en Fig. 2.2). Il existe un plan spécifique entre ces deux lentilles appelé plan de Fourier, en effet si l'objectif est corrigé avec la condition des sinus d'Abbe, celui-ci opère une transformée de Fourier du champ entre le plan objet et le plan de Fourier [22, Sec. 5.2]. Une pupille circulaire est présente sur le plan de Fourier (P en Fig. 2.2), elle agit comme un filtre passe bas. L'image obtenue au plan image est inversée et agrandie par le système optique, ces transformations géométriques ne changent pas qualitativement l'image obtenue en sortie et seront donc négligées par la suite. On peut remarquer que l'illumination nécessaire à l'excitation des émetteurs passe par le même objectif que celui utilisé pour imager l'objet. Le système peut être

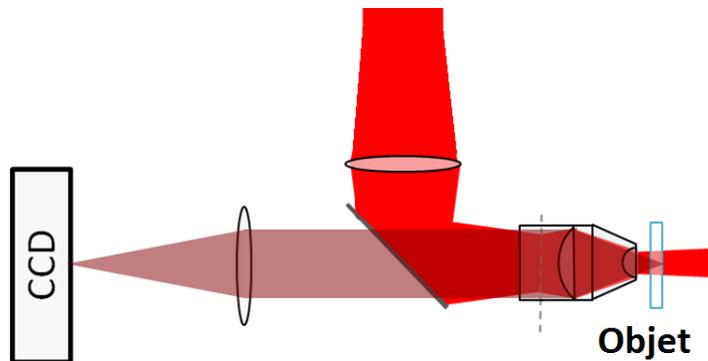


FIGURE 2.1 – Montage en *epi*-fluorescence d'un microscope de fluorescence en champ large.

modélisé en utilisant (1.2.1) et (1.1.2) où  $\rho$  est proportionnel à une densité d'émetteurs

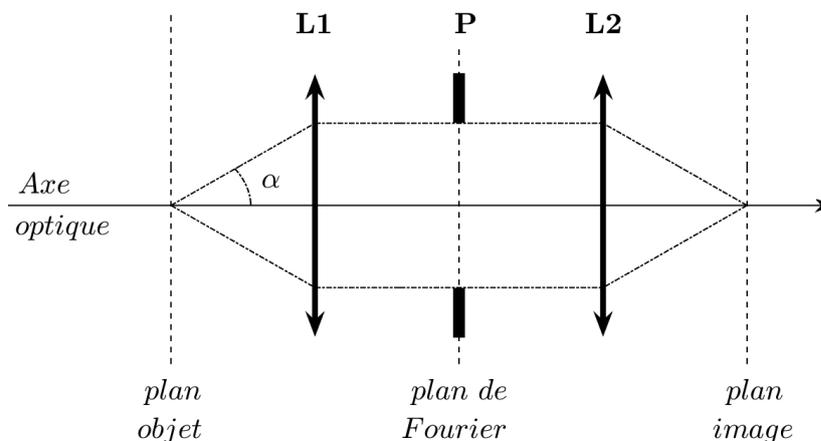


FIGURE 2.2 – Schéma d'un microscope composé de deux lentilles conjuguées  $L1$ ,  $L2$  et d'une pupille  $P$  dans le plan focal des lentilles, l'axe optique correspond à un axe de symétrie du système, le plan perpendiculaire à l'axe optique passant par la pupille est appelé plan de Fourier. Le plan focal situé à gauche de la lentille  $L1$  est appelé plan objet, celui à droite de la lentille  $L2$ , plan image. Les rayons lumineux passant par l'axe optique et le plan objet peuvent atteindre le plan image sans être arrêtés par la pupille si il ne dépassent pas un angle  $\alpha$  avec l'axe optique.

fluorescents et  $E$  est l'intensité lumineuse utilisée pour exciter ces émetteurs [36, 22]. On se place ici dans le cas où l'illumination est uniforme, la modélisation est donc à une constante multiplicative près  $x(\mathbf{r}) = [h \otimes \rho](\mathbf{r})$ , avec  $h$  la PSF du système optique et  $\rho$  une densité d'émetteurs fluorescents.

On considère ici que le système optique est optimisé pour être aplanétique et donc pour vérifier les conditions de sinus d'Abbe. La condition des sinus d'Abbe est l'expression mathématique de l'aplanétisme d'un système optique<sup>1</sup> [23]. Une source ponctuelle placée sur le plan objet d'un microscope aplanétique forme une onde sphérique en sortie du microscope qui converge vers un point du plan image (voir Fig. 2.2), le microscope est alors limité uniquement par la diffraction. Si l'onde en sortie n'est pas sphérique, le système optique comporte alors des aberrations [22, Sec. 6.4].

Lorsque l'échantillon est plan, *i.e.*, lorsque l'objet est suffisamment fin pour être considéré 2D, il est alors possible de se limiter à une modélisation 2D du microscope de fluorescence. En l'absence d'aberrations<sup>2</sup>, la PSF est alors une tache d'Airy [22, Sec. 4.4]. En coordonnées polaires, la PSF 2D peut alors être modélisée ainsi :

$$h(r, \theta) = \frac{k_0^2}{\pi} \left( \frac{J_1(r k_0 \text{NA})}{k_0 r} \right)^2 \quad r \geq 0, \theta \in \mathbb{R} \quad (2.1.1)$$

1. Un système est aplanétique si un objet étendu perpendiculaire à l'axe optique forme une image perpendiculaire à l'axe optique en sortie de l'imageur. Maxwell a démontré qu'il n'est pas possible d'avoir un microscope stigmatique en tous points de l'espace, sauf si l'agrandissement du microscope est de  $n_i/n_d$  avec  $n_i$  l'indice optique du milieu entourant l'objet et  $n_d$  celui du milieu entourant le capteur [39].

2. Les aberrations ne peuvent que réduire la taille du support  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ .

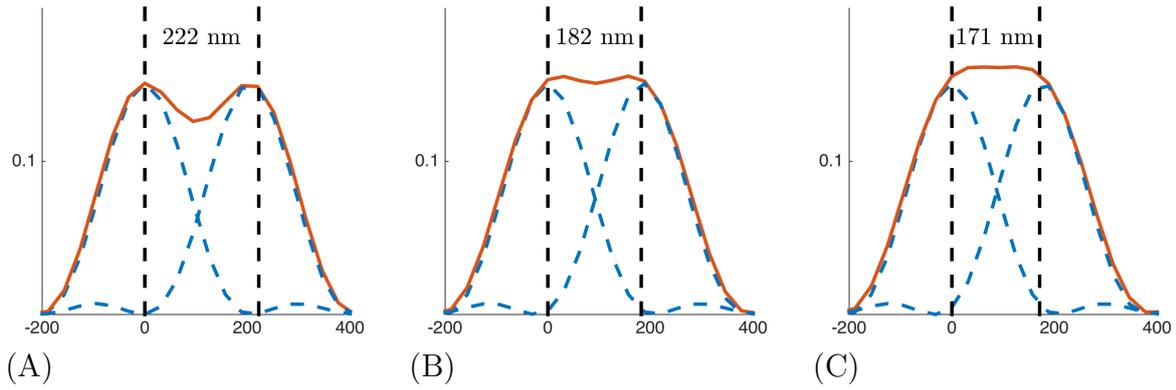


FIGURE 2.3 – Au préalable, une tache d’Airy est simulée en utilisant (2.1.1) avec une longueur d’onde de 510 nm et une ouverture numérique de 1,4. Puis, dans chacune de ces figures, deux taches d’Airy ou PSF sont représentées en bleu (pointillé). La somme de ces deux taches d’Airy est tracée en rouge. (A) Les deux PSF sont espacées de 171 nm soit de  $d = \frac{0.61\lambda}{NA}$ , cette distance correspond au critère de *Rayleigh*, le maximum de la première tache d’Airy est placé au dessus du premier minimum de la deuxième tache d’Airy. (B) Les deux PSF sont espacées de 182 nm soit de  $d = \frac{0.5\lambda}{NA}$ , cette distance correspond au critère de *Abbe*, on peut toujours distinguer un creux sur la somme des deux PSF. Cette distance correspond à la plus petite période d’un objet harmonique discernable après convolution avec la PSF. (C) Les deux PSF sont espacées de 171 nm soit de  $d = \frac{0.47\lambda}{NA}$ , cette distance correspond au critère de *Sparrow*, à partir de cette distance, le creux entre les deux PSF disparaît. Ce critère est notamment utilisé en astronomie car il est fréquent d’avoir à localiser deux objets ponctuels.

ou  $J_1$  est la fonction de Bessel du première ordre, NA est l’ouverture numérique de l’objectif, et  $k_0 = 2\pi/\lambda$  est le nombre d’onde dans le vide avec  $\lambda$  la longueur d’onde d’émission et d’excitation. Le support de l’OTF est alors un disque (voir Fig. 2.4) de rayon  $2k_0NA$ , avec  $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$  le nombre d’onde,  $\lambda$  la longueur d’onde,  $NA = n \sin(\alpha)$  l’ouverture numérique du microscope.  $n$  est l’indice optique du milieu et  $\alpha$  est l’angle de collection de la lentille définie en figure 2.2. Le rayon du support de l’OTF est appelé fréquence de coupure. L’illumination utilisée étant uniforme, le contenu fréquentiel de

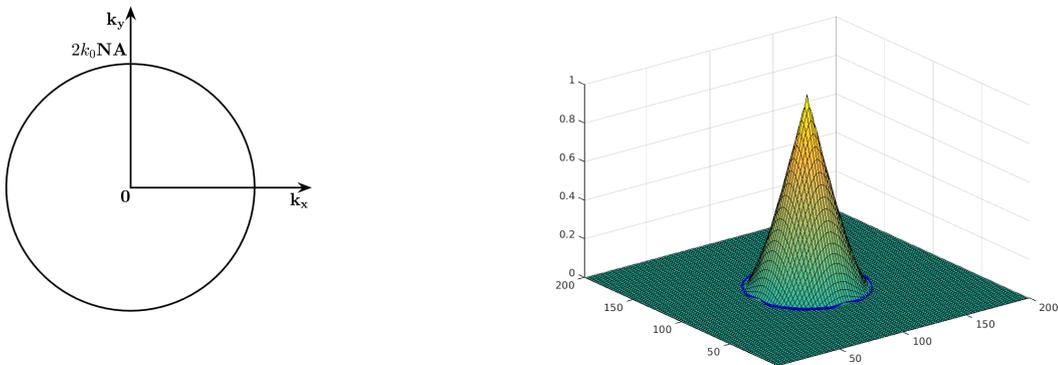


FIGURE 2.4 – **Partie gauche** : Domaine fréquentiel accessible en microscopie de fluorescence 2D avec une illumination uniforme. **Partie droite** : Optical Transfert Function (OTF) 2D, la limite du support de l’OTF notée  $\mathcal{D}_{PSF}$  est indiquée en bleu.

l'objet  $\rho$  en dehors de  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  est complètement filtré par le microscope (1.1.4). Ceci définit une limite de résolution qui dépend de la longueur d'onde  $\lambda$  et de l'ouverture numérique NA.

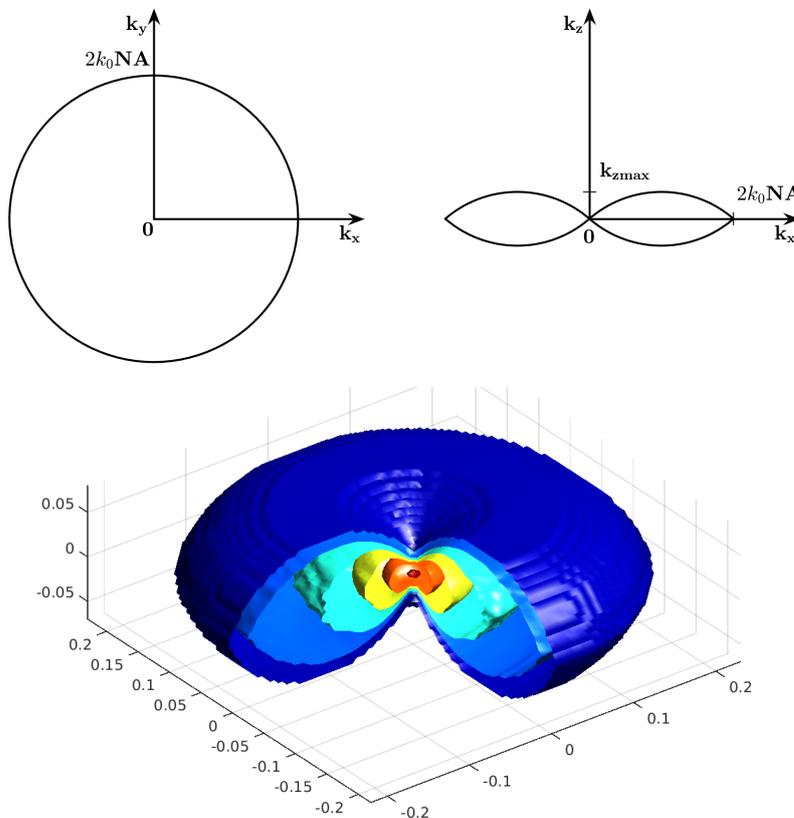


FIGURE 2.5 – **Partie haute** : Domaine fréquentiel accessible en microscopie de fluorescence 3D avec une illumination uniforme. A gauche dans le plan  $(k_x, k_y)$ , a droite dans le plan  $(k_x, k_z)$ . **Partie basse** : Optical Transfert Function (OTF) 3D, la limite du support de l'OTF notée  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  est indiquée en bleu foncé (correspond à la plus petite iso-valeur tracée).

Il existe plusieurs critères définissant la limite de résolution, le critère de Sparrow[40], de Rayleigh [41], d'Abbe [42] (voir Fig. 2.3). Selon Abbe, la limite de résolution correspond à la plus petite période d'un objet périodique visible sur le plan image et est directement liée à l'extension maximale de l'OTF. Cette période minimale est de  $d = \frac{\lambda}{2NA}$ . Pour donner un ordre de grandeur, dans le domaine du visible  $380 < \lambda < 780$  nm et pour un NA de 1, la limite de résolution selon Abbe est comprise entre 190 nm et 390 nm. Physiquement, cette limite est liée à la diffraction de la lumière au niveau de la pupille (représentée en Fig. 2.2) du microscope.

Lorsque l'objet est épais il faut prendre en compte caractère 3D du problème. La PSF 3D est alors allongée le long de l'axe optique, la résolution transversal est donc meilleur que la résolution axial, il est plus difficile d'obtenir des informations de profondeur sur les détails de l'objet. On obtient les mêmes conclusions en interprétant la forme de l'OTF 3D qui est plus étendue dans les directions latérales. On peut cependant ajouter que l'OTF 3D est proche d'être un tore (voir Fig. 2.5), le « trou » correspond à tout

un cône de l'espace fréquentiel qui n'est pas transmis par le microscope, appelé cône manquant [7]. Cette particularité, nous indique qu'un microscope de fluorescence à un mauvais sectionnement optique. Par exemple, un objet composé de plusieurs plans 2D uniformes et perpendiculaires à l'axe optique ne peut pas être reconstruit en utilisant une illumination uniforme. Ceci traduit le manque de capacité de sectionnement optique d'un microscope de fluorescence.

Nous allons voir qu'un moyen de dépasser la limite de résolution aussi appelée limite de diffraction, est d'utiliser l'illumination comme un degré de liberté supplémentaire permettant ainsi d'accéder à un contenu fréquentiel de l'objet en dehors de  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  le support de l'OTF.

### 2.1.2 Microscopie à éclairements structurés harmoniques (SIM)

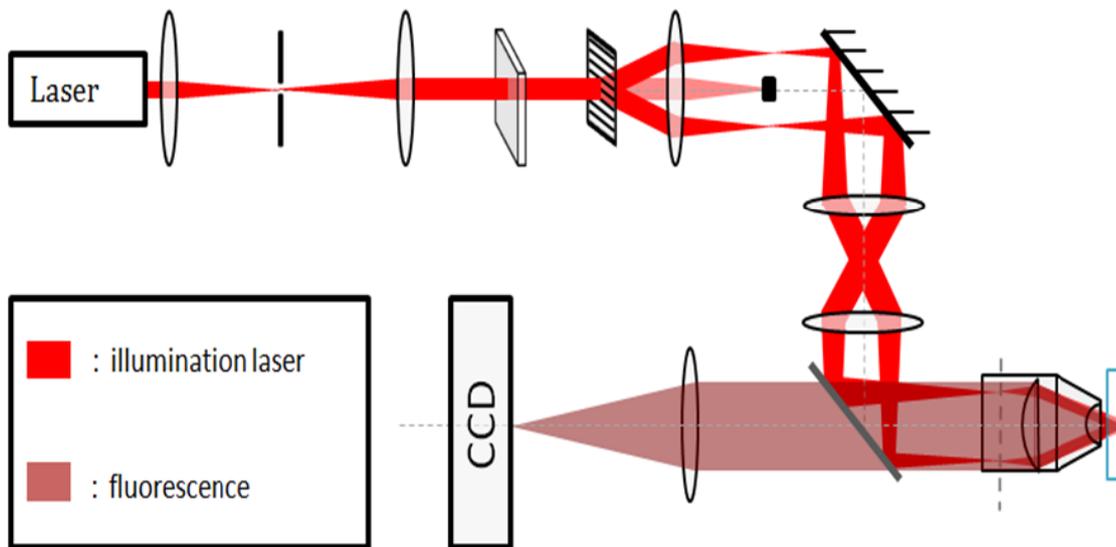


FIGURE 2.6 – Montage d'un microscope de fluorescence en champ large à éclairements harmoniques.

On a vu qu'en utilisant l'éclairage d'un imageur il est possible d'améliorer la capacité de résolution de celui-ci, voir Sec. 1.3. Ainsi, la limite de résolution d'un microscope de fluorescence à illumination uniforme peut être dépassée en utilisant l'illumination d'excitation comme un degré de liberté supplémentaire. En utilisant plusieurs illuminations structurées (*i.e.*, non uniforme) pour exciter l'objet, il est possible de remonter à de l'information fréquentielle en dehors du support de l'OTF,  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ . Au début des années 2000 la microscopie de fluorescence à éclairements structurés harmoniques fut développée par Heintzmann [10] et Gustafsson,[43] dans cet objectif.

Différentes illuminations d'excitation harmoniques sont utilisées pour moduler l'objet  $\rho$ , il est alors possible de reconstruire une image super-résolue à partir des images basses résolutions acquises. Si l'objet imagé est fin, on peut alors considérer le problème comme 2D. Une configuration SIM classique est alors d'utiliser l'interférence de

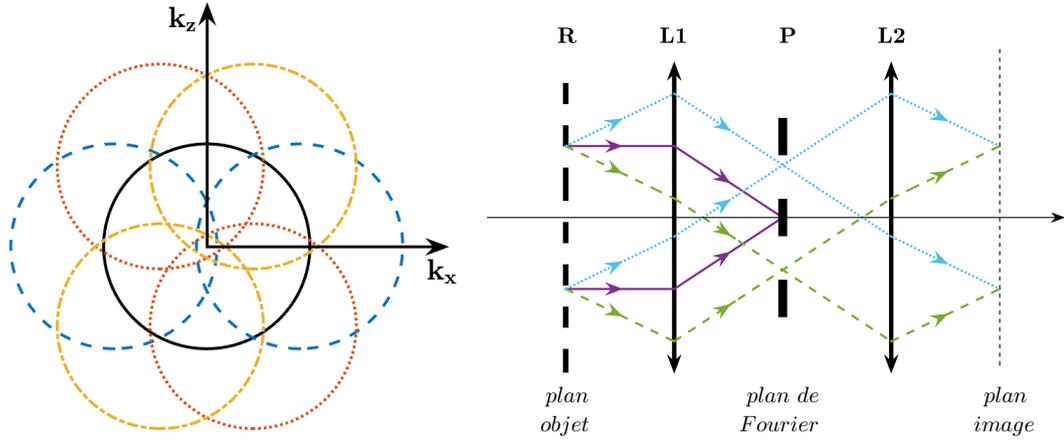


FIGURE 2.7 – **Partie gauche** : Le domaine  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  est représenté en trait plein noir dans le plan  $(\mathbf{k}_x, \mathbf{k}_y)$ . L'ensemble des cercles de cette figure forment le domaine accessible en utilisant un jeu de 9 illuminations harmoniques composées de trois orientations distinctes  $\theta := \tan^{-1}(k_y/k_x) \in \{0, 2\pi/3, 4\pi/3\}$ , et pour chacune d'elles trois incréments différents de phases d'un tiers de période sont effectués. La fréquence des illuminations est égale à 90% du rayon de  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ . Les paires de cercles de couleur indiquent le domaine des fréquences identifiables de l'objet en n'utilisant que la direction d'illumination correspondante. **Partie droite** : Schéma d'un microscope de fluorescence avec illumination harmonique, R est un réseau de diffraction, les autres éléments sont décrits en Fig. 2.2. Une onde plane illumine le réseau de diffraction, des ondes planes appelées ordres sortent alors de celui-ci. Seules les ordres 1,0 et -1 sont représentés respectivement en bleu (pointillé), en violet et en vert (tireté). Au niveau du plan de Fourier, un filtre basse fréquence est utilisé pour supprimer l'ordre 0, ainsi seuls les ordres 1 et -1 arrivent au niveau du plan image, ces deux ondes planes interfèrent et forment une illumination harmonique (2.1.3).

deux ondes planes (voir Fig. 2.7) pour générer une illumination harmonique au niveau de l'objet, l'image acquise est modélisé ainsi [10] :

$$x_m(\mathbf{r}) = [h \otimes (\rho \times E_m)](\mathbf{r}) \quad m = 1 \dots M \quad (2.1.2)$$

$$\text{avec } E_m(\mathbf{r}) = a_m (1 + b_m \cos(\mathbf{r} \cdot \mathbf{k}_m + \varphi_m)) \quad (2.1.3)$$

où  $\varphi_m$  est une phase, et avec  $\mathbf{r} = (x, y)^t$  et  $\mathbf{k}_m = (k_{m,x}, k_{m,y})^t$  respectivement les coordonnées spatiales et les fréquences spatiales de la fonction harmonique. Le paramètre  $a_m \geq 0$  est une intensité de modulation et  $0 \geq b_m \geq 1$  est un taux de modulation. La transformée de Fourier de l'illumination est

$$\tilde{E}_m(\mathbf{k}) = a_m \delta(\mathbf{k}) + \frac{b_m}{2} e^{i\varphi_m} \delta(\mathbf{k} - \mathbf{k}_m) + \frac{b_m}{2} e^{-i\varphi_m} \delta(\mathbf{k} + \mathbf{k}_m). \quad (2.1.4)$$

On peut maintenant utiliser cette expression dans la transformée de Fourier de la mesure :

$$\tilde{x}_m(\mathbf{k}) = \tilde{h}(\mathbf{k}) \times \left( a_m \tilde{\rho}(\mathbf{k}) + \frac{b_m}{2} e^{i\varphi_m} \tilde{\rho}(\mathbf{k} - \mathbf{k}_m) + \frac{b_m}{2} e^{-i\varphi_m} \tilde{\rho}(\mathbf{k} + \mathbf{k}_m) \right).$$

L'information fréquentielle de l'objet est donc déplacée et mélangée dans l'espace de Fourier. Si l'on considère que seul le paramètre  $\varphi_m$  change entre deux acquisitions, tel

que  $\varphi_m = \frac{2\pi}{3} \times m$ ,  $m = 1 \dots 3$ , on notera  $\mathbf{k}_E = \mathbf{k}_m, \forall m$ . On peut alors écrire ces trois images ainsi :

$$\widetilde{\mathbf{X}}(\mathbf{k}) = \mathbf{M} \times \mathbf{b}(\mathbf{k}) \quad (2.1.5)$$

avec

$$\widetilde{\mathbf{X}}(\mathbf{k}) = \begin{pmatrix} \tilde{x}_0(\mathbf{k}) \\ \tilde{x}_1(\mathbf{k}) \\ \tilde{x}_2(\mathbf{k}) \end{pmatrix}, \quad \mathbf{M} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & e^{i\frac{2\pi}{3}} & e^{-i\frac{2\pi}{3}} \\ 1 & e^{i\frac{4\pi}{3}} & e^{-i\frac{4\pi}{3}} \end{pmatrix}, \quad \mathbf{b} = \begin{pmatrix} a \tilde{h}(\mathbf{k}) \tilde{\rho}(\mathbf{k}) \\ \frac{b}{2} \tilde{h}(\mathbf{k}) \tilde{\rho}(\mathbf{k} - \mathbf{k}_E) \\ \frac{b}{2} \tilde{h}(\mathbf{k}) \tilde{\rho}(\mathbf{k} + \mathbf{k}_E) \end{pmatrix}$$

On peut facilement montrer que  $\mathbf{M}^{-1} = \frac{1}{3} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & e^{-i\frac{2\pi}{3}} & e^{i\frac{2\pi}{3}} \\ 1 & e^{-i\frac{4\pi}{3}} & e^{i\frac{4\pi}{3}} \end{pmatrix}$ .

Si on suppose les composantes de  $\mathbf{b}$  indépendantes, on peut alors identifier chacune d'elles grâce au calcul suivant :  $\tilde{\mathbf{b}}(\mathbf{k}) = \mathbf{M}^{-1} \times \mathbf{X}(\mathbf{k})$  [44], on peut ainsi identifier des composantes fréquentielles de l'objet en dehors du support de l'OTF. Un ensemble classique d'illumination est composé de trois orientations distinctes  $\theta := \tan^{-1}(k_y/k_x) \in \{0, 2\pi/3, 4\pi/3\}$ , et pour chacune d'elles, trois incréments différents de phases d'un tiers de période sont effectués.  $a_m$  et  $b_m$  sont le plus souvent supposés constants sur toutes les images. La aussi, il est possible d'identifier le contenu fréquentiel de l'objet sur un domaine plus grand que  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  à partir des 9 images basses résolutions  $x_m(\mathbf{r})$ , ce domaine est représenté en Fig. 2.7. Dans le montage présenté en Fig. 2.7, ces illuminations sont générées grâce à un réseau de diffraction, il faut contrôler précisément celui-ci en translation et en rotation, pour pouvoir générer les différentes illuminations nécessaires.

Si l'objet est épais, le problème 3D doit être considéré, il est possible de garder le montage optique de la Fig. 2.7, l'ordre zero du réseau étant bloqué seul les ordres +1 et -1 sont utilisés et l'illumination est alors constante le long de l'axe optique. Dans ce cas de figure un compromis est requis entre le facteurs de super-résolution souhaité et la capacité de sectionnement optique en choisissant la période de l'illumination de manière adéquate (voir Fig. 2.8).

Une autre approche consiste à ne pas filtrer l'ordre 0, l'illumination est alors formée par interférence entre trois ondes planes. Cette nouvelle configuration permet d'obtenir un facteur de super-résolution latéral et axial proche de deux, tout en garantissant un bon sectionnement optique (voir Fig. 2.9). L'inconvénient est qu'il faut plus d'images basses fréquences pour être capable de reconstruire l'objet super-résolu. Typiquement 15 images sont utilisées, avec trois orientations distinctes  $\theta := \tan^{-1}(k_y/k_x) \in \{0, 2\pi/3, 4\pi/3\}$ , et pour chacune d'elles cinq incréments différents de phases d'un cinquième de période.

Que ce soit en 3D ou en 2D, avec l'ordre 0 bloqué ou non, il est nécessaire de connaître les illuminations pour reconstruire l'image super-résolue de l'objet [44, 45, 10, 43]. Définissons le problème suivant :

$$\min_{\rho(\mathbf{r})} \sum_{m=1}^M \| y_m(\mathbf{r}) - [h \otimes (\rho E_m)](\mathbf{r}) \|^2. \quad (2.1.6)$$

Il est possible de montrer que la solution de ce problème est une estimation super-résolue de l'objet  $\rho$ , et que le contenu fréquentiel identifié de l'objet correspond aux

domaines fréquentiels représentés en figures 2.7, 2.8, 2.9 selon le cas considéré. Après discrétisation spatiale, le problème de minimisation peut être résolu numériquement par un algorithme dédié (e.g., un gradient pré-conditionné [46]) et produire une reconstruction super-résolue<sup>3</sup>. On a vu qu'en théorie, un facteur deux de super-résolution est possible en *epi*-fluorescence lorsque la réponse des émetteurs fluorescent est linéaire. En exploitant des non linéarités comme la saturation des fluorophores, la limite de super-résolution est en théorie illimitée [48]. Le gain en résolution est alors limité par le rapport signal sur bruit des mesures effectuées.

Dans le cas où les paramètres de l'illumination ne sont pas précisément connus, il est possible de les estimer au préalable, [49, 13, 50, 51] puis d'utiliser un algorithme de reconstruction SIM harmonique classique. Ce point est important en pratique car la calibration du montage optique peut être très sensible, les paramètres des illuminations utilisées peuvent par exemple changer en fonction de la température.

Si l'illumination est déformée par des aberrations optiques et ne correspond donc plus à une illumination harmonique, des artefacts de reconstruction peuvent alors apparaître [14]. Ceci limite la profondeur à laquelle ces techniques de reconstruction fonctionnent car l'objet ne doit pas déformer l'illumination harmonique. Certaines tech-

3. En guise de remarque technique, on pourra souligner que ce problème de minimisation n'a pas de solution unique et est mal conditionné. On peut cependant restaurer l'unicité de la solution et la stabilité numérique par une simple pénalisation quadratique, voir par exemple [47] pour plus de détails

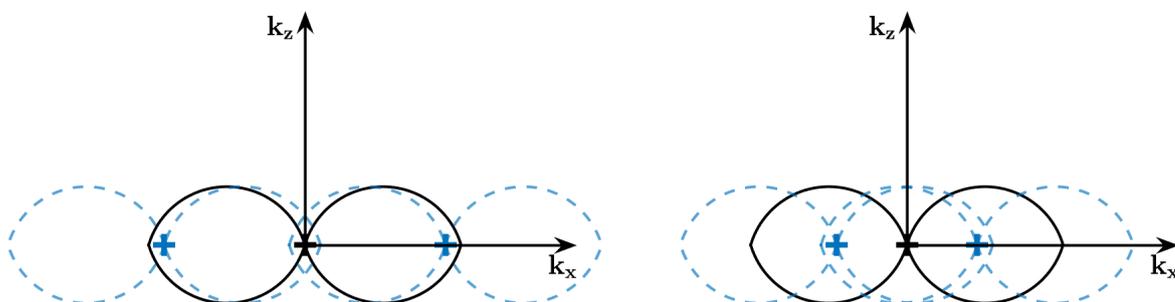


FIGURE 2.8 – Dans le cas 3D, utiliser des illuminations harmonique de type (2.1.3) permet d'identifier le contenu fréquentiel de l'objet sur un domaine étendue. L'étendue et la forme de ce domaine dépend de la période choisie pour l'illumination harmonique. Les deux figures représentent le domaine fréquentiel dans le plan  $(\mathbf{k}_x, \mathbf{k}_z)$ , le domaine  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  est représenté en trait noir. Le contenu fréquentiel des illuminations (2.1.4) est indiqué avec des croix. A gauche la fréquence des illuminations harmonique est de 90% de la fréquence de coupure, a droite elle est de 45%. Dans le premier cas on peut voir grâce aux domaines représentés en traits bleu (pointillés) que la résolution latérale est améliorée d'un facteur proche de deux, cependant le «cône manquant» est toujours présent indiquant un mauvais sectionnement optique. A l'opposé dans le cas représenté à droite, le facteur de super-résolution latérale est proche de 1,5, mais le «cône manquant» est comblé. Il y a un compromis entre super-résolution et sectionnement optique à spécifier pour régler la période des illuminations harmoniques utilisées.

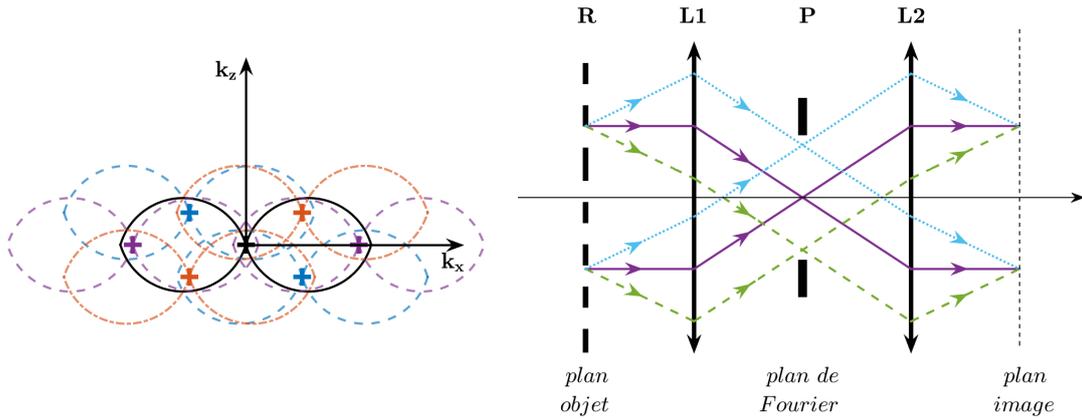


FIGURE 2.9 – **Partie gauche** : Le domaine  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  est représenté en trait noir dans le plan  $(\mathbf{k}_x, \mathbf{k}_z)$ . Le contenu fréquentiel d’une des illuminations est indiqué avec des croix. L’ensemble des domaines représentés forment le contenu fréquentiel identifiable de l’objet. On peut remarquer que celui-ci est environ deux fois plus grand latéralement et axialement, ce qui correspond à un facteur de super-résolution de deux, de plus le « cone manquant » est comblé indiquant un meilleur sectionnement optique. **Partie droite** : Schéma d’un microscope de fluorescence avec illumination harmonique, R est un réseau de diffraction, les autres éléments sont décrits en Fig. 2.2. Une onde plane illumine le réseau de diffraction, des ondes planes appelées ordres sortent alors de celui-ci. Seules les ordres 1,0 et -1 sont représentés respectivement en bleu (pointillé), en violet et en vert (tireté). Au niveau du plan image, les trois ondes planes interfèrent et forment l’illumination.

niques de reconstruction permettent d’être robuste à ces déformations [14] en relâchant les contraintes sur l’illumination : on se rapproche donc du cas *Blind-SIM* présenté dans la section suivante.

### 2.1.3 Microscopie à éclairements structurés aveugle (*Blind-SIM*)

La nécessité de contrôler l’illuminations utilisées rend très souvent le montage optique plus complexe et limite les cas d’utilisations. Une autre approche consiste à se passer de la connaissance *a priori* des illuminations : on parle de techniques de microscopie à éclairements structurés aveugle *Blind-SIM*. C’est notamment le cas pour les techniques d’imagerie à base de speckle, utilisées en microscopie optique [2], en photoacoustique [52], en thermographie [53], etc.

Une des premières applications *Blind-SIM* apparaît en 2012 à l’Institut Fresnel. Un microscope de fluorescence allié à des illuminations de speckle est proposé [2]. Cette nouvelle approche simplifie grandement le montage optique, comme on peut le voir en comparant la figure 2.6 du montage nécessaire au *SIM* harmonique à la figure 2.10 du montage pour speckle *Blind-SIM*. L’illumination de speckle est très simple à générer, de plus dans le cas où l’objet interagit avec l’illumination, celle-ci reste une illumination de speckle ce qui confie une bonne robustesse à ces techniques. Pour changer l’illumination, il suffit de déplacer le diffuseur, ce déplacement ne nécessite pas d’être précis, il peut donc être fait grossièrement et très rapidement.

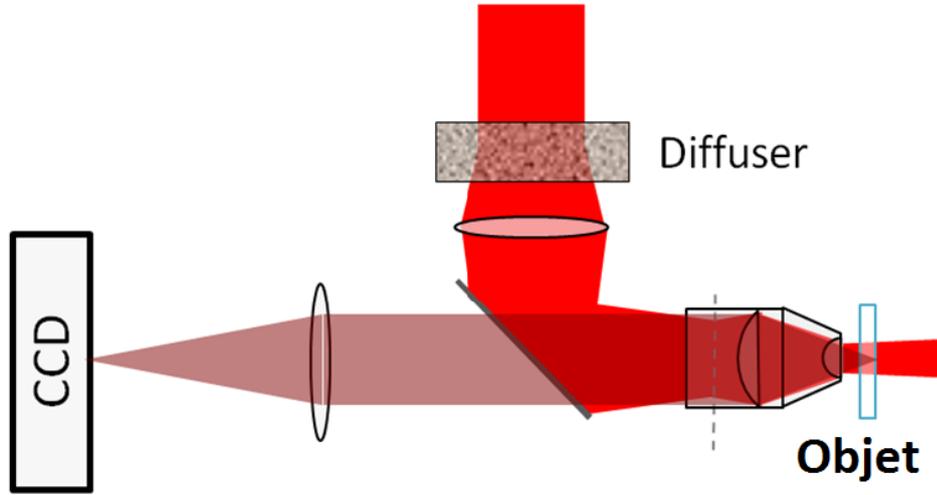


FIGURE 2.10 – Montage d’un microscope de fluorescence en champ large à éclairagements de speckle.

Le problème *Blind-SIM* joint<sup>4</sup> à résoudre et tel que proposé par Mudry *et al.* [2] s’écrit alors :

$$\min_{\rho, \{\mathbf{E}_m\}} \sum_{m=1}^M \|\mathbf{y}_m - \mathbf{H}(\rho \odot \mathbf{E}_m)\|^2 \quad (2.1.7a)$$

$$\text{sujet à} \quad \sum_m \mathbf{E}_m = M \times \mathbf{E}_0 \quad (2.1.7b)$$

$$\text{et} \quad \rho_n \geq 0, \quad E_{m;n} \geq 0, \quad \forall m, n \quad (2.1.7c)$$

avec  $\mathbf{H}$  une matrice de convolution construite *via* la discrétisation de la PSF,  $\rho$  et  $\mathbf{E}_m$  les versions discrétisées de  $\rho(\mathbf{r})$  et  $I_m(\mathbf{r})$  respectivement, et  $\odot$  le produit de Hadamard ou produit terme à terme. Le critère (2.1.7a) à lui seul comporte plus d’inconnues que de mesures, la contrainte (2.1.7b) permet de lever cette ambiguïté. Nous montrerons plus loin que les contraintes de positivités sur l’objet et sur l’illumination sont nécessaires à l’obtention de super-résolution dans l’image reconstruite. La contribution [2] contient des reconstructions issues de simulation et de données réelles en utilisant un algorithme de gradient conjugué. Dans les deux cas de la super-résolution est observée, le mécanisme amenant à cette super-résolution n’étant cependant pas explicité. Ces travaux sont à la base de cette thèse et constituent donc le point de départ pour nos travaux. D’autres groupes proposent des alternatives également basées sur des techniques à éclairement de speckle [17], [18].

## 2.2 Techniques de super résolution concurrentes

L’objectif ici n’est pas de faire un état des lieux exhaustif, mais plutôt de présenter rapidement les méthodes très répandues pour obtenir de la super résolution en micro-

4. L’adjectif « joint » renvoie ici au fait que l’objet et l’ensemble des illuminations sont simultanément estimées.

scopie de fluorescence. On s'intéressera aussi aux techniques permettant d'améliorer le sectionnement optique. La super-résolution et le sectionnement optique peuvent être vu comme l'augmentation du domaine fréquentiel de l'objet identifiable. En effet, lorsque la technique utilisée permet d'accéder aux fréquences normalement non transmises du « cône manquant » (voir Fig. 2.5), on améliore alors la capacité de sectionnement optique.

### 2.2.1 Microscopie à balayage : Confocal, Simulated emission depletion microscopy (STED)

Les techniques de microscopie à balayage peuvent être vues comme une structuration de l'illumination. Par exemple, le microscope confocal consiste à focaliser l'illumination en un point, l'illumination prend alors la forme de la PSF d'illumination du mi-

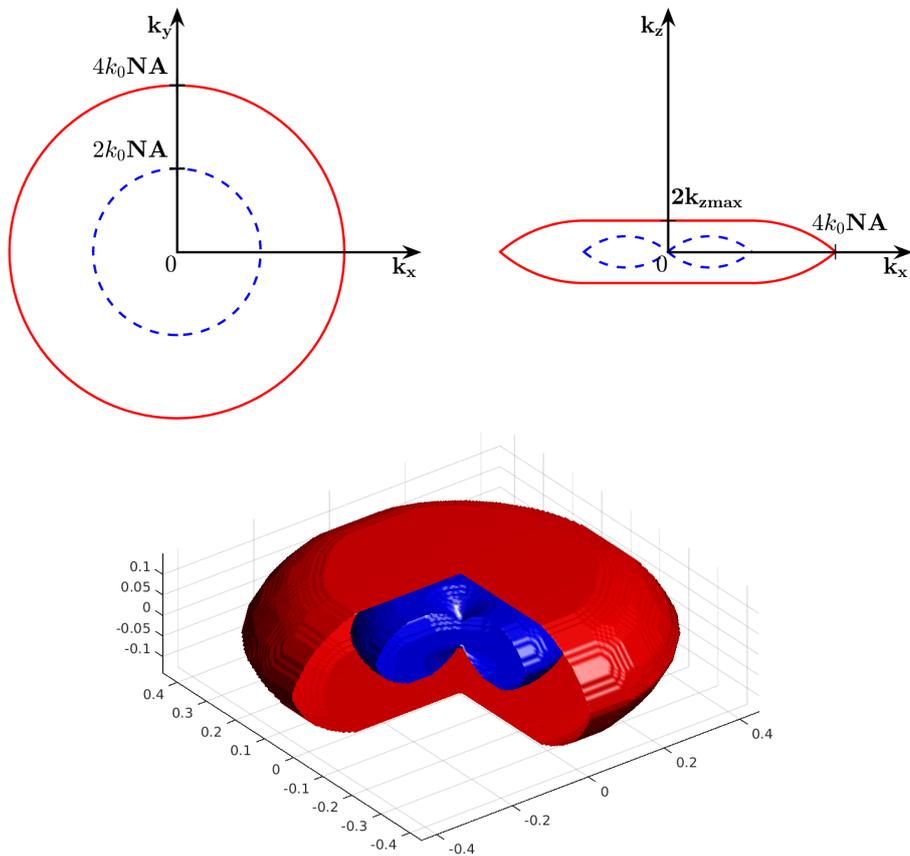


FIGURE 2.11 – On suppose que la PSF d'illumination est égale à la PSF de détection,  $h_{det} = h_{illu}$ . **Partie haute :** Domaine fréquentiel accessible en microscopie de fluorescence 3D avec une illumination uniforme en bleu traits pointillés et dans le cas confocal en rouge traits pleins. A gauche dans le plan  $(k_x, k_y)$ , à droite dans le plan  $(k_x, k_z)$ . **Partie basse :** Limites du domaine de la fonction de transfert optique (OTF) 3D  $\tilde{h}_{det}$  en bleu (surface intérieure) ainsi que de la pseudo fonction de transfert optique  $\tilde{h}_{conf}$  en rouge (surface extérieure).

croscopie  $h_{illu}$ , la lumière est ensuite captée au travers d'une pupille qui filtre la lumière

ne venant pas du plan focal [54]. Un balayage permet de former une image de l'objet. En théorie avec une pupille infiniment petite, la résolution d'un microscope confocal est deux fois plus grande que celle d'un microscope à champ large, de même le sectionnement optique est aussi amélioré. En effet, on peut modéliser un microscope confocal par l'équation [55]  $x(\mathbf{r}) = [h_{conf} \otimes \rho](\mathbf{r})$  avec  $h_{conf} = h_{illu} \times h_{det}$  où  $h_{det}$  est la PSF de l'optique de collection. Si l'on considère le cas  $h_{det} = h_{illu}$ , le domaine de  $\tilde{h}_{conf}$  est latéralement deux fois plus grand que celui de  $\tilde{h}_{det}$ , et il n'y a plus de « cône manquant », cf. Sec. 2.1.2. On peut ainsi montrer un gain en résolution et un meilleur sectionnement optique du microscope confocal (voir figure 2.11). En pratique, la fluorescence d'un échantillon biologique classique est cependant trop faible pour pouvoir suffisamment réduire le rayon de la pupille et le gain en résolution devient alors moindre, voir négligeable [56]. Il est possible de remplacer la pupille par une matrice de détecteurs ponctuels agissant comme des pupilles, un meilleur compromis entre super-résolution et rapport signal sur bruit est alors atteignable en comparaison à un microscope confocal [57].

D'autres approches permettent de réduire la taille de la tache d'illumination pour obtenir une résolution latéral plus importante [58], [59]. C'est notamment le cas du STED, où l'on tire partie de la déplétion par émission stimulée pour pouvoir éliminer la fluorescence provenant des bords de la tache d'illumination. Un gain en super-résolution important est alors possible [59]. Ces techniques nécessitent elles aussi une bonne calibration et un contrôle rigoureux des illuminations utilisées, ce qui se traduit par une complexité du montage expérimental en lien avec le gain de super résolution souhaité.

### 2.2.2 Super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI)

Certains fluorophores ont la particularité de clignoter aléatoirement sans aucune corrélation spatiale. La technique SOFI [60] permet à partir d'une séquence d'images de microscopie en champ large, où l'on peut observer ces clignotements, de reconstruire une image super-résolue. On suppose ici un objet composé de  $N$  émetteurs ponctuels indépendants :

$$\sum_{k=1}^N \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_k) \epsilon_k s_k(t) \quad (2.2.1)$$

avec  $\mathbf{r}_k$  la position de l'émetteur  $k$ ,  $\epsilon_k$  une constante de luminosité moléculaire et  $s_k(t)$  une fluctuation dans le temps de la luminosité. L'image à un instant  $t$ , obtenue avec un microscope à champ large d'un ensemble de  $N$  particules est alors :

$$x(\mathbf{r}, t) = \sum_{k=1}^N h(\mathbf{r} - \mathbf{r}_k) \epsilon_k s_k(t) \quad (2.2.2)$$

Sous hypothèse que les fluorophores ne bougent pas pendant l'acquisition et que l'émission de photons des différents fluorophores n'est pas corrélée dans le temps, il est possible de montrer que le cumulatif d'ordre 2 est alors

$$C_2(\mathbf{r}, \tau) = \mathcal{E}(\delta x(\mathbf{r}, t + \tau) \times \delta x(\mathbf{r}, t)) \quad (2.2.3a)$$

$$= \sum_{k=1}^N h(\mathbf{r} - \mathbf{r}_k)^2 \epsilon_k^2. \quad (2.2.3b)$$

avec  $\delta x(\mathbf{r}, t) = x(\mathbf{r}, t) - \mathcal{E}(x(\mathbf{r}, t))$  et  $\mathcal{E}(\dots)$  est une espérance mathématique qui sous l'hypothèse d'ergodicité est obtenue par une moyenne temporelle. Toujours selon [60] si l'on peut approximer la PSF  $h$  par une fonction gaussienne, alors la «taille» de  $h^2$  est réduite d'un facteur  $\sqrt{2}$ , ce qui augmente la résolution de l'image du second cumulant<sup>5</sup>. Il faut probablement noter que ce résultat ne correspond pas à un facteur de super-résolution sur  $\rho$ . Pour un objet binaire tel que  $\rho^2 = \rho$  alors effectivement, on obtient bien le même facteur de super-résolution sur  $\rho$  mais dans le cas général, observer  $\rho^2$  avec une PSF  $h^2$  ne permet d'obtenir aucune super-résolution sur  $\rho$ . On reviendra sur ce point en Sec. 3.1.2. SOFI est directement applicable aux microscopes existant mais reste limitée à l'utilisation de fluorophores qui clignote aléatoirement à une fréquence adéquate. Une version modifiée appelée S-SOFI [61] est utilisée en remplaçant la variation temporelle apportée par le clignotement des fluorophores par une variation temporelle apportée par une illumination de speckle.

### 2.2.3 *Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM), Photoactivated localization microscopy (PALM)*

En utilisant un microscope optique, la position d'un émetteur fluorescent unique peut être estimée bien plus précisément que la limite de diffraction ne le suggère. On peut montrer que l'écart-type de l'estimation de la position latérale du centre de l'émetteur est approximativement  $\sigma = s/\sqrt{N}$  avec  $s$  l'écart type de la gaussienne approximant au mieux la PSF du microscope,  $N$  le nombre de photons captés [62, 63]. Pour une longueur d'onde d'émission de 500 nm, le paramètre  $s$  vaut environ 200 nm, sachant qu'un émetteur unique peut émettre plus de  $10^4$  photons avant de photoblanchir<sup>6</sup>, on arrive à un écart-type de presque 1 nm [65]. Certains fluorophores peuvent être éteints ou allumés optiquement de manière répétée. L'activation de ces fluorophores est aléatoire et il est possible de cycliquement allumer un petit nombre de fluorophore aléatoirement, puis d'éteindre l'ensemble des fluorophores. Les techniques STORM [66] et PALM [65] correspondent à cette stratégie ; elles ont été proposées indépendamment (et simultanément) par deux groupes distincts. Elles utilisent cette propriété d'activation pour obtenir des séquences d'images où les fluorophores activés sont suffisamment éloignés pour considérer qu'ils n'interfèrent pas les uns sur les autres. Ainsi, le problème revient à une stratégie en deux étapes : d'abord l'ensemble des quelques émetteurs activés sont détectés sur le plan de l'image, et ensuite, la localisation sub-pixelique de chaque émetteur détecté est produite par un algorithme de localisation de particule unique [66], [65]. La précision de localisation alors obtenue en pratique est de l'ordre de 20 à 40 nm. La reconstruction PALM/STORM n'est pas sans présenter quelques difficultés. Ainsi, plus la densité de fluorophores activés est faible plus le nombre d'images à acquérir est grand pour localiser l'ensemble des fluorophores, inversement plus la densité est fortes, plus il faut prendre en compte dans l'estimation de la position des fluorophores l'interaction entre émetteur voisin. De par leur stratégie « pointilliste », ces techniques nécessitent donc un nombre d'images important (de l'ordre de 10000 images) pour produire une reconstruction satisfaisante de la scène. De ce fait, les reconstructions PALM/STORM

---

5. Il est possible d'appliquer le même cheminement avec les cumulants d'ordre  $n$ , un facteur de super-résolution de  $\sqrt{n}$  sur l'image du cumulant est alors obtenue.

6. La réponse d'un fluorophore est proportionnelle à l'intensité, ce coefficient de proportionnalité diminue proportionnellement au nombre de photons émis par le fluorophore [64].

demandent des acquisitions très longues (plusieurs heures) et elles sont très sensibles à toutes formes de dérives instrumentales ou de l'échantillon, notamment les dérives thermiques [67]. La tendance est donc aujourd'hui d'augmenter le nombre d'émetteurs actifs par image, ceci au prix des biais liés à l'absence de prise en compte de l'interaction des émetteurs voisins entre eux.



## Chapitre 3

# Origine de la super-résolution en éclairagements aléatoires

Afin de justifier du bien fondé des méthodes d'imageries utilisant des éclairagements aléatoires inconnus (Random Blind-SIM ), nous allons étudier la capacité de super-résolution théorique de ces imageurs. Le terme Blind-SIM (BS) sera compris par la suite dans un sens plus large : ainsi, tout imageur actif utilisant des éclairagements inconnus sera qualifié de Blind-SIM. En outre, une sous-classe d'imageurs « Blind-SIM » utilise des illuminations aléatoires, notamment de speckle, et seront appelées « Random Blind-SIM » (RBS). Les résultats de ce chapitre concernent donc uniquement les montages de type « RBS ». Ce chapitre produit une analyse asymptotique<sup>1</sup> garantissant qu'à partir d'éclairagements aléatoires (donc non contrôlés) certaines fréquences de l'objet non transmises par l'OTF peuvent effectivement être identifiées. Si on écarte le caractère asymptotique, les hypothèses nécessaire pour produire cette analyse sont réalisables en pratique. Cette analyse permet de tirer des conclusions importantes pour notamment trois techniques d'imagerie.

La première est l'imagerie de fluorescence (voir sous-section. 3.1.3), en effet pour le montage classique en *epi*-microscopie, la capacité théorique de super-résolution en éclairagements aléatoires est similaire à celle atteinte en théorie par le SIM standard. Dans cette configuration, l'utilisation d'illuminations aléatoires inconnues, ou d'illuminations déterministes contrôlées permettent toutes les deux la même capacité de super-résolution.

La deuxième est la tomographie de diffraction (voir sous-section. 3.1.3 ), où l'on montre qu'il est possible pour une configuration en transmission, de remplacer les illuminations contrôlées et connues ( par exemple en ondes planes dont l'angle d'incidence est contrôlé) par des illuminations de speckles aléatoires inconnues, tout en conservant la même résolution théoriquement atteignable. Cela permet d'envisager une simplification du montage expérimental nécessaire et de simplifier la calibration.

La troisième est la photo-acoustique (voir sous-section. 3.1.3). En effet on peut démontrer que l'utilisation d'illuminations de speckles spatialement décorrélés permet d'identifier le contenu fréquentiel de l'objet élevé au carré, sur un domaine<sup>2</sup> plus étendue que le domaine de la transformée de Fourier de la PSF acoustique.

---

1. en présence de bruit et à mesure que le nombre d'acquisition croît vers l'infini.

2. Avec une illumination uniforme, il n'est pas possible d'identifier le contenu fréquentiel de l'objet élevé au carré sur un quelconque domaine.

Les résultats obtenus s'appliquent aussi à de nombreuses autres techniques (radar à synthèse d'ouverture [6], en thermographie [53]...) pouvant être employées dans un cadre Blind-SIM aléatoires. En effet, pour toutes ces modalités d'imagerie, il est en théorie possible de relâcher des contraintes sur les éclairements utilisés en conservant des performances de résolution équivalente, ceci permet aussi d'envisager une simplification des implémentations expérimentales et de la calibration de ces systèmes. Nous allons cependant nous arrêter aux cas de la microscopie de fluorescence et de la tomographie de diffraction pour illustrer nos résultats.

### 3.1 Capacité de super résolution intrinsèque induite par des éclairements aléatoires <sup>3</sup>

Nous nous intéressons ici à la capacité de super-résolution d'imageurs optiques à base d'illuminations aléatoires inconnues. Nous restreignons notre analyse asymptotique des propriétés de super-résolution en analysant l'information contenue dans les deux premiers moments statistiques (moyenne et covariance des mesures). Plus précisément, nous allons établir les expressions des deux premiers moments statistiques des mesures, puis donner les liens que l'on peut établir entre ces relations et le contenu fréquentiel de l'objet  $\tilde{\rho}$ .

On considère  $M$  images  $(\mathbf{y}_1, \dots, \mathbf{y}_M)$  d'un même objet ayant été acquises en utilisant  $M$  différentes illuminations. Chaque image  $\mathbf{y}_m = (y_m(\mathbf{r}_1), \dots, y_m(\mathbf{r}_N))$  est un ensemble de  $N$  pixels, chacun étant indexé par un vecteur de coordonnées spatiales  $\mathbf{r}_n$ . En pratique, les vecteurs  $\mathbf{r}_n$  couvrent une grille  $\mathcal{G}$  rectangulaire discrète et finie de dimension  $d$  avec  $d$  égale à deux ou trois. Sans perte de généralité, on va considérer que la période d'échantillonnage est normalisée à un dans chaque directions. Par convention, nous allons considérer que  $\mathbf{y}_m$  est un vecteur colonne obtenu en balayant la grille  $\mathcal{G}$  de l'image dans un ordre arbitraire. Donc pour tout  $m \in \{1 \dots M\}$  et  $\mathbf{r} \in \mathcal{G}$ , le modèle d'observation s'écrit

$$y_m(\mathbf{r}) = [h \otimes (\rho \times E_m)](\mathbf{r}) + \epsilon_m(\mathbf{r}) \quad (3.1.1)$$

avec  $h \in \mathbb{C}$  la PSF,  $y(\mathbf{r})$  le signal mesuré et  $\epsilon_m$  est un bruit additif. Les hypothèses suivantes nous seront nécessaires :

- (i) La PSF  $h$  est intégrable mais aussi de carré intégrable (*i.e.*,  $\int |h(\mathbf{x})|^p d\mathbf{x} < \infty$  pour  $p = 1, 2$ ), elle est un opérateur positif semi-défini (*i.e.*, sa transformée de Fourier ou OTF est réelle non-négative). De plus, sa transformée de Fourier  $\tilde{h}$  prend des valeurs finies puis nulles en dehors d'un domaine fermé noté  $\mathcal{D}_{\text{PSF}} = \{\mathbf{k} \mid \tilde{h}(\mathbf{k}) > 0\}$ . Ces hypothèses sont vérifiées dès lors que les mesures  $y$  sont effectuées en champ lointain ce qui est le cas pour de nombreux imageurs [8].
- (ii) La grille d'échantillonnage est supposée assez fine pour échantillonner la PSF  $h$  sans erreur de discrétisation. D'après le théorème multidimensionnel de Parzen [25], cette condition est respectée dès lors que  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  appartient à la bande passante  $\mathcal{B} = [-1/2, 1/2]^d$ .

---

3. Les résultats présentés dans cette partie sont actuellement soumis dans la revue IEEE TCI. <https://arxiv.org/pdf/1512.06260.pdf>

- (iii) L'objet  $\rho$  est intégrable et prend des valeurs finies non-négatives dans  $\mathbb{R}^d$
- (iv) Le bruit et les illuminations sont des processus aléatoires stationnaires de second ordre, mutuellement décorrélés. Cette hypothèse est vérifiée pour de nombreux imageurs [16, Sec. 4.4]. Une extension au cas où la moyenne statistique des illuminations est spatialement variable est possible. Sans perte de généralité, on va supposer un bruit centré.
- (v) Les deux premiers moments statistiques des éclairissements,  $\mu_E$  et  $\Gamma_E$  sont supposés connus. La densité spectrale de puissance  $\tilde{\Gamma}_E$  (i.e. les composantes fréquentielles du speckle) est nulle en dehors d'un domaine noté  $\mathcal{D}_{\text{spec}}$ . Cette hypothèse est le cœur de notre approche. Cette connaissance est supposée plus facile à obtenir comparée à la connaissance de chacune des illuminations.

On restreint notre analyse des données en considérant uniquement les statistiques d'ordre deux des mesures, i.e., la moyenne et la covariance statistique des mesures. L'objectif est de déterminer quelles composantes fréquentielles de l'objet sont identifiables à partir de ces statistiques. Une telle restriction est légitime pour plusieurs raisons.

D'abord, la moyenne et la covariance empirique sont les quantités statistiques standard procurant l'information au second ordre dont la robustesse s'établit souvent à partir d'un nombre relativement réduit d'illuminations. Ensuite, la moyenne et la covariance statistique sont des statistiques exhaustives si les données sont gaussiennes, qu'elles soient réelles ou complexes. Par exemple, cette dernière hypothèse est adaptée au cas de l'imagerie cohérente telle que l'holographie digitale. Dans d'autres situations, telle que la microscopie de fluorescence, les illuminations de speckles, et donc les données, ne sont pas Gaussiennes. La moyenne et la covariance statistique ne résument donc pas l'ensemble de l'information sur l'objet contenue dans les mesures dans ce cas de figure, mais nos résultats procurent une *borne inférieure* sur l'information que l'on peut retrouver à partir des statistiques complètes des données.

Afin de caractériser le potentiel de super-résolution des méthodes du second ordre, on souhaite assigner chaque composante de la transformée de Fourier spatiale  $\tilde{\rho}(\mathbf{k})$  de l'échantillon imagé (le signe  $\tilde{\phantom{x}}$  correspond à la transformée de Fourier de dimension  $d$  telle que définie par la relation (1.1.3)) à une de ces trois classes :

- *Non-identifiable*  
Ces composantes fréquentielles ne sont pas identifiables à partir des moments statistiques d'ordre deux.
- *Partiellement identifiable*  
Les moments statistiques d'ordre deux dépendent de ces composantes fréquentielles mais des ambiguïtés d'identification demeurent sur ces composantes.
- *Identifiable*  
Les composantes fréquentielles de ce domaine sont identifiables de manière unique à partir des moments statistiques d'ordre deux.

Naturellement, le support de chacune de ces classes dans le domaine de Fourier peut dépendre du support fréquentiel  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  et des propriétés statistiques des illuminations utilisées. Pour des raisons de simplicité, le caractère fini de la grille de mesure  $\mathcal{G}$  est négligé, ce qui revient à assumer que  $\mathcal{G}$  peut être créée arbitrairement grande de façon à atteindre un régime sans pertes. Nous allons donc identifier  $\mathcal{G}$  à  $\mathbb{Z}^d$  par la suite.

Cette simplification est légitime car la PSF  $h$  s'estompe pour une distance arbitrairement grande de l'origine, en effet sa transformée de Fourier  $\tilde{h}$  est intégrable d'après l'hypothèse (i) (cette implication est une conséquence directe du théorème de Cauchy-Riemann [68]). Notre étude se porte sur les deux premiers moments statistiques des mesures sans bruit, on suppose que l'on peut accéder à ces moments à partir des moments statistiques des mesures bruitées. Nous allons maintenant étudier le contenu fréquentiel de l'objet identifiable à partir de la moyenne des données.

### 3.1.1 Information du premier ordre

La moyenne des mesures sans bruit  $\mu_x(\mathbf{r})$  s'écrit très simplement, à partir de la relation d'observation (3.1.1) donnée ci-dessus :

$$\mu_x(\mathbf{r}) = [h \otimes (\rho \times \mu_E)](\mathbf{r}) \quad (3.1.2)$$

avec  $\mu_E$  la moyenne statistique des illuminations. La transformée de Fourier continue de  $\mu_x(\mathbf{r})$  s'écrit :

$$\tilde{\mu}_x(\mathbf{k}) = \mu_E \tilde{h}(\mathbf{k}) \tilde{\rho}(\mathbf{k}) \quad (3.1.3)$$

pour tout  $\mathbf{k} \in \mathbb{R}^d$ . La fonction  $\tilde{\mu}_x$  a un support limité à  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  et peut donc être échantillonnée sans pertes en respectant l'hypothèse (ii). De plus, l'équation (3.1.3) permet d'accéder aux composantes fréquentielles de l'objet  $\rho$  appartenant à  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  si  $\mu_E \neq 0$ . Si  $E$  correspond à un champ complexe circulaire, on a alors  $\mu_E = 0$  [16] et dans ce cas,  $\mu_x$  n'apporte pas d'information sur le contenu fréquentiel de l'objet.

**Propriété 1** *La composante fréquentielle  $\tilde{\rho}(\mathbf{k})$  est identifiable à partir de  $\mu_x(\mathbf{r})$  si et seulement si  $\mathbf{k} \in \mathcal{D}_1$  avec*

$$\mathcal{D}_1 = \begin{cases} \mathcal{D}_{\text{PSF}} & \text{si } \mu_E \neq 0, \\ \emptyset & \text{sinon.} \end{cases}$$

En aucun cas les propriétés du premier ordre n'apporte de l'information sur le contenu fréquentiel de l'objet en dehors de  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  i.e., cette information ne donne aucune capacité de super-résolution.

### 3.1.2 Information du second ordre

Nous allons maintenant nous concentrer sur la fonction de corrélation des mesures sans bruit (voir (A.2.2)) :

$$\Gamma_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} h(\mathbf{r} - \mathbf{p}) h^*(\mathbf{r}' - \mathbf{p}') \Gamma_E(\mathbf{p} - \mathbf{p}') \rho(\mathbf{p}) \rho^*(\mathbf{p}') d\mathbf{p} d\mathbf{p}'. \quad (3.1.4)$$

Encore une fois, nous allons examiner cette fonction dans l'espace de Fourier. Par double transformée de Fourier continue sur l'équation (3.1.4) on obtient :

$$\begin{aligned} \tilde{\Gamma}_x(\mathbf{k}, \mathbf{k}') &= \tilde{h}(\mathbf{k}) \tilde{h}(-\mathbf{k}') \\ &\iint e^{-2i\pi(\mathbf{k} \cdot \mathbf{x} + \mathbf{k}' \cdot \mathbf{x}')} \rho(\mathbf{x}) \rho(\mathbf{x}') \Gamma_E(\mathbf{x} - \mathbf{x}') d\mathbf{x} d\mathbf{x}' \end{aligned} \quad (3.1.5)$$

ou  $\mathbf{k} \cdot \mathbf{x}$  est le produit scalaire usuel de  $\mathbb{R}^d$ . En sachant que

$$\Gamma_E(\mathbf{x}' - \mathbf{x}) = \int e^{2i\pi(\mathbf{x}-\mathbf{x}') \cdot \mathbf{k}''} \tilde{\Gamma}_E(\mathbf{k}'') d\mathbf{k}'',$$

on peut exprimer  $\tilde{\Gamma}_x(\mathbf{k}, \mathbf{k}')$  comme ceci :

$$\tilde{\Gamma}_x(\mathbf{k}, \mathbf{k}') = \tilde{h}(\mathbf{k}) \tilde{h}(-\mathbf{k}') \tilde{g}(\mathbf{k}, \mathbf{k}'), \quad (3.1.6)$$

avec

$$\tilde{g}(\mathbf{k}, \mathbf{k}') = \int \tilde{\rho}(\mathbf{k} - \mathbf{k}'') \tilde{\rho}(\mathbf{k}' + \mathbf{k}'') \tilde{\Gamma}_E(\mathbf{k}'') d\mathbf{k}''. \quad (3.1.7)$$

D'après (3.1.6) et l'hypothèse (ii),  $\tilde{\Gamma}_x$  a un support limité à  $\mathcal{B} \times \mathcal{B}$  et  $\tilde{\Gamma}_x(\mathbf{k}, \mathbf{k}')$  s'identifie à la double transformée de Fourier discrète de  $\tilde{\Gamma}_x$  pour tout  $\mathbf{k}, \mathbf{k}' \in \mathcal{B}$ . Les expressions (3.1.6), (3.1.7) et (3.1.5) permettent de voir que  $\tilde{\Gamma}_E$  joue un rôle central pour l'identification des composantes spectrales de l'objet. Cependant, le fait que les moments statistiques d'ordre deux ne dépendent pas linéairement mais plutôt de manière quadratique de l'objet  $\rho$ , rend l'interprétation en terme de capacité de super-résolution difficile. À notre connaissance, aucune théorie générale ne peut être appliquée pour résoudre les équations (3.1.6), (3.1.7) et (3.1.5) en  $\rho$ . Cependant, deux cas de figures sont développés ci-dessous. Le premier cas correspond à une illumination aléatoire « suffisamment » corrélée, dans le sens où la densité spectrale de puissance  $\mathcal{D}_{\text{spec}}$  est incluse  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ . À l'opposé le cas limite où l'illumination n'est pas corrélée spatialement peut aussi être traité. Ces deux cas de figures sont traités dans les deux prochaines sections, le cas intermédiaire reste quant à lui une question ouverte. Par la suite, nous aurons recours à la différence de Minkowski entre deux ensembles telle que nous l'avons introduite en Sec. 1.3 et dont nous rappelons ici la définition :

$$A \ominus B = \{\mathbf{u} - \mathbf{v}, \mathbf{u} \in A, \mathbf{v} \in B\}.$$

Cette différence nous permettra notamment de définir le domaine fréquentiel sur lequel il y a identification ou identification partielle des composantes spectrales de l'objet.

### Cas d'une illumination aléatoire suffisamment corrélée

Nous postulons ici que les illuminations inconnues utilisées sont spatialement corrélées avec un support fréquentiel limité au domaine  $\mathcal{D}_{\text{spec}}$  (voir l'hypothèse (v) Sec. 3.1). D'après l'équation (3.1.6),  $\tilde{\Gamma}_x(\mathbf{k}, \mathbf{k}')$  s'annule si  $\mathbf{k}$  ou  $\mathbf{k}'$  est pris en dehors de  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ . D'un autre côté, selon (3.1.7),  $\tilde{g}(\mathbf{k}, \mathbf{k}')$  ne transmet aucune information sur le contenu fréquentiel  $\tilde{\rho}(\mathbf{v})$  si  $\mathbf{v} \pm \mathbf{k}$  ou  $\mathbf{v} \pm \mathbf{k}'$  est en dehors de  $\mathcal{D}_{\text{spec}}$ . On peut donc en déduire la propriété suivante.

**Propriété 2** *Toutes composantes spectrales  $\tilde{\rho}(\mathbf{k})$  tel que  $\mathbf{k} \notin \mathcal{D}_1 \cup \mathcal{D}'_2$  avec  $\mathcal{D}'_2 = \mathcal{D}_{\text{PSF}} \ominus \mathcal{D}_{\text{spec}}$  n'est pas identifiable à partir de la moyenne  $\mu_x(\mathbf{r})$  et de la corrélation  $\tilde{\Gamma}_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$ .*

**Remarque 1** *Si les illuminations utilisées étaient connues, les composantes fréquentielles identifiables formeraient le domaine  $\mathcal{D}'_2$ , et les composantes en dehors de  $\mathcal{D}'_2$  resteraient non-identifiables. Ce cas de figure est facilement analysable puisque il correspond à la situation usuelle où les illuminations sont parfaitement contrôlées. De la même manière,*

si on avait accès à l'ensemble des statistiques (les illuminations restant inconnues), les composantes en dehors de  $\mathcal{D}'_2$  resteraient non-identifiables, puisque cette situation n'est pas plus favorable que la précédente. On peut donc conclure que les composantes en dehors de  $\mathcal{D}'_2$  ne peuvent être retrouvées à partir d'information statistique standard (i.e., non Bayésienne).

La propriété 2 est de nature négative. Heureusement, une propriété positive peut y être associée dans le cas où le support fréquentiel de l'illumination n'est pas plus large que celui de la PSF (la preuve de cette propriété est en annexe A.4).

**Propriété 3** Si  $\Gamma_E$  est tel que  $\mathcal{D}_{\text{spec}} \subseteq \mathcal{D}_{\text{PSF}}$ , alors toutes les composantes fréquentielles  $\tilde{\rho}(\mathbf{k})$  sont identifiables à partir de la moyenne  $\mu_x(\mathbf{r})$  et de la fonction de corrélation  $\Gamma_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$  si  $\mathbf{k} \in \mathcal{D}_1 \cup \mathcal{D}''_2$  avec  $\mathcal{D}''_2 = \mathcal{D}_{\text{spec}} \ominus \mathcal{D}_{\text{spec}}$ .

Pour la suite, il sera utile de noter qu'une définition équivalente de  $\mathcal{D}''_2$  peut être obtenue ainsi

$$\mathcal{D}''_2 = \{\mathbf{k} \mid (\tilde{\Gamma}_E \star \tilde{\Gamma}_E)(\mathbf{k}) > 0\} \quad (3.1.8)$$

avec  $\star$  l'opérateur d'inter-corrélation déterministe :

$$(f \star g)(\mathbf{r}) = \int_{-\infty}^{\infty} f(\mathbf{r}')g^*(\mathbf{r}' - \mathbf{r})d\mathbf{r}'. \quad (3.1.9)$$

Des exemples d'applications de la propriété 3 sont développés en section 3.1.3.

### Cas d'une illumination aléatoire décorrélée

On suppose maintenant que  $\Gamma_E(\mathbf{r}) = \Gamma_E(0)\delta(\mathbf{r})$ , ou  $\delta$  est la distribution de Dirac. Cette hypothèse est considérée valide si la taille caractéristique de corrélation de l'illumination est beaucoup plus petite que celle de la PSF. L'équation (3.1.5) devient

$$\Gamma_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \Gamma_E(\mathbf{0}) \int_{-\infty}^{\infty} h(\mathbf{r} - \mathbf{p}) h^*(\mathbf{r}' - \mathbf{p}) |\rho(\mathbf{p})|^2 d\mathbf{p} \quad (3.1.10)$$

Dans le domaine de Fourier,  $\tilde{\Gamma}_E(\mathbf{k}) = \Gamma_E(\mathbf{0})$ , donc (3.1.7) et (3.1.6) deviennent

$$\begin{aligned} \tilde{g}(\mathbf{k}, \mathbf{k}') &= \Gamma_E(\mathbf{0})\tilde{\rho}^2(\mathbf{k} + \mathbf{k}'), \\ \tilde{\Gamma}_x(\mathbf{k}, \mathbf{k}') &= \Gamma_E(\mathbf{0})\tilde{h}(\mathbf{k})\tilde{h}(-\mathbf{k}')\tilde{\rho}^2(\mathbf{k} + \mathbf{k}'), \end{aligned} \quad (3.1.11)$$

respectivement. Cette dernière relation est importante car elle montre que  $\rho^2$  est accessible pour toutes les fréquences  $\mathbf{k} + \mathbf{k}'$  tels que  $\mathbf{k}$  et  $\mathbf{k}'$  appartiennent à  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ . En conclusion la propriété suivante est valable.

**Propriété 4** Les composantes fréquentielles  $\tilde{\rho}^2(\mathbf{k})$  sont identifiables à partir de la fonction de corrélation  $\Gamma_y(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$  si et seulement si  $\mathbf{k} \in \mathcal{D}_2 = \mathcal{D}_{\text{PSF}} \ominus \mathcal{D}_{\text{PSF}}$ .

On peut aussi remarquer que la propriété 4 reste valable même si la variance  $v(\mathbf{r}) = \Gamma_y(\mathbf{r}, \mathbf{r})$  est utilisée au lieu de la fonction de corrélation complète  $\Gamma_y(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$ . Dans ce cas, il faut néanmoins une discrétisation plus fine que celle supposée en (ii). Le point de départ est la relation suivante obtenue grâce à (3.1.10) :

$$v(\mathbf{r}) = \Gamma_E(\mathbf{0}) (\rho^2 \otimes |h|^2)(\mathbf{r}), \quad (3.1.12)$$

La transformée de Fourier continue de  $v$  étant :

$$\tilde{v}(\mathbf{k}) = \Gamma_E(\mathbf{0}) \tilde{\rho}^2(\mathbf{k}) \times (\tilde{h} \star \tilde{h})(\mathbf{k}).$$

Le support de  $\tilde{h} \star \tilde{h}$  couvre tout le domaine  $\mathcal{D}_2$ , la transformée de Fourier discrète de  $v$  s'identifie donc bien à  $\tilde{v}$  si on a  $\mathcal{D}_2 \subset \mathcal{B}$ . Cette hypothèse est plus forte que (ii). En d'autres termes, cela veut dire que les données doivent être acquises avec un échantillonnage deux fois plus fin que celui donné par (ii). Une autre possibilité est de garder l'échantillonnage donné par (ii) et de procéder à une interpolation numérique avant le calcul de la variance.

**Propriété 5** *Sous l'hypothèse  $\mathcal{D}_2 \subset \mathcal{B}$ , les composantes fréquentielles de  $\tilde{\rho}^2(\mathbf{k})$  sont identifiables à partir de la variance  $\Gamma_x(\mathbf{r}, \mathbf{r})$  si et seulement si  $\mathbf{k} \in \mathcal{D}_2$ .*

Une propriété similaire à la propriété 5 est énoncée dans [69], où une hypothèse de pupille circulaire ainsi que la présence d'un unique point source incohérent (pour  $\rho$ ) est faite.

Il est important de noter que la connaissance de  $|\widehat{\rho}|^2 = \tilde{\rho} \star \tilde{\rho}$  sur le domaine  $\mathcal{D}_2$  ne permet pas de dire que l'on connaît le contenu fréquentiel de  $\rho$  sur un domaine donné quelque soit ce domaine. Pour montrer cela voici un simple contre exemple (il est unidimensionnel, mais une version multi-dimensionnel peut en être déduite) : définissons un sinus cardinal modulé,

$$\delta\rho(r) = \frac{\sin \pi r}{\pi r} \cos 2\pi\nu r,$$

où  $\nu$  est un paramètre fréquentiel. Sa transformée de Fourier est

$$\tilde{\delta\rho}(u) = \frac{1}{2} \text{rect}(u + \nu) + \frac{1}{2} \text{rect}(u - \nu),$$

ou  $\text{rect}$  est égal à un dans  $[-1/2, 1/2]$  et zero ailleurs. Prenons  $\nu$  assez grand pour que le support de  $\tilde{\delta\rho}$  n'intersecte pas  $\mathcal{D}_2$  (ceci est toujours possible car  $\mathcal{D}_2$  et un domaine fréquentiel borné). Maintenant on choisit  $\rho_1(r) = 1$  pour tout  $r$  et  $\rho_2 = (1 + \delta\rho)^{1/2}$ . On a  $\tilde{\rho}_1^2$  et  $\tilde{\rho}_2^2$  identique à l'intérieur de  $\mathcal{D}_2$ , alors que  $\tilde{\rho}_1$  et  $\tilde{\rho}_2$  diffèrent même à l'intérieur de  $\mathcal{D}_2$ . Ceci peut être vérifié en développant  $\tilde{\rho}_2$  en série de Maclaurin de  $(1 + \delta\rho)^{1/2}$ . Ainsi, une capacité de super-résolution sur  $\rho^2$  ne s'identifie pas à une capacité de super-résolution sur  $\rho$ . En pratique, des contraintes sur l'objet peuvent être prises en compte dans un algorithme de reconstruction basé sur des projections (e.g. la contrainte de positivité sur l'objet est une de nos hypothèses (iii)) [24, Sec. 6.6.4], [21] mais à notre connaissance, aucune preuve formelle sur la capacité d'un tel algorithme à fournir de la super-résolution n'existe.

### 3.1.3 Exemples d'applications

Suivant l'imageur considéré, l'excitation  $E$  peut représenter soit une intensité, soit le champ électromagnétique, voir une onde sonore. De même, les statistiques des mesures dépendent également des statistiques du bruit, or la modélisation couramment utilisé pour le bruit dépend de l'application considérée. Dans cette partie, nous allons utiliser deux exemples d'applications respectant toutes les hypothèses nécessaires pour appliquer nos résultats et voir quelles implications ont ces résultats.

### Microscopie de fluorescence

Le microscope de fluorescence est un imageur incohérent (voir Sec. 2.1 pour plus de détails). L'objet  $\rho$  est une densité de fluorophore et l'illumination est une intensité. On considère ici un bruit additif de lecture que nous supposons suivre une distribution Gaussien centrée décorrélée :

$$y_m(\mathbf{r}) = [h \otimes (\rho \times E_m)](\mathbf{r}) + \epsilon_m(\mathbf{r}) \quad (3.1.13)$$

$$\epsilon_m(\mathbf{r}) \sim \mathcal{N}(0, \sigma_\epsilon(\mathbf{r})^2) \quad (3.1.14)$$

Le cas d'un bruit de comptage modélisé par une distribution de Poisson peut aussi être traité de la même manière (voir annexe A.2.2).

Nous allons vérifier chacune des cinq hypothèses pour cette modélisation. La PSF 2D (Fig. 2.1) et 3D (Fig. 2.5) est bien intégrable mais aussi de carré intégrable car les OTF correspondantes sont bornées de support limité [22]. De plus ces OTF sont réelles positives donc les PSF définissent bien un opérateur défini positif. Comme cité précédemment, les OTF 2D et 3D sont à support borné, on supposera que l'échantillonnage des données respecte le théorème de Parzen. L'hypothèse sur l'objet  $\rho$  intégrable n'est pas restrictive, l'objet observé étant en réalité borné et à support borné, de plus celui-ci est bien positif car il représente une densité de fluorophore. Dans le cas du montage de la Fig. 2.10, le bruit d'instrument peut être raisonnablement considéré comme un processus aléatoire stationnaire de second ordre, décorrélé des illuminations aléatoires. De plus les illuminations peuvent elles aussi être considérées comme un processus aléatoire stationnaire de second ordre (voir Sec. A.1). Nous supposons également que l'hypothèse (v) est vérifiée. C'est notamment le cas pour le montage en epi-illumination de la Fig. 2.10, pour lequel on peut montrer que la corrélation des illuminations s'identifie à la PSF (voir annexe A.1.2). La moyenne spatiale des illuminations est supposée constante.

D'après la modélisation (3.1.13) et (3.1.14), nous pouvons maintenant spécifier les deux premiers moments centrés pour le cas du microscope de fluorescence en epi-illumination présenté en Fig. 2.10. Dans notre cas, la moyenne des mesures est,

$$\mu_y(\mathbf{r}) = [h \otimes (\rho \times \mu_E)](\mathbf{r}). \quad (3.1.15)$$

La corrélation des mesures  $y(\mathbf{r})$  est :

$$\Gamma_y(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \Gamma_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}') + \sigma_\epsilon(\mathbf{r})^2 \times \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \quad (3.1.16)$$

ou  $\Gamma_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$  est donné par l'expression (3.1.4).

Nous allons maintenant illustrer les propriétés 1 (Sec. 3.1.1), 2 et 3 (Sec. 3.1.2) en prenant pour exemple le cas de la microscopie de fluorescence 2D (voir Fig. 3.1). Le domaine  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  est un disque de rayon  $\nu_{\text{PSF}} = 2k_0 \text{ NA}$ , le domaine  $\mathcal{D}_{\text{spec}}$  est également un disque dont le rayon noté  $\nu_{\text{spec}}$  est inférieur à  $\nu_{\text{PSF}}$  dans le cas du montage en epi-illumination de la Fig. 2.10. Dans ce cas, selon la propriété 3 le domaine des fréquences identifiables  $\mathcal{D}_2''$  est alors lui aussi un disque centré, de rayon  $2\nu_{\text{spec}}$ . La figure 3.1 donne une illustration graphique de la situation. Si l'on est dans le cas de figure où  $\nu_{\text{PSF}}/2 < \nu_{\text{spec}} < \nu_{\text{PSF}}$ , on a alors  $\mathcal{D}_1 \subset \mathcal{D}_2''$  et le facteur de super-résolution est de

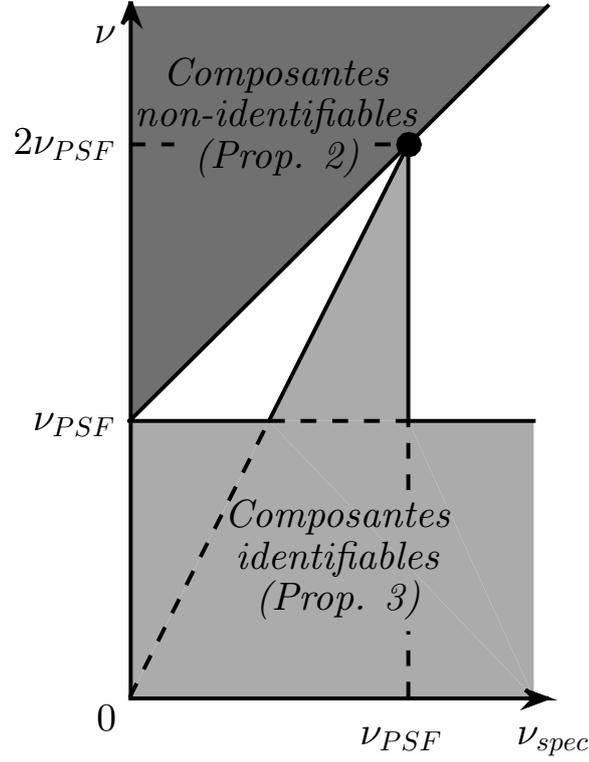


FIGURE 3.1 – Illustration des propriétés 2 et 3 quand  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  et  $\mathcal{D}_{\text{spec}}$  sont des disques centrés de rayons respectifs  $\nu_{\text{PSF}}$  et  $\nu_{\text{spec}}$  (on suppose aussi  $\mu_E \neq 0$ ). La fréquence de coupure  $\nu_{\text{PSF}}$  est fixée, alors que la fréquence spatiale maximale de l’illumination  $\nu_{\text{spec}}$  varie le long de l’axe des abscisses. L’évolution des rayons pour lesquels les composantes fréquentielles sont identifiables et celui pour lesquels les composantes sont non identifiables sont représentés selon l’axe des ordonnées.

$2\nu_{\text{spec}}/\nu_{\text{PSF}}$ . Le statut des composantes fréquentielles en dehors des zones grisées reste une question ouverte. Notre conjecture est qu’elles sont seulement partiellement identifiables depuis les moments statistiques d’ordre deux. Le cas important où  $\mathcal{D}_{\text{spec}} = \mathcal{D}_{\text{PSF}}$  est rencontré en pratique pour le montage en *epi*-fluorescence de la Fig. 2.10, *i.e.*, lorsque les illuminations et les observations passent par les mêmes composants optiques (même objectifs optique pour l’illumination et la collection, on néglige ici l’effet de la différence de longueur d’onde). Dans ce contexte, on peut conclure que les moments statistiques d’ordre deux suffisent à identifier les composantes fréquentielles de l’objet dans le domaine  $\mathcal{D}_2'' = \mathcal{D}_2' = \mathcal{D}_2 = \mathcal{D}_{\text{PSF}} \ominus \mathcal{D}_{\text{PSF}}$  et n’apporte pas d’information en dehors de ce domaine (cette situation correspond au point noir de la figure 3.1). En d’autres termes, cela permet un niveau de super-résolution équivalent à celui obtenu avec un microscope ayant pour PSF  $|h|^2$ , comme dans le cas classique de microscopie SIM à éclairements connus. Dans le cas 3D, le domaine accessible  $\mathcal{D}_2''$  est le même que pour un microscope confocal parfait (avec une pupille infiniment petite), voir Fig. 2.11.

Finalement, il est important de signaler que la propriété 3 donne un ensemble de composantes fréquentielles identifiable, et ne prédit absolument pas la précision d’estimation dans un cas réaliste où le nombre d’illuminations utilisées est limité, les images collectées par le microscope sont bruitées et acquises sur un champ de vue limité. Néanmoins des reconstructions numériques présentées en section 3.2.2 suggèrent qu’une très

grosse proportion du contenu fréquentiel dans le domaine  $\mathcal{D}_{\text{PSF}} \ominus \mathcal{D}_{\text{PSF}}$  peut être estimée à partir d'un nombre limité d'images bruitées.

**Remarque 2** *La même étude peut être menée en prenant en compte un bruit modélisé par une distribution de Poisson et un bruit de lecture que nous supposons suivre une distribution Gaussienne de paramètres connus. Les mêmes capacités de super-résolution asymptotiques sont alors démontrées. Les expressions des moments statistiques d'ordre deux sont indiquées en annexe A.2.2.*

Pour illustrer la présence d'information de super-résolution dans les moments statistiques et la possibilité d'extraire cette information, nous allons effectuer des simulations Blind-SIM en microscopie de fluorescence avec un nombre modéré d'illuminations de speckles  $E_m$ , les résultats sont présentés en Fig. 3.2 de la section 3.2.2.

## Holographie digitale

L'holographie digitale est une technique d'imagerie cohérente (voir Sec. 1.3 pour plus de détails). Usuellement, en tomographie de diffraction les champs d'excitation utilisés sont parfaitement contrôlés. Le plus souvent, un ensemble d'ondes planes de directions différentes est utilisé pour illuminer l'objet. Ici, nous allons considérer le cas d'illuminations de speckle *i.e.*, chaque illumination est une somme d'ondes planes de phase aléatoire. Dans ce cas de figure, chaque illumination comporte tous les angles d'illumination possibles. Nous allons voir qu'en théorie, bien que les illuminations soient supposées inconnues, il est possible de retrouver le contenu fréquentiel de l'objet sur le même domaine fréquentiel que dans le cas de figure usuel de la tomographie de diffraction en transmission Fig. 1.3.

L'objet  $\rho$  est en général à valeur complexe mais pour respecter l'hypothèse (iii), nous devons restreindre l'analyse au cas où  $\rho$  est seulement composé d'une partie réelle positive. Ce cas de figure correspond à la classe des objets sans absorption<sup>8</sup>. On supposera également que l'éclairage aléatoire est un champ électromagnétique complexe suivant une distribution gaussienne complexe centrée corrélée correspondant à un speckle pleinement développé. Les mesures  $y(\mathbf{r})$  correspondent au champ électromagnétique diffracté par l'objet<sup>9</sup>. On considérera uniquement le cas d'un bruit additif complexe gaussien circulaire [26] :

$$y_m(\mathbf{r}) = [h \otimes (\rho \times E_m)](\mathbf{r}) + \epsilon_m(\mathbf{r}) \quad (3.1.17)$$

$$\epsilon_m(\mathbf{r}) \sim \mathcal{N}(0, \sigma_\epsilon(\mathbf{r})^2) \quad (3.1.18)$$

Le support de l'OTF de ce système optique ( $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ ) est une calotte de sphère (voir Fig. 1.3), les valeurs prises sur ce support étant réelles positives et bornées. La PSF correspondante est donc bien un opérateur semi-défini positif de carré intégrable. Sous réserve que l'objet observé soit non absorbant (donc réel et positif), on pourrait montrer là encore que les hypothèses de (i) à (v) sont des pré-requis raisonnables pour l'holographie digitale. On notera par exemple que les statistiques spatiales au second ordre

---

8. La même analyse est possible pour les objets purement absorbant, *i.e.*, avec seulement une partie imaginaire positive.

9. Une technique d'holographie doit être utilisée pour accéder à ce champ

du speckle sont connues dès que l'éclairement est obtenu via un objectif dont la PSF est donnée, voir (A.1.8). Comme pour le cas de la fluorescence, ceci ouvre la voie à l'application des propriétés 1 (Sec. 3.1.1), 2 et 3 (Sec. 3.1.2) qui donne des garanties sur les propriétés de super-résolution du système.

De la même manière que pour le cas incohérent, il est possible de calculer les moments statistiques des mesures, la moyenne  $\mu_y$  et la corrélation  $\Gamma_y$  restent inchangés, respectivement (3.1.15) et (3.1.16). Les domaines  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  et  $\mathcal{D}_{\text{spec}}$  sont des calottes de sphères, et on considère ici le cas  $\mathcal{D}_{\text{spec}} = \mathcal{D}_{\text{PSF}}$ <sup>10</sup>, dans ce contexte, on peut conclure que les moments statistiques d'ordre deux suffisent à identifier les composantes fréquentielles de l'objet dans le domaine  $\mathcal{D}'_2 = \mathcal{D}'_2 = \mathcal{D}_2 = \mathcal{D}_{\text{PSF}} \ominus \mathcal{D}_{\text{PSF}}$  et n'apporte pas d'information en dehors de ce domaine. Ce domaine accessible, représenté en Fig. 1.3, correspond exactement à celui de la tomographie de diffraction optique en transmission, montage pour lequel il faut contrôler précisément l'angle d'incidence des ondes planes utilisées pour éclairer l'objet.

### Photo-acoustique

Lorsqu'un tissu absorbe une onde électromagnétique pulsée, des contraintes thermiques créent des ondes ultrasoniques se propageant dans le milieu. L'imagerie photoacoustique utilise ces ondes sonores pour imager en profondeur, notamment dans des tissus biologiques. Les mesures acoustiques  $x$  peuvent être modélisées en utilisant (1.1.2), avec  $h$  la PSF acoustique[70],  $\rho$  l'absorption optique et  $E$  l'intensité de l'illumination optique.

Récemment il a été proposé d'utiliser une illumination de speckle au niveau de l'objet, la taille des grains de speckles et alors négligeable par rapport à celle de la PSF acoustique du système [52]. La propriété 4 énoncée en Sec. 3.1.2 est alors applicable. On peut donc identifier les composantes fréquentielles de  $\tilde{\rho}^2(\mathbf{k})$  à partir de la fonction de corrélation  $\Gamma_y(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$  si et seulement si  $\mathbf{k} \in \mathcal{D}_2 = \mathcal{D}_{\text{PSF}} \ominus \mathcal{D}_{\text{PSF}}$ . Lorsque l'illumination est uniforme, seules les fréquences spatiales<sup>11</sup> de l'objet appartenant à  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  sont identifiables.

## 3.2 Estimation par critère de contraste

Nous avons vu que l'emploi d'éclairements aléatoires (notamment de speckle) permet en théorie d'identifier des composantes fréquentielles de l'objet qui n'appartiennent pas au support de l'OTF de l'optique de collection. Dans cette nouvelle partie, nous allons proposer un estimateur permettant d'extraire l'information de super-résolution contenue dans les moments statistiques au second ordre des mesures.

La notation discrète sera adoptée, celle-ci étant plus adaptée au traitement d'un cas réel d'estimation à partir d'images discrètes issues d'une caméra. La modélisation d'un

10. Pour que les domaines  $\mathcal{D}_{\text{spec}}$  et  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  coïncident, il faut une configuration en transmission, on suppose donc que deux objectifs parfaitement similaires sont utilisés pour l'illumination et la collection.

11. L'absorption de l'onde sonore par l'échantillon ainsi que la taille de  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  augmentent si l'on réduit la longueur d'onde sonore enregistrée. Il y a donc un compromis entre profondeur de pénétration et résolution atteignable, pour une profondeur de 5 mm la résolution axiale est environ de 5  $\mu\text{m}$ .

imageur optique devient :

$$\mathbf{y}_m = \mathbf{H}(\boldsymbol{\rho} \odot \mathbf{E}_m) + \boldsymbol{\epsilon}_m \quad (3.2.1)$$

$$\boldsymbol{\epsilon}_m \sim \mathcal{N}(0, \boldsymbol{\Gamma}_\epsilon) \quad (3.2.2)$$

avec  $\odot$  le produit d'Hadamard, *i.e.*, le produit composante par composante de deux vecteurs et  $\mathbf{H} \in \mathbb{R}^{P \times N}$  la matrice de convolution 2D, construite à partir de  $h$  la discrétisation de la PSF. On note  $\boldsymbol{\rho} = \mathbf{vect}(\rho_n) \in \mathbb{R}^N$  la discrétisation de la densité de fluorophores,  $\mathbf{y}_m = \mathbf{vect}(y_{m;n}) \in \mathbb{R}^P$  la mième image enregistrée et  $\mathbf{E}_m = \mathbf{vect}(E_{m;n}) \in \mathbb{R}^N$  la mième illumination d'intensité moyenne spatiale,  $\mathbf{E}_0 = \mathbf{vect}(E_{0;n}) \in \mathbb{R}_+^N$  (cette dernière quantité peut être spatialement inhomogène mais est supposée connue). Le bruit instrumental additif  $\boldsymbol{\epsilon}_m$  suit une distribution aléatoire gaussienne centrée notée  $\mathcal{N}$  de covariance  $\boldsymbol{\Gamma}_\epsilon$  supposée connue.

Du point de vue de l'inférence statistique, le caractère aléatoire des éclairagements peut être décrit par un modèle de fluctuation ce qui permet formellement d'intégrer « hors du problème » les variables aléatoires  $\mathbf{E}_m$  qui sont de fait des variables de nuisance pour le problème d'estimation de  $\boldsymbol{\rho}$  [71]. Dès lors, une stratégie statistiquement saine consisterait à définir une vraisemblance marginale pour construire un estimateur de l'objet imagé. Il est cependant délicat, voir impossible en pratique, de construire la loi jointe du speckle corrélé et cette approche ne peut pas être adoptée. Il est en revanche possible de construire un *critère de contraste* [72] à partir des deux premiers moments empiriques pour définir implicitement un estimateur consistant (*i.e.*, tel que le biais et la variance de l'estimateur tendent asymptotiquement vers zéro à mesure que le nombre d'acquisition croît à l'infini). De ce fait, conformément aux résultats théoriques de la section précédente, nous pouvons espérer qu'un tel estimateur produise une estimée super-résolue de l'objet imagé, tout du moins dans les limites des résultats prédits par les propriétés 1, 2 et 3.

### 3.2.1 Critère de contraste à optimiser

Pour un nombre fini d'acquisition, la moyenne empirique  $\hat{\boldsymbol{\mu}}_y$  et la covariance empirique  $\hat{\boldsymbol{\Gamma}}_y$  sont définis par :

$$\hat{\boldsymbol{\mu}}_y = \frac{1}{M} \sum_{m=1}^M \mathbf{y}_m, \quad \hat{\boldsymbol{\Gamma}}_y = \frac{1}{M} \sum_{m=1}^M \mathbf{y}_m \mathbf{y}_m^\dagger - \hat{\boldsymbol{\mu}}_y \hat{\boldsymbol{\mu}}_y^\dagger. \quad (3.2.3)$$

On considère ici uniquement le cas où le bruit et les éclairagements sont des processus aléatoires de moments statistiques du deuxième ordre stationnaire et mutuellement décorrélés, de plus les deux premiers moments statistiques des illuminations  $E_0$  et  $\boldsymbol{\Gamma}_E$  sont supposés connus<sup>12</sup>. A partir de la modélisation des mesures  $\mathbf{y}_m$ , leurs moments

---

12. Dans le cas d'un montage en épi-fluorescence, il est possible de calculer de manière théorique la valeur de ces moments en fonction de la psf  $h$  du microscope et de l'intensité moyenne en entrée du microscope (voir Annexe A.1).

statistiques peuvent être calculés

$$\boldsymbol{\mu}_y = \mathcal{E}(\mathbf{y}_m) = E_0 \mathbf{H} \boldsymbol{\rho} \quad (3.2.4)$$

$$\begin{aligned} \Gamma_y &= \mathcal{E} \left( (\mathbf{y}_m - \boldsymbol{\mu}_y)(\mathbf{y}_m - \boldsymbol{\mu}_y)^\dagger \right) \\ &= \mathbf{H} \mathbf{Diag}(\boldsymbol{\rho}) \Gamma_E \mathbf{Diag}(\boldsymbol{\rho})^\dagger \mathbf{H}^\dagger + \Gamma_\epsilon \end{aligned} \quad (3.2.5)$$

avec  $\mathcal{E}$  l'espérance statistique,  $\dagger$  l'opérateur conjugué transpose et  $\mathbf{Diag}(\boldsymbol{\rho})$  une matrice diagonal composé des éléments du vecteur  $\boldsymbol{\rho}$ . D'après, la loi des grands nombres on a [73] :

$$\lim_{M \rightarrow \infty} \widehat{\boldsymbol{\mu}}_y \xrightarrow{\mathcal{P}} \boldsymbol{\mu}_y^*, \quad \lim_{M \rightarrow \infty} \widehat{\Gamma}_y \xrightarrow{\mathcal{P}} \Gamma_y^* \quad (3.2.6)$$

avec  $\boldsymbol{\mu}_y^*$  et  $\Gamma_y^*$  les vraies moyenne et covariance statistique des mesures,  $\xrightarrow{\mathcal{P}}$  représente la convergence en probabilité. La mesure de dissemblance entre les moments empiriques (3.2.3) et les expressions théoriques de ces moments (3.2.4) et (3.2.5) choisie est la divergence de Kullback-Leibler (DKL) entre une loi gaussienne dont la moyenne  $\widehat{\boldsymbol{\mu}}_y$  et la covariance  $\widehat{\Gamma}_y$  correspondent aux moments empiriques centrés 3.2.3, d'une part, et une loi gaussienne dont la moyenne  $\boldsymbol{\mu}_y$  et la covariance  $\Gamma_y$  correspondent au moments structurés par la modélisation 3.2.5, d'autre part. Selon [74, §9.1], une expression explicite de cette divergence de Kullback-Leibler est :

$$\begin{aligned} D_M(\boldsymbol{\rho}) &= \frac{1}{2} \text{Tr}(\Gamma_y^{-1} \widehat{\Gamma}_y) + (\boldsymbol{\mu}_y - \widehat{\boldsymbol{\mu}}_y)^\dagger \frac{\Gamma_y^{-1}}{2} (\boldsymbol{\mu}_y - \widehat{\boldsymbol{\mu}}_y) \\ &\quad + \frac{1}{2} \log \frac{|\Gamma_y|}{|\widehat{\Gamma}_y|} - \frac{N}{2} \end{aligned} \quad (3.2.7)$$

ou  $|\cdot|$  et  $\text{Tr}(\cdot)$  sont respectivement le déterminant et la trace d'une matrice carrée. On peut remarquer que  $D_M(\boldsymbol{\rho})$  est proportionnel à la log-vraisemblance des données si l'on suppose que les données suivent la loi  $\mathcal{N}(\boldsymbol{\mu}_y, \Gamma_y)$  [75].

### Analyse asymptotique<sup>13</sup>

Le principe statistique derrière l'estimateur créé est appelé *estimation par minimum de contraste* [72]. Considérons les variables  $\mathbf{y}_m$ ,  $m = 1 \dots, M$  comme des vecteurs de données indépendants et identiquement distribués, chacun prenant des valeurs dans  $\mathcal{Y}$ , avec une loi de probabilité commune dépendant d'un vecteur de paramètres  $\boldsymbol{\theta}^*$  dans  $\Theta$ . Prenons  $C : \mathcal{Y} \times \Theta \rightarrow \mathbb{R}$  une fonction à valeurs réelles. La théorie de l'estimation par minimum de contraste s'appuie sur les définitions suivantes.

**Définition 1** *L'espérance statistique  $J(\boldsymbol{\theta}^*, \boldsymbol{\theta}) = \mathcal{E}[C(\mathbf{y}, \boldsymbol{\theta})]$  est une fonction de contraste si elle atteint un minimum strict pour la valeur vraie  $\boldsymbol{\theta}^*$ .*

**Définition 2** *Pour un  $M$  arbitrairement large, si la moyenne empirique*

$$J_M(\boldsymbol{\theta}) = \frac{1}{M} \sum_{m=1}^M C(\mathbf{y}_m, \boldsymbol{\theta}) \quad (3.2.8)$$

*converge en probabilité vers  $J(\boldsymbol{\theta}^*, \boldsymbol{\theta})$  pour toutes valeurs de  $\boldsymbol{\theta}^*$  et  $\boldsymbol{\theta}$ , alors  $J_M(\boldsymbol{\theta})$  est appelé un processus de contraste.*

13. Ces résultats sont extraits de la publication [76]

On peut associer à un processus de contraste un estimateur à minimum de contraste  $\widehat{\boldsymbol{\theta}}_M$  défini comme le minimum de (3.2.8). L'estimateur  $\widehat{\boldsymbol{\theta}}_M$  est alors consistant (i.e.,  $\widehat{\boldsymbol{\theta}}_M$  converge en probabilité vers  $\boldsymbol{\theta}^*$  quand  $M \rightarrow \infty$ ) si les conditions suivantes sont validées [72, 77] :

**Théorème 1** Soit  $\Theta$  un ensemble fermé borné de  $\mathbb{R}^N$  et  $J(\boldsymbol{\theta}^*, \boldsymbol{\theta})$  une fonction continue sur la fermeture de  $\Theta$ . Si

- $J_M(\boldsymbol{\theta})$  est une fonction continue de  $\boldsymbol{\theta}$
- $J_M(\boldsymbol{\theta})$  converge uniformément vers  $J(\boldsymbol{\theta}^*, \boldsymbol{\theta})$ , i.e.,

$$\sup_{\boldsymbol{\theta} \in \Theta} |J_M(\boldsymbol{\theta}) - J(\boldsymbol{\theta}^*, \boldsymbol{\theta})| \rightarrow 0$$

alors  $\widehat{\boldsymbol{\theta}}_M$  est un estimateur consistant de  $\widehat{\boldsymbol{\theta}}$ .

Pour notre application, on définit  $\boldsymbol{\theta} = \mathcal{S}\rho$  avec  $\mathcal{S}$  le filtre passe bas idéal de support fréquentiel égal à  $\mathcal{D}_2$ . Alors on peut définir la fonction de contraste suivante :

$$J(\boldsymbol{\theta}^*, \boldsymbol{\theta}) = D^*(\mathcal{S}^+\boldsymbol{\theta})$$

avec  $D^*(\boldsymbol{\rho}) = D_{\mathcal{KL}}(\mathcal{N}(\boldsymbol{\mu}_y^*, \boldsymbol{\Gamma}_y^*) \parallel \mathcal{N}(\boldsymbol{\mu}_y, \boldsymbol{\Gamma}_y))$  et  $\mathcal{S}^+$  la pseudo inverse de  $\mathcal{S}$ .  $J(\boldsymbol{\theta}^*, \boldsymbol{\theta})$  coïncide avec notre définition de fonction de contraste puisque la vraie valeur  $\boldsymbol{\theta}^*$  est identifiable à partir de  $J(\boldsymbol{\theta}^*, \boldsymbol{\theta})$ , voir 3.1. De plus en utilisant 3.2.6 et le fait que la distance de Kullback-Leibler est une mesure convexe minimale en zéro, on a bien  $\boldsymbol{\theta}^*$  minimum strict de  $J(\boldsymbol{\theta}^*, \boldsymbol{\theta})$ . De la même manière on peut définir le processus de contraste par  $J_M(\boldsymbol{\theta}) = J(\boldsymbol{\theta}^*, \boldsymbol{\theta})$ . Prouver que  $J_M(\boldsymbol{\theta})$  est continu est simple. On peut voir dans la formule (3.2.7) que chaque composante de  $D_M(\boldsymbol{\rho})$  est continue. D'après les règles de construction de fonctions continues [78], il est donc facile de montrer que  $D_M(\boldsymbol{\rho})$  est continue, et par le même raisonnement  $J_M(\boldsymbol{\theta})$  l'est aussi.

La preuve de la convergence uniforme de  $J_M(\boldsymbol{\theta})$  vers  $J(\boldsymbol{\theta}^*, \boldsymbol{\theta})$  est reportée en annexe A.6. L'estimateur créé est donc bien consistant.

### Régularisation et mise en pratique

Il faut noter que le minimiseur de  $D$  n'est pas une solution *régularisée* [79], et dans notre cas n'est pas stable vis à vis des fluctuations liées au bruit des mesures. De ce fait, nous avons ajouté une pénalisation quadratique pour stabiliser la solution en gardant l'effet de super-résolution purement dirigé par les données. Le critère à minimiser devient donc :

$$J(\boldsymbol{\rho}) = D_M(\boldsymbol{\rho}) + \frac{\beta}{2} \|\boldsymbol{\rho}\|_2^2, \quad (3.2.9)$$

avec  $\beta \geq 0$  et  $\|\cdot\|_2$  la norme Euclidienne. Ce critère n'a à notre connaissance pas de solutions analytiques, une stratégie itérative d'optimisation doit donc être mise en place. Le problème est un problème à covariance structurée, pour lequel un algorithme espérance-maximisation (EM) peut être implémenté [75, 80, 81]. Cependant la convergence est lente. Notre stratégie d'optimisation c'est portée sur un algorithme de gradient conjugué non linéaire [46, (1.173)]. Le gradient peut s'écrire sous la forme :

$$\nabla J(\boldsymbol{\rho}) = - \left( [\boldsymbol{\Omega}^t (\boldsymbol{\Delta}_\Gamma + \boldsymbol{\delta}_\mu \boldsymbol{\delta}_\mu^t) \boldsymbol{\Omega}] \odot \boldsymbol{\Gamma}_E \right) \boldsymbol{\rho} - I_0 \boldsymbol{\Omega}^t \boldsymbol{\delta}_\mu + \beta \boldsymbol{\rho}, \quad (3.2.10)$$

avec  $\Omega = \Gamma_y^{-1} \mathbf{H}$ ,  $\delta_\mu = \hat{\mu}_y - \mu_y$ ,  $\Delta_\Gamma = \hat{\Gamma}_y - \Gamma_y$ . Le calcul du gradient du critère (3.2.9) est en annexe A.5. On peut remarquer que le calcul de ce gradient nécessite l'inversion d'une matrice  $N \times N$  pour une image reconstruite de  $N$  pixels, la complexité algorithmique est donc en  $\mathcal{O}(N^3)$ , ce qui est hors d'atteinte pour un problème de taille réaliste. La création d'un algorithme de plus faible complexité n'est pas traité ici mais constitue une direction de recherche délicate mais centrale pour obtenir un algorithme implémentable en microscopie 2D, voir en 3D.

Dans ce qui suit, nous montrons cependant sur un problème de taille modeste que l'estimateur de contraste ainsi défini permet bien d'obtenir les niveaux de super-résolution attendus.

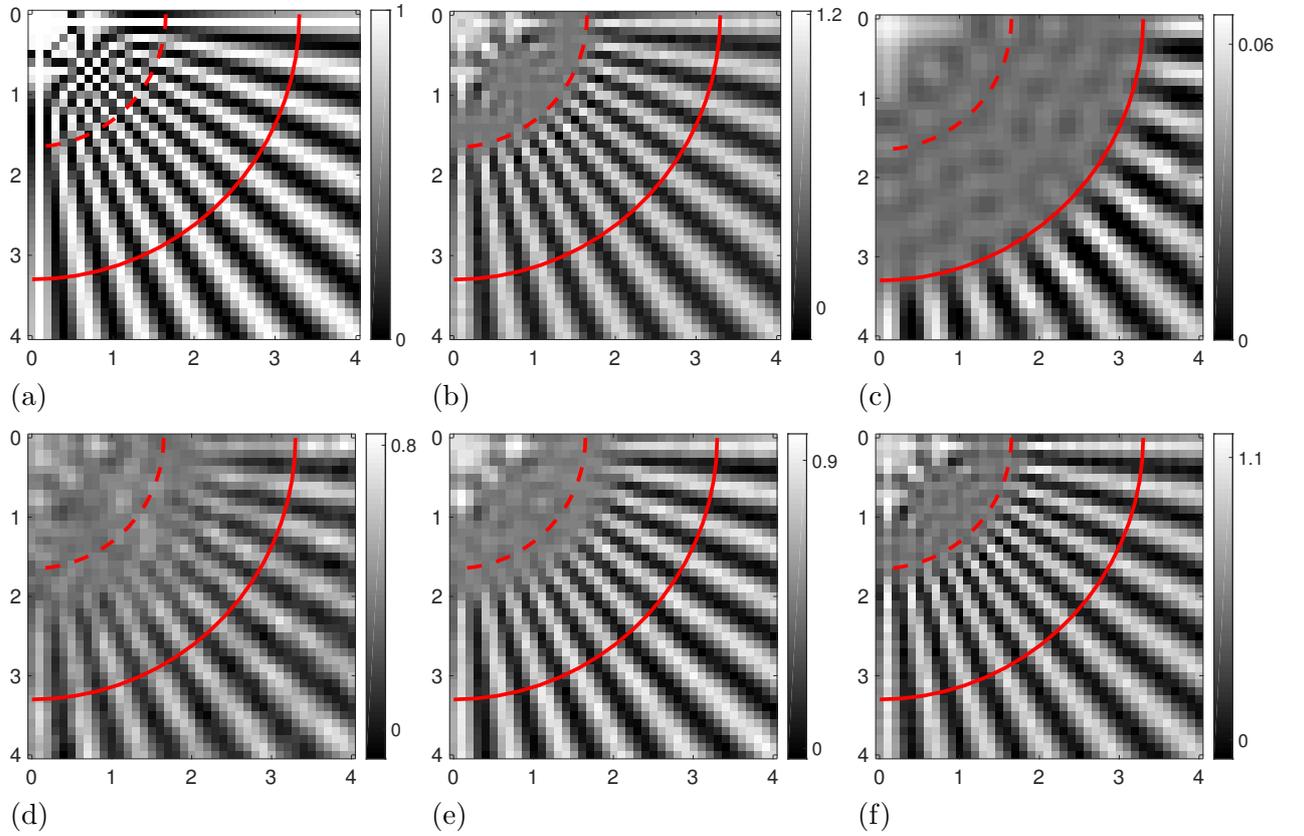


FIGURE 3.2 – (a) Le quart inférieur droit de l'objet utilisé ou vérité terrain ( $80 \times 80$  pixels), similaire à celui utilisé dans [2]. (b) Objet filtré à deux fois la fréquence de coupure de l'OTF. (c) Image *widefield* déconvoluée (illumination constante) (d,e) Estimation de  $\rho$  obtenue par minimisation de la pseudo distance KDL pénalisée 3.2.9 avec  $M = 100$  (d) avec  $M = 1000$  (e) illumination de speckle; le paramètre de régularisation est réglé à  $\beta = \beta_0/M$  avec  $\beta_0 = 100$ . (f) Estimateur de  $\rho$  obtenu par minimisation de la pseudo distance KDL en utilisant les statistiques asymptotiques  $\hat{\mu} = \mu^*$  and  $\hat{\Gamma} = \Gamma^*$ . L'unité de distance sur l'axe horizontal et vertical sont en longueur d'onde  $\lambda$ . Le pas d'échantillonnage des images pour toutes les simulations est de  $\lambda/20$ . La ligne en trait plein (respectivement en pointillé) correspond à la fréquence spatiale limite transmise par l'OTF ( respectivement deux fois la fréquence spatiale limite transmise).

### 3.2.2 Exemples d'applications

#### Microscopie de fluorescence

Pour illustrer la présence d'information de super-résolution dans les moments statistiques et la possibilité d'extraire cette information, nous allons effectuer des simulations Blind-SIM en microscopie de fluorescence avec un nombre modéré d'illuminations de speckles  $\mathbf{E}_m$ . L'objet utilisé (ou « vérité terrain ») noté  $\rho^*$  est une mire en forme d'étoile telle que représentée sur la figure Fig. 3.2(a). Le contenu fréquentiel spatial local augmente plus on se rapproche du centre, cela permet d'évaluer le contenu fréquentiel des reconstructions directement à partir de l'espace direct sans passer par une représentation dans l'espace de Fourier. Comme indiqué précédemment, la matrice de convolution  $\mathbf{H}$  modélisant le microscope est construite à partir d'une discrétisation de l'OTF, ici l'auto-corrélation d'une ouverture circulaire [22, Sec. 4.4.2] ; l'ouverture numérique NA utilisée est de 1.49, la longueur d'onde  $\lambda$  d'émission et d'excitation est arbitrairement réglée à 1. Pour cette configuration, la limite de résolution d'un microscope champ large à illumination uniforme est clairement visible Fig. 3.2-(c).

Un jeu de  $M \in \{100, 1000\}$  illuminations de speckles sont générés de manière à produire  $M$  images basses résolutions  $\{\mathbf{y}_m\}$  ceci conformément au modèle d'observation défini par (3.2.1). Nous considérons pour cette simulation un montage de microscopie en *epi*-fluorescence. De ce fait, les illuminations de speckles pleinement développées ont pour matrice de covariance  $\Gamma_E = E_0^2 \mathbf{H}$ . D'autre part, chaque acquisition  $\mathbf{y}_m$  est corrompue par un bruit spatial gaussien indépendant et identiquement distribué tel que le SNR, rapport signal sur bruit soit de 40 dB. A partir du jeu de données, les statistiques  $\hat{\boldsymbol{\mu}}_z$  et  $\hat{\boldsymbol{\Gamma}}_z$  sont construites en utilisant (3.2.3). Le cas d'un nombre infini d'illuminations ( $M = \infty$ ) est aussi considéré en utilisant les statistiques asymptotiques  $\boldsymbol{\mu}_y^*$  et  $\boldsymbol{\Gamma}_y^*$  dans la fonction de contraste (3.2.7) à la place de  $\hat{\boldsymbol{\mu}}_y$  et de  $\hat{\boldsymbol{\Gamma}}_y$  respectivement. Dans tous les cas de figure, on procède à la minimisation itérative de la divergence de Kullback-Leibler (DKL) pénalisée (3.2.9) pour estimer l'objet. On utilise l'image appelée champ-large de la figure 3.2(c) comme estimation initiale.

Pour obtenir le résultat statistique asymptotique, le paramètre de régulation est réglé à  $\beta = 0$  et comme on pouvait l'espérer, la reconstruction montre une amélioration de la résolution d'un facteur 2 comme prédit par la propriété 3, voir Fig. 4.1(f) à comparer avec Fig. 4.1(b,c). Avec 100 et 1000 illuminations, le facteur de super-résolution est plus bas, mais les reconstructions montrées en Fig. 4.1(d,e) sont toujours beaucoup mieux résolues par rapport à l'image en champ large Fig. 4.1(c). De plus, le facteur de super-résolution augmente progressivement avec le nombre d'illuminations  $M$ , le résultat avec  $M = 1000$  illuminations est très proche du résultat asymptotique. A nombre d'illuminations fini, on doit ajuster un paramètre  $\beta > 0$  pour éviter la sur-amplification du bruit d'instrument dans la reconstruction, effet lié au caractère mal conditionné du problème inverse [47, Sec. 1.5].

#### Holographie digitale

De même, pour illustrer la possibilité d'utiliser des illuminations aléatoires en holographie digitale, nous avons effectué des simulations Blind-SIM en microscopie de dif-

fraction optique en transmission avec un nombre modéré d'illuminations gaussiennes complexes circulaires  $\mathbf{E}_m$  (l'intensité de ce champ correspond alors à un champ de speckle pleinement développé). L'objet utilisé pour cette simulation est de nouveau la mire présentée en Fig. 3.2(a). Cette objet est réel positif, en effet on suppose ici que l'on traite un objet non absorbant donc sans partie imaginaire. La matrice de convolution  $\mathbf{H}$  modélisant le microscope est construite à partir d'une discrétisation de l'OTF, ici une ouverture circulaire [22, Sec. 4.4.2], en effet on se place dans un cas 2D (dans un cas 3D on aurait une calotte de sphere); l'ouverture numérique NA utilisée est de 2.98 (ce NA est physiquement impossible dans les milieux couramment utilisé mais correspond au double du NA utilisé pour la simulation de microscopie de fluorescence, ainsi les domaines fréquentiels de l'OTF et du contenu spectral des illuminations restent les mêmes), la longueur d'onde  $\lambda$  d'émission et d'excitation est arbitrairement réglé à 1. On fait l'hypothèse que l'on a accès au champ diffracté par l'objet seul, on suppose donc que les étapes d'estimation de la phase et de soustraction du champ incident sont effectuées.

Un jeu de  $M = 1000$  éclairagements gaussiens complexes circulaires est simulé afin de produire  $M$  images complexes basse résolution  $\{\mathbf{y}_m\}_{m=1}^M$ . La matrice de covariance  $\Gamma_E$  est réglée à  $\mathbf{H}$ , la moyenne des illuminations est  $E_0 = 0$ . Chaque acquisition  $\mathbf{y}_m$  est corrompue avec un bruit gaussien complexe circulaire indépendant et uniformément distribué tel que le SNR rapport signal sur bruit est de 40 dB.

A partir du jeu de données, les statistiques  $\hat{\boldsymbol{\mu}}_y$  et  $\hat{\boldsymbol{\Gamma}}_y$  (3.2.3) sont construites. On peut voir que la moyenne des mesures Fig. 3.3(a) ne contient aucune information sur l'objet comme attendu. On procède ensuite à la minimisation itérative de la divergence de Kullback-Leibler (DKL) pénalisée (3.2.9) pour estimer l'objet. On utilise une image constante comme estimation initiale. La reconstruction obtenue en minimisant le critère de contraste est présenté en Fig. 3.3(b). On pourra noter que ce résultat est similaire en terme de résolution au résultat que l'on obtiendrait avec une technique classique de

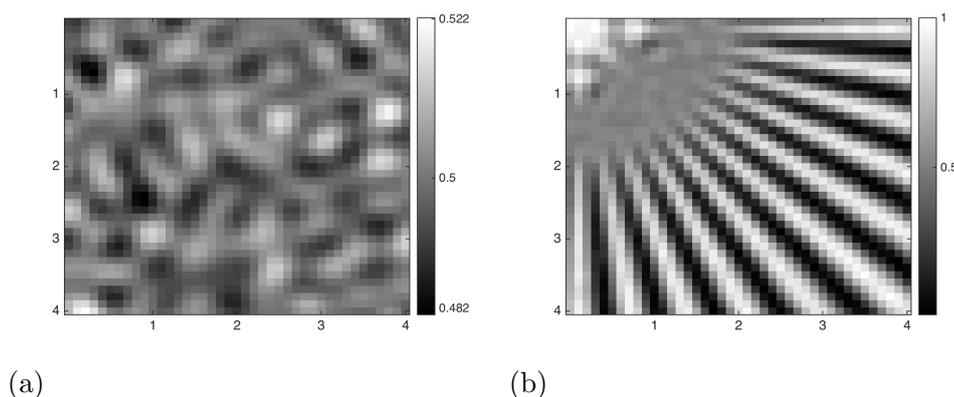


FIGURE 3.3 – Résultats obtenus à partir d'images 2D simulées de tomographie de diffraction, l'otf utilisée est une pupille de rayon égal à celui du support de l'otf dans le cas de la microscopie de fluorescence. L'objet utilisé est représenté dans l'image (a) de la figure 3.2. (a) Moyenne des 1000 images simulées, on peut voir que dans le cas de la tomographie aucune information n'est contenue dans la moyenne des champs électromagnétiques enregistrés. (b) Reconstruction obtenue en utilisant l'algorithme marginal 3.2.

tomographie à illuminations en ondes planes.

Enfin, on notera que cette simulation 2D ne permet pas de souligner la capacité de sectionnement que permet l'éclairage aléatoire pour un problème de reconstruction 3D. Le problème 3D synthétique est cependant trop onéreux en terme d'implémentation informatique pour nous permettre de le conduire.

### 3.3 Conclusion

Nous avons vu dans les parties précédentes que les images obtenues à partir d'éclairages aléatoires contiennent de l'information identifiable sur le contenu fréquentiel de l'objet en dehors du support de l'OTF. Nous avons aussi vu qu'il est possible de créer un algorithme marginal pour extraire cette information à partir d'un jeu d'images basses résolutions obtenues à partir de différentes illuminations structurées. Malheureusement, la complexité de l'algorithme marginal développé est trop importante  $\mathcal{O}(N^3)$  pour pouvoir utiliser cet algorithme sur des données de taille réaliste. Cette algorithme basé sur la minimisation d'un critère de contraste reste trop lent et utilise trop de mémoire pour traiter efficacement des problèmes de tailles réalistes.

La création d'un algorithme de plus faible complexité est actuellement l'objet de travaux et reste une direction importante à approfondir. Une approche envisagée pour réduire cette complexité est d'utiliser une méthode à patch. Les images sont découpées en un jeu de patch, la corrélation entre deux pixels provenant de patches différents est négligée. Cela correspond à un nouveau problème d'optimisation :

$$J(\boldsymbol{\rho}) = \sum_p D_p(\boldsymbol{\rho}) \quad (3.3.1)$$

ou  $D_p(\boldsymbol{\rho})$  est la relation (3.2.7) appliqué au patch  $p$ , c'est à dire où  $\boldsymbol{\mu}_{yp}$  et  $\boldsymbol{\Gamma}_{yp}$  sont respectivement la moyenne et la covariance du patch  $p$ . La complexité peut alors être réduite à  $\mathcal{O}(N^2(\log N + L))$  avec  $N$  le nombre de pixels total et  $L$  le nombre de pixels dans chaque patch, de plus l'optimisation peut maintenant être parallélisée [82, 76]. Une autre approche envisagée est de n'utiliser qu'une partie des moments statistiques d'ordre deux, pour estimer l'objet. Ainsi la mémoire nécessaire peut être grandement réduite et on peut espérer trouver un algorithme en  $\mathcal{O}(N \log N)$ . Par exemple, un estimateur utilisant uniquement la variance et la moyenne des mesures peut être envisagé. Une autre possibilité serait d'utiliser la variance ainsi que la corrélation uniquement entre pixels voisins, la taille et la forme du voisinage étant à définir, pour estimer l'objet.

# Chapitre 4

## Estimation en microscopie à éclairements structurés<sup>1</sup>

Ce chapitre se focalise sur la reconstruction *Blind-SIM* pour la microscopie de fluorescence. Contrairement au chapitre précédent qui proposait un estimateur de contraste pour estimer l'échantillon seul, ce chapitre propose une stratégie d'estimation *jointe* qui vise à reconstruire à la fois les illuminations et l'échantillon. Plus précisément, l'estimateur proposé est un minimiseur d'un critère des moindres carrés pénalisé. Nous adoptons dans ce chapitre le cadre discret et les notations introduites précédemment en Sec. 3.2. On utilise la modélisation suivante d'un imageur optique :

$$\begin{aligned}\mathbf{x}_m &= \mathbf{H}(\boldsymbol{\rho} \odot \mathbf{E}_m) \\ \mathbf{y}_m &\sim \mathcal{T}(\mathbf{x}_m)\end{aligned}\tag{4.0.1}$$

où  $\mathcal{T}$  est une loi statistique modélisant le bruit dans les images de sortie de l'imageur. L'analyse produite dans ce chapitre a pour ambition de fournir une refonte complète de la stratégie *jointe Blind-SIM* telle qu'elle a été proposée initialement à l'Institut Fresnel par E. Mudry et al. [2]. Plus précisément, nos travaux comportent deux contributions principales complémentaires :

- Nous proposons une reformulation du problème *Blind-SIM* joint qui permet d'accélérer les reconstructions de plusieurs ordres de grandeur. Cette accélération s'appuie sur deux contributions techniques distinctes. Premièrement, on montre que le problème tel que proposé dans [2] est équivalent à un problème de minimisation complètement séparable, et donc le problème original peut être séparé en  $M$  sous-problèmes de plus petite taille. Ensuite, on introduit un nouvel algorithme proximal pré-conditionné (appelé PPDS) pour résoudre de manière efficace chaque sous problème. La stratégie PPDS est une contribution importante de cette thèse : elle est de convergence garantie [83], facile à implémenter et, pour notre problème spécifique, on observe une convergence asymptotique super linéaire. Avec ces éléments, la reconstruction *Blind-SIM* jointe est très rapide et hautement parallélisable, ce qui ouvre la voie pour des reconstructions en temps réel.
- Hormis cette contribution algorithmique, le mécanisme mis en jeu pour obtenir la super-résolution dans ce contexte aveugle est analysé et une connexion est faite

---

1. Les résultats présentés dans cette partie sont publiés dans la revue IEEE TIP [1].

avec l'effet « Near-black object » introduit par Donoho [84]. Nous montrons que la super-résolution s'appuie sur la parcimonie imposée sur l'échantillon par les illuminations inconnues. Cette information nous aide à comprendre dans quel cas de figure une reconstruction super-résolue peut être fournie. Une part significative de ce chapitre sera donc dédiée à des simulations numériques dont le but est de montrer comment l'effet de super-résolution peut être maximisé. Dans cette perspective, nos simulations montrent qu'une illumination de speckle « deux photons » peut potentiellement améliorer le pouvoir de super-résolution de cette méthode jointe.

Le rôle central joué par les illuminations parcimonieuses dans le mécanisme de super-résolution rapproche cette stratégie jointe d'autres stratégies basées sur des *activations aléatoires* tel que PALM [65] ou STORM [66], voir aussi [85, 86] pour des méthodes explicitement basées sur la parcimonie appliquées à STORM. Avec PALM/STORM des résolutions sans précédent sont atteintes grâce à une stratégie d'activation massivement parcimonieuse et principalement localisée sur les structures marquées. Avec la stratégie Blind-SIM jointe, l'illumination joue le rôle du processus d'activation de manière évidemment moins efficace et donc une moins bonne résolution est attendue. Blind-SIM joint cependant, produit de la super-résolution tant que l'illumination force à zéro (ou pratiquement zéro) le produit objet fois illumination  $\rho \times E_m$  : plus l'illumination utilisée est parcimonieuse, plus le gain de résolution attendu est important avec cette approche. Cette super-résolution peut être induite par des illuminations déterministes ou aléatoires, ces dernières étant souvent plus facile à générer. Plusieurs contributions récentes proposent également d'utiliser des illuminations de speckle pour produire de la super-résolution [17, 69], soit en microscopie de fluorescence, soit en photo-acoustique [21]. Dans ces contributions, cependant, les stratégies de reconstructions sont basées sur des modélisations statistiques et reposent donc sur le caractère aléatoire des illuminations utilisées. En comparaison, cette approche jointe requiert seulement que les illuminations annulent l'objet et que leur somme soit connue avec une précision suffisante.

## 4.1 Critère joint à optimiser

A partir d'une modélisation de bruit, on peut utiliser la log-vraisemblance comme terme d'attache aux données. En considérant un bruit additif Gaussien centré de variance uniforme, on retrouve le terme d'attache aux données du critère utilisé dans [2], pour rappel le critère (2.1.7) est le suivant :

$$\min_{\rho, \{E_m\}} \sum_{m=1}^M \|\mathbf{y}_m - \mathbf{H}(\rho \odot \mathbf{E}_m)\|^2 \quad (4.1.1a)$$

$$\text{sujet à} \quad \sum_m \mathbf{E}_m = M \times \mathbf{E}_0 \quad (4.1.1b)$$

$$\text{et} \quad \rho_n \geq 0, \quad E_{m;n} \geq 0, \quad \forall m, n \quad (4.1.1c)$$

On peut remarquer que (4.1.1) est un problème bi-quadratique. Une stratégie de minimisation par bloc, alternant entre l'objet et les différentes illuminations peut être mise en place, ceci revenant à résoudre de manière cyclique  $M+1$  problèmes quadratiques [15]. Dans [2], un algorithme plus complexe mais plus rapide est proposé. Un algorithme de

gradient conjugué est utilisé où la contrainte de positivité est assurée en introduisant des variables auxiliaires dont le carré correspond aux quantités d'intérêt  $\boldsymbol{\rho}$  et  $\mathbf{E}_m$  [87]. Cependant, nous allons voir que la structure particulière du problème (4.1.1), permet une stratégie d'optimisation beaucoup plus rapide et simple. Envisageons pour cela le problème sans la contrainte d'égalité (4.1.1b) : on peut alors décomposer le problème en  $M$  sous problèmes quadratiques :

$$\min_{\mathbf{q}_m} \quad \|\mathbf{y}_m - \mathbf{H} \mathbf{q}_m\|^2 \quad (4.1.2a)$$

$$\text{sujet à} \quad \mathbf{q}_m \geq 0, \quad (4.1.2b)$$

où  $\mathbf{q}_m := \mathbf{vect}(\rho_n \times E_{m;n})$ . Chaque problème (4.1.2) peut être résolu grâce à l'algorithme que nous proposerons en section 4.2, fournissant ainsi un jeu de minimiseurs globaux  $\{\hat{\mathbf{q}}_m\}_{m=1}^M$ . Ces minimiseurs correspondent à un nombre infini de solutions  $(\hat{\boldsymbol{\rho}}, \{\hat{\mathbf{E}}_m\}_{m=1}^M)$ , mais la contrainte d'égalité (4.1.1b) permet d'obtenir une solution unique telle que  $\hat{\mathbf{q}}_m = \mathbf{vect}(\hat{\rho}_n \times \hat{I}_{m;n})$  pour tout  $m$  :

$$\hat{\boldsymbol{\rho}} = \mathbf{Diag}(\mathbf{E}_0)^{-1} \bar{\mathbf{q}} \quad (4.1.3a)$$

$$\forall m \quad \hat{I}_m = \mathbf{Diag}(\hat{\boldsymbol{\rho}})^{-1} \hat{\mathbf{q}}_m \quad (4.1.3b)$$

avec  $\bar{\mathbf{q}} := \frac{1}{M} \sum_m \hat{\mathbf{q}}_m$ . La solution (4.1.3a) existe tant que  $E_{0;n} \neq 0$  et  $\hat{\rho}_n \neq 0$ ,  $\forall n$ . La première condition est valide si l'objet est illuminé en tout point, ce qui est une condition nécessaire à l'observation de l'objet dans son ensemble. Pour tous les pixels où  $\hat{\rho}_n = 0$ , l'illumination correspondante  $\hat{I}_{m;n}$  n'est pas définie, ce qui ne pose pas de problèmes si l'unique quantité d'intérêt est l'objet  $\boldsymbol{\rho}$ . On peut également remarquer que les contraintes suivantes sont respectées :

$$E_{0;n} \geq 0, \hat{q}_{m;n} \geq 0 \implies \hat{I}_{m;n} \geq 0 \quad \text{and} \quad \hat{\rho}_n \geq 0.$$

Dans le cas où l'on a une illumination d'intensité, la contrainte  $E_{0;n} \geq 0$  est respecté  $\forall n$ . Résoudre (4.1.2) et (4.1.3a) est donc équivalent à trouver une solution au problème (4.1.1). Le critère (4.1.1) étant convexe mais non strictement convexe, il n'y a pas une solution unique au problème (4.1.2), ce que l'on retrouve dans le fait que (4.1.2) est aussi un problème convexe qui admet plusieurs solutions globales. Si les contraintes de positivités sont relaxées, alors toute solution du problème s'écrit (voir calcul en annexe A.3) :

$$\hat{\boldsymbol{\rho}} = \mathbf{Diag}(\mathbf{E}_0)^{-1} (\mathbf{H}^+ \bar{\mathbf{y}} + \bar{\mathbf{q}}^\perp) \quad (4.1.4a)$$

$$\hat{I}_m = \mathbf{Diag}(\hat{\boldsymbol{\rho}})^{-1} (\mathbf{H}^+ \mathbf{y}_m + \mathbf{q}_m^\perp), \quad (4.1.4b)$$

ou  $\mathbf{H}^+$  est la *pseudo-inverse* de  $\mathbf{H}$  [88, Sec. 5.5.4],  $\bar{\mathbf{y}} = \frac{1}{M} \sum_m \mathbf{y}_m$ , et  $\bar{\mathbf{q}}^\perp = \frac{1}{M} \sum_m \mathbf{q}_m^\perp$  avec  $\mathbf{q}_m^\perp$  un élément du noyau de  $\mathbf{H}$ , *i.e.* avec des composantes fréquentielles arbitraires en dehors du support de l'OTF  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ . Le problème 4.1.1a-4.1.1b ne permet donc pas de discriminer les composantes fréquentielles en dehors de  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ . On peut en conclure que sans la contrainte de positivité, il n'y a pas de super résolution dans les solutions du problème. On peut donc s'attendre à ce que les résultats obtenues dans [2], reposent sur le fait que les illuminations activent la contrainte de positivité sur  $\mathbf{q}_m$  de manière fréquente (voir A.1). On va maintenant considérer une expérience numérique pour sup-

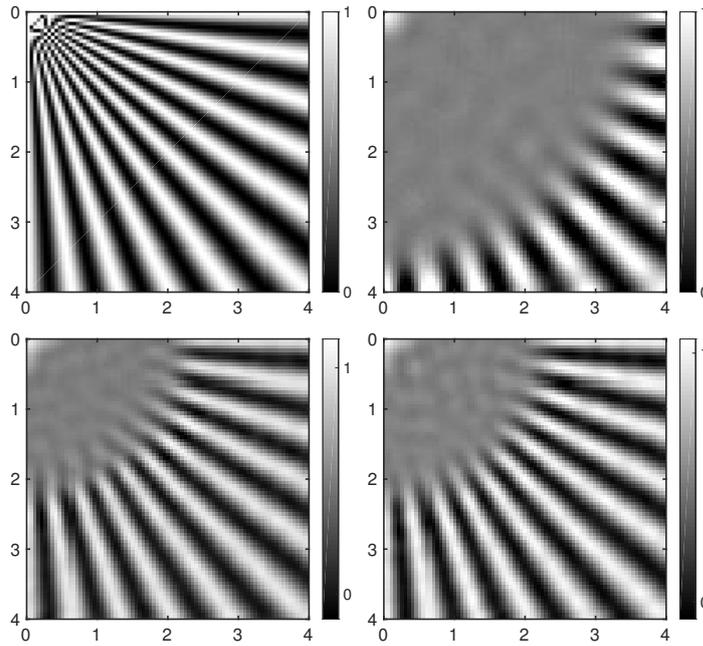


FIGURE 4.1 – [Ligne du haut] Quart bas droit de la mire de fluorescence servant de vérité terrain ( $160 \times 160$  pixels) considérée dans [2] (à gauche) et la dé-convolution de l'image champ large correspondante (à droite) La ligne pointillée (respectivement pleine) correspond aux fréquences spatiales transmises par le support de l'OTF (respectivement deux fois le support de l'OTF). [Ligne du bas] Reconstruction à partir d'illuminations connues : (gauche)  $M = 9$  illuminations harmoniques et (droite)  $M = 200$  illuminations de speckle. Les unités de distances des axes sont en longueur d'onde  $\lambda$ .

porter cette hypothèse. Un jeu de  $M$  images est simulé suivant (4.0.1) avec  $\mathbf{H}$  la PSF construite à partir de la tache de Airy (2.1.1). L'ouverture numérique de l'objectif est de 1,49, les longueurs d'ondes d'excitation et de collection sont supposées égales à 520 nm. La vérité terrain est la mire de fluorescence « similaire à une étoile » utilisée précédemment en Sec. 3.2.2 et de nouveau affichée dans la figure 4.1 (gauche). Le pas d'échantillonnage<sup>3</sup> des images pour toutes les simulations de ce chapitre est de  $\lambda/20$ . Pour cette simulation numérique, le jeu d'illuminations  $\{\mathbf{E}_m\}_{m=1}^M$  consiste en  $M = 200$  illuminations de speckle modifiées, voir Fig. 4.2(A). Plus précisément, un premier jeu d'illuminations est obtenu en ajoutant une constante positive (égale à trois ici) à chaque illuminations de speckles, ainsi les illuminations n'atteignent jamais zéro et la contrainte de positivité n'est pas activée. Au contraire, un deuxième jeu d'illumination est construit en soustrayant une constante positive (égale à 0,2) à chaque illumination de speckle, les valeurs négatives sont affectées à zéro. Les illuminations ainsi créées activent très souvent la contrainte de positivité de 4.1.2. Pour chacun de ces jeux d'illuminations,

3. Pour un système optique modélisé par 2.1.1, le pas d'échantillonnage des acquisitions (limité à la diffraction) est usuellement à la limite de Nyquist, donc réglé en fonction de la fréquence de coupure de l'OTF  $k_{PSF} = 2k_0 \text{ NA}$ . Un pas d'échantillonnage plus fin est ici nécessaire pour obtenir des reconstructions super-résolues, le facteur de sur-échantillonnage entre les « acquisitions » et les images « traitées » étant au moins égale au facteur de super-résolution espéré. Ici, on adopte un pas d'échantillonnage commun à toutes les simulations impliquant la mire, cela permet une comparaison directe des résultats de reconstructions.

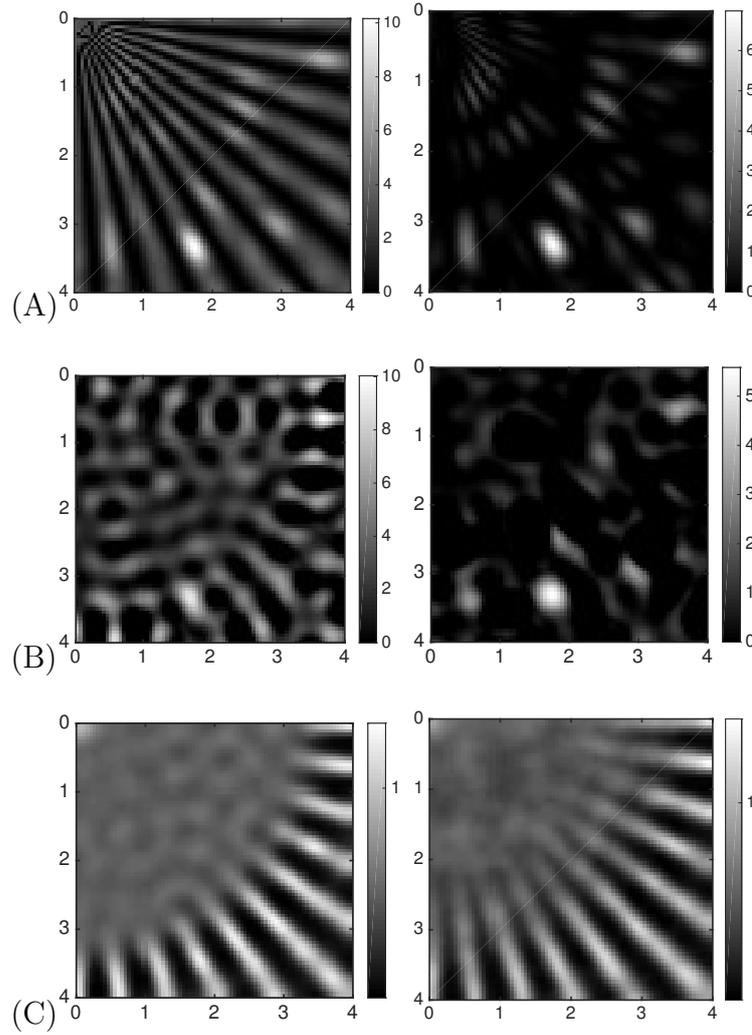


FIGURE 4.2 – [Ligne A] Une image produit  $\mathbf{q}_m = \mathbf{vect}(\rho_n \times E_{m;n})$  construite à partir d'une des 200 illuminations utilisée pour générer les données : (gauche) une constante positive est *ajoutée* aux illuminations de speckle standard de telle sorte que la plus petite valeur soit beaucoup plus grande que zero ; (droite) une constante positive est *soustraite* des illuminations de speckle standard, les valeurs négatives sont mises à zero. [Ligne B] Reconstruction de l'image produit  $\mathbf{q}_m$  correspondante à celle montrée ci-dessus. [Ligne C] Reconstruction finale  $\hat{\rho}$  achevée grâce à l'ensemble des illuminations.

les images basse résolution de microscopie sont simulées et corrompues avec un bruit gaussien ; ici le SNR du jeu de donnée est de 40 dB. La reconstruction du premier produit « objet fois illumination »  $\mathbf{q}_1$  obtenue en résolvant 4.1.2 est montrée en Fig. 4.2(C) ; pour chaque reconstruction la moyenne spatiale  $E_0$  de (4.1.3a) est réglée en utilisant la moyenne statistique des illuminations générées. Comme attendu, la reconstruction à partir du premier jeu d'illuminations est pratiquement identique à la déconvolution de l'image champ large affiché en Fig. 4.1(haut-droit), *i.e.* il n'y a pas de super-résolution dans ce cas. Au contraire, le deuxième jeu d'illuminations produit une reconstruction super-résolue, ce qui établit le rôle central de la contrainte de positivité dans le problème joint original (4.1.1).

On a mentionné précédemment que le problème 4.1.1 n'a pas une solution unique. Nous

proposons donc d'ajouter une pénalisation strictement convexe au critère des moindres carrés, soit

$$\min_{\mathbf{q}_m \geq 0} \|\mathbf{y}_m - \mathbf{H}\mathbf{q}_m\|^2 + \varphi(\mathbf{q}_m). \quad (4.1.5)$$

Un autre avantage de cette approche est qu'elle permet de choisir  $\varphi$  pour assurer la robustesse au bruit ainsi que de favoriser certain *a priori* sur la solution attendue. En particulier, l'étude menée précédemment suggère qu'un *a priori* de parcimonie sur les composantes de  $\mathbf{q}_m$  est approprié. Dans le cas d'une illumination de speckle ou d'une illumination harmonique, l'objet est fréquemment éteint ou quasiment éteint par l'illumination. Pour de telles illuminations le concept d'objet presque noir (*Near-Black Object*) introduit par Donoho [84] est un modèle approprié. Une pénalisation " $\ell_1 + \ell_2$ " est un choix possible dans ce contexte

$$\varphi(\mathbf{q}_m) := \alpha \sum_n |q_{m;n}| + \beta \|\mathbf{q}_m\|^2 \quad (4.1.6)$$

avec  $\alpha \geq 0$  et  $\beta > 0$  des hyper-paramètres. Pour des  $(\alpha, \beta)$  bien réglés, notre stratégie Blind-SIM doit apporter de la super-résolution si des illuminations « parcimonieuses » sont utilisées, *i.e.* si pour beaucoup de  $n$  elles forcent  $q_{m;n} = 0$ .<sup>5</sup> Plus précisément, [84, Sec. 4] démontre que l'on obtient de la super-résolution si le nombre de composante non nulles de  $E_{m;n}$  divisé par le nombre de pixels  $N$  est inférieur à  $\frac{1}{2}\epsilon$ , avec  $\epsilon := R/N$  le rapport entre  $R$  le rang de  $\mathbf{H}$  et  $N$ . Le pouvoir de super-résolution est aussi influencé par la distance entre les composantes non nulles à retrouver, idéalement ces composantes devraient être séparées par une distance supérieure à  $\frac{\lambda}{2\text{NA}}$ , voir [84, pp. 56-57]. Ces conditions sont sévères, et en réalité non respectées par les illuminations utilisées en pratique. La plupart du temps on utilise des illuminations harmoniques déterministes ou quasi-harmoniques<sup>6</sup>, ou bien des speckles aléatoires, ces derniers étant très facile à générer [2]. Dans tous ces cas de figures, on observe de la super-résolution grâce à notre méthode d'estimation jointe dédié au Blind-SIM. De plus, cet effet peut être maximisé *via* le réglage de certains paramètres expérimentaux, comme la période de l'illumination harmonique, le nombre de translation pour les illuminations (quasi-)harmoniques et la corrélation spatiale ainsi que la loi instantanée pour les illuminations de speckles. L'analyse théorique des propriétés de super-résolution au regard de ces différents paramètres semble difficile. Une analyse numérique est cependant possible, et certains résultats représentatifs sont présentés dans la prochaine section. Toutes les reconstructions présentées sont construites à partir de 4.1.3a et de la résolution numérique de 4.1.5. Toutes ces simulations représentent un microscope de basse résolution, les images sont corrompues avec un bruit additif Gaussien tel que le rapport signal à bruit (SNR) de l'ensemble des images  $\{\mathbf{y}_m\}_{m=1}^M$  est de 40 dB. On notera que la stratégie Blind-SIM jointe pénalisée requiert un réglage explicite de certains hyper-paramètres  $\alpha$  et  $\beta$  de la fonction de pénalisation 4.1.6. Tous les détails algorithmiques concernant le problème de minimisation sont présentés en Sec. 4.2.

5. La première utilisation d'une pénalisation  $\ell_1$  pour favoriser la parcimonie de la solution provient de la sismologie en réflexion avec un papier de Claerbout et Muir [89]

6. Pouvoir gérer des illuminations distordues et en pratique très utile, cela permet d'être robuste à des déformations de l'illumination du à des aberrations optiques provenant soit du système optique soit de l'objet imagé [14, 15].

### 4.1.1 Illuminations harmoniques régulières et distordues

On commence par considérer le cas d'illuminations harmoniques inconnues, on définit une expérience standard à base de  $M = 18$  illuminations. Plus précisément, les illuminations sont harmoniques de la forme  $I(\mathbf{r}) = 1 + \cos(2\pi\mathbf{k}^t\mathbf{r} + \phi)$  où  $\phi$  est une phase,  $\mathbf{r} = (x, y)^t$  et  $\mathbf{k} = (k_x, k_y)^t$  respectivement les coordonnées spatiales et les fréquences spatiales de la fonction harmonique. Des versions distordues de ces illuminations (déformées par des aberrations optiques telle que de l'astigmatisme et de la coma [14]) sont aussi considérées. Trois orientations distinctes

$$\theta := \tan^{-1}(k_y/k_x) \in \{0, 2\pi/3, 4\pi/3\}$$

sont considérées, et pour chacune d'elle six incréments différents de phase d'un sixième de période sont effectués. La fréquence des illuminations harmoniques  $\|\boldsymbol{\nu}\| := (\nu_x^2 + \nu_y^2)^{1/2}$  est réglée à 80% de la fréquence de coupure de l'OTF, *i.e.* cette fréquence est à l'intérieur du domaine de l'OTF. Une illumination régulière et une illumination distordue sont affichées dans la Fig. 4.3(A), les reconstructions *Blind-SIM joint* pénalisées sont affichées en Fig. 4.3(B). Pour chaque jeu d'illuminations, un net effet de super-résolution est observé, ce qui est en accord avec les observations présentées en [2].

Cependant, comme on peut s'y attendre, la qualité de reconstruction obtenue dans le contexte *Blind-SIM* est moins bonne que celle obtenue dans le cas *SIM* harmonique standard, pour comparaison voir Fig. 4.1. De plus, des artefacts peuvent apparaître pour un nombre réduit de pas de phases pour chaque direction, voir Fig. 4.3(C-gauche). Si on se rappelle que la super-résolution sur  $\tilde{\rho}$  de (4.1.3a) provient d'une somme d'estimations (super-résolue) du produit « objet fois illuminations »  $\hat{\mathbf{q}}_m$ , ces artefacts sont induits (au moins partiellement) par le fait que l'utilisation de moins de phases différentes créer un jeu d'illumination qui n'annule pas l'objet en tout point de l'espace. En d'autre terme, les illuminations « éteignent l'objet », mais pas de manière assez fréquente et uniforme pour apporter un effet de super-résolution uniforme.

Regardons maintenant comment la fréquence de modulation  $\mathbf{k}$  utilisée pour générer les illuminations impacte la super-résolution des reconstructions *Blind-SIM joint* pénalisées. On peut observer que la super-résolution disparaît dès lors que  $\|\mathbf{k}\|$  est plus grand que la fréquence de coupure de l'OTF. Pour illustrer ce résultat, la reconstruction affichée en Fig. 4.3(C-droite) est obtenue avec  $\|\mathbf{k}\|$  réglée à 120% de la fréquence de coupure de l'OTF, voir aussi Fig. 4.1(haut droit) pour une comparaison avec l'image champ large déconvoluée. Dans ce cas de figure, chaque porteuse harmonique  $\mathbf{E}_m$  est complètement filtrée en dehors de l'image basse résolution  $\mathbf{y}_m$ , voir Fig. 4.3(D). Cela a pour résultat, d'empêcher l'apparition de toute super-résolution puisque la déconvolution sous *a priori* de parcimonie de  $\mathbf{y}_m$  (4.1.5) ne permet pas d'obtenir de la super-résolution en localisant les zéros dûs aux illuminations.

### 4.1.2 Illuminations de speckles

On considère maintenant des illuminations de speckles  $\mathbf{E}_m$  stationnaires au second ordre et dont le premier moment est supposé connu  $E_{0;n} = E_0, \forall n$ . Chacune de ces illuminations est un speckle pleinement développé obtenu en calculant l'intensité d'un champ aléatoire gaussien circulaire centré corrélé. La corrélation étant ajustée de façon

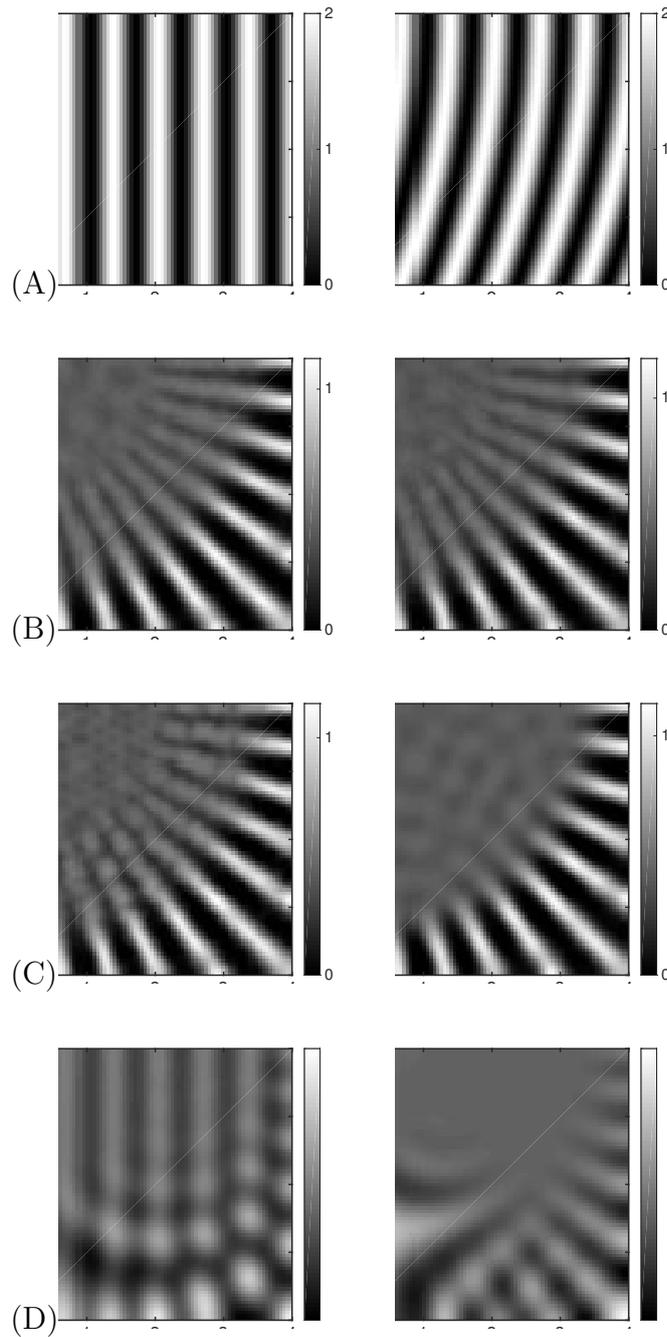


FIGURE 4.3 – **Illuminations Harmoniques** : [Ligne A] Une illumination  $\mathbf{E}_m$  extraite de l'ensemble des illuminations harmoniques régulières (gauche) et distordues (droite) [Ligne B] Reconstructions Blind-SIM joint pénalisé correspondant [Ligne C] (gauche) Réduire le nombre de phases par orientation de 6 à 3 fait apparaître des artefacts dans la reconstruction, voir (B-gauche) pour comparaison. (droite) Augmenter la fréquence de modulation  $\|\boldsymbol{\nu}\|$  des illuminations harmoniques au delà de la fréquence de coupure de l'OTF empêche l'apparition de toute super-résolution. [Ligne D] Image basse résolution  $\mathbf{y}_m$  extraite de l'ensemble des illuminations dont la fréquence de modulation est à l'intérieur (gauche) à l'extérieur (droite) du domaine de l'OTF – voir Sec. 4.1.1 pour plus de détails.

à ce que l'illumination  $E_m$  présente une corrélation spatiale de la forme (2.1.1) mais avec un paramètre « d'ouverture numérique »  $NA_{\text{ill}}$  qui donne une longueur de corrélation de  $\frac{\lambda}{2NA_{\text{ill}}}$  pour le champ aléatoire. En guise d'illustration, une illumination de speckle est représentée en Fig. 4.4(A-gauche), pour le cas standard de l'*epi*-microscopie<sup>8</sup> avec  $NA_{\text{ill}}=NA$ .

À partir d'un jeu d'illuminations de speckles (pleinement développés), on considère

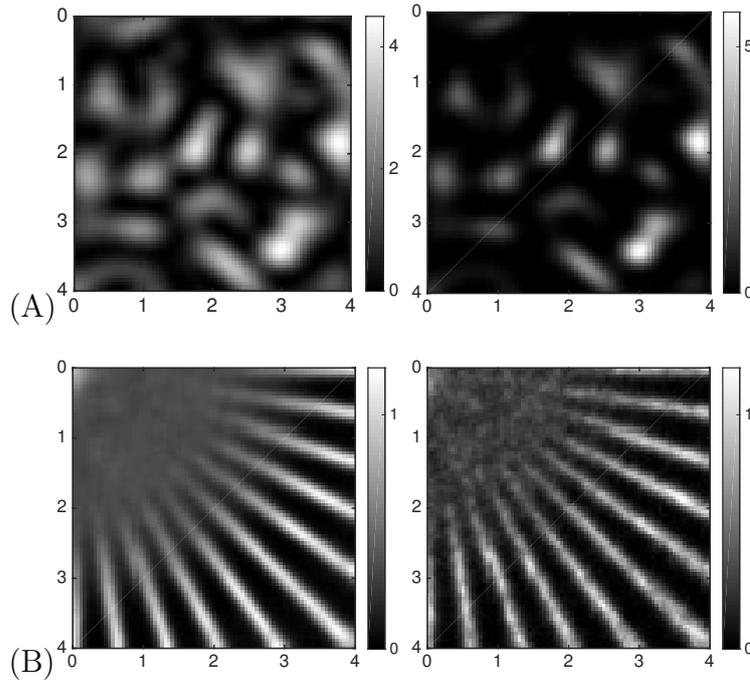


FIGURE 4.4 – **Illuminations de speckle** : [Ligne A] une illumination de speckle telle que  $NA_{\text{ill}} = NA$  (gauche) et sa contrepartie « deux photons » (droite). [Ligne B] Reconstitutions Blind-SIM joint pénalisé à partir de  $M = 1000$  illuminations de speckle (gauche) et d'illuminations « deux photons » (droite).

aussi le cas d'un deuxième jeu d'illuminations construit en calculant le carré de chaque illumination de speckle, voir Fig. 4.4(A). Ces illuminations « au carré » sont considérées pour analyser plus finement le mécanisme de super-résolution lié à la stratégie *Blind-SIM joint*. De plus, on verra que ces illuminations peuvent avoir un sens physique dans d'autres techniques de microscopies. D'un point de vue statistique, la loi instantanée (pdf) d'une illumination de speckle « standard » et « au carré » diffèrent l'une de l'autre, voir l'annexe A.1 pour plus de détails. En particulier, la statistique ponctuelle du speckle « au carré » est plus concentrée en zéro<sup>9</sup> comparée à la loi exponentielle de l'illumination de speckle « standard ».

La corrélation spatiale est elle aussi changée puisque la densité spectrale de puissance

8. On considère que  $NA_{\text{ill}}=NA$  si l'illumination et la collection de la lumière de fluorescence sont effectuées au travers des mêmes éléments optiques, on néglige la différence de longueur d'onde.

9. Sous hypothèse d'un speckle pleinement développé, les fluctuations de  $E_{m,n}$  suivent une pdf exponentiel de paramètre  $E_0$  alors que la pdf du cas « au carré »  $J_{m,n} = E_{m,n}^2$  est une loi de Weibull de paramètre de forme  $k = 0.5$  et de paramètre d'échelle  $\lambda = E_0^2$ .

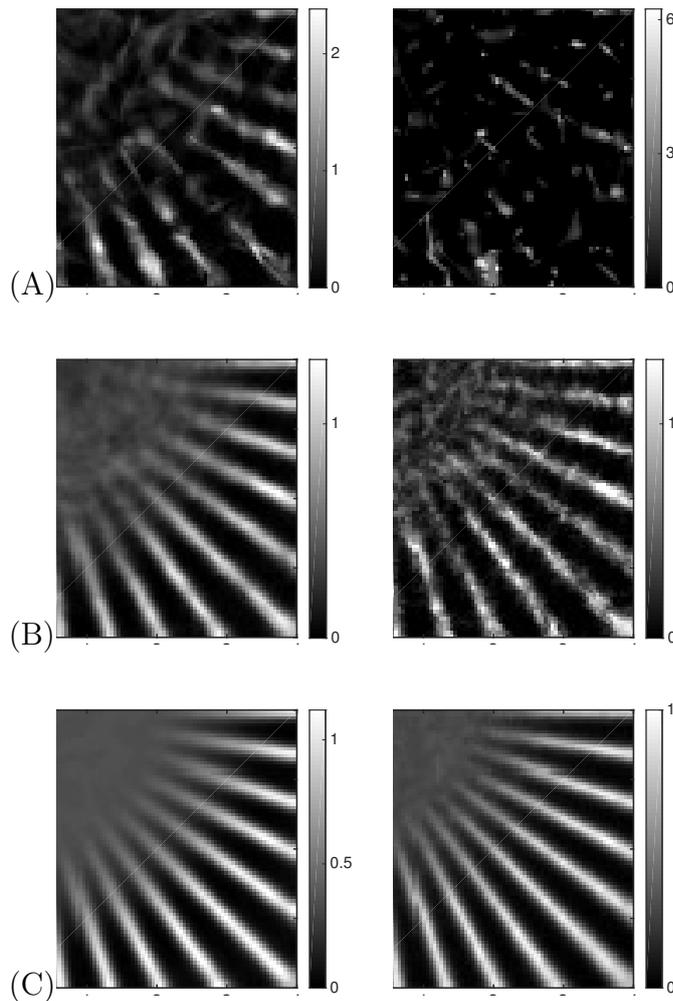


FIGURE 4.5 – **Illuminations de speckle (suite)** : Reconstructions Blind-SIM joint pénalisé à partir d’illumination de speckle standard (gauche) et d’illuminations de speckle « deux photons » (droite). Le nombre d’illuminations considéré pour ces reconstructions est  $M = 10$  (A),  $M = 200$  (B) et  $M = 10000$  (C).

du speckle « au carré » couvre un support deux fois plus grand que celui du speckle « standard » [37]. Ainsi, les grains du speckle « au carré » sont plus fins (voir Fig. A.1), est elles sont plus espacées spatialement. De ce fait, le speckle « au carré » présente un « niveau » de parcimonie plus élevé que le speckle pleinement développé standard. On peut donc s’attendre à ce que des illuminations de speckle « au carré » produisent des résultats de super-résolution supérieurs en comparaison à des illuminations de speckle standard [84, p. 57]. Cette hypothèse est en accord avec nos résultats de simulations. Par exemple, les reconstructions en Fig. 4.4(B) sont obtenues à partir d’un unique ensemble de  $M = 1000$  illuminations de speckles tel que  $NA_{\text{ill}} = NA$  : dans ce cas, les illuminations « au carré » (obtenues en calculant le carré des illuminations de speckles) apportent une amélioration de la résolution de la reconstruction en comparaison de celle obtenue à partir des illuminations de speckles standards.

La figure 4.5 montre comment la qualité de reconstruction évolue avec le nombre d’illuminations. Avec très peu d’illuminations, l’objet est retrouvé uniquement dans les

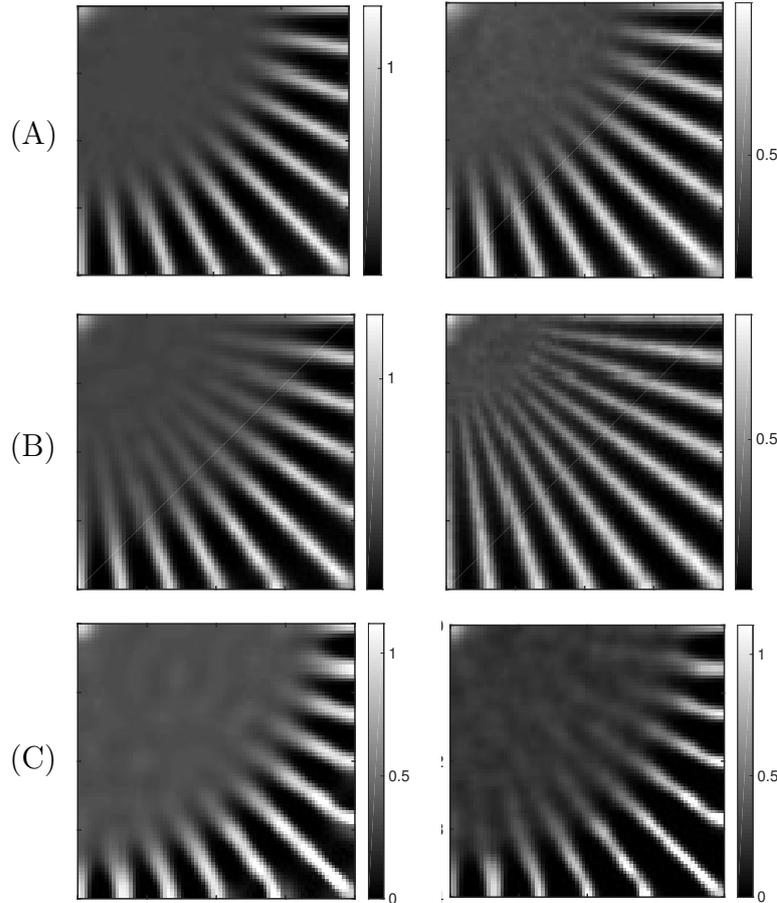


FIGURE 4.6 – **Illuminations de speckle (suite)** : La taille de corrélation des illuminations aléatoires de speckle et de speckle « au carré » influence le niveau de super-résolution des reconstructions Blind-SIM pénalisé : [Ligne A] reconstruction avec  $M = 10000$  speckle,  $NA_{\text{ill}} = 0.5 NA$  (gauche) et avec les speckles « au carré » correspondants (droite). [Ligne B] *idem* avec  $NA_{\text{ill}} = 2 NA$ . [Ligne C] *idem* avec des illuminations spatialement décorréelées.

quelques endroits où les « points chauds » des illuminations sont apparus. Cela montre que la stratégie Blind-SIM jointe est aussi une stratégie « d'activation », dans l'esprit de PALM [65] et STORM [66]. Pour notre stratégie, le processus d'activation est produit par la structuration de l'illumination et non par le choix des marqueurs fluorescents. Cette effet est encore plus visible avec les illuminations de speckle « au carré », celles-ci étant plus parcimonieuses. Il faut alors plus d'illuminations pour limiter les fluctuations de  $\sum_m \mathbf{E}_m$ , de façon à ce que la contrainte d'égalité nécessaire (4.1.1b) soit légitime. On peut remarquer que pour  $M \approx 200$  illuminations de speckle, la super-résolution de la reconstruction est comparable à celle obtenue avec  $M \approx 9$  illuminations harmoniques, voir Fig. 4.3(C-gauche) et Fig. 4.5(B-gauche). Évidemment, utiliser des illuminations de speckle reste une stratégie attractive puisqu'elle permet de travailler avec un montage expérimental très simple [2], voir également la Section 2.1.3. Pour les deux types d'illuminations, on remarque qu'augmenter la longueur de corrélation au dessus de la distance de Rayleigh  $\frac{\lambda}{2NA}$  (*i.e.*, pour  $NA_{\text{ill}} < NA$ ) détériore la super-résolution obtenue

alors que inversement prendre  $NA_{\text{ill}} = 2NA$  améliore celle-ci, voir Fig. 4.6-(A,B). Cependant, le pouvoir de super-résolution des techniques Blind-SIM joint se détériore si l'on réduit encore cette longueur de corrélation ; par exemple, pour des illuminations complètement décorréliées la reconstruction n'est visiblement pas super-résolue, voir Fig. 4.6-(C). En effet, avec des longueurs de corrélation arbitrairement faible, beaucoup de « points chauds » sont générés à l'intérieur même d'une distance de Rayleigh (défini en Sec. 2.1.1) et donc non visible sur l'image basse résolution, la contrainte de parcimonie est alors moins efficace. Évidemment, les illuminations de speckle « au carré » sont moins sensible à ce problème puisqu'elles sont intrinsèquement plus parcimonieuses.

Enfin, il est important de noter que les illuminations de speckle « au carré » ont une signification physique : en effet la fluorescence à 2 photons est sensible au *carré* de l'intensité [90]. La plupart de ces simulations peuvent donc être considérées comme des expériences de microscopie champ large 2 photons à illuminations structurées. Contrairement aux illuminations de speckles (*i.e.* pleinement développées) un-photon<sup>10</sup>, dans le cas d'interactions 2 photons (2P), la longueur d'onde d'excitation est  $\lambda_{\text{ill}} \sim 1000$  nm ce qui est environ deux fois la longueur d'onde de la fluorescence collectée  $\lambda_{\text{det}} \sim 500$  nm. La longueur de corrélation de l'illumination dans le cas deux photons est de  $\frac{\lambda_{\text{ill}}}{4NA_{\text{ill}}}$  et donc en *epi*-illumination dans le cas un photon (1P) et 2 photons (2P) la longueur de corrélation latérale est similaire.

le cas de figure 2 photons est simulé en Fig. 4.6-(A-droit), et ne montre pas une amélioration significative de super-résolution en comparaison au cas 1P correspondant affiché en Fig. 4.5-(C-gauche). Un rapport de super-résolution plus important peut être observé grâce au 2P en utilisant des objectifs de collection et d'illumination différents. Par exemple, le comportement observé en Fig. 4.5-(C-droit) et en Fig. 4.6-(B-droit) peut être obtenu si le NA d'excitation est respectivement deux fois et quatre fois plus grand que le NA de collection. Pour ces deux configurations, l'excitation 2P a une longueur de corrélation bien inférieure à celle conduite par la PSF de collection de l'objectif, et la super-résolution obtenue en simulation est très importante.

La simulation montrée en Fig. 4.6-(C-droit) correspond au cas limite d'une expérience 2P ou le NA de collection est très petit. La simulation 1P de la Fig. 4.6-(C-gauche) peut être interprétée comme une expérience de photo-acoustique [21], une technique d'imagerie pour laquelle l'illumination à une longueur de corrélation latérale négligeable par rapport à la taille de la PSF. En remarque finale, on notera que les interactions 2P ne sont pas le seul moyen de générer des illuminations plus parcimonieuses utilisable en Blind-SIM joint. En particulier, les illuminations de speckle super-Rayleigh [91] ainsi que les illuminations super-critiques [92, 93] sont des candidats prometteurs.

## 4.2 Algorithme joint

Nous allons maintenant décrire l'algorithme permettant de minimiser le problème (4.1.5)-(4.1.6). Pour simplifier les notations, les indices  $m$  pour  $\mathbf{y}_m$  et  $\mathbf{q}_m$  vont être omis par la suite. Il faudra cependant garder à l'esprit que l'algorithme présenté ici permet de

10. Pour une interaction un photon, la différence de Stokes [35] implique que l'excitation et la fluorescence ne sont pas strictement à la même longueur d'onde. La différence est d'environ 10% et sera négligée ici

résoudre l'un des  $M$  sous-problèmes impliqués dans la reconstruction Blind-SIM jointe finale. En premier lieu, on peut noter que le problème (4.1.5)-(4.1.6) est un exemple du problème plus général

$$\min_{\mathbf{q} \in \mathbb{R}^N} [f(\mathbf{q}) := g(\mathbf{q}) + h(\mathbf{q})] \quad (4.2.1)$$

où  $g$  et  $h$  sont des fonctions convexes fermées ne partageant pas les mêmes hypothèses de régularité :  $g$  est supposée lisse, avec un gradient  $\nabla g$  continu et  $L$ -Lipschitz alors que  $h$  peut ne pas être lisse. Cette séparation a pour but de pouvoir résoudre des problèmes d'optimisation contraints non-lisses en utilisant des méthodes proximales (comme *forward-backward* [94]). Dans ce qui suit, nous présentons tout d'abord l'algorithme proximal standard permettant de résoudre le problème (4.2.1) [95], puis l'algorithme FISTA [96] qui est usuellement considéré comme une version accélérée du premier algorithme.

### 4.2.1 Itération proximale standard et version accélérée

En premier lieu, une solution du problème générique (4.2.1) est présentée, suivi de l'application à notre problème Blind-SIM joint pénalisé.

### 4.2.2 Problème générique

Prenons  $\mathbf{q}^{(0)}$  une solution initiale arbitraire. Pour minimiser le critère convexe  $f$ , la mise à jour proximale standard s'écrit [95, 97, 98]

$$\mathbf{q}^{(k+1)} \longleftarrow \mathcal{P}_{\gamma h}(\mathbf{q}^{(k)} - \gamma \nabla g(\mathbf{q}^{(k)})) \quad (4.2.2)$$

où  $\mathcal{P}_{\gamma h}$  est l'opérateur proximal de la fonction  $\gamma h$  [99, p.339] défini par

$$\mathcal{P}_{\gamma h}(\mathbf{q}) := \arg \min_{\mathbf{x} \in \mathbb{R}^N} \left[ h(\mathbf{x}) + \frac{1}{2\gamma} \|\mathbf{x} - \mathbf{q}\|^2 \right]. \quad (4.2.3)$$

Malgré la définition implicite de cet opérateur, une forme explicite existe pour de très nombreuses fonctions rencontrées dans le domaine du traitement du signal et de l'image, voir par exemple [98, Table 10.2]. La constante de Lipschitz  $L$  postulée pour  $\nabla g$  joue un rôle important dans la convergence des itérations (4.2.2). Plus précisément, la convergence globale vers une solution de (4.2.2) est garantie tant que le pas  $\gamma$  est choisi tel que  $0 < \gamma < 2/L$ . Cependant, la vitesse de convergence est habituellement lente, ainsi la version accélérée nommée FISTA [96] lui est souvent préférée :

$$\mathbf{q}^{(k+1)} \longleftarrow \mathcal{P}_{\gamma h}(\boldsymbol{\omega}^{(k)} - \gamma \nabla g(\boldsymbol{\omega}^{(k)})) \quad (4.2.4a)$$

$$\boldsymbol{\omega}^{(k+1)} \longleftarrow \mathbf{q}^{(k+1)} + \frac{k-1}{k+2} (\mathbf{q}^{(k+1)} - \mathbf{q}^{(k)}). \quad (4.2.4b)$$

La vitesse de convergence vers  $\min_{\mathbf{q}} f(\mathbf{q})$  de (4.2.4) est de  $O(1/k^2)$ , ce qui est souvent considéré comme un gain substantiel par rapport à la vitesse de convergence en  $O(1/k)$  de l'algorithme proximal standard présenté précédemment. Il est important de noter que FISTA n'améliore pas systématiquement la vitesse de convergence en comparaison à l'algorithme standard, voir [98, Fig. 10.2]. Pour ce qui est de notre problème Blind-SIM de minimisation sous contraintes, FISTA permet une nette accélération de la vitesse de convergence, voir Fig. 4.9. Enfin, on notera que la convergence de (4.2.4) est garantie si  $0 < \gamma < 1/L$ .

### 4.2.3 Solution du $m$ -ème problème Blind-SIM joint

En ce qui concerne le problème Blind-SIM joint pénalisé considéré dans ce chapitre, le problème de minimisation (4.1.5) [avec la pénalité (4.1.6)] prend la forme (4.2.1) suivante

$$g(\mathbf{q}) = \|\mathbf{y} - \mathbf{H}\mathbf{q}\|^2 + \beta\|\mathbf{q}\|^2 \quad (4.2.5a)$$

$$h(\mathbf{q}) = \alpha \sum_n \phi(q_n) \quad (4.2.5b)$$

avec  $\phi : \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R} \cup \{+\infty\}$  de la forme suivante

$$\phi(u) := \begin{cases} u & \text{si } u \geq 0. \\ +\infty & \text{sinon.} \end{cases} \quad (4.2.5c)$$

Le gradient de la partie régulière de notre séparation

$$\nabla g(\mathbf{q}) = 2 [\mathbf{H}^t(\mathbf{H}\mathbf{q} - \mathbf{y}) + \beta\mathbf{q}] \quad (4.2.6)$$

est  $L$ -Lipschitz avec  $L = 2(\lambda_{\max}(\mathbf{H}^t\mathbf{H}) + \beta)$  où  $\lambda_{\max}(\mathbf{A})$  est la plus grande valeur propre de la matrice  $\mathbf{A}$ . De plus, l'opérateur proximal (4.2.3) avec  $h$  définie comme (4.2.5b) conduit à une forme explicite appelée seuillage doux (ou *soft-thresholding*) [100, 101]

$$\mathcal{P}_{\gamma h}(\mathbf{q}) = \mathbf{vect}(\max\{q_n - \gamma\alpha, 0\}). \quad (4.2.7)$$

D'un point de vue pratique, la version proximale (4.2.2) et sa contrepartie accélérée (4.2.4) sont facilement implémentables avec une faible complexité algorithmique <sup>14</sup> grâce aux relations (4.2.6) and (4.2.7). Cependant on peut remarquer que, visuellement, la super-résolution de l'estimé n'apparaît qu'après quelques centaines d'itérations FISTA, il faut donc plusieurs dizaines de secondes pour reconstruire une image Blind-SIM super-résolue telle que présentée en Fig. 4.5(B) où  $M = 200$  sous-problèmes doivent être résolus. Pour aller plus loin, on peut voir en Fig. 4.7(a-c) les reconstructions à partir de 10, 50 et 1000 itérations FISTA. L'objectif est de réussir à obtenir la qualité de reconstruction obtenue « à convergence » en utilisant le moins de temps possible. La prochaine section introduit une nouvelle stratégie d'optimisation appelée PPDS (*preconditioned primal-dual splitting*) permettant une vitesse de convergence bien plus importante, comme illustré ici Fig. 4.7(right).

### 4.2.4 Pré-conditionnement et séparation primal-dual

Utiliser un pré-conditionneur [46, p. 69] est formellement équivalent à résoudre le problème initial (4.2.1) en ayant effectué un changement de variable linéaire  $\mathbf{q} := \mathbf{P}\mathbf{v}$ , avec  $\mathbf{P} \in \mathbb{R}^{N \times N}$  une matrice symétrique strictement définie positive. Il n'y a pas de difficulté formelle à écrire un algorithme proximal similaire à (4.2.2) et basé sur ce pré-conditionnement. Cependant, hormis dans le cas où  $\mathbf{P}$  est une matrice diagonale [103, 104, 105, 106], l'opérateur proximal  $\mathcal{H}(\mathbf{v}) := h(\mathbf{P}\mathbf{v})$  ne peut être obtenu

---

14. Comme  $\mathbf{H}$  est une matrice de convolution, le calcul du gradient (4.2.6) peut être effectué en utilisant uniquement des transformées de Fourier rapides et des produits scalaires, voir [102, Sec. 5.2.3].

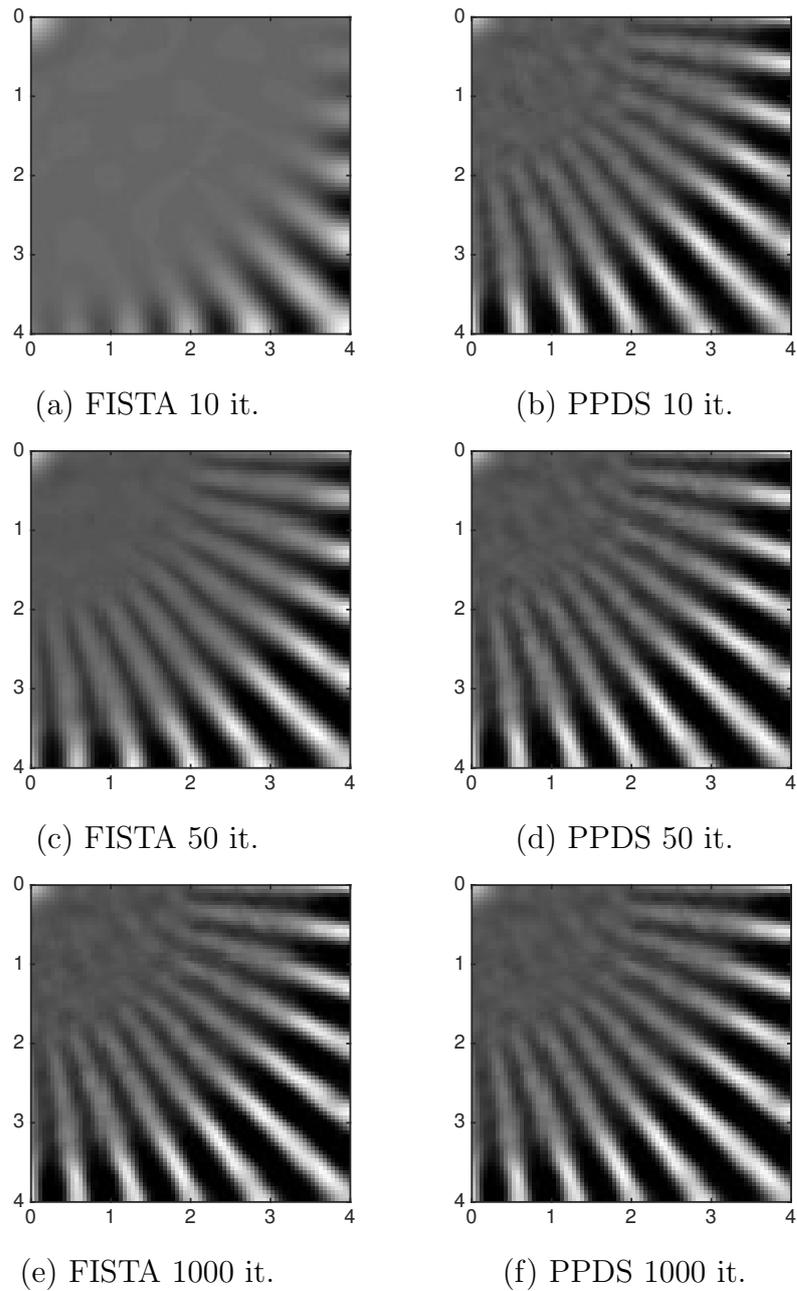


FIGURE 4.7 – Reconstruction d’une cible fluorescente à partir de données Blind-SIM en éclairage de speckles, réalisé en minimisant le critère (4.1.5) avec 10, 50 ou 1000 itérations FISTA (abc) ou PPDS(def). Pour toutes ces simulations, l’estimée initiale est  $\mathbf{q}^{(0)} = \mathbf{0}$  et les paramètres ont pour valeurs ( $\alpha = 0.3, \beta = 10^{-6}$ ). Les itérations PPDS utilisent le pré-conditionneur donné en (4.2.19) avec  $\mathbf{C} = \mathbf{H}^t \mathbf{H}$  et  $a = 1$ , (voir Sec 4.2.5 pour plus de détail).

de manière explicite et doit donc être calculé de manière numérique. Cela implique de résoudre à chaque itération un problème imbriqué, ce qui augmente le coût de calcul et introduit une incertitude sur la convergence, puisque le nombre de sous-itérations est limité en pratique [105, 107]. Malgré cette difficulté, les techniques de pré-conditionnement sont très largement reconnues pour accélérer la vitesse de conver-

gence de nombreux algorithmes proximaux. Par la suite, nous allons utiliser un nouvel algorithme proximal pré-conditionnée proposé par [83, 108, 94] sans aucun problème imbriqué à résoudre. Cette nouvelle approche pré-conditionnée est présentée pour une formulation générique du problème d'optimisation (4.2.1). En premier lieu, on effectue le changement de variable linéaire sur le critère  $f$ .

$$f(\mathbf{P}\mathbf{v}) = \mathcal{G}(\mathbf{v}) + h(\mathbf{P}\mathbf{v}) \quad (4.2.8)$$

avec  $\mathcal{G}(\mathbf{v}) := g(\mathbf{P}\mathbf{v})$ . Le critère ci-dessus étant une forme particulière du problème considéré dans [83, Eq. (45)], on peut optimiser celui-ci grâce à l'algorithme primal-dual [83, Eq. (55)] s'écrivant ainsi

$$\mathbf{v}^{(k+1)} \leftarrow \mathbf{v}^{(k)} - \theta\tau\mathbf{d}^{(k)} \quad (4.2.9a)$$

$$\boldsymbol{\omega}^{(k+1)} \leftarrow \boldsymbol{\omega}^{(k)} + \theta\boldsymbol{\Delta}^{(k)} \quad (4.2.9b)$$

avec

$$\mathbf{d}^{(k)} := \nabla\mathcal{G}(\mathbf{v}^{(k)}) + \mathbf{P}\boldsymbol{\omega}^{(k)} \quad (4.2.10a)$$

$$\boldsymbol{\Delta}^{(k)} := \mathcal{P}_{\sigma h^*}(\boldsymbol{\omega}^{(k)} + \sigma\mathbf{P}(\mathbf{v}^{(k)} - 2\tau\mathbf{d}^{(k)})) - \boldsymbol{\omega}^{(k)} \quad (4.2.10b)$$

où l'opérateur proximal de  $h^*$ , le conjugué de Fenchel de la fonction  $h$ , est facilement obtenu en utilisant la relation

$$\mathcal{P}_{\sigma h^*}(\boldsymbol{\omega}) = \boldsymbol{\omega} - \sigma\mathcal{P}_{h/\sigma}(\boldsymbol{\omega}/\sigma). \quad (4.2.11)$$

La mise à jour primale (4.2.9a) peut aussi être réécrite en fonction des variables  $\mathbf{q}$  :

$$\mathbf{q}^{(k+1)} \leftarrow \mathbf{q}^{(k)} - \theta\tau\mathbf{B}\boldsymbol{\zeta}^{(k)} \quad (4.2.12)$$

avec  $\boldsymbol{\zeta}^{(k)} := \nabla g(\mathbf{q}^{(k)}) + \boldsymbol{\omega}^{(k)}$  et  $\mathbf{B} := \mathbf{P}\mathbf{P}$ . Comme la mise à jour (4.2.12) est très proche d'une descente de gradient pré-conditionnée, on peut s'attendre à ce qu'un choix adapté de matrice  $\mathbf{B}$  apporte une accélération significative de la convergence. De plus, on peut noter que la quantité  $\mathbf{a}^{(k)} := \boldsymbol{\omega}^{(k)} + \sigma\mathbf{P}(\mathbf{v}^{(k)} - 2\tau\mathbf{d}^{(k)})$  impliquée dans l'itération duale via (4.2.10b) peut aussi s'écrire

$$\mathbf{a}^{(k)} := \boldsymbol{\omega}^{(k)} + \sigma(\mathbf{q}^{(k)} - 2\tau\mathbf{B}\boldsymbol{\zeta}^{(k)}). \quad (4.2.13)$$

La pair primale-duale de mise à jour (4.2.9b) et (4.2.12) est appelée *preconditioned primal-dual splitting* (PPDS). D'après [83, Theorem 5.1], la convergence des itérations PPDS est assurée si certaines conditions sont respectées pour les paramètres  $(\theta, \tau, \sigma)$ . Plus précisément, la mise à jour primale (4.2.12) converge vers un minimum global du critère (4.2.8) si

$$\sigma > 0, \tau > 0, \theta > 0 \quad (4.2.14a)$$

$$\gamma_{\tau, \sigma} \in [1; 2) \quad (4.2.14b)$$

$$\gamma_{\tau, \sigma} > \theta \quad (4.2.14c)$$

avec  $\gamma_{\tau, \sigma} := 2 - \tau [1 - \tau\sigma\lambda_{\max}(\mathbf{B})]^{-1} \mathcal{L}/2$ , où  $\mathcal{L}$  est la constante de Lipschitz continue de  $\nabla\mathcal{G}$ , voir Eq. (4.2.8). Dans ce domaine défini par (4.2.14), le réglage des paramètres

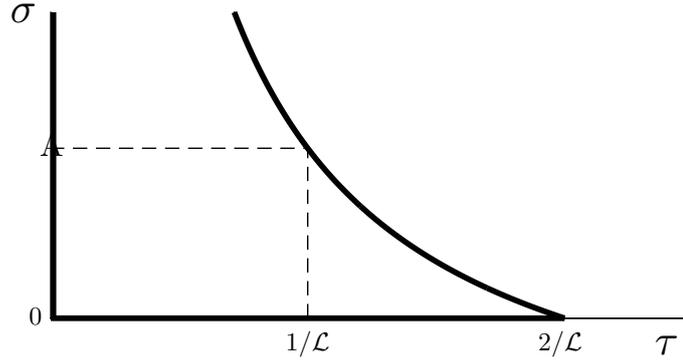


FIGURE 4.8 – Domaine admissible pour  $(\tau, \sigma)$  assurant la convergence globale des itérations PPDS avec  $\theta \in (0; 1)$ , voir relation (4.2.15).

$(\theta, \tau, \sigma)$  est critique, en effet la vitesse de convergence est nettement influencée par ce réglage. Nous proposons un réglage de ces paramètres pour lequel un bon comportement de l'algorithme est observé. Dans un premier temps, on peut noter que le pas  $\tau$  n'apparaît que dans le pas primal (4.2.9a) alors que  $\sigma$  lui n'apparaît que dans le pas dual (4.2.9b) via  $\Delta^{(k)}$ . De plus le paramètre de relaxation  $\theta$  permet d'agir conjointement sur le pas primal et dual (4.2.9). Si l'on considère uniquement le cas sous-relaxé (*i.e.*,  $\theta < 1$ ), la condition (4.2.14c) n'est alors plus nécessaire et (4.2.14b) peut être reformulée ainsi

$$\sigma \leq \bar{\sigma} \quad \text{with} \quad \bar{\sigma} := (1/\tau - \mathcal{L}/2) \lambda_{\max}^{-1}(\mathbf{B}). \quad (4.2.15)$$

Cette relation définit un domaine admissible pour  $(\tau, \sigma)$  sous la condition  $\theta < 1$ , voir Fig. 4.8. Notre stratégie définit  $\tau$  comme *le seul paramètre à régler* de notre algorithme PPDS, le paramètre  $\sigma$  étant alors réglé pour maximiser le pas dual :

$$0 < \tau < \bar{\tau}, \quad \sigma = \bar{\sigma} \quad \text{et} \quad \theta = 0.99, \quad (4.2.16)$$

avec  $\bar{\tau} := 2/\mathcal{L}$ . Enfin, on donne à  $\theta$  une valeur arbitrairement proche de 1, en effet empiriquement on observe qu'une sous-relaxation réduit la vitesse de convergence. L'évaluation numérique des bornes  $\bar{\tau}$  et  $\bar{\sigma}$  est dépendante de l'application puisqu'elles dépendent de  $\mathcal{L}$  et  $\lambda_{\max}(\mathbf{B})$ .

### 4.2.5 Résolution du sous problème Blind-SIM joint

Pour notre problème spécifique, l'implémentation de l'algorithme PPDS requiert le conjugué de la fonction (4.2.11) : avec  $h$  définie par (4.2.5b), la fonction conjuguée de Fenchel s'écrit alors

$$\mathcal{P}_{\sigma h^*}(\boldsymbol{\omega}) = \mathbf{vect}(\min\{\omega_n, \alpha\}). \quad (4.2.17)$$

Les mises à jour de PPDS s'écrivent alors

$$\mathbf{q}^{(k+1)} \leftarrow \mathbf{q}^{(k)} - \theta\tau \mathbf{B}\boldsymbol{\zeta}^{(k)} \quad (4.2.18a)$$

$$\boldsymbol{\omega}^{(k+1)} \leftarrow \boldsymbol{\omega}^{(k)} + \theta\boldsymbol{\Delta}^{(k)} \quad (4.2.18b)$$

avec  $\boldsymbol{\Delta}^{(k)} = \mathbf{vect}(\min\{a_n^{(k)}, \alpha\}) - \boldsymbol{\omega}^{(k)}$  et  $a_n^{(k)}$  la  $n$ -ème composante du vecteur  $\mathbf{a}^{(k)}$  définie par (4.2.13). On peut noter que la contrainte de positivité n'est pas appliquée dans le

pas primal (4.2.18a). La contrainte de positivité est donc appliquée asymptotiquement, grâce à la convergence globale de la séquence (4.2.18) vers le minimum global du critère (4.2.5). Comparé à FISTA, ce comportement peut être considéré comme un inconvénient de l'algorithme PPDS. Cependant, nous pensons que le « transfert » de la contrainte dure du pas primal au pas dual est précisément ce qui permet l'accélération fournie par le pré-conditionnement. Évidemment, une telle accélération requiert un choix judicieux du pré-conditionneur  $\mathbf{B}$ . Pour notre problème, la matrice de pré-conditionnement est celle de la construction semi-quadratique de Geman and Yang [109], [110, Eq. (6)]

$$\mathbf{B} = \frac{1}{2} (\mathbf{C} + \beta \mathbf{I}_d/a)^{-1} \quad (4.2.19)$$

où  $\mathbf{I}_d$  est la matrice identité et  $a > 0$  est un paramètre du pré-conditionneur. On a choisi  $\mathbf{C}$  dans la classe des matrices semi-définies positives avec une structure BCCB (*Block Circulant with Circulant Block*) [102, Sec. 5.2.5]. Ce choix implique que la matrice  $\mathbf{B}$  est aussi BCCB ce qui permet de réduire le coût algorithmique : (i)  $\mathbf{B}$  peut être stockée de manière efficace<sup>17</sup> et (ii) le produit matrice vecteur  $\mathbf{B}\zeta^{(k)}$  apparaissant dans (4.2.18a) peut être calculé avec une complexité en  $\mathcal{O}(N \log N)$  en utilisant la transformée de Fourier rapide (FFT). Évidemment, si le modèle d'observation  $\mathbf{H}$  est aussi une matrice BCCB construite à partir de la discrétisation de l'OTF, le choix  $\mathbf{C} = \mathbf{H}^t \mathbf{H}$  pour (4.2.19) nous emmène à la forme  $\mathbf{B} = (\nabla^2 g)^{-1}$  pour  $a = 1$ . On s'attend à ce qu'un tel pré-conditionneur apporte une convergence asymptotique très rapide puisqu'il permet de corriger les anisotropies de courbure de la partie régulière  $g$  du critère dans (4.2.1). Le pseudo-code PPDS utilisé pour résoudre le problème Blind-SIM joint est donné dans l'Algorithme 1. Ce pseudo-code nécessite la connaissance de  $\mathcal{L}$  et  $\lambda_{\max}(\mathbf{B})$  pour pouvoir régler les paramètres (4.2.16) : On a

$$\lambda_{\max}(\mathbf{B}) = 1/\lambda_{\min}(\mathbf{B}^{-1}) = a(2\beta)^{-1} \quad (4.2.20a)$$

car  $\mathbf{H}$  est de rang déficient dans notre contexte, et puisque la constante de Lipschitz s'écrit  $\mathcal{L} = \lambda_{\max}(\mathbf{B} \nabla^2 g)$ , on peut simplifier cette expression sous la forme

$$\mathcal{L} = \begin{cases} a & \text{si } a \geq 1 \\ (\tilde{\gamma}_{\max} + \beta)(\tilde{\gamma}_{\max} + \beta/a)^{-1} & \text{sinon,} \end{cases} \quad (4.2.20b)$$

avec  $\tilde{\gamma}_{\max}$  la valeur maximum du carré de la valeur absolue des composantes de l'OTF. Grâce au pseudo-code, on peut remarquer que la mise à jour primale (4.2.18a) reste dans le domaine de Fourier pendant l'itération PPDS, voir ligne 14. Avec cette stratégie, (possible parce que  $\nabla g$  est une fonction linéaire), le coût algorithmique par itérations PPDS<sup>18</sup> est dominé par le coût d'une transformée de Fourier directe et d'une inverse, *i.e.*, PPDS et FISTA partagent un coût algorithmique équivalent.

Nous allons maintenant illustrer la minimisation numérique par les itérations PPDS du

17. Toute matrice BCCB peut s'écrire  $\mathbf{B} = \mathbf{F}^\dagger \mathbf{\Lambda} \mathbf{F}$  avec  $\mathbf{F}$  la matrice unitaire représentant la transformée de Fourier discrète,  $^\dagger$  l'opérateur conjugué transpose et  $\mathbf{\Lambda} := \mathbf{Diag}(\tilde{\mathbf{b}})$  où  $\tilde{\mathbf{b}} := \mathbf{vect}(\tilde{b}_n)$  sont les valeurs propres de  $\mathbf{B}$ , voir [102, Sec. 5.2.5].

18. L'implémentation MATLAB du pseudo-code Algorithme 1 requiert moins de 6 ms par itération sur un ordinateur portable standard (Intel Core M 1.3 GHz). Pour comparaison, une itération FISTA prend approximativement 5 ms sur le même ordinateur.

---

```

1  Données initial :
2  PSF  $\mathbf{h}$ , images  $\{\mathbf{y}_m\}_{m=1}^M$ , Intensité moyenne  $\mathbf{E}_0 \in \mathbb{R}_+^N$ ;
3  Paramètres de régularisations :  $\beta, \alpha \in \mathbb{R}_+$ ;
4  Paramètres PPDS :  $a \in \mathbb{R}_+$ ;  $\theta \in (0, 1)$ ;  $\tau \in (0, 2\mathcal{L})$ ;  $k_{\max} \in \mathbb{N}$ ;
5  Estimation initial :  $\{\mathbf{q}_m^{(0)}, \boldsymbol{\omega}_m^{(0)}\}_{m=1}^M$ ;

```

---

```

6   $\hat{\boldsymbol{\rho}} \leftarrow \mathbf{0}$ ;  $\sigma \leftarrow \bar{\sigma}$ ;
7   $\tilde{\mathbf{h}} \leftarrow \text{FFT}(\mathbf{h})$ ;  $\tilde{\boldsymbol{\gamma}} \leftarrow \tilde{\mathbf{h}}^* \odot \tilde{\mathbf{h}}$ ;  $\tilde{\mathbf{b}} \leftarrow (2\tilde{\boldsymbol{\gamma}} + 2\beta/a)$ ;
8  // Boucle extérieur : traitement de chaque images  $\mathbf{y}_m \dots$ 
9  for  $m = 1 \dots M$  do
10      $\tilde{\mathbf{y}} \leftarrow \text{FFT}(\mathbf{y}_m)$ ;  $\tilde{\mathbf{q}}^{(0)} \leftarrow \text{FFT}(\mathbf{q}_m^{(0)})$ ;  $\tilde{\boldsymbol{\omega}}^{(0)} \leftarrow \text{FFT}(\boldsymbol{\omega}_m^{(0)})$ ;
11     // Boucle intérieur : minimisation PPDS ...
12     for  $k = 0 \dots k_{\max}$  do
13         // Le pas primal (domaine de Fourier)...
14          $\tilde{\mathbf{d}}^{(k)} \leftarrow \left( 2(\tilde{\boldsymbol{\gamma}} \odot \tilde{\mathbf{q}}^{(k)} - \tilde{\mathbf{h}} \odot \tilde{\mathbf{y}} + \beta) + \tilde{\boldsymbol{\omega}}^{(k)} \right) \oslash \tilde{\mathbf{b}}$ ;
15          $\tilde{\mathbf{q}}^{(k+1)} \leftarrow \tilde{\mathbf{q}}^{(k)} - \theta\tau\tilde{\mathbf{d}}^{(k)}$ ;
16         // Le pas dual (domaine direct)...
17          $\mathbf{a}^{(k)} \leftarrow \text{FFT}^{-1} \left( \tilde{\boldsymbol{\omega}}^{(k)} + \sigma(\tilde{\mathbf{q}}^{(k)} - 2\tau\tilde{\mathbf{d}}^{(k)}) \right)$ ;
18          $\boldsymbol{\omega}^{(k+1)} \leftarrow (1 - \theta)\boldsymbol{\omega}^{(k)} + \theta \text{vect}(\min\{a_n^{(k)}, \alpha\})$ ;
19         // Préparation de la prochaine iteration PPDS...
20          $\tilde{\mathbf{q}}^{(k)} \leftarrow \tilde{\mathbf{q}}^{(k+1)}$ ;  $\tilde{\boldsymbol{\omega}}^{(k)} \leftarrow \text{FFT}(\boldsymbol{\omega}^{(k+1)})$ ;
21     end
22     // Création de l'estimation Blind-SIM jointe ...
23      $\hat{\boldsymbol{\rho}} \leftarrow \hat{\boldsymbol{\rho}} + \frac{1}{M}\text{FFT}^{-1}(\tilde{\mathbf{q}}^{(k)}) \oslash \mathbf{E}_0$ ;
24 end

```

---

```

25 Résultat final : L'estimation Blind-SIM jointe est stockée dans  $\hat{\boldsymbol{\rho}}$ 

```

---

**Algorithme 1 :** Pseudo-code de l'algorithme Blind-SIM PPDS, sous l'hypothèse  $\mathbf{H}$  est une matrice BCCB et  $\mathbf{C} = \mathbf{H}^t \mathbf{H}$ . Le symbole  $\odot$  et  $\oslash$  sont respectivement, le produit et la division terme à terme. Pour rester le plus simple possible, ce pseudo-code utilise un critère d'arrêt basé sur un nombre d'itération à effectuer, voir ligne 11. En pratique, un critère d'arrêt plus élaboré peut être utilisé en suivant l'évolution de la norme  $\|\boldsymbol{\zeta}^{(k)}\|$  définie par (4.2.12) en effet celle-ci tend vers zero quand  $\mathbf{q}^{(k)}$  atteint asymptotiquement la solution contrainte du problème.

critère impliqué dans la reconstruction Blind-SIM joint montrée en Fig. 4.7-(droite). Ces simulations sont effectuées avec une implémentation MATLAB standard du pseudo-code présenté Algorithm 1. On règle  $a = 1$  de telle sorte que le pré-conditionneur  $\mathbf{B}$  soit l'inverse de la matrice hessienne de  $g$  dans (4.2.5). Avec ce réglage, on s'attend à ce que les itérations PPDS bénéficie de la vitesse de convergence la plus favorable, dès lors que les

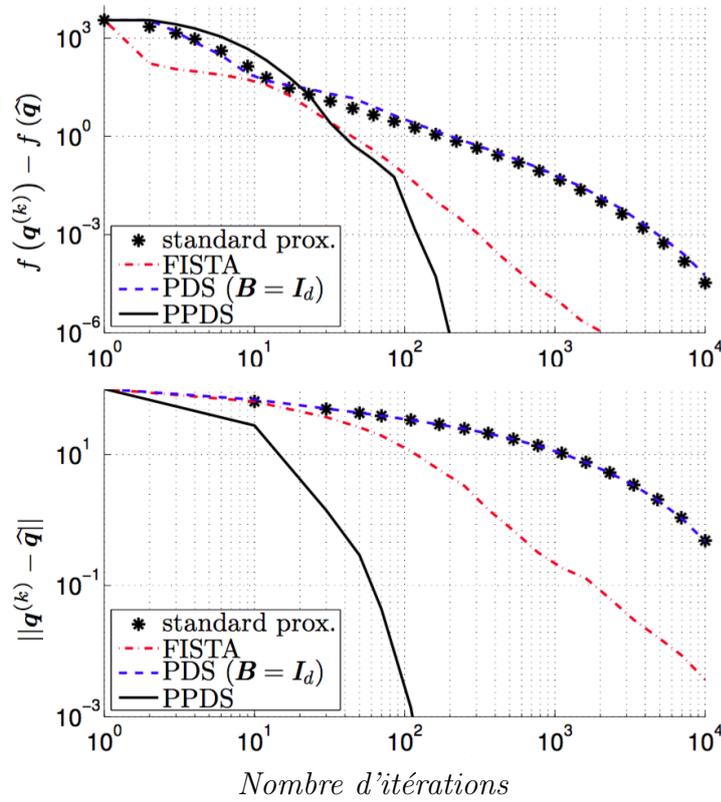


FIGURE 4.9 – Valeur du critère (graphique du haut) et distance au minimiseur (graphique du bas) en fonction du nombre d’itérations PPDS pour le problème de reconstruction considéré pour la Fig. 4.7. L’estimée initial choisi est  $\mathbf{q}^{(0)} = \mathbf{0}$  pour les variables primales et  $\boldsymbol{\omega}^{(0)} = -\nabla g(\mathbf{q}^{(0)})$  pour les variables dual. Le paramètre du pré-conditionneur prend pour valeur  $a = 1$  et  $(\theta, \tau, \sigma)$  sont réglés selon la règle (4.2.16). Pour être complet, les courbes concernant les itérations FISTA et PDS (*i.e.*, algorithme PPDS avec pour pré-conditionner la matrice identité  $\mathbf{B} = \mathbf{I}_d$ ) sont aussi tracées.

contraintes sont correctement identifiées. En commençant avec une estimée initiale grossière,  $\mathbf{q}^{(0)} = \mathbf{0}$  (la variable duale étant initialisée en utilisant  $\boldsymbol{\omega}^{(0)} = -\nabla g(\mathbf{q}^{(0)})$ , voir par exemple [46, Sec. 3.3]), la valeur du critère pour les itérations PPDS tracé en Fig. 4.9 montre une convergence asymptotique pouvant être considérée comme super-linéaire. D’autres réglages pour le paramètre  $a$  ont été testés (non présentés ici) et montrent une réduction de la vitesse asymptotique de convergence.

Le rôle central du pré-conditionneur dans l’amélioration de la vitesse de convergence et mis en valeur par le fait que l’algorithme PPDS devient aussi lent que l’algorithme proximal standard si l’on utilise  $\mathbf{B} = \mathbf{I}_d$ , voir la courbe PDS de la Fig. 4.9. De plus, il est important de noter que les composantes hautes fréquences (*i.e.*, la super résolution) apparaissent dès les premières itérations. En pratique, une fois les paramètres PPDS proprement réglés, on observe une accélération significative par rapport aux itérations FISTA (ou au proximal standard). Finalement, on rappelle que les simulations numériques présentées utilisent une matrice de convolution  $\mathbf{H}$  de structure BCCB. Dans

certains cas, l'hypothèse implicite de périodicité<sup>19</sup> associée à ces matrices n'est pas appropriée et un modèle de convolution avec une hypothèse de bord nuls (*i.e.*, Dirichlet) est alors préférable, ce qui conduit à une matrice  $\mathbf{H}$  avec une structure BTTB (*Block Toeplitz with Toeplitz blocks*).

Dans ce cas de figure, le produit d'un vecteur avec la matrice  $\mathbf{H}^t \mathbf{H}$  peut toujours être effectué de manière rapide avec une complexité de  $O(N \log N)$  via un algorithme basé sur la FFT, voir [102, Sec. 5.2.3]. Ceci s'applique au calcul de  $\nabla g(\mathbf{q}^{(k)})$  dans le pas primal (4.2.12), d'après (4.2.6). Contrairement au cas précédent, le système à résoudre (4.2.12) ne peut être résolu avec une complexité en  $O(N \log N)$  si la matrice  $\mathbf{H}$  à une structure uniquement BTTB (et non BCCB). Dans une telle situation, il est possible d'utiliser une matrice  $\mathbf{C}$  comme une approximation BCCB de  $\mathbf{H}^t \mathbf{H}$ , de façon à conserver une matrice de pré-conditionnement  $\mathbf{B} = (\mathbf{C} + \beta \mathbf{I}_d)^{-1}$  avec une structure BCCB, tout en s'assurant que la matrice  $\mathbf{B}(\mathbf{H}^t \mathbf{H} + \beta \mathbf{I}_d)$  a un spectre de valeurs propres se concentrant autour de 1 quand la taille  $N$  augmente [111, Th. 4.6].

Finalement, une autre difficulté peut apparaître lors de l'évaluation de  $\mathcal{L}$ . Il n'y a pas d'expression explicite pour (4.2.20b) quand  $\mathbf{H}$  est BTTB mais pas BCCB. Cependant, d'après (4.2.16), la convergence globale des itérations PPDS est assurée si  $\tau < 2/\hat{\mathcal{L}}$  avec  $\mathcal{L} \leq \hat{\mathcal{L}}$ . On pourra par exemple noter que,  $\hat{\mathcal{L}} := \lambda_{\max}(\mathbf{B})(\|\mathbf{H}\|_{\infty}\|\mathbf{H}\|_1 + \beta)$  est une borne supérieure de  $\mathcal{L}$  facile à calculer.

### 4.3 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons proposé un algorithme de reconstruction adapté à la microscopie de fluorescence à éclaircissements inconnus et pouvant traiter des problèmes de taille réaliste. Le mécanisme de super-résolution derrière cette stratégie, qui n'était pas expliqué, est maintenant clairement relié à la parcimonie des illuminations. Ceci établit un lien clair entre l'approche Blind-SIM joint à des techniques de localisation de particules uniques telles que PALM [65] ou STORM [66], ces dernières étant basées sur un processus d'activation très parcimonieux (donc très efficace) créé par la dynamique de fluorescence marquant l'échantillon. Cette conclusion suggère qu'une illumination « optimisée » peut être utilisée pour améliorer la super-résolution de la stratégie Blind-SIM joint, un exemple étant l'excitation deux photons proposée dans ce chapitre.

Il doit être remarqué que le mécanisme de super-résolution en Blind-SIM joint diffère très fortement de celui de la stratégie marginale [17, 69, 21] basée sur un critère de contraste et présentée au chapitre précédent, voir Sec. 3. L'estimation conjointe des variables de nuisances (les illuminations) du problème, et surtout la croissance linéaire du nombre de ces variables en régime asymptotique induit des biais asymptotiques pour cette stratégie, y compris pour les composantes fréquentielles transmises par l'OTF. Enfin, si l'estimateur de contraste est statistiquement convergent (voir Sec. 3.2.1), son coût de mise en oeuvre le rend pour le moment inaccessible pour les problèmes de tailles réelles [112].

Une motivation importante de ces travaux est la réduction du temps de calcul d'une re-

<sup>19</sup>. Une multiplication matrice-vecteur  $\mathbf{H}\mathbf{q}$  avec  $\mathbf{H}$  une matrice BCCB correspond à la convolution circulaire de  $\mathbf{q}$  avec le noyau de convolution défini par  $\mathbf{H}$ .

construction Blind-SIM joint. La reformulation du problème original a été une première étape importante en direction de cet objectif. En effet, cette reformulation permet de décomposer en  $M$  sous problèmes de structures identiques le problème initial, voir Sec.4.1. Le nouvel algorithme pré-conditionné proximal PPDS proposé en Sec. 4.2.4 est aussi décisif puisqu'il permet de traiter de manière rapide chaque sous problème. De notre point de vue, cet algorithme PPDS est intéressant puisqu'il permet l'utilisation d'un pré-conditionneur dans un algorithme proximal de manière simple à implémenter et à convergence garantie. Pour notre problème nous avons constaté que PPDS convergeait plus rapidement que FISTA vers le minimiseur du critère pénalisé. Nous pensons, cependant, que l'algorithme PPDS mériterait plus d'investigations théoriques et expérimentales. Notamment, cette stratégie de minimisation devrait être testée avec d'autres pénalisations[113] et d'autre modèles d'observation [114]. Par exemple, le cas d'une distribution de Poisson lorsque le nombre de photons collectés est faible peut être pris en compte. La convergence global et local de PPDS devrait également être explorée intensivement, en particulier dans le cas où la matrice de pré-conditionnement change au cours des itérations. Ce problème est important si l'on veut obtenir des itérations quasi-Newton avec PPDS dans un contexte plus général.

Une difficulté attendue dans le traitement des données réelles est la présence d'un fond lumineux important induit par la lumière hors-focus, où bien par un mauvais contraste des illuminations utilisées. Ces phénomènes empêchent l'extinction local des émetteurs fluorescents, ce qui détruit la super-résolution attendue en Blind-SIM joint. Une estimation de ce fond est proposé plus loin dans ce manuscrit, voir Sec.5.2. L'impact de la présence de ce fond sur la super-résolution peut ainsi être fortement réduit en enlevant l'estimation de celui-ci aux images avant la reconstruction par une technique Blind-SIM joint. Une approche plus naturelle serait de résoudre le problème en trois dimensions ce qui est numériquement plus délicat, mais reste une étape nécessaire pour obtenir des reconstructions 3D [19].

# Chapitre 5

## Résultats expérimentaux

Dans cette partie, nous allons présenter des résultats de reconstruction à partir d'images réelles de microscope de fluorescence. Les images ont été acquises par Thomas Mangeat, ingénieur de recherche au LBCMCP. Bien que théoriquement attractive, la stratégie de reconstruction itérative par minimisation d'une fonction de contraste (voir Sec. 3) sera écartée de part son coût de calcul prohibitif au profit de l'approche jointe présentée au chapitre précédent. Nous nous focaliserons aussi sur la reconstruction 2D de l'échantillon de fluorescence dans le plan focal. Pour des échantillons épais, comme nous le verrons, ce traitement 2D oblige à gérer le problème de la fluorescence « hors-focus » qui peut fortement détériorer la (super) résolution finale. Les reconstructions seront d'abord obtenues sur des objets réels mais calibrés pour estimer une capacité de super-résolution des techniques Blind-SIM à illuminations de speckles (*i.e.*, des billes de 100 nanomètre de diamètre, une mire de calibration Argolight), puis nous étudierons des échantillons biologiques.

### 5.1 Montage expérimental

Le microscope de fluorescence à éclairage structuré utilisé pour l'acquisition des images en figure 5.1, est construit à Toulouse dans le Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire du contrôle de la prolifération (LBCMCP) par Thomas Mangeat. Ce montage s'inspire de celui utilisé dans la publication de Lu-Walther [3] où la vitesse d'acquisition de la technique SIM à éclairages harmoniques est nettement améliorée. La fréquence d'acquisition obtenue est de 162 images par seconde en conservant une région d'intérêt de  $16,5 \times 16,5 \mu\text{m}^2$  et sans mouvement mécanique. Pour cela un SLM (*spatial light modulator*) est utilisé afin de contrôler de manière rapide et précise le motif d'excitation. Une caméra sCMOS est utilisée en mode «free running» pour maximiser la vitesse d'acquisition. Dans le montage réalisé par Thomas Mangeat, plusieurs longueurs d'onde d'excitation sont utilisables, 405, 445, 488 et 561 nanomètres, les filtres et dichroïques peuvent facilement être changés, il est donc facile de changer de longueur d'onde d'excitation et de collection sur ce montage. Là aussi un SLM (QXGA-3DM) est utilisé pour générer les illuminations structurées de speckles ou harmoniques. Ce SLM à une résolution de 2048 x 1536 pixels, il permet de générer des motifs différents à un taux de rafraîchissement de 4,5 kilohertz. Le taux de remplissage est de 94%, ceci permet d'éviter la présence de structures indésirables dans les illuminations

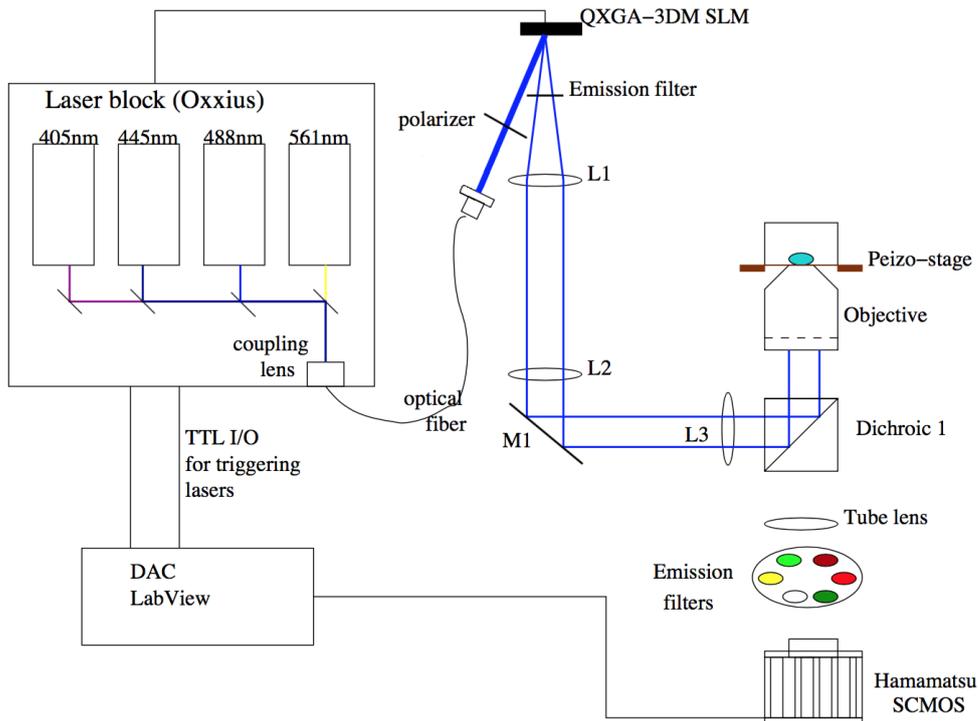


FIGURE 5.1 – Microscope de fluorescence pouvant fonctionner avec 4 longueurs d’onde d’excitation différentes grâce à un bloc laser Oxxius. Un SLM QXGA-3DM est utilisé pour structurer l’illumination au niveau de l’échantillon permettant ainsi de générer des illuminations de speckle ou des illuminations harmoniques. Différents objectifs sont utilisés sur ce montage. Ce montage à été réalisé par Thomas Mangeat, ingénieur de recherche au LBCMCP en se basant sur le montage présenté dans une publication de Lu-Walther [3].

générées. Une mémoire interne permet de stocker 1024 motifs à projeter sur le SLM ; on ne peut donc utiliser que 1024 illuminations de speckle au maximum, ce qui est plus que suffisant pour notre application. Nous pouvons, grâce à ce montage, comparer les résultats obtenus avec des illuminations harmoniques connues et des illuminations de speckle inconnues simplement en chargeant à la suite dans le SLM les différents motifs nécessaires pour générer les illuminations harmoniques puis les illuminations de speckle. Ce type de montage ouvre en perspective, la possibilité d’essayer d’autres types d’illuminations aléatoires, avec d’autres statistiques [91], ou d’autres structures [115].

## 5.2 Estimation du fond

Dans cette partie, nous décrivons un pré-traitement dédié aux images Blind-SIM à illuminations de speckle permettant de réduire l’impact d’un fond lumineux sur la super-résolution des reconstructions. Ce pré-traitement est incontournable si l’on souhaite reconstruire une image 2D dans le plan focal à partir d’échantillons fluorescents épais (épaisseur plus grande que la taille de la PSF axiale) car l’éclairage produit également une excitation de la fluorescence hors du plan focal. Cette fluorescence « hors-focus » vient se superposer au speckle dans le plan de reconstruction ce qui masque

l'extinction locale de l'objet. En présence de ce fond, toute parcimonie sur le produit objet  $\times$  illumination est empêchée dans le plan focal et par la même toute super-résolution finale, voir notamment la Sec. 4.1 et la Fig. 4.2 à ce propos.

Pour prendre en compte les effets d'un fond lumineux, nous proposons de modifier la modélisation des données afin d'inclure notre modélisation du fond :

$$\mathbf{y}_m = \mathbf{H} [\boldsymbol{\rho} \odot (\mathbf{I}_m + \mathbf{a})] + \mathbf{b} + \boldsymbol{\epsilon}_m \quad (5.2.1)$$

$$\boldsymbol{\epsilon}_m \sim \mathcal{N}(\mathbf{0}, \text{Diag}(\boldsymbol{\sigma})^2) \quad (5.2.2)$$

où  $\mathbf{a}$  modélisera l'effet d'un fond lié à l'objet dans l'observation  $\mathbf{y}_m$  (induit par le fait que le contraste du speckle n'est pas maximal),  $\mathbf{b}$  un fond diffus non lié à l'objet et dont le contenu fréquentiel est supposé inclus dans le support de l'OTF  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ .  $\boldsymbol{\epsilon}_m$  est un bruit additif décorrélé, centré gaussien et de variance  $\boldsymbol{\sigma}^2$ .

L'estimation du fond est basée sur une approximation de la loi de probabilité d'un pixel des images déconvoluées. En première approximation, on supposera que l'image déconvoluée peut s'écrire comme la somme de  $\boldsymbol{\rho} \odot \mathbf{I}_m$ , d'une variable liée au fond et d'une variable aléatoire suivant une loi normale. L'illumination étant un speckle, le signal  $[\boldsymbol{\rho} \odot \mathbf{I}_m]_n$  suit une loi exponentielle, l'hypothèse s'écrit donc :

$$[\mathbf{H}^+ \mathbf{y}_m]_n \sim \mathcal{EMG}(\mu_n, \sigma_n, \tau_n) \quad \forall n \quad (5.2.3a)$$

$$\text{avec } \mu_n = [\boldsymbol{\rho} \odot \mathbf{a} + \mathbf{H}^+ \mathbf{b}]_n \quad \text{et} \quad \tau_n = [\mathbf{I}_0 \odot \boldsymbol{\rho}]_n \quad (5.2.3b)$$

où  $\mathbf{X}^+$  est la pseudo inverse de  $\mathbf{X}$ .  $\mathcal{EMG}$  (*Exponentially modified Gaussian distribution* [116]) est la distribution suivie par une somme de deux variables aléatoires indépendantes, la première suivant une loi normale et la seconde une loi exponentielle (une convolution entre la distribution normale et exponentielle). Les paramètres sont respectivement, la moyenne et la variance de la loi normale,  $\mu_n$  et  $\sigma_n$  et  $\tau_n$  le paramètre de la loi exponentielle.

Dans le cas où  $\mathbf{H}$  est inversible, cette approximation devient exacte. Évidemment on ne se trouve pas dans ce cas de figure, mais on peut observer que cette approximation est en pratique réaliste. La figure 5.2 illustre la distribution  $\mathcal{EMG}$  estimée à partir des pixels  $[\mathbf{H}^+ \mathbf{y}_m]_n$  issues de données réelles provenant de la mire Argolight<sup>1</sup> présentées en Fig. 5.4. Un estimateur basé sur les moments statistiques permet d'estimer les paramètres de cette loi pour chaque pixel et notamment le paramètre  $\mu_n$  qui permet de remonter à la composante hors-focus que nous cherchons à estimer (voir plus bas) :

$$\hat{\mu}_n = \hat{m}_n - \hat{\sigma}_n \times \left( \frac{\hat{\gamma}_n}{2} \right)^{1/3} \quad \forall n \quad (5.2.4)$$

avec  $\hat{m}_n$ ,  $\hat{\sigma}_n$  et  $\hat{\gamma}_n$  les estimations empiriques de la moyenne, de l'écart type et de l'asymétrie de  $[\mathbf{H}^+ \mathbf{y}_m]_n$ . Nous définissons enfin le fond comme la contribution dans l'acquisition  $\mathbf{y}_m$  (5.2.1) issues de  $\mathbf{a}$  et  $\mathbf{b}$ . Cette contribution peut être estimée à partir de l'estimateur empirique de  $\boldsymbol{\mu}$  puisque d'après (5.2.3b) et (5.2.4), on a

$$\mathbf{H} \hat{\boldsymbol{\mu}} \simeq \mathbf{H}(\boldsymbol{\rho} \odot \mathbf{a}) + \mathbf{b} \quad (5.2.5)$$

Nous allons maintenant illustrer les performances de cet estimateur du fond par une

1. <http://argolight.com/argo-sim/> voir « *pattern L - Stability of resolution* »

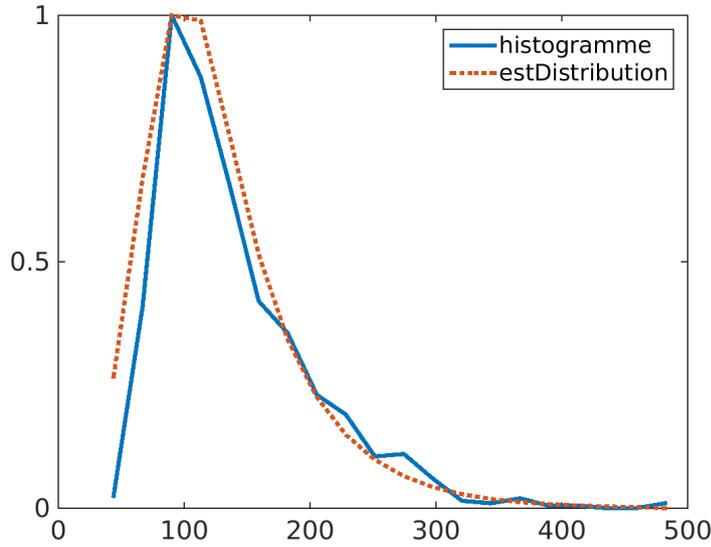


FIGURE 5.2 – Histogramme de  $[\mathbf{H}^+ \mathbf{y}_m]_i$  à partir de données réelles (mire Argolight L) tracé en ligne continue bleu et tracé de la densité de probabilité  $\mathcal{EMG}$  à partir des paramètres estimés  $\hat{\mu}_n$ ,  $\hat{\sigma}$  et  $\hat{\tau}_n$  en trait pointillé rouge.

simulation. Pour cela on considère des illuminations de speckles pleinement développés dont la corrélation spatiale correspond à la PSF  $h$  du microscope. L'objet utilisé (ou « vérité terrain ») est une mire en forme d'étoile telle que représentée sur la figure Fig. 3.2(a). Un fond lumineux basse fréquence, dont le contenu fréquentiel est inclus dans le domaine  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  de l'OTF, est généré afin de représenter la contribution « hors-focus »  $\mathbf{b}$ . Ici, on considère que les illuminations sont parfaitement contrastées (*i.e.*,  $\mathbf{a} = 0$ ), de façon à pouvoir visuellement identifier si la structuration de l'objet apparaît dans l'estimation du fond. Les simulations représentent un microscope de basse résolution, les images sont ensuite corrompues en ajoutant le fond aux images puis un bruit de grenaille suivant une distribution de Poisson est utilisé tel que le rapport signal à bruit (SNR) de l'ensemble des images  $\{\mathbf{y}_m\}_{m=1}^M$  soit de 30 dB. Les résultats présentés montrent l'estimation du fond obtenue Fig. 5.3-(B), à comparer à la vérité terrain utilisée pour simuler les images Fig. 5.3-(A). On peut voir en comparant les images Fig. 5.3-(E) et Fig. 5.3-(F) que la soustraction du fond fait disparaître la structure de ce fond de l'image. Ceci nous conforte dans la qualité de l'estimation de ce fond. La structure de l'objet est présente dans l'estimation Fig. 5.3-(B), on peut le voir sur les bords de l'image. Dans le cas où l'on connaît *a priori* le support fréquentiel du fond, il est possible de filtrer les fréquences en dehors de ce domaine pour améliorer l'estimation Fig. 5.3-(C).

### 5.3 Capacité de super-résolution sur données réelles

Afin d'estimer la capacité de super-résolution d'une technique Blind-SIM appliquée à la microscopie de fluorescence à illumination de speckle, nous avons utilisé des objets calibrés. Nous allons dans un premier temps utiliser une partie d'une mire Argolight<sup>2</sup>

2. <http://argolight.com/argo-sim/> voir « pattern L – Stability of resolution »

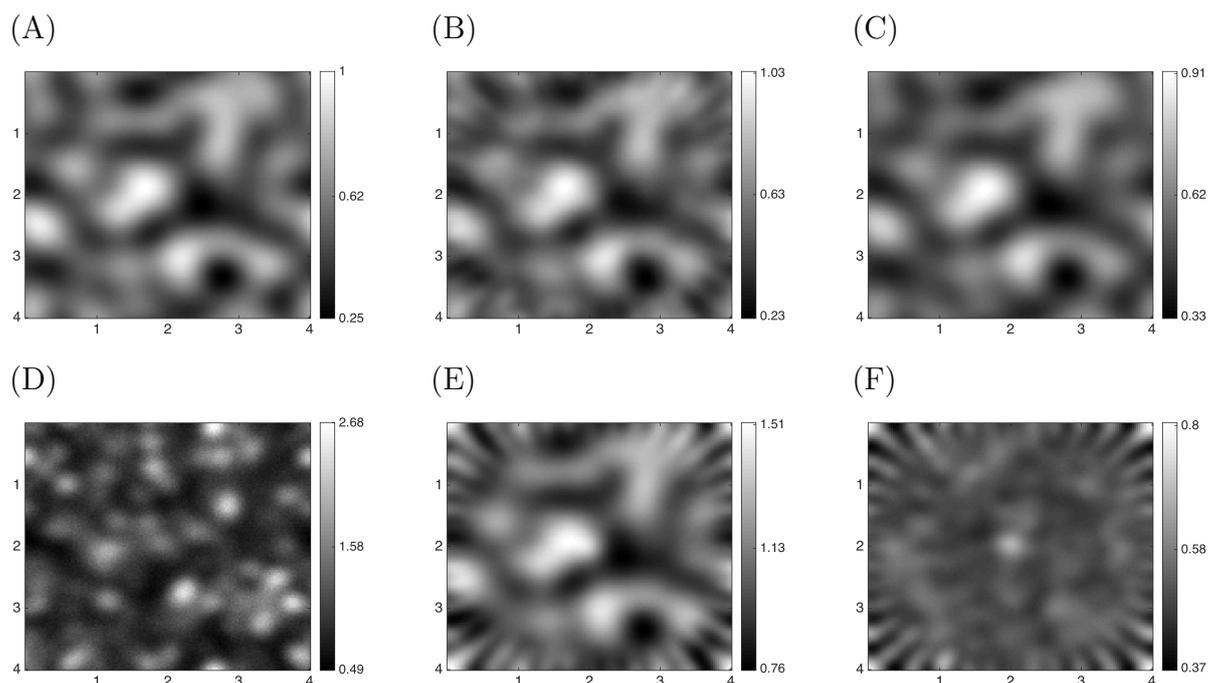


FIGURE 5.3 – Les images présentées sont obtenues en simulant 500 illuminations de speckle pleinement développé de corrélation égale à la PSF du microscope simulé. A partir de cet ensemble d’illuminations, des images de microscopie sont simulées en utilisant la mire présentée Fig. 3.2(a) comme échantillon de fluorescence. Sur ces données basse résolution, on ajoute un fond basse fréquence (avec un domaine fréquentiel limité à 0,4 fois la fréquence de coupure) aux images. Ces images sont ensuite bruitées avec un bruit de Poisson de tel sorte que le SNR soit de 30 dB (on multiplie par un facteur l’image avant de procéder au tirage aléatoire). (A) Fond basse fréquence ajouté aux images (vérité terrain) (B) Estimation du fond à partir de l’estimateur 5.2.4. (C) Estimation du fond filtrée à 0,4 fois la fréquence de coupure. (D) Simulation d’une image en sortie de microscope. Cette image est la somme du fond simulé avec la convolution de la PSF et du produit objet fois illumination, cette image est ensuite bruitée avec un bruit de grenaille. (E) Moyenne des images simulées en présence de fond perturbant la mesure. (D) Moyenne des images simulées en présence de fond perturbant la mesure après soustraction du fond estimé (B).

appelée *pattern L* présentées en Fig. 5.4. Les mires Argolight sont conçues pour évaluer les performances de systèmes d’imagerie de fluorescence. La mire Argo-SIM est dédiée au microscope de fluorescence à éclairements structurés (SIM), elle contient différents motifs permettant d’évaluer différentes caractéristiques du microscope (résolution, aberrations, etc.). Le motif appelé L de la plaquette Argo-SIM a été conçue pour évaluer la résolution, ce motif contient des paires de lignes parallèles produites par lithographie et dont l’espacement augmente graduellement avec des pas d’environ 30 nanomètres. On va s’intéresser à la distance entre les deux lignes du milieu de chaque groupe de lignes. Selon la fiche technique, cette distance varie de 30 nanomètres plus ou moins 10 nanomètres entre deux groupes de lignes successifs. La précision sur l’écartement des lignes n’étant pas suffisante, nous utiliserons une estimation de cette distance grâce aux images reconstruites et à la connaissance de la taille des pixels en

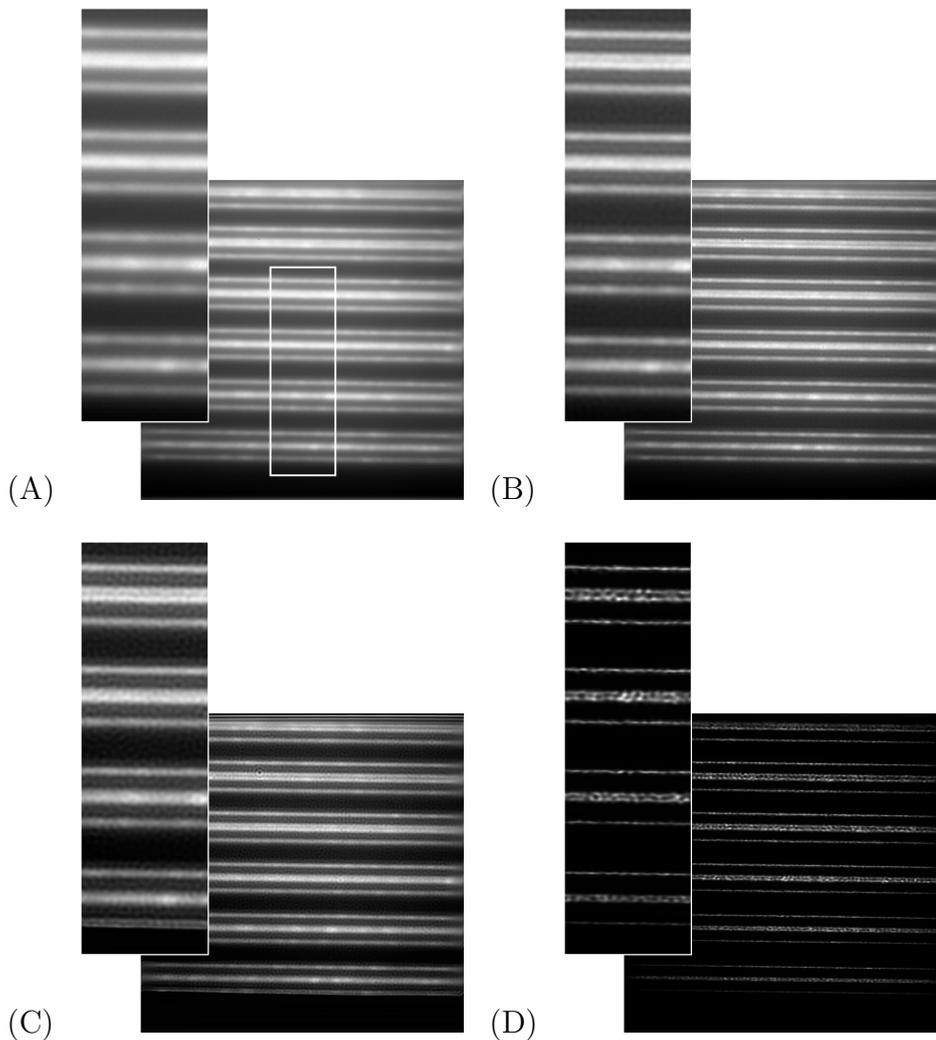


FIGURE 5.4 – Les images présentées sont obtenues à partir d’un microscope de fluorescence (voir montage 5.1), l’objet observé est un élément d’une mire Argolight appelé pattern L. L’objectif utilisé est un X100 avec une ouverture numérique de 1,49 et une huile dont l’indice optique est de 1,515. L’indice optique du milieu de montage est de 1,49 et la longueur d’onde d’excitation est de 405 nanomètres celle de collection est de 520 nanomètres. (A) Moyenne des images basse résolution à base d’illuminations de speckle. (B) Déconvolution de Wiener de l’image (A). La PSF utilisée a été simulée à partir des caractéristiques expérimentales en utilisant le modèle optique de Gibson & Lanni implémenté dans le *plug-in PSF Generator* de ICY [4]. (C) Reconstruction Blind-SIM produite par l’algorithme d’estimation jointe (voir le pseudo-code 1) à partir de 900 illuminations de speckle. (D) *Idem* en soustrayant au préalable l’estimée du fond aux acquisitions.

nanomètres.

On peut voir sur la figure 5.4, que l’utilisation d’illuminations de speckle inconnues permet de séparer des lignes parallèles distantes d’environ 164 nanomètres, alors qu’en utilisant une illumination uniforme, il est possible de séparer des lignes distantes de 226 nanomètres, si l’on néglige l’incertitude sur la distance entre les lignes et que l’on considère que la séparation de deux lignes proches est un bon critère d’estimation de la

Nom de l'image	Distance minimum pour séparer deux lignes
(A)	257 nm
(B)	226 nm
(C)	226 nm
(D)	164 nm

FIGURE 5.5 – Distance minimum de séparation des lignes pour chaque images présentée en figure 5.4.

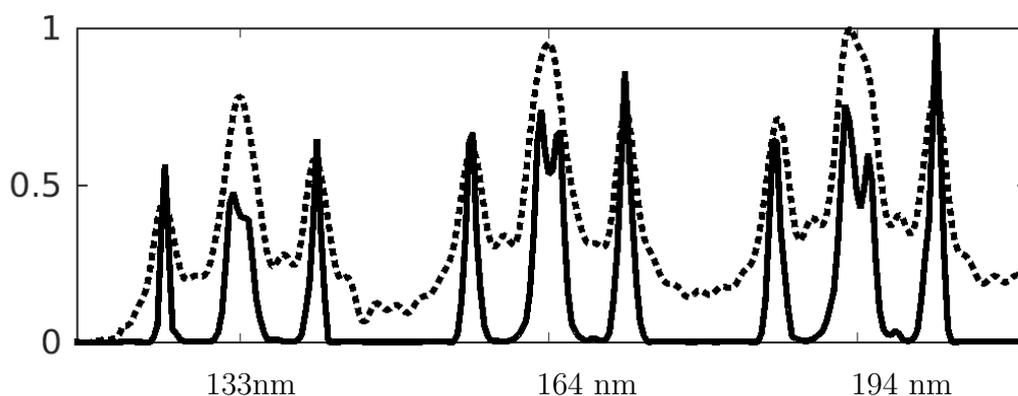


FIGURE 5.6 – Coupes verticales extraites des images (B) et (D) de la figure 5.4 respectivement en ligne pointillée et en trait plein. L'abscisse indique la distance estimée entre les lignes.

résolution, le facteur de super-résolution est ici compris entre 1,18 et 1,70. La reconstruction Fig. 5.4(D), laisse apparaître des variations le long des lignes. Il est difficile d'identifier la provenance de ces variations, elles peuvent venir de l'objet lui même, du fait que l'on utilise un nombre limité d'illuminations de speckle. La séparation en deux lignes nous semble un bon indice de la capacité d'une technique Blind-SIM à identifier des structures plus petites que la résolution d'un microscope à illumination uniforme.

Nous avons également utilisé un ensemble de billes de 100 nanomètres de diamètre pour estimer à partir de quelle distance il est possible de séparer ces billes sur une image large champ à illumination uniforme et sur la reconstruction Blind-SIM à partir d'illuminations de speckle. On peut voir en figure 5.7 que certaines billes ne sont pas résolues dans l'image large champ à éclairage uniforme déconvolué, alors que l'on peut clairement les compter dans l'image reconstruite à partir de 900 images à base d'illuminations de speckle inconnues. La distance minimum de séparation de deux billes observées est estimée à 134 nanomètres dans la reconstruction, contre 234 nanomètres dans la moyenne des images déconvoluées. Le facteur de super-résolution est au minimum de 1,74. Là encore, nous estimons que le fait de pouvoir clairement compter le nombre de billes dans la reconstructions Blind-SIM est un bon indice de la capacité à observer des structures de taille inférieure à la limite de diffraction. Il faut cependant noter que la mire Argolight et les billes sont des objets très parcimonieux. Comme nous l'avons vu au chapitre 4, ces objets exaltent probablement le niveau de super-résolution de la méthode car ils renforcent la parcimonie du produit objet  $\times$  illumination. Nous allons

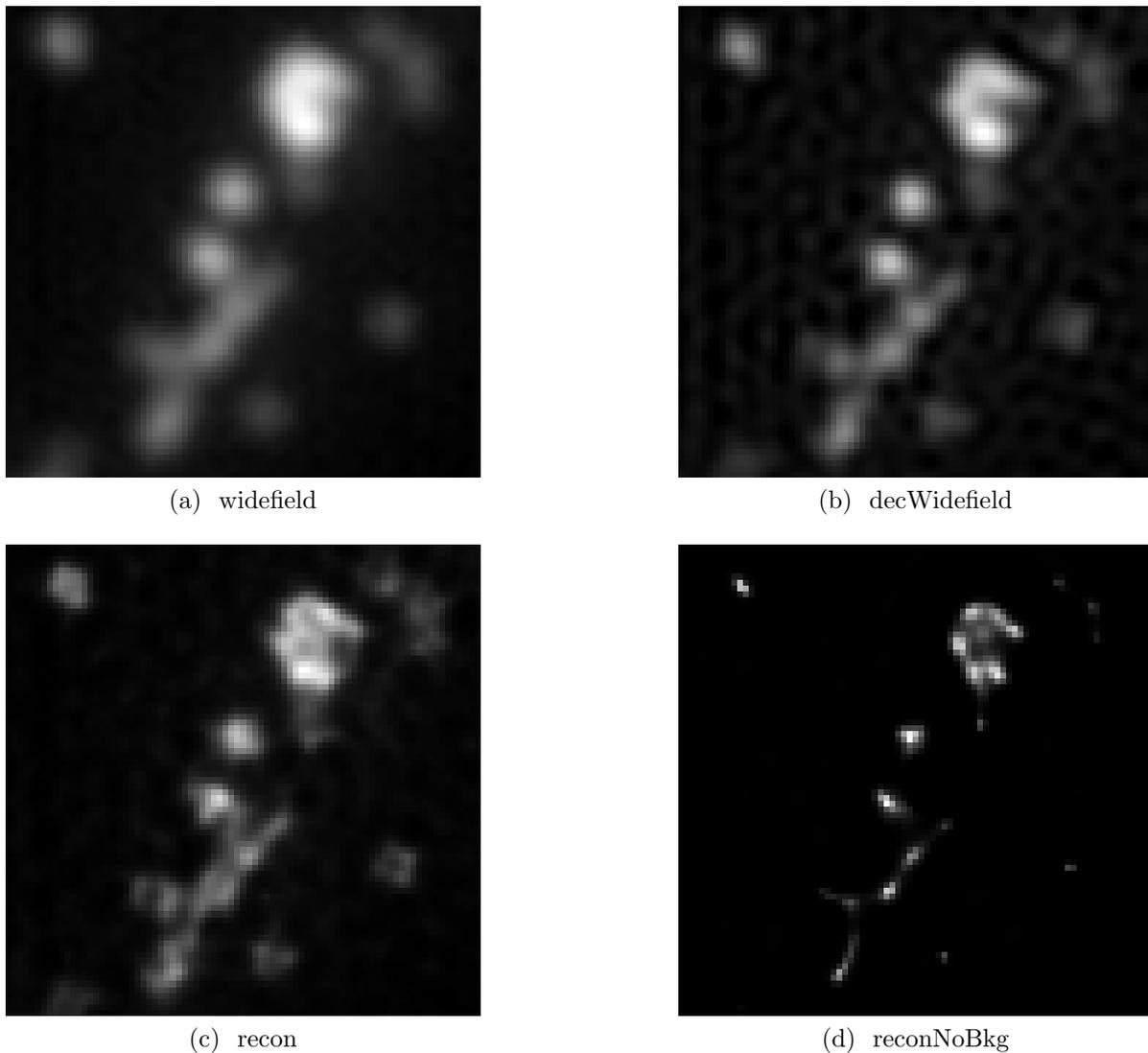


FIGURE 5.7 – Les images présentées sont obtenues à partir d’une microscopie de fluorescence (voir montage 5.1), l’objet observé est composé de billes de diamètre 100 nanomètres. L’objectif utilisé est un X100 avec une ouverture numérique de 1,49 et une huile dont l’indice optique est de 1,515. L’indice optique du milieu de montage est de 1,49 et la longueur d’onde d’excitation est de 488 nanomètres celle de collection est de 520 nanomètres. (A) Moyenne des images basse résolution à base d’illuminations de speckles. (B) Déconvolution de Wiener de l’image (A). La PSF utilisée a été simulée à partir des caractéristiques expérimental en utilisant le modèle optique de Gibson & Lanni implémenté dans le *plug-in PSF Generator* de ICY [4]. (C) Reconstruction Blind-SIM produite par l’algorithme d’estimation jointe (voir le pseudo-code 1) à partir de 900 illuminations de speckle. (D) *Idem* en soustrayant au préalable l’estimée du fond aux acquisitions.

voir cependant que même pour des objets non parcimonieux, il est possible d’identifier des structures de taille inférieure à la limite de résolution.

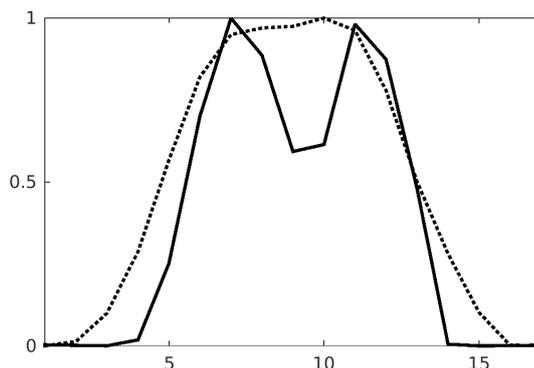


FIGURE 5.8 – Coupes extraites des images (B) et (D) de la figure 5.4 respectivement en ligne pointillée et en trait plein.

## 5.4 Comparaison SIM harmonique et Blind-SIM speckle

En utilisant le montage présenté 5.1, il est possible de générer différents types d'illuminations grâce au SLM. On peut donc, par exemple, générer des illuminations harmoniques, ainsi que des illuminations de speckles. Grâce à cette souplesse, il a été possible d'acquérir en utilisant exactement le même objet des images SIM avec illuminations de speckle et des images avec illuminations harmoniques. Nous présentons ici les résultats de reconstruction obtenues à partir de ces deux jeux d'images. L'objet utilisé est composé de podosomes. Les podosomes sont des structures submicrométriques de cellules d'adhésion, formées à la membrane plasmique. Ces podosomes sondent et remodelent l'environnement extra-cellulaire. Les podosomes sont formés par des macrophages, des cellules dendritiques immatures, des ostéoclastes et ils concernent également les structures protrusives trouvées dans les lymphocytes, les cellules endothéliales, les cellules tumorales invasives ainsi que dans les neurones [117, 118]. Un podosome est donc une petite structure capable de créer des forces de traction et de compression, une partie du podosome forme un anneau servant à adhérer à la matrice extra-cellulaire, c'est cet anneau qui est ici marqué avec des fluorophores (Alexa Fluor 488).

Cette fois, l'échantillon n'est pas parcimonieux, on peut voir sur l'image champ large à illumination uniforme Fig. 5.9(C) que très peu de zones sont éteintes et donc vides (cette image est obtenue en prenant la moyenne des images à base d'illuminations de speckles). Cette image est à comparer à une image à base d'illumination de speckle montrée en Fig. 5.9(B), on peut constater que l'illumination de speckle vient bien « éteindre » localement l'objet en de nombreux endroits. Le produit objet fois illumination est donc « parcimonieux », ce qui explique que l'algorithme joint utilisé pour effectuer les reconstructions permet d'obtenir des informations sur des structures plus petites que la limite de résolution.

L'image Fig. 5.9(D) correspond à la déconvolution d'une image champ large à illumination uniforme, elle permet donc de voir quelles détails sont discernables dans une image obtenue sans illumination structurée. Elle est donc à comparer à l'image Fig. 5.9(F) obtenue en utilisant une reconstruction à partir des images à base d'illuminations har-

moniques en supposant les illuminations connues (voir Sec. 2.1.2). Cet objet étant fin, il est possible de contrôler les illuminations au plan focal. On peut constater que de nombreuses structures apparaissent dans l'image reconstruite, ces structures sont en accord avec les connaissances biologiques que l'on a sur les podosomes, ainsi qu'avec des images obtenues en STED ou en STORM.

La reconstruction Blind-SIM à partir de 800 illuminations de speckles est affichée en Fig. 5.9(E). On peut constater que certaines structures apparaissent en comparaison de l'image champ large déconvoluée Fig. 5.9(D), de plus ces structures sont présentes dans l'image Fig. 5.9(F). Ceci nous conforte dans l'idée que l'on est pas en présence d'artefact mais belle et bien de structure plus petite que la limite de diffraction faisant parti de l'objet.

## 5.5 Conclusion

Ce chapitre a permis de montrer sur des données expérimentales l'intérêt de l'éclairage de speckle pour améliorer la résolution en microscopie de fluorescence.

Le point crucial du traitement des données réelles réside dans l'élimination du fond de fluorescence provenant d'objets hors-focus qui vient détériorer le contraste des images.

Nous avons proposé une estimation efficace de ce fond en utilisant les propriétés statistiques du speckle. Avec ce prétraitement des résolutions comparables à celles obtenues en microscopie à éclairages structurés connus ont été obtenues.

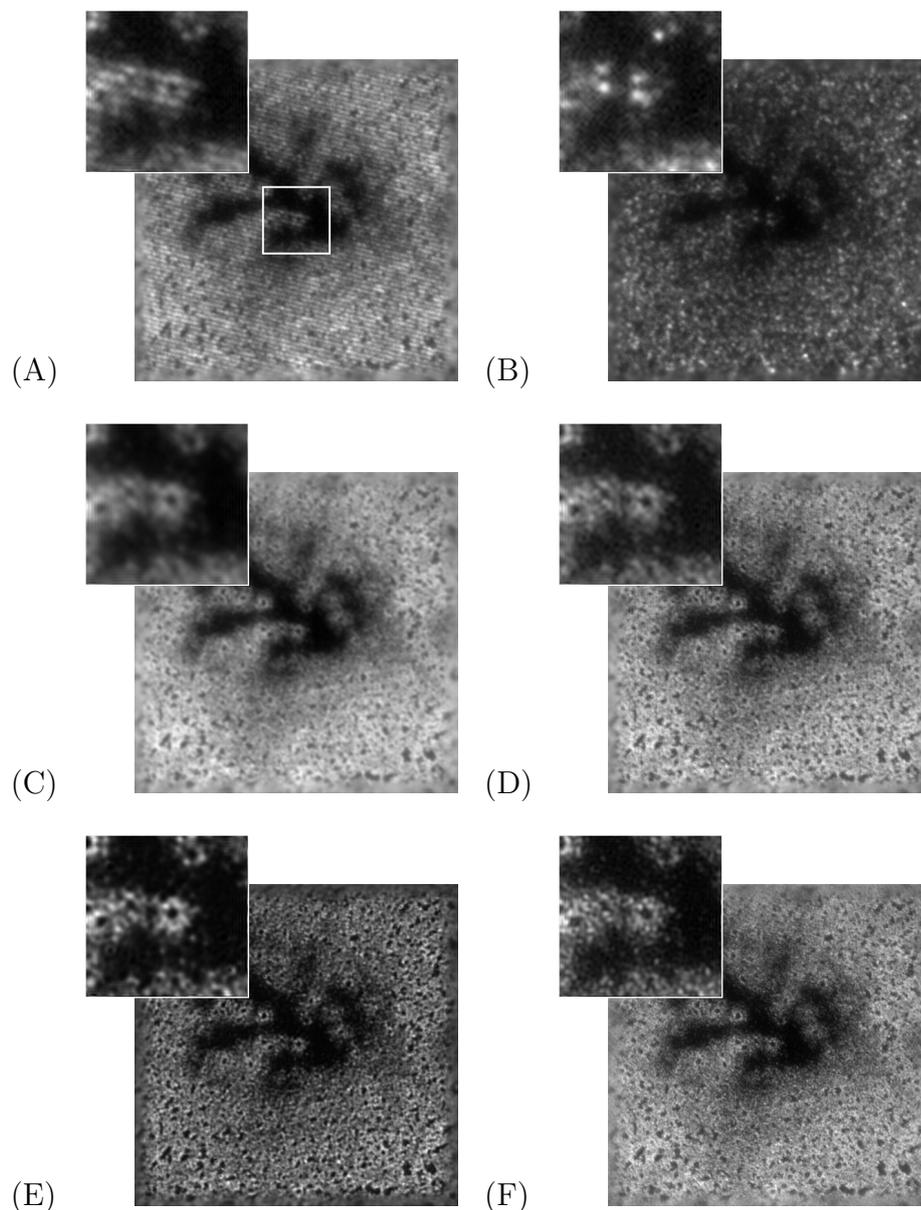


FIGURE 5.9 – Les images présentées sont obtenues à partir d’une microscopie de fluorescence (voir montage 5.1), l’objet observé est composé de podosomes dont l’anneau d’adhésion est marqué avec des fluorophores Alexa Fluor 488. L’objectif utilisé est un X60 avec un NA de 1,40 et une huile à 1,515. Le milieu de montage est de 1,49. La longueur d’onde d’excitation est de 488 nm, celle de collection est de 520 nm. (A) Image obtenue avec une illumination harmonique, 30 images de ce type sont acquises avec 5 phases et 6 directions différentes. (B) Image obtenue avec une illumination de speckle, 800 illuminations de ce type sont utilisées. (C) Image widefield obtenue en sommant l’ensemble des images à base de speckles. (D) Image widefield précédente déconvoluée à l’aide d’un filtre de Wiener. (E) Reconstruction Blind-SIM utilisant le pseudo code 1 à partir des images à illumination de speckle, une estimation du fond (5.2.5) est soustraite aux images avant reconstruction. (F) Reconstruction SIM à illumination connues (2.1.6) à partir des images à illuminations harmoniques. On peut voir une amélioration de la qualité visuelle des images en allant de l’image (C) à (F). On retrouve les nouvelles structures apparaissant grâce à la super-résolution dans l’image Blind-SIM (E) dans l’image (F), ceci nous conforte dans l’idée que ces nouveaux éléments ne sont pas des artefacts.



# Perspectives et conclusions

Le besoin de voir avec une meilleure résolution des phénomènes biologiques, des matériaux, pousse à développer de nouvelles techniques d'imageries. La résolution des imageurs étant limitée, une technique proposée pour améliorer la résolution est d'utiliser l'illumination en tant que degré de liberté supplémentaire afin d'améliorer la capacité de résolution de l'imageur. Dans le cas de la microscopie de fluorescence, un doublement de la résolution spatiale est permis par la structuration des illuminations (SIM), une technique proposée par Heintzmann [10] et Gustafsson [43] au tournant du 21<sup>ème</sup> siècle. La technique SIM nécessite la connaissance des illuminations utilisées et donc un contrôle précis de celles-ci. Ceci induit un montage plus complexe en nombre d'éléments et en calibration, et donc un prix élevé de l'instrument.

L'approche proposée au sein de l'Institut Fresnel [2] abandonne définitivement l'idée de contrôler les illuminations en utilisant des speckles d'intensité. Cette approche *Blind-SIM* permet de garder un montage expérimental simple, plus facile à calibrer et moins coûteux. En contrepartie, la reconstruction super-résolue de l'objet est plus complexe.

Dans cette thèse nous avons proposé une étude des techniques de super-résolution *Blind-SIM*. Notre premier résultat permet notamment de quantifier la capacité de super-résolution théorique des techniques *Blind-SIM* applicable à de nombreux imageurs. Pour un montage en *epi*-fluorescence, un résultat remarquable de notre analyse est que la capacité de super-résolution dans le cas d'illuminations harmoniques connues et dans le cas d'illuminations aléatoires est asymptotiquement la même.

Ces résultats ont également motivé le développement d'un estimateur marginal asymptotiquement consistant. Dans le cas de la microscopie en *epi*-fluorescence, pour un nombre infini d'illuminations différentes, l'estimation proposée est super-résolue avec un facteur deux de super-résolution (*i.e.*, les composantes fréquentielles de l'objet sont identifiées sur un support deux fois plus grand que dans le cas d'une illumination uniforme). De plus pour un nombre d'illumination réaliste (*i.e.*, entre 100 à 1000), l'estimation proposée est super-résolue avec un facteur de super-résolution se rapprochant de deux lorsque le nombre d'illuminations augmente Fig. 3.2. La complexité de cette algorithme ne permet cependant pas de traiter des problèmes de taille réaliste. Une approche à base de *patch* est actuellement développée à Nantes, au LS2N, par J. Idier et ses collaborateurs, ceci afin de réduire la complexité algorithmique en gardant de bonnes propriétés de convergence statistique et une capacité de super-résolution la plus importante possible. Une autre approche est d'utiliser uniquement la variance et la moyenne des mesures pour estimer l'objet.

Une autre stratégie de reconstruction est de considérer que les illuminations doivent également être estimées, conformément à la démarche adoptée dans Mudry *et al.* [2].

Un estimateur joint (Blind-SIM joint) est alors utilisé pour estimer l'objet d'intérêt et les illuminations utilisées. Dans cette thèse, nous avons proposé une formulation du problème permettant de traiter indépendamment chaque images basses fréquences. Nous avons identifié les sources de super-résolution à l'oeuvre dans cette approche en la reliant aux travaux sur le *Near-Black Object* introduit par Donoho [84]. Dans ce cadre, la positivité et la parcimonie du produit objet  $\times$  illumination sont des éléments clés pour la super-résolution. Malheureusement, il semble extrêmement difficile d'étudier la capacité de super-résolution théorique d'un tel estimateur.

Cette thèse aura aussi été l'occasion de développer le PPDS, un algorithme primal-dual à base d'opérateur proximal et préconditionné. Cet algorithme est une variation de l'algorithme proposé par Condat [83, algorithme 3.1] et permet d'accélérer la vitesse de convergence par rapport à des stratégies itératives standard (e.g., FISTA) couramment utilisé pour cette tâche. Cet algorithme permet d'accélérer très sensiblement les reconstructions Blind-SIM.

Pour finir, nous avons abordé le cas du traitement des données réelles dans le cas d'illuminations de speckle en microscopie de fluorescence. Dans la plupart des cas un fond provenant de plans hors-focus ou d'un manque de contraste des illuminations utilisées est présent. Nous avons développé un estimateur de fond dédié à la modalité Blind-SIM à éclairissements de speckle afin de pré-traiter les images issues de l'instrument. Un développement envisagé est d'incorporer cette estimation du fond à l'algorithme Blind-SIM joint, celui-ci estimerait donc conjointement l'objet, les illuminations et le fond.

Des images de microscopie de fluorescence à partir d'illuminations de speckle à deux photons sont en cours d'acquisition afin de démontrer le gain de super-résolution attendu en présence d'illuminations plus parcimonieuses (voir Sec. 4). Le montage expérimental est réalisé par Hilton Barbosa de Aguiar actuellement rattaché au Laboratoire Kastler Brossel. La création d'un montage expérimentale de tomographie de diffraction utilisant des illuminations de speckle (Champ gaussien complexe circulaires) est également envisagé au sein de l'institut Fresnel. Ce travaille devrait permettre de vérifier les prédictions de la Sec. 3, i.e., la capacité à obtenir avec un montage d'holographie digitale les mêmes performances qu'en tomographie de diffraction optique, ceci simplement en utilisant des illuminations aléatoires.

# Annexe A

## Annexe

### A.1 Statistiques des illuminations de speckle

Le caractère aléatoire des illuminations utilisées, allié au caractère aléatoire du bruit de mesure, poussent à voir les images de microscope  $y(\mathbf{r})$  comme la réalisation d'une variable aléatoire. Sous certaines hypothèses les moments statistiques de cette variable aléatoire ont une expression analytique reliée à l'objet d'intérêt  $\rho$ . Ces expressions sont utilisées en section 3.1 où la capacité de super-résolution en éclairements aléatoires est démontrée. De plus selon les simulations réalisées en section 4.1 la proportion de l'illumination proche de zero est un critère important au bon fonctionnement des algorithmes de reconstruction joint. Dans cette annexe, les propriétés statistiques de différents type d'illuminations sont calculées à partir d'éléments supposés connus du montage optique 2.10, la PSF du microscope et la variance de l'amplitude en sortie du diffuseur. Nous verrons que la distribution statistique en un point spatial de l'illumination peut être calculée et on peut donc comparer la probabilité de différents type d'illumination à être proche de zero. L'illumination la plus facile à générer est une illumination de speckle, en effet il suffit d'introduire un diffuseur sur le chemin optique du laser pour générer une figure de speckle au niveau de l'échantillon. On va donc se focaliser sur ce type d'illumination en champ et en intensité, ainsi que sur le cas d'un speckle au carré pouvant être utilisé dans le cas 2 photons (2PE) [37]. il est intéressant de remarquer que les illuminations de speckle sont liées à des distributions maximisant l'entropie, ce qui explique la robustesse et la facilité de générer ce genre d'illuminations.

#### A.1.1 Lois instantanées

Les statistiques d'une illumination de speckle sont intensivement décrites dans la littérature et plus particulièrement dans le livre de J. W. Goodman [16]. Un speckle pleinement développé peut s'écrire comme une somme d'ondes planes dont l'amplitude suit une loi de probabilité de moyenne et de variance définie et dont la phase suit une

lois uniforme entre 0 et  $2\pi$ .

$$E_e(\mathbf{r}, t) = \sum_{k=0}^{\infty} a_k(\mathbf{r}, t) e^{2\pi i \phi_k(\mathbf{r}, t)} \quad (\text{A.1.1})$$

$$a_k(\mathbf{r}, t) \sim \mathcal{T}(\mathbf{r}, t; \theta) \quad \forall k \quad (\text{A.1.2})$$

$$\phi_k(\mathbf{r}, t) \sim \mathcal{U}( ; [0, 2\pi[) \quad \forall k \quad (\text{A.1.3})$$

Il est possible de montrer que le champ électromagnétique  $E_e(\mathbf{r}, t)$  suit une lois Gaussienne complexe circulaire centrée  $\mathcal{N}(\mu, \sigma^2)$ , de même on peut montrer que l'amplitude du champ  $|E_e(\mathbf{r}, t)|$  suit une lois de Rayleigh,  $\mathcal{R}(\sigma^2)$ , l'intensité  $E_i(\mathbf{r}, t) = |E_e(\mathbf{r}, t)|^2$  suit une loi exponentiel  $\mathcal{E}_{xp}(2\sigma^2)$ . Le carré de l'intensité  $|E_e(\mathbf{r}, t)|^4$  suit une loi de Weibull  $W(4\sigma^4, \frac{1}{2})$ , see figure A.1. La distribution exponentiel de l'intensité d'un speckle pleinement développé nous indique que l'intensité de l'illumination sera faible en de nombreux points spatiaux, ce sera d'autant plus le cas pour l'illumination au carre utilisé dans le cas 2 photons [37].

### A.1.2 Moments statistiques d'ordre deux

Dans le montage optique présenté 2.1, l'illumination passe au travers du microscope avant d'atteindre l'échantillon. On modélise le microscope par l'équation de convolution 1.1.2. Le champ électromagnétique au niveau de l'échantillon suit la relation suivante :

$$E_e(\mathbf{r}) = \int_{-\infty}^{+\infty} h_e(\mathbf{r} - \mathbf{x}) A(\mathbf{x}) d\mathbf{x} \quad (\text{A.1.4})$$

avec  $h_e$  la PSF en champ du microscope (par exemple dans le cas 3D  $h_e$  correspond à une calotte de sphère 1.3),  $A$  le champ électromagnétique immédiatement après le diffuseur. Si  $A$  est un champ gaussien centré,  $E_e$  l'est aussi. Si l'on considère que l'étendue de la corrélation du champ  $A$  est négligeable [16, p74],  $A$  est alors un champ gaussien centré non corrélé, on peut alors montrer que l'auto-corrélation spatial du champ d'excitation est :

$$\Gamma_{E_e}(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \mathcal{E}( E_e(\mathbf{r}) E_e^*(\mathbf{r}') ) - \mathcal{E}(E_e(\mathbf{r})) \mathcal{E}(E_e(\mathbf{r}'))^* \quad (\text{A.1.5})$$

$$= \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} h_e(\mathbf{r} - \mathbf{x}) h_e^*(\mathbf{r}' - \mathbf{x}') \mathcal{E}( A(\mathbf{x}) A^*(\mathbf{x}') ) d\mathbf{x} d\mathbf{x}' \quad (\text{A.1.6})$$

$$= \sigma^2 \times \int_{-\infty}^{+\infty} h_e(\mathbf{r} - \mathbf{x}) h_e^*(\mathbf{r}' - \mathbf{x}) d\mathbf{x} \quad (\text{A.1.7})$$

$$= \sigma^2 \times h_e(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \quad (\text{A.1.8})$$

avec  $\mathcal{E}(\cdot)$  l'opérateur d'espérance statistique. Ici, on a considéré que la transformée de Fourier de  $h_e$  est dans notre cas une fonction prenant pour valeur 0 ou 1 (c'est le cas pour une calotte de sphère en 3D et pour une pupille en 2D), on a donc  $\int_{-\infty}^{+\infty} h_e(\mathbf{r} - \mathbf{x}) h_e^*(\mathbf{r}' - \mathbf{x}) d\mathbf{x} = h_e(\mathbf{r} - \mathbf{r}')$ .

La corrélation de l'intensité d'excitation peut elle aussi être calculée :

$$\begin{aligned}\Gamma_{E_i}(\mathbf{r}, \mathbf{r}') &= \mathcal{E}( E_i(\mathbf{r})E_i^*(\mathbf{r}') ) - \mathcal{E}(E_i(\mathbf{r})) \mathcal{E}(E_i(\mathbf{r}'))^* \\ &= \mathcal{E}( E_e(\mathbf{r})E_e^*(\mathbf{r})E_e(\mathbf{r}')E_e^*(\mathbf{r}') )\end{aligned}\quad (\text{A.1.9})$$

$$\begin{aligned}&\quad - \mathcal{E}( E_e(\mathbf{r})E_e^*(\mathbf{r}) ) \mathcal{E}( E_e(\mathbf{r}')E_e^*(\mathbf{r}') ) \\ &= \mathcal{E}( E_e^*(\mathbf{r})E_e(\mathbf{r}') ) \mathcal{E}( E_e(\mathbf{r})E_e^*(\mathbf{r}') )\end{aligned}\quad (\text{A.1.10})$$

$$\begin{aligned}&= \sigma^4 \times |h_e(\mathbf{r}' - \mathbf{r})|^2 \\ &= \sigma^4 \times h_i(\mathbf{r}' - \mathbf{r})\end{aligned}\quad (\text{A.1.11})$$

avec  $h_i$  la PSF en intensité du microscope (voir 2.4 pour le cas 2D et 2.5 pour le cas 3D). L'étape pour passer de la ligne (A.1.9) à (A.1.10) nécessite que le champ soit Gaussien centré.

De la même manière il est possible de calculer la corrélation d'un speckle au carre utilisé dans le cas de la microscopie 2 photons :

$$\Gamma_{E_i^2}(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = 4\sigma^8 \times ( h_i(\mathbf{r}' - \mathbf{r})^2 + 4 \times h_i(\mathbf{r}' - \mathbf{r}) \times h_i(0) )\quad (\text{A.1.12})$$

Par la suite on supposera que la PSF  $h$  du microscope utilisé est connue, les corrélations calculées précédemment seront elles aussi supposées connues à un facteur prêt. On suppose ici que l'objet observé n'interagit pas avec l'illumination auquel cas ces calculs ne sont plus valables, on peut cependant retomber sur des illuminations de speckle avec une corrélation similaire dans le cas où l'illumination se propage dans un milieu complexe fortement diffusant, dans ce cas le domaine fréquentiel de l'illumination est dans certain cas une boule de rayon  $\frac{\lambda}{2n}$  avec  $\lambda$  la longueur d'onde de l'illumination et  $n$  l'indice optique moyen du milieu dans lequel se propage l'illumination [119].

## A.2 Statistiques des mesures

Le caractère aléatoire des illuminations utilisées, pousse à voir les images de microscope même en l'absence de bruit  $x(\mathbf{r})$  comme la réalisation d'une variable aléatoire.

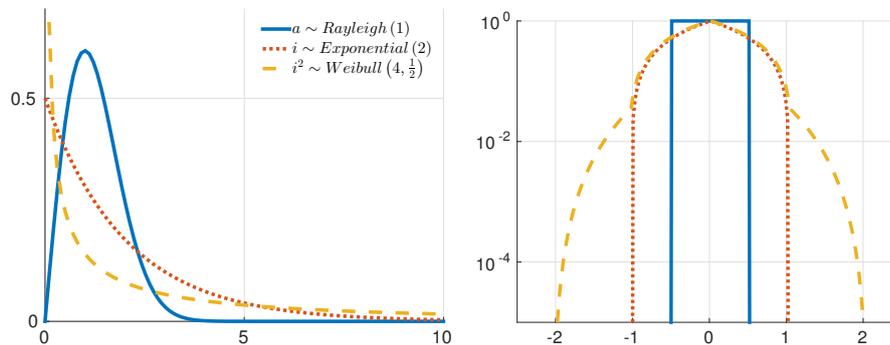


FIGURE A.1 – gauche : Distribution de probabilité en un point spatial dans le cas d'une illumination de speckle pleinement développé, en trait plein pour l'amplitude, en pointillé pour l'intensité et en trait interrompu pour l'intensité au carre droite : densité spectrale d'une illumination de speckle pleinement développé 1D en échelle logarithmique , en trait plein pour l'amplitude, en pointillé pour l'intensité et en trait interrompu pour l'intensité au carre

Sous certaines hypothèses les moments statistiques de cette variable aléatoire ont une expression analytique reliée à l'objet d'intérêt  $\rho$ . Ces expressions sont utilisées en section 3.1 ou la capacité de super-résolution en éclairiments aléatoires est démontrée.

### A.2.1 Statistiques des mesures sans bruit d'instrument

La distribution suivit par les mesures non bruitées dépend de la nature des illuminations utilisées et donc du type de montage considéré, cependant l'expression des moments statistiques d'ordre deux reste toujours la même et dépend uniquement de la PSF  $h$ , de la corrélation de l'illumination utilisée  $\Gamma_E$  et de l'objet :

$$\begin{aligned}\mu_x(\mathbf{r}) &= \mathcal{E}(x(\mathbf{r})) & (A.2.1) \\ &= \mathcal{E}\left(\int_{-\infty}^{\infty} h(\mathbf{r} - \mathbf{p}) E(\mathbf{p}) \rho(\mathbf{p}) d\mathbf{p}\right) \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} h(\mathbf{r} - \mathbf{p}) \mathcal{E}(E(\mathbf{p})) \rho(\mathbf{p}) d\mathbf{p} \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} h(\mathbf{r} - \mathbf{p}) \mu_E(\mathbf{p}) \rho(\mathbf{p}) d\mathbf{p}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\Gamma_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}') &= \mathcal{E}(x(\mathbf{r}) x^*(\mathbf{r}')) - \mathcal{E}(x(\mathbf{r})) \mathcal{E}(x^*(\mathbf{r}')) & (A.2.2) \\ &= \mathcal{E}\left(\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} h(\mathbf{r} - \mathbf{p}) h^*(\mathbf{r}' - \mathbf{p}') E(\mathbf{p}) E^*(\mathbf{p}') \rho(\mathbf{p}) \rho^*(\mathbf{p}') d\mathbf{p} d\mathbf{p}'\right) \\ &\quad - \mathcal{E}(x(\mathbf{r})) \mathcal{E}(x^*(\mathbf{r}')) \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} h(\mathbf{r} - \mathbf{p}) h^*(\mathbf{r}' - \mathbf{p}') \Gamma_E(\mathbf{p} - \mathbf{p}') \rho(\mathbf{p}) \rho^*(\mathbf{p}') d\mathbf{p} d\mathbf{p}'\end{aligned}$$

avec  $\mathcal{E}(\cdot)$  l'opérateur d'espérance statistique.

### A.2.2 Statistiques des mesures avec bruit d'instrument

L'expression des moments statistiques des mesures  $y(\mathbf{r})$  dépend de la modélisation du bruit employée, nous allons traiter ici le cas de la microscopie de fluorescence avec un montage en *epi*-fluorescence 2.1. On modélise le bruit de comptage par une distribution de Poisson et le bruit de lecture par une distribution Gaussienne de paramètres supposés connus :

$$x(\mathbf{r}) = [h \otimes (\rho \times E)](\mathbf{r}) \quad (A.2.3)$$

$$p(\mathbf{r}) \sim \mathcal{P}(x(\mathbf{r})) \quad (A.2.4)$$

$$\epsilon(\mathbf{r}) \sim \mathcal{N}(\mu_\epsilon(\mathbf{r}), \sigma_\epsilon(\mathbf{r})^2) \quad (A.2.5)$$

$$y(\mathbf{r}) = p(\mathbf{r}) + \epsilon(\mathbf{r}). \quad (A.2.6)$$

On peut maintenant calculer la moyenne des mesures :

$$\begin{aligned}\mu_y(\mathbf{r}) &= \mathcal{E}(y(\mathbf{r})) \\ &= \mathcal{E}(\mathcal{E}(y(\mathbf{r}) | E)) \\ &= \mathcal{E}(x(\mathbf{r}) + \mu_\epsilon(\mathbf{r})) \\ &= \mu_x(\mathbf{r}) + \mu_\epsilon(\mathbf{r})\end{aligned} \quad (A.2.7)$$

avec

$$\mu_x(\mathbf{r}) = [h \otimes (\rho \times \mu_E)](\mathbf{r}).$$

Avant de calculer la corrélation des mesures on commence par calculer la corrélation de  $p(\mathbf{r})$  :

$$\begin{aligned} \Gamma_p(\mathbf{r}, \mathbf{r}') &= \mathcal{E}(\mathcal{E}(p(\mathbf{r}) p^*(\mathbf{r}') | E)) - \mathcal{E}(\mathcal{E}(p(\mathbf{r}) | E)) \mathcal{E}(\mathcal{E}(p^*(\mathbf{r}') | E)) \\ &= \mathcal{E}(x(\mathbf{r}) x^*(\mathbf{r}') + x(\mathbf{r}) * \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')) - \mathcal{E}(x(\mathbf{r})) \mathcal{E}(x^*(\mathbf{r}')) \\ &= \Gamma_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}') + \mathcal{E}(x(\mathbf{r})) * \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \end{aligned}$$

La corrélation des mesures  $y(\mathbf{r})$  s'écrit alors :

$$\begin{aligned} \Gamma_y(\mathbf{r}, \mathbf{r}') &= \Gamma_p(\mathbf{r}, \mathbf{r}') + \Gamma_\epsilon(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \\ &= \Gamma_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}') + (\mu_x(\mathbf{r}) + \sigma_\epsilon^2(\mathbf{r})) * \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \end{aligned} \quad (\text{A.2.8})$$

avec  $\Gamma_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$  calculé précédemment (A.2.2).

**Remarque 3** Si on suppose les deux moments statistiques,  $\mu_\epsilon$  et  $\sigma_\epsilon$ , du bruit additif connues, il est alors possible d'identifier  $\Gamma_x$  à partir de  $\Gamma_y$  et  $\mu_y$  en utilisant les relations (A.2.8) et (A.2.7). Les résultats du chapitre 3 sont donc applicables au cas de la microscopie de fluorescence en présence d'un bruit de grenaille que l'on suppose suivre une loi de Poisson et d'un bruit de lecture que l'on suppose suivre une loi Normale.

## A.3 Problème joint sans contrainte de positivité

Dans cette section, nous allons montrer que le problème Blind-SIM joint sans pénalisation et sans contraintes à une solution analytique, de plus nous allons montrer que cette solution ne dépend pas du contenu fréquentielle de l'objet en dehors du domaine de l'OTF  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$ . On considère donc le problème à résoudre suivant :

$$\begin{aligned} \min_{\rho, \{\mathbf{I}_m\}} \quad & \sum_{m=1}^M \|\mathbf{y}_m - \mathbf{H}(\rho \odot \mathbf{I}_m)\|^2 \\ \text{sujet à} \quad & \sum_m \mathbf{I}_m = M \times \mathbf{I}_0 \end{aligned}$$

Comme on la vu au début de la section (4.1), on peut reformuler de manière équivalente ce problème, on doit alors résoudre pour chaque images le problème suivant :

$$\min_{\mathbf{q}_m} \|\mathbf{y}_m - \mathbf{H} \mathbf{q}_m\|^2$$

En calculant le gradient du critère à minimiser, on peut montrer que les solutions  $\hat{\mathbf{q}}_m$  respectent l'équation suivante :

$$\mathbf{H}^t \mathbf{H} \hat{\mathbf{q}}_m = \mathbf{H}^t \mathbf{y}_m$$

On peut remarquer à cette étape que le contenu fréquentielle de  $\hat{\mathbf{q}}_m$  en dehors du support de l'OTF n'a pas d'impact sur le respect ou non de l'égalité précédente. On peut d'ailleurs écrire les solutions sous la forme :

$$\hat{\mathbf{q}}_m = \mathbf{H}^+ \mathbf{y}_m + \mathbf{q}_m^\perp$$

avec  $(.)^+$  la matrice pseudo inverse et  $\mathbf{q}_m^\perp$  une variable appartenant à l'ensemble  $\{x, \mathbf{H}x = 0\}$  donc avec un contenu fréquentiel uniquement en dehors de  $\mathcal{D}_{\text{PSF}}$  et quelconque. On peut ensuite incorporer ces solutions dans l'étape finale (4.1.3a) pour obtenir l'expression (4.1.4a). Il n'y a donc pas de super résolution dans les solutions du problème sans la contrainte de positivité.

## A.4 Démonstration de la propriété 3

Appelons  $q$  la réponse impulsionnelle du filtre définie dans le domaine de Fourier par

$$\tilde{q}(\mathbf{k}) = \tilde{\Gamma}_E^{1/2}(\mathbf{k}) \quad \text{si } \mathbf{k} \in \mathcal{D}_{\text{spec}}, \quad 0 \text{ sinon.}$$

comme pour  $\Gamma_E$ ,  $q$  est définie semi-positif, c'est donc une fonction symétrique Hermittienne. On peut donc écrire l'égalité suivante :  $\tilde{\Gamma}_E = \tilde{q}^2$ , ainsi que :

$$\Gamma_E = q \otimes q. \tag{A.4.1}$$

Définissons maintenant les noyaux suivant :

$$f(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \int q(\mathbf{r} - \mathbf{x}) \bar{q}(\mathbf{r}' - \mathbf{x}) \rho(\mathbf{x}) d\mathbf{x}, \tag{A.4.2}$$

$$F(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \int f(\mathbf{r}, \mathbf{r}'') \bar{f}(\mathbf{r}', \mathbf{r}'') d\mathbf{r}'' . \tag{A.4.3}$$

ainsi que les opérateurs intégraux associés  $K_f$  et  $K_F$  :

$$K_f \phi(\mathbf{r}) = \int f(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \phi(\mathbf{r}') d\mathbf{r}',$$

$$K_F \phi(\mathbf{r}) = \int F(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \phi(\mathbf{r}') d\mathbf{r}' .$$

Selon l'inégalité de Cauchy-Schwartz on a,

$$|f(\mathbf{r}, \mathbf{r}')|^2 \leq \int |q(\mathbf{r} - \mathbf{x})|^2 \rho(\mathbf{x}) d\mathbf{x} \int |q(\mathbf{r}' - \mathbf{x})|^2 \rho(\mathbf{x}) d\mathbf{x} .$$

Ce qui a pour conséquence,

$$\iint |f(\mathbf{r}, \mathbf{r}')|^2 d\mathbf{r} d\mathbf{r}' \leq \left( \int |q(\mathbf{r})|^2 d\mathbf{r} \int \rho(\mathbf{x}) d\mathbf{x} \right)^2 ,$$

ou  $\rho$  est intégrable, et

$$\int |q(\mathbf{r})|^2 d\mathbf{r} = \int \tilde{\Gamma}_E(\mathbf{u}) d\mathbf{u} = \Gamma_E(0) < \infty .$$

On a donc

$$\iint |f(\mathbf{r}, \mathbf{r}')|^2 d\mathbf{r} d\mathbf{r}' < \infty ,$$

*i.e.*,  $f \in L^2(\mathbb{R}^d \times \mathbb{R}^d; \mathbb{C})$ , on en déduit que  $K_f$  est un opérateur intégrale de Hilbert-Schmidt [120, Proposition 3.4.16]. D'un autre coté, l'opérateur intégrale  $K_F$  est le carré

de  $K_f$ , au sens où  $K_F \phi = K_f K_f \phi$  quelque soit  $\phi$ . Donc  $K_F$  est aussi un opérateur intégrale de Hilbert-Schmidt.

Maintenant allons directement au coeur de la preuve qui se déroule en trois parties. La première étape est de montrer que le noyau de  $F$  est définie de manière unique à partir de  $\Gamma_x$ . Dans une deuxième étape, on établie le fait que  $f$  est définie de manière unique à partir de  $F$  en sachant (A.4.3). Arrivé à ce point, on peut conclure que la connaissance de  $\Gamma_x$  implique celle de  $f$ , qui est une fonction linéaire en  $\rho$  (alors que la dépendance de  $\Gamma_x$  en  $\rho$  est quadratique). La dernière étape consiste à faire une analyse de Fourier de  $f$ , de façon à déterminer quelles composantes spectrales de  $\rho$  sont identifiables grâce à la connaissance de  $f$ .

*Étape 1)* En sachant (A.4.2) et (A.4.1), on a les expressions alternatives suivantes pour (A.4.3) :

$$F(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \iint \rho(\mathbf{x}) \rho(\mathbf{x}') q(\mathbf{r} - \mathbf{x}) \bar{q}(\mathbf{r}' - \mathbf{x}') \Gamma_E(\mathbf{x} - \mathbf{x}') d\mathbf{x} d\mathbf{x}'. \quad (\text{A.4.4})$$

En comparant cette dernière expression à (3.1.4), il est claire que dans le cas où  $q = h$  on a  $F = \Gamma_x$ , *i.e.*, quand la corrélation du speckle est  $\otimes h$ . Plus généralement, en utilisant une double transformée de Fourier sur (A.4.4), de la même façon que l'on a obtenue (3.1.6) de (3.1.4), on a

$$\begin{aligned} \tilde{F}(\mathbf{k}, \mathbf{k}') &= \tilde{q}(\mathbf{k}) \tilde{q}(-\mathbf{k}') \tilde{g}(\mathbf{k}, \mathbf{k}') \\ &= \frac{\tilde{q}(\mathbf{k}) \tilde{q}(-\mathbf{k}')}{\tilde{h}(\mathbf{k}) \tilde{h}(-\mathbf{k}')} \tilde{\Gamma}_x(\mathbf{k}, \mathbf{k}') && \text{si } \mathbf{k}, \mathbf{k}' \in \mathcal{D}_{\text{spec}}, \end{aligned} \quad (\text{A.4.5})$$

$$= 0 \quad \text{sinon.} \quad (\text{A.4.6})$$

On peut remarquer que  $\tilde{h}(\mathbf{k}) \neq 0$  si  $\mathbf{k} \in \mathcal{D}_{\text{spec}}$  car on a assumé  $\mathcal{D}_{\text{spec}} \subseteq \mathcal{D}_{\text{PSF}}$ .

*Étape 2)* Le noyau  $f$  est évidemment symétrique. De plus, il est semi-définie positif, puisque pour toute fonction  $\phi$  de carrée intégrable,

$$\iint f(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \phi(\mathbf{r}) \bar{\phi}(\mathbf{r}') d\mathbf{r} d\mathbf{r}' = \int |q \otimes \phi|^2(\mathbf{x}) \rho(\mathbf{x}) d\mathbf{x} \geq 0.$$

Il est facile de vérifier que le noyau  $F$  est aussi semi-définie positif. De plus  $K_F$  est borné, puisque que c'est un opérateur de Hilbert-Schmidt. Étant borné et semi-définie positif,  $K_F$  admet une unique racine carré semi-définie positive [120, Prop. 3.2.11] En d'autres termes,  $K_f$  est définie de manière unique à partir de  $K_F$ , et de manière équivalente à partir du noyau  $F$ , il existe un unique noyau  $f$  qui respecte (A.4.3). Finalement, on a montré que la connaissance de  $\Gamma_x$  détermine de manière unique  $F$  grâce aux relations (A.4.5)-(A.4.6), est donc détermine aussi  $f$ .

*Étape 3)* L'équation (A.4.2) peut être écrite de la manière suivante dans le domaine de Fourier :

$$\tilde{f}(\mathbf{k}, \mathbf{k}') = \tilde{q}(\mathbf{k}) \tilde{q}(-\mathbf{k}') \tilde{\rho}(\mathbf{k} + \mathbf{k}'). \quad (\text{A.4.7})$$

Cette dernière expression est très similaire à (3.1.11) obtenue pour le cas d'un speckle dé-corrélé. De manière similaire on peut déduire que les composantes fréquentielle  $\tilde{\rho}(\mathbf{k})$  sont identifiable à partir du noyau  $f$ , et donc à partir de la corrélation des données sans bruit  $\Gamma_x$ , pour tout  $\mathbf{k} \in \mathcal{D}_{\text{spec}} \ominus \mathcal{D}_{\text{spec}}$ .

## A.5 Gradient de la divergence de Kullback-Leibler

On commence par remarquer que l'équation (3.2.7) s'écrit aussi

$$D(\boldsymbol{\rho}) = \frac{1}{2} \log \det \boldsymbol{\Gamma}_y + \frac{1}{2M} \text{Tr} (\boldsymbol{\Gamma}_y^{-1} \mathbf{V} \mathbf{V}^t) + C \quad (\text{A.5.1})$$

ou  $C$  est un terme constant qui n'a ici pas d'importance, et

$$\mathbf{V} = (\mathbf{v}_1 | \cdots | \mathbf{v}_M) \quad \text{avec} \quad \mathbf{v}_m = \mathbf{y}_m - \boldsymbol{\mu}_y. \quad (\text{A.5.2})$$

Les formules de dérivations [121, Sec. 2] suivantes vont être utiles pour calculer l'expression du gradient de (A.5.1) :

$$\begin{aligned} \nabla_{\theta} \log \det \mathbf{A} &= \text{Tr} (\mathbf{A}^{-1} (\nabla_{\theta} \mathbf{A})) \\ \nabla_{\theta} (\mathbf{A}^{-1}) &= -\mathbf{A}^{-1} (\nabla_{\theta} \mathbf{A}) \mathbf{A}^{-1} \\ \nabla_{\theta} (\mathbf{A} \mathbf{B}) &= (\nabla_{\theta} \mathbf{A}) \mathbf{B} + \mathbf{A} (\nabla_{\theta} \mathbf{B}) \\ \nabla_{\theta} \text{Tr} (\mathbf{A}) &= \text{Tr} (\nabla_{\theta} \mathbf{A}) \\ \nabla_{\theta} (\mathbf{A}^t) &= (\nabla_{\theta} \mathbf{A})^t \end{aligned} \quad (\text{A.5.3})$$

ou  $\mathbf{A}$  et  $\mathbf{B}$  sont deux matrices dépendantes d'un paramètre scalaire réel  $\theta$ . A partir de ces relations on obtient

$$\begin{aligned} \partial_n D(\boldsymbol{\rho}) &= \frac{1}{2} \text{Tr} (\boldsymbol{\Gamma}_y^{-1} (\partial_n \boldsymbol{\Gamma}_y)) \\ &+ \frac{1}{2M} \text{Tr} ((\partial_n \boldsymbol{\Gamma}_y^{-1}) \mathbf{V} \mathbf{V}^t + \boldsymbol{\Gamma}_y^{-1} \partial_n (\mathbf{V} \mathbf{V}^t)) \end{aligned} \quad (\text{A.5.4})$$

ou  $\partial_n = \nabla_{\rho_n}$ . Le gradient de (A.5.1) est alors définie par

$$\nabla D(\boldsymbol{\rho}) = \mathbf{vect} \{ \partial_n D(\boldsymbol{\rho}) \} \quad (\text{A.5.5})$$

ou  $\mathbf{vect} \{v_n\} = (v_1 | \cdots | v_N)^t$ . D'après (A.5.4) et (A.5.3), l'expression de  $\partial_n \boldsymbol{\Gamma}_y$  et  $\partial_n (\mathbf{V} \mathbf{V}^t)$  sont requises. Appelons  $\mathbf{e}_n$  le  $n$ ème vecteur de la base canonique,  $\mathbf{h}_n$  la  $n$ ème colonne de la matrice  $\mathbf{H}$  et  $\mathbf{1} = (1 \cdots 1)^t$ . on obtient en utilisant (3.2.4) et (3.2.5)

$$\partial_n \boldsymbol{\Gamma}_y = \mathbf{H} \Delta \boldsymbol{\Gamma}_E \mathbf{e}_n \mathbf{h}_n^t + (\mathbf{H} \Delta \boldsymbol{\Gamma}_E \mathbf{e}_n \mathbf{h}_n^t)^t \quad (\text{A.5.6})$$

et avec (A.5.2) :

$$\partial_n (\mathbf{V} \mathbf{V}^t) = -E_0 (\mathbf{V} \mathbf{1} \mathbf{h}_n^t + (\mathbf{V} \mathbf{1} \mathbf{h}_n^t)^t). \quad (\text{A.5.7})$$

On peut maintenant calculer les trois termes de (A.5.4). Dans un premier temps de simple manipulations impliquant l'opérateur trace permettent de voir que

$$\text{Tr} (\boldsymbol{\Gamma}_y^{-1} (\partial_n \boldsymbol{\Gamma}_y)) = 2 \mathbf{e}_n^t \mathbf{W} \mathbf{h}_n \quad (\text{A.5.8})$$

à partir de (A.5.6), avec  $\mathbf{W} = \boldsymbol{\Gamma}_E \Delta \mathbf{H}^t \boldsymbol{\Gamma}_y^{-1}$ . Dans un second temps, on a d'après (A.5.3) ET (A.5.6) :

$$\text{Tr} ((\partial_n \boldsymbol{\Gamma}_y^{-1}) \mathbf{V} \mathbf{V}^t) = -2 \mathbf{e}_n^t (\mathbf{W} \mathbf{V} \mathbf{V}^t \boldsymbol{\Gamma}_y^{-1}) \mathbf{h}_n \quad (\text{A.5.9})$$

et d'après (A.5.7) :

$$\text{Tr}(\boldsymbol{\Gamma}_y^{-1} \partial_n(\mathbf{V}\mathbf{V}^t)) = -2 E_0 \mathbf{h}_n^t \boldsymbol{\Gamma}_y^{-1} \mathbf{V} \mathbf{1}. \quad (\text{A.5.10})$$

Selon (A.5.4) et (4.2.6), on doit vectoriser les relations (A.5.8), (A.5.9) et (A.5.10) pour obtenir le gradient final (A.5.1). D'après la formule,

$$((\mathbf{A} \text{Diag}(\boldsymbol{\rho}) \mathbf{B}^t) \circ \mathbf{I}) \mathbf{1} = (\mathbf{A} \circ \mathbf{B}) \boldsymbol{\rho}, \quad (\text{A.5.11})$$

on déduit avec (A.5.8) que

$$\begin{aligned} \mathbf{vect} \{ \text{Tr}(\boldsymbol{\Gamma}_y^{-1} (\partial_n \boldsymbol{\Gamma}_y)) \} &= 2 ((\mathbf{W} \mathbf{H}) \circ \mathbf{I}) \mathbf{1} \\ &= 2 ((\mathbf{H}^t \boldsymbol{\Gamma}_y^{-1} \mathbf{H}) \circ \boldsymbol{\Gamma}_E) \boldsymbol{\rho}. \end{aligned} \quad (\text{A.5.12})$$

De la même manière, on obtient à l'aide de quelques opérations

$$\frac{1}{M} \mathbf{vect} \{ \text{Tr}((\partial_n \boldsymbol{\Gamma}_y^{-1}) \mathbf{V}\mathbf{V}^t) \} = -\frac{2}{M} ((\boldsymbol{\Omega}^t \mathbf{V}\mathbf{V}^t \boldsymbol{\Omega}) \circ \boldsymbol{\Gamma}_E) \boldsymbol{\rho} \quad (\text{A.5.13})$$

et

$$\frac{1}{M} \mathbf{vect} \{ \text{Tr}(\boldsymbol{\Gamma}_y^{-1} \partial_n(\mathbf{V}\mathbf{V}^t)) \} = -\frac{2}{M} E_0 \boldsymbol{\Omega} \mathbf{V} \mathbf{1} \quad (\text{A.5.14})$$

ou  $\boldsymbol{\Omega} = \boldsymbol{\Gamma}_y^{-1} \mathbf{H}$ . En résultats final, l'expression du gradient (A.5.4) s'écrit

$$\begin{aligned} \nabla D(\boldsymbol{\rho}) &= \\ &- \left( \left( \boldsymbol{\Omega}^t \left( \frac{1}{M} \mathbf{V}\mathbf{V}^t - \boldsymbol{\Gamma}_y \right) \boldsymbol{\Omega} \right) \circ \boldsymbol{\Gamma}_E \right) \boldsymbol{\rho} - \frac{1}{M} E_0 \boldsymbol{\Omega} \mathbf{V} \mathbf{1}. \end{aligned} \quad (\text{A.5.15})$$

où finalement, les relations suivantes sont utilisées :

$$\begin{aligned} \mathbf{V} &= (z_1 - \hat{\boldsymbol{\mu}} | \dots | z_M - \hat{\boldsymbol{\mu}}) + \boldsymbol{\delta}_\mu \mathbf{1}^t, \\ \frac{1}{M} \mathbf{V}\mathbf{V}^t &= \hat{\boldsymbol{\Gamma}}_y + \boldsymbol{\delta}_\mu \boldsymbol{\delta}_\mu^t, \end{aligned}$$

cette formulation du gradient permet de calculer l'expression du gradient de (3.2.10), en sachant que  $\nabla J(\boldsymbol{\rho}) = \nabla D(\boldsymbol{\rho}) + \beta \boldsymbol{\rho}$ .

## A.6 Démonstration de la convergence uniforme de $J_M(\boldsymbol{\theta})$ vers $J(\theta^*, \theta)$

Pour montrer la convergence uniforme de  $J_M(\boldsymbol{\theta})$  vers  $J(\theta^*, \theta)$ , on peut noter que :

$$D_M(\boldsymbol{\rho}) - D^*(\boldsymbol{\rho}) = \text{Tr}(\boldsymbol{\Gamma}_y^{-1} (\hat{\boldsymbol{\Gamma}}_y - \boldsymbol{\Gamma}_y^*)) + \log \frac{|\boldsymbol{\Gamma}_y^*|}{|\hat{\boldsymbol{\Gamma}}_y|} \quad (\text{A.6.1})$$

Comme la matrice de covariance  $\mathbf{H} \text{Diag}(\boldsymbol{\rho}) \boldsymbol{\Gamma}_E \text{Diag}(\boldsymbol{\rho})^\dagger \mathbf{H}^\dagger$  est semi-définie positive, on peut appliquer l'inégalité de Weyl [122] à la formule 3.2.5 , ce qui donne :

$$\lambda_{\min}(\boldsymbol{\Gamma}_y) \geq \lambda_{\min}(\boldsymbol{\Gamma}_\epsilon)$$

ou  $\lambda_{\min}(A)$  représente la plus petite valeur propre de la matrice  $A$ . Comme  $\Gamma_y^{-1}$  est une matrice symétrique, sa norme peut être définie comme sa plus grande valeur propre :

$$\|\Gamma_y^{-1}\| = \lambda_{\max}(\Gamma_y^{-1}) = \frac{1}{\lambda_{\min}(\Gamma_y)} \leq \frac{1}{\sigma^2} \quad (\text{A.6.2})$$

avec  $\sigma^2 = \lambda_{\min}(\Gamma_\epsilon)$ . En combinant (3.2.6)(A.6.1)(A.6.2), on obtient :

$$\sup_{\rho \in \mathbb{R}^N} |D_M(\rho) - D^*(\rho)| \rightarrow 0$$

En restreignant le domaine de  $D_M(\rho)$  à  $\{\rho | \rho = \mathcal{S}^+\theta, \theta \in \Theta\}$ , on obtient :

$$\sup_{\theta \in \Theta} |D_M(\mathcal{S}^+\theta) - D^*(\mathcal{S}^+\theta)| \rightarrow 0$$

On a donc que  $J_M(\theta)$  converge uniformément vers  $J(\theta^*, \theta)$ .

# Bibliographie

- [1] Simon Labouesse, Marc Allain, Jérôme Idier, Sébastien Bourguignon, Awoke Negash, Penghuan Liu, and Anne Sentenac. Joint reconstruction strategy for structured illumination microscopy with unknown illuminations. *IEEE Transactions on Image Processing*, 2016.
- [2] E. Mudry, K. Belkebir, J. Savatier, E. Le Moal, C. Nicoletti, M. Allain, and A. Sentenac. Structured illumination microscopy using unknown speckle patterns. *Nature Photonics*, 6 :312–315, 2012.
- [3] H. W. Lu-Walther *et al.* fastSIM : a practical implementation of fast structured illumination microscopy. *Methods and Applications in Fluorescence*, 3(1) :014001, 2015.
- [4] Sarah Frisken Gibson and Frederick Lanni. Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy. *JOSA A*, 9(1) :154–166, 1992.
- [5] Peter M van den Berg and Jacob T Fokkema. Removal of undesired wavefields related to the casing of a microwave scanner. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, 51(1) :187–192, 2003.
- [6] David C Munson, James D O’Brien, and W Kenneth Jenkins. A tomographic formulation of spotlight-mode synthetic aperture radar. *Proceedings of the IEEE*, 71(8) :917–925, 1983.
- [7] Mats GL Gustafsson, Lin Shao, Peter M Carlton, CJ Rachel Wang, Inna N Golubovskaya, W Zacheus Cande, David A Agard, and John W Sedat. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophysical journal*, 94(12) :4957–4970, 2008.
- [8] Olivier Haeberlé, Kamal Belkebir, H Giovaninni, and Anne Sentenac. Tomographic diffractive microscopy : basics, techniques and perspectives. *Journal of Modern Optics*, 57(9) :686–699, 2010.
- [9] AJ Devaney. A filtered backpropagation algorithm for diffraction tomography. *Ultrasonic imaging*, 4(4) :336–350, 1982.
- [10] R. Heintzmann and C. Cremer. Laterally modulated excitation microscopy : improvement of resolution by using a diffraction grating. In *Proc. SPIE, Optical Biopsies and Microscopic Techniques III*, pages 185–196, 1999.
- [11] Mats GL Gustafsson, David A Agard, and John W Sedat. Doubling the lateral resolution of wide-field fluorescence microscopy using structured illumination. In *Proc. SPIE*, volume 3919, pages 141–150, 2000.

- [12] Pierre Thibault, Martin Dierolf, Oliver Bunk, Andreas Menzel, and Franz Pfeiffer. Probe retrieval in ptychographic coherent diffractive imaging. *Ultramicroscopy*, 109(4) :338–343, 2009.
- [13] Kai Wicker, Ondrej Mandula, Gerrit Best, Reto Fiolka, and Rainer Heintzmann. Phase optimisation for structured illumination microscopy. *Optics express*, 21(2) :2032–2049, 2013.
- [14] Roland Ayuk, Hugues Giovannini, Aurélie Jost, E Mudry, Jules Girard, Thomas Mangeat, Nicolas Sandeau, R Heintzmann, K Wicker, Kamal Belkebir, et al. Structured illumination fluorescence microscopy with distorted excitations using a filtered blind-sim algorithm. *Optics letters*, 38(22) :4723–4726, 2013.
- [15] Aurélie Jost, Elen Tolstik, Polina Feldmann, Kai Wicker, Anne Sentenac, and Rainer Heintzmann. Optical sectioning and high resolution in single-slice structured illumination microscopy by thick slice blind-SIM reconstruction. *PloS one*, 10(7) :e0132174, 2015.
- [16] Joseph W Goodman. *Speckle phenomena in optics : theory and applications*. Roberts and Company Publishers, 2007.
- [17] Junhong Min, Jaeduck Jang, Dongmin Keum, Seung-Wook Ryu, Chulhee Choi, Ki-Hun Jeong, and Jong Chul Ye. Fluorescent microscopy beyond diffraction limits using speckle illumination and joint support recovery. *Scientific reports*, 3, 2013.
- [18] Joo-Eon Oh, Young-Wook Cho, Giuliano Scarcelli, and Yoon-Ho Kim. Sub-Rayleigh imaging via speckle illumination. *Opt. Lett.*, 38(5) :682–684, Mar 2013.
- [19] Awoke Negash, Simon Labouesse, Nicolas Sandeau, Marc Allain, Hugues Giovannini, Jérôme Idier, Rainer Heintzmann, Patrick C. Chaumet, Kamal Belkebir, and Anne Sentenac. Improving the axial and lateral resolution of three-dimensional fluorescence microscopy using random speckle illuminations. *J. Opt. Soc. Am. A*, 33(6) :1089–1094, Jun 2016.
- [20] Jérôme Gateau, Thomas Chaigne, Ori Katz, Sylvain Gigan, and Emmanuel Bossy. Improving visibility in photoacoustic imaging using dynamic speckle illumination. *Optics letters*, 38(23) :5188–5191, 2013.
- [21] Thomas Chaigne, Jérôme Gateau, Marc Allain, Ori Katz, Sylvain Gigan, Anne Sentenac, and Emmanuel Bossy. Super-resolution photoacoustic fluctuation imaging with multiple speckle illumination. *Optica*, 3(1) :54–57, 2016.
- [22] Joseph W Goodman and Steven C Gustafson. Introduction to fourier optics. *Optical Engineering*, 35(5) :1513–1513, 1996.
- [23] GD Wassermann and E Wolf. On the theory of aplanatic aspheric systems. *Proceedings of the Physical Society. Section B*, 62(1) :2, 1949.
- [24] J.W. Goodman. *Introduction to Fourier Optics*. Roberts & Company Publishers, 2005.
- [25] Emanuel Parzen. A simple proof and some extensions of the sampling theorem. Technical report, STANFORD UNIV CA, 1956.
- [26] Catherine Forbes, Merran Evans, Nicholas Hastings, and Brian Peacock. *Statistical distributions*. John Wiley & Sons, 2011.

- [27] Emil Wolf. Three-dimensional structure determination of semi-transparent objects from holographic data. *Optics Communications*, 1(4) :153–156, 1969.
- [28] Philippe Réfrégier. *Noise theory and application to physics : from fluctuations to information*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [29] Emmett N Leith and Juris Upatnieks. Reconstructed wavefronts and communication theory. *JOSA*, 52(10) :1123–1130, 1962.
- [30] Bertrand Simon, Matthieu Debailleul, Anne Beghin, Yves Tourneur, and Olivier Haeberlé. High-resolution tomographic diffractive microscopy of biological samples. *Journal of Biophotonics*, 3(7) :462–467, 2010.
- [31] Matthieu Debailleul, Vincent Georges, Bertrand Simon, R Morin, and Olivier Haeberlé. High-resolution three-dimensional tomographic diffractive microscopy of transparent inorganic and biological samples. *Optics letters*, 34(1) :79–81, 2009.
- [32] Guillaume Maire, Filip Drsek, Jules Girard, Hugues Giovannini, Anne Talneau, Denis Konan, Kamal Belkebir, Patrick C Chaumet, and Anne Sentenac. Experimental demonstration of quantitative imaging beyond abbe’s limit with optical diffraction tomography. *Physical review letters*, 102(21) :213905, 2009.
- [33] YongKeun Park, Gabriel Popescu, Takahiro Ikeda, Kamran Badizadegan, Ramachandra R Dasari, and Michael S Feld. Diffraction phase microscopy. In *Biomedical Topical Meeting*, page Tu150. Optical Society of America, 2006.
- [34] Max Born and Emil Wolf. *Principles of Optics : Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*. Pergamon Press, 1959.
- [35] Joseph R Lakowicz and Barry R Masters. Principles of fluorescence spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 13(2) :029901, 2008.
- [36] SJ Strickler and Robert A Berg. Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules. *The Journal of chemical physics*, 37(4) :814–822, 1962.
- [37] Winfried Denk, James H Strickler, and Watt W Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951) :73–76, 1990.
- [38] S Singh and LT Bradley. Three-photon absorption in naphthalene crystals by laser excitation. *Physical Review Letters*, 12(22) :612, 1964.
- [39] J Clerk Maxwell. On the general laws of optical instruments. *The Quarterly Journal of Pure and Applied Mathematics*, 2 :233–246, 1858.
- [40] Carroll Mason Sparrow. On spectroscopic resolving power. *The Astrophysical Journal*, 44 :76, 1916.
- [41] Lord Rayleigh. Xxxi. investigations in optics, with special reference to the spectroscope. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 8(49) :261–274, 1879.
- [42] Ernst Abbe. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 9(1) :413–418, 1873.
- [43] M. G. L. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.*, 2000.

- [44] Amit Lal, Chunyan Shan, and Peng Xi. Structured illumination microscopy image reconstruction algorithm. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 22(4) :50–63, 2016.
- [45] Jérôme Boulanger, Laurent Condat, Tristan Piolot, Lucie Sengmanivong, and Nelly Pustelnik. Nonsmooth Convex Optimization for Structured Illumination Microscopy Image Reconstruction. Technical report, October 2015. working paper or preprint.
- [46] Dimitri P. Bertsekas. *Nonlinear programming*. Athena Scientific, Belmont, USA, 2nd edition, 1999.
- [47] Jérôme Idier et al. Approche bayésienne pour les problèmes inverses. *Hermès, Paris*, 3, 2001.
- [48] Mats GL Gustafsson. Nonlinear structured-illumination microscopy : wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(37) :13081–13086, 2005.
- [49] François Orieux, Eduardo Sepulveda, Vincent Loriette, Benoit Dubertret, and Jean-Christophe Olivo-Marin. Bayesian estimation for optimized structured illumination microscopy. *IEEE Transactions on image processing*, 21(2) :601–614, 2012.
- [50] Laurent Condat, Jérôme Boulanger, Nelly Pustelnik, Souleymen Sahnoun, and Lucie Sengmanivong. A 2-d spectral analysis method to estimate the modulation parameters in structured illumination microscopy. In *Biomedical Imaging (ISBI), 2014 IEEE 11th International Symposium on*, pages 604–607. IEEE, 2014.
- [51] LH Schaefer, D Schuster, and J Schaffer. Structured illumination microscopy : artefact analysis and reduction utilizing a parameter optimization approach. *Journal of microscopy*, 216(2) :165–174, 2004.
- [52] Thomas Chaigne, Jérôme Gateau, Marc Allain, Ori Katz, Sylvain Gigan, Anne Sentenac, and Emmanuel Bossy. Super-resolution photoacoustic fluctuation imaging with multiple speckle illumination. *Optica*, 3(1) :54–57, 2016.
- [53] Peter Burgholzer, Thomas Berer, Jürgen Gruber, and Günther Mayr. Super-resolution thermographic imaging using blind structured illumination. *Applied Physics Letters*, 111(3) :031908, 2017.
- [54] JB Pawley and Barry R Masters. Handbook of biological confocal microscopy. *Optical Engineering*, 35(9) :2765–2766, 1996.
- [55] T Wilson and CJR Sheppard. Theory and practice of optical scanning microscopy. *Academic, London*, page 47, 1984.
- [56] Shigeharu Kimura and Chusuke Munakata. Dependence of 3-d optical transfer functions on the pinhole radius in a fluorescent confocal optical microscope. *Applied optics*, 29(20) :3007–3011, 1990.
- [57] Joseph Huff. The airyscan detector from zeiss : confocal imaging with improved signal-to-noise ratio and super-resolution. *Nature methods*, 12(12), 2015.
- [58] Stefan W Hell. Improvement of lateral resolution in far-field fluorescence light microscopy by using two-photon excitation with offset beams. *Optics communications*, 106(1-3) :19–24, 1994.

- [59] Stefan W Hell and Jan Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters*, 19(11) :780–782, 1994.
- [60] Thomas Dertinger, Ryan Colyer, G Iyer, S Weiss, and J Enderlein. Fast, background-free, 3d super-resolution optical fluctuation imaging (sofi). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(52) :22287–22292, 2009.
- [61] MinKwan Kim, ChungHyun Park, Christophe Rodriguez, YongKeun Park, and Yong-Hoon Cho. Superresolution imaging with optical fluctuation using speckle patterns illumination. *Scientific reports*, 5, 2015.
- [62] Richik N Ghosh and Watt W Webb. Automated detection and tracking of individual and clustered cell surface low density lipoprotein receptor molecules. *Biophysical journal*, 66(5) :1301–1318, 1994.
- [63] Raimund J Ober, Sripad Ram, and E Sally Ward. Localization accuracy in single-molecule microscopy. *Biophysical journal*, 86(2) :1185–1200, 2004.
- [64] Loling Song, EJ Hennink, I Ted Young, and Hans J Tanke. Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical journal*, 68(6) :2588–2600, 1995.
- [65] Eric Betzig, George H Patterson, Rachid Sougrat, O Wolf Lindwasser, Scott Olenych, Juan S Bonifacino, Michael W Davidson, Jennifer Lippincott-Schwartz, and Harald F Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793) :1642–1645, 2006.
- [66] Michael J Rust, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature methods*, 3(10) :793–796, 2006.
- [67] Pierre Bon, Nicolas Bourg, Sandrine Lécart, Serge Monneret, Emmanuel Fort, Jérôme Wenger, and Sandrine Lévêque-Fort. Three-dimensional nanometre localization of nanoparticles to enhance super-resolution microscopy. *Nature communications*, 6 :7764, 2015.
- [68] Pierre Brémaud. *Mathematical principles of signal processing : Fourier and wavelet analysis*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [69] Joo-Eon Oh, Young-Wook Cho, Giuliano Scarcelli, and Yoon-Ho Kim. Sub-rayleigh imaging via speckle illumination. *Optics letters*, 38(5) :682–684, 2013.
- [70] Minghua Xu and Lihong V Wang. Analytic explanation of spatial resolution related to bandwidth and detector aperture size in thermoacoustic or photoacoustic reconstruction. *Physical Review E*, 67(5) :056605, 2003.
- [71] Little Rja and DB Rubin. *Statistical analysis with missing data*, 1987.
- [72] Peter J Bickel and Kjell A Doksum. *Mathematical statistics*, volume i, 2001.
- [73] Geoffrey Grimmett and David Stirzaker. *Probability and random processes*. Oxford university press, 2001.
- [74] Solomon Kullback. *Information theory and statistics*. Courier Corporation, 1997.
- [75] Michael I Miller and Donald L Snyder. The role of likelihood and entropy in incomplete-data problems : Applications to estimating point-process intensities and toeplitz constrained covariances. *Proceedings of the IEEE*, 75(7) :892–907, 1987.

- [76] LIU Penghuan, Jérôme Idier, Sébastien Bourguignon, Simon Labouesse, Marc Allain, and Anne Sentenac. Minimum contrast estimation for super-resolution fluorescence microscopy using speckle patterns. page ID284. colloque GRETSI, 2017.
- [77] Aad W Van der Vaart. *Asymptotic statistics*, volume 3. Cambridge university press, 1998.
- [78] James R Munkres. *Topology*. Prentice Hall, 2000.
- [79] Andrey Tikhonov. Solution of incorrectly formulated problems and the regularization method. *Soviet Meth. Dokl.*, 4 :1035–1038, 1963.
- [80] Arthur P Dempster, Nan M Laird, and Donald B Rubin. Maximum likelihood from incomplete data via the em algorithm. *Journal of the royal statistical society. Series B (methodological)*, pages 1–38, 1977.
- [81] Aaron D Lanterman. Statistical radar imaging of diffuse and specular targets using an expectation-maximization algorithm. In *AeroSense 2000*, pages 20–31. International Society for Optics and Photonics, 2000.
- [82] LIU Penghuan, Sébastien Bourguignon, Jérôme Idier, Marc Allain, Simon Labouesse, and Anne Sentenac. A marginal image reconstruction approach in fluorescence microscopy with pseudo-random illumination patterns. In *Mathematics in Imaging*, pages MTh1H–3. Optical Society of America, 2016.
- [83] L. Condat. A primal-dual splitting method for convex optimization involving Lipschitzian, proximable and linear composite terms. *J. Optim. Theory Appl.*, 158(2) :460–479, August 2013.
- [84] D. L. Donoho, A. M. Johnstone, J. C. Hoche, and A. S. Stern. Maximum entropy and the nearly black object. *J. R. Stat. Soc.*, 198 :41–81, 1992.
- [85] Eran A Mukamel, Hazen Babcock, and Xiaowei Zhuang. Statistical deconvolution for superresolution fluorescence microscopy. *Biophysical journal*, 102(10) :2391–2400, 2012.
- [86] Junhong Min, Cédric Vonesch, Hagai Kirshner, Lina Carlini, Nicolas Olivier, Seamus Holden, Suliana Manley, Jong Chul Ye, and Michael Unser. Falcon : fast and unbiased reconstruction of high-density super-resolution microscopy data. *Scientific reports*, 4, 2014.
- [87] Henri Lanteri, Muriel Roche, and Claude Aime. Penalized maximum likelihood image restoration with positivity constraints : multiplicative algorithms. *Inverse problems*, 18(5) :1397, 2002.
- [88] G. H. Golub and C. H. Van Loan. *Matrix computation*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 3rd ed. edition, 1996.
- [89] Jon F Claerbout and Francis Muir. Robust modeling with erratic data. *Geophysics*, 38(5) :826–844, 1973.
- [90] Min Gu and CJR Sheppard. Comparison of three-dimensional imaging properties between two-photon and single-photon fluorescence microscopy. *Journal of microscopy*, 177(2) :128–137, 1995.
- [91] Yaron Bromberg and Hui Cao. Generating non-rayleigh speckles with tailored intensity statistics. *Physical Review Letters*, 112(21) :213904, 2014.

- [92] Daniel Axelrod. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic*, 2(11) :764–774, 2001.
- [93] Thomas Barroca, Karla Balaa, Sandrine Lévêque-Fort, and Emmanuel Fort. Full-field near-field optical microscope for cell imaging. *Physical review letters*, 108(21) :218101, 2012.
- [94] Patrick L. Combettes and Jean-Christophe Pesquet. Primal-dual splitting algorithm for solving inclusions with mixtures of composite, Lipschitzian, and parallel-sum type monotone operators. *Set-Valued Var. Anal.*, 20(2) :307–330, 2012.
- [95] Patrick L Combettes and Valérie R Wajs. Signal recovery by proximal forward-backward splitting. *Multiscale Model. Simul.*, 4(4) :1168–1200, 2005.
- [96] A. Beck and M. Teboulle. A fast iterative shrinkage-thresholding algorithm for linear inverse problems. *SIAM J. Imaging Sciences*, 2(1) :183–202, 2009.
- [97] Amir Beck and Marc Teboulle. Gradient-based algorithms with applications to signal recovery problems. In Yonina Eldar and Daniel Palomar, editors, *Convex Optimization in Signal Processing and Communications*, pages 42–85. Cambridge university press, 2010.
- [98] Patrick L Combettes and Jean-Christophe Pesquet. Proximal splitting methods in signal processing. In *Fixed-point algorithms for inverse problems in science and engineering*, pages 185–212. Springer New York, 2011.
- [99] Ralph T. Rockafellar. *Convex analysis*. Princeton university press, 1970.
- [100] P. Moulin and Juan Liu. Analysis of multiresolution image denoising schemes using generalized Gaussian and complexity priors. *IEEE Trans. Inf. Theor.*, 45(3) :909–919, September April 1999.
- [101] Mário AT Figueiredo and Robert D Nowak. An EM algorithm for wavelet-based image restoration. *IEEE Trans. Im. Proc.*, 12(8) :906–916, 2003.
- [102] Curt R. Vogel. *Computational Methods for Inverse Problems*, volume 23 of *Frontiers in Applied Mathematics*. SIAM, 2002.
- [103] Silvia Bonettini, Riccardo Zanella, and Luca Zanni. A scaled gradient projection method for constrained image deblurring. *Inverse Probl.*, 25(1) :015002, 2009.
- [104] Nelly Pustelnik, Jean-Christophe Pesquet, and Caroline Chaux. Relaxing tight frame condition in parallel proximal methods for signal restoration. *IEEE Trans. Signal Process.*, 60(2) :968–973, 2012.
- [105] Stephen Becker and Jalal Fadili. A quasi-Newton proximal splitting method. In *Adv. Neural Inf. Process Syst.*, pages 2618–2626, 2012.
- [106] Hugo Raguet and Loïc Landrieu. Preconditioning of a generalized forward-backward splitting and application to optimization on graphs. *SIAM J. Imaging Sciences*, 8(4) :2706–2739, 2015.
- [107] Emilie Chouzenoux, Jean-Christophe Pesquet, and Audrey Repetti. Variable metric forward–backward algorithm for minimizing the sum of a differentiable function and a convex function. *J. Optim. Theory Appl.*, 162(1) :107–132, 2013.
- [108] Ngô Công Vũ. A splitting algorithm for dual monotone inclusions involving cocoercive operators. *Adv. Comput. Math.*, 38(3) :667–681, April 2013.

- [109] Donald Geman and Chengda Yang. Nonlinear image recovery with half-quadratic regularization. *IEEE Trans. Im. Proc.*, 4(7) :932–946, July 1995.
- [110] Marc Allain, Jérôme Idier, and Yves Goussard. On global and local convergence of half-quadratic algorithms. *IEEE Trans. Im. Proc.*, 15(5) :1130–1142, May 2006.
- [111] Raymond H. Chan and Michael K. Ng. Conjugate gradient methods for Toeplitz systems. *SIAM Review*, 38(3) :427–482, 1996.
- [112] Jérôme Idier, Simon Labouesse, Penhuan Liu, Marc Allain, Sébastien Bourguignon, and Anne Sentenac. A theoretical analysis of the super-resolution capacity of imagers using speckle illuminations. Research rep., IRCCyN/Inst. Fres., 2015.
- [113] Emmanuel Soubies, Laure Blanc-Féraud, and Gilles Aubert. Quelles relaxations continues pour le critère  $l_2 - l_0$ ? In *Colloque Gretsi*, page 4, 2017.
- [114] Johnathan M Bardsley and Aaron Luttmann. Total variation-penalized poisson likelihood estimation for ill-posed problems. *Advances in Computational Mathematics*, 31(1) :35–59, 2009.
- [115] Nadya Chakrova, Rainer Heintzmann, Bernd Rieger, and Sjoerd Stallinga. Studying different illumination patterns for resolution improvement in fluorescence microscopy. *Optics express*, 23(24) :31367–31383, 2015.
- [116] Joe P Foley and John G Dorsey. A review of the exponentially modified gaussian (emg) function : Evaluation and subsequent. *Journal of chromatographic science*, 22, 1984.
- [117] Anaïs Bouissou, Amscha Proag, Nicolas Bourg, Karine Pingris, Clément Gabriel, Stéphanie Balor, Thomas Mangeat, Christophe Thibault, Christophe Vieu, Guillaume Dupuis, et al. Podosome force generation machinery : A local balance between protrusion at the core and traction at the ring. *ACS nano*, 11(4) :4028–4040, 2017.
- [118] Amscha Proag, Anaïs Bouissou, Thomas Mangeat, Raphael Voituriez, Patrick Delobelle, Christophe Thibault, Christophe Vieu, Isabelle Maridonnea Parini, and Renaud Poincloux. Working together : spatial synchrony in the force and actin dynamics of podosome first neighbors. *ACS nano*, 9(4) :3800–3813, 2015.
- [119] B Shapiro. Large intensity fluctuations for wave propagation in random media. *Physical review letters*, 57(17) :2168, 1986.
- [120] G. K. Pedersen. *Analysis Now*. Springer-Verlag, New York, NYUSA, 1995.
- [121] Kaare Brandt Petersen and Michael Syskind Pedersen. The matrix cookbook. Technical report, Technical University of Denmark, November 2012.
- [122] D Serre. Matrices : Theory and applications. 2002. *Graduate Texts in Mathematics*, 2000.