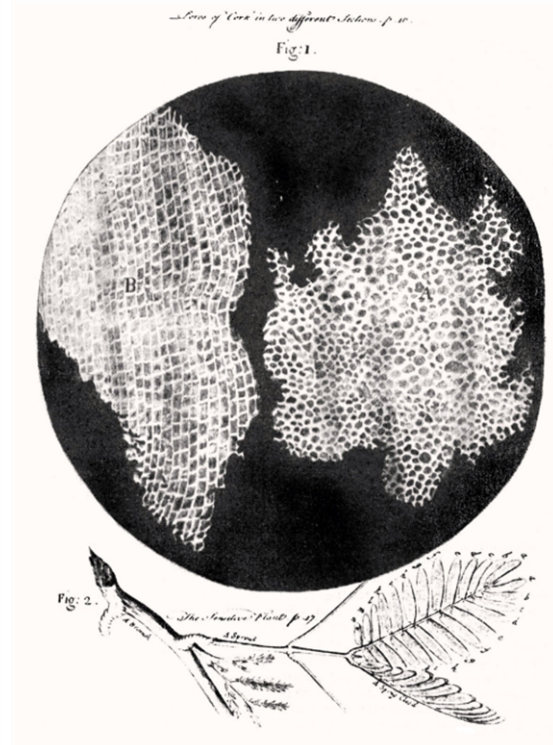
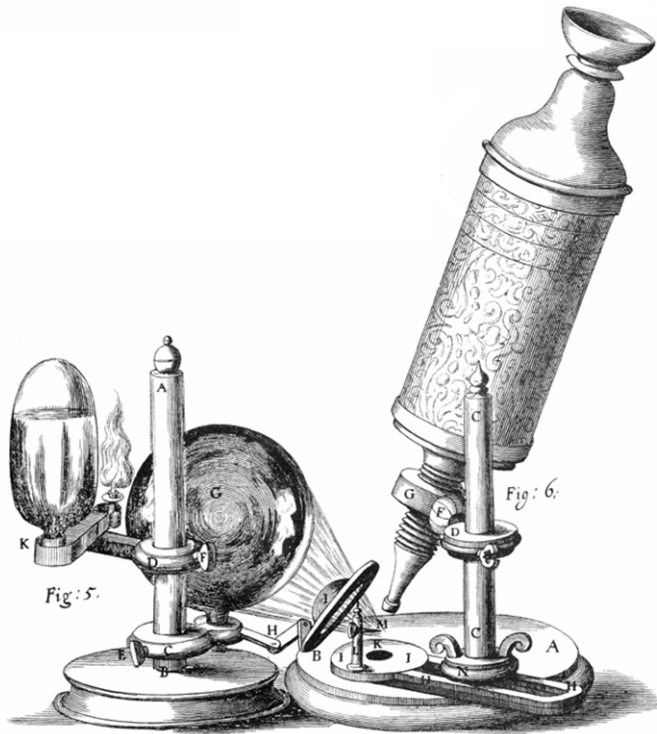


Imagerie : Microscopie



1)
Préparer un échantillon

2)
Eclairer l'échantillon

3)
Observer l'échantillon

Premier microscope construit par Robert Hooke en 1667
Première observation de chloroplastes de plantes : découverte de la cellule

1. Physique des ondes pour l'imagerie

1. Physique ondulatoire
2. Interférences
3. Focalisation
4. Imagerie de Fourier

2. Le microscope : les bases

1. Le microscope plein champ
2. Critères de résolution
3. Le microscope confocal

3. Les bases mathématiques

1. Approche analytique
2. Approche bayésienne
3. Approche matricielle

4. Super-résolution

1. Illumination structurée
2. Microscopie de fluorescence

Physique des ondes pour l'imagerie



Onde de surface

Propagation réversible des propriétés locales du milieu

Obéissant à l'équation de D'Alembert :

$$\nabla^2 s(\vec{r}, t) - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 s(\vec{r}, t)}{\partial t^2} = 0$$

Avec un terme source :

$$\nabla^2 s(\vec{r}, t) - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 s(\vec{r}, t)}{\partial t^2} = S(\vec{r}, t)$$

Propriétés :

- *Invariance par renversement du temps* : $\vec{r} \rightarrow -\vec{r}$ et $t \rightarrow -t$ laissent l'équation inchangée

- *Invariance par translation dans le temps et l'espace*

Classe de solutions dites 'harmoniques' :

= $\varphi(\vec{r}, t)$ Phase

$$s(\vec{r}, t) = s_0 \cdot e^{j(\omega t - \vec{k} \cdot \vec{r} + \phi_0)}$$

Décomposable par transformée de Fourier :

$$s(\vec{r}, t) = \iint s_0(\omega, \vec{k}) \cdot e^{j(\omega t - \vec{k} \cdot \vec{r} + \phi_0)} d\omega d\vec{k}$$

Spectre : $s_0(\omega, \vec{k})|_{\vec{k} \text{ fixé}}$

Spectre angulaire : $s_0(\omega, \vec{k})|_{\omega \text{ fixé}}$

Réponse impulsionnelle

- *Linéarité par rapport au terme source* : par linéarité on peut ajouter les ondes correspondantes à deux termes sources différents
On peut définir la réponse impulsionnelle du système comme solution de :

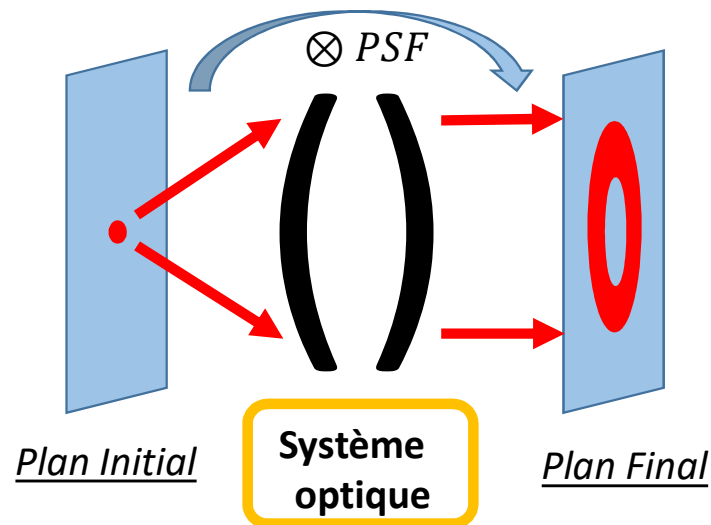
$$\nabla^2 s(\vec{r}, t) - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 s(\vec{r}, t)}{\partial t^2} = \delta(\vec{r}) \delta(t)$$

On a alors :

$$s(\vec{r}, t) = G(\vec{r}, t) \otimes_{\vec{r}} S(\vec{r}, t)$$

Par exemple pour une onde électromagnétique ou acoustique se propageant en 3D : $G(\vec{r}, t) = \frac{e^{i\frac{\omega}{c}|\vec{r}|}}{4\pi|\vec{r}|}$

En optique on l'appelle *PSF*
pour *point-spread function*
(fonction d'étalement du point)

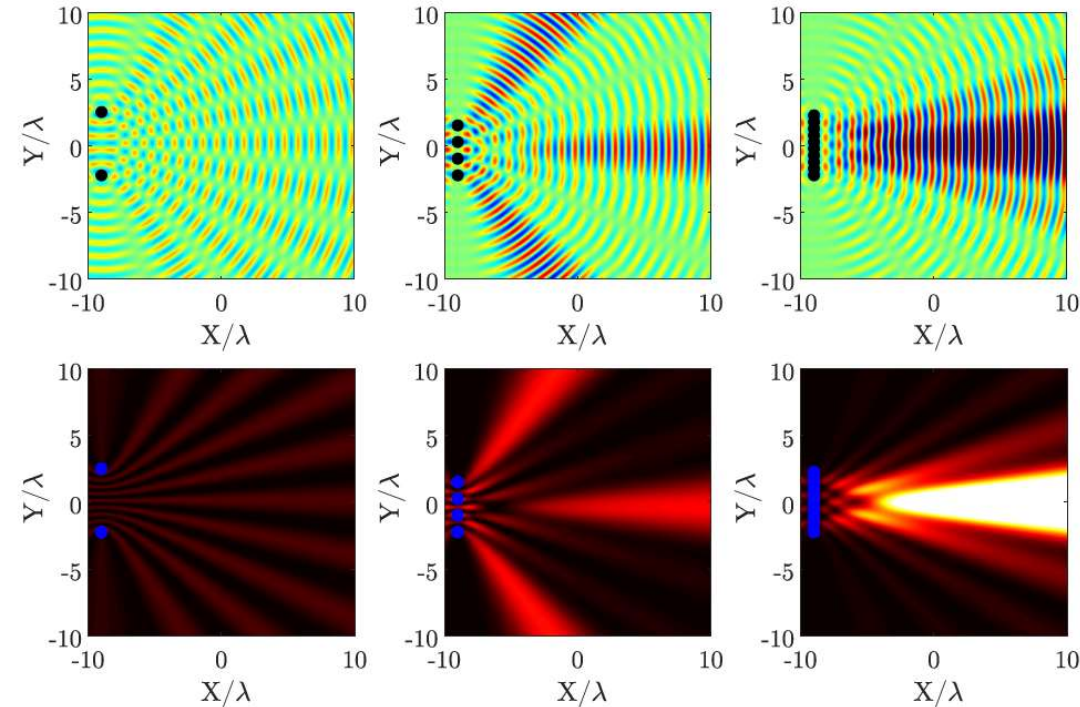


En optique on cherche le plus souvent
à propager le champ d'un plan à l'autre :

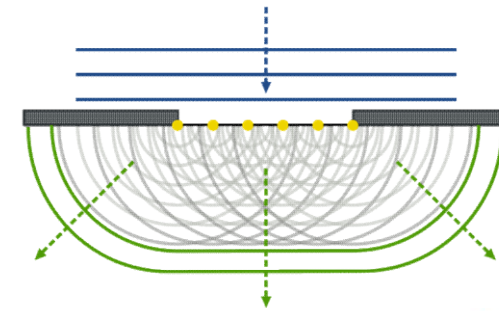
Convolution ou multiplication

Interférences

De quoi a l'air l'onde émise par deux sources ? Plusieurs sources ? Une infinité ?



Passage au cas continu/infini :
Théorème de Huygens-Fresnel



Chaque point de la surface Σ émet une 'ondelette' sphérique

$$\Phi_P(x, y) = \frac{z}{j\lambda} \iint_{\Sigma} \Phi_{P'}(x', y') \frac{e^{jkr}}{r^2} dx' dy'$$

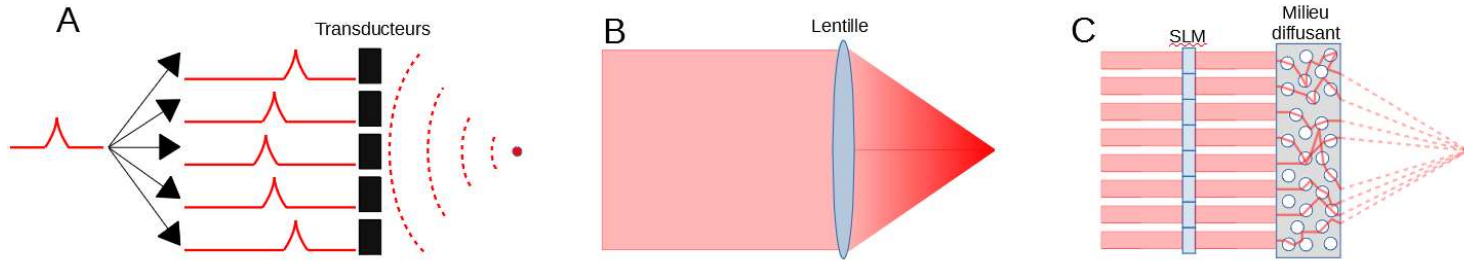
$$\Phi_P(x, y) = \frac{e^{jkz}}{j\lambda z} \iint_{-\infty}^{\infty} \Phi_{P'}(x', y') e^{j\frac{k}{2z}((x-x')^2 + (y-y')^2)} dx' dy'$$

Réécriture pour faire apparaître
la transformée de Fourier

$$= \frac{e^{jkz}}{j\lambda z} e^{j\frac{k}{2z}(x^2 + y^2)} \iint_{-\infty}^{\infty} \Phi_{P'}(x', y') e^{j\frac{k}{2z}(x'^2 + y'^2)} e^{-j\frac{2\pi}{\lambda z}(xx' + yy')} dx' dy'$$

Focalisation & Optique de Fourier

Concentration de l'énergie d'une onde en un point de l'espace et/ou du temps



A : focalisation spatiotemporelle

B et C : focalisation spatiale

Ajustement des délais : informatiquement ou par calcul de la courbure d'un milieu de célérité différente

$$\text{Transmittance d'une lentille : } t(x, y) = e^{-jk(n-1)\frac{x^2+y^2}{2}\left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2}\right)} = e^{-jk\frac{x^2+y^2}{2f}}$$

En repartant d'Huygens Fresnel :

$$\Phi_P(x, y, t) = A \frac{e^{j\frac{k}{2f}\left(1-\frac{d}{f}\right)(x^2+y^2)}}{j\lambda f} \iint_{-\infty}^{+\infty} \underbrace{Pup\left(x' + \frac{d}{f}x, y' + \frac{d}{f}y\right) \cdot M(x', y', t)}_{\text{Champ en entrée de la lentille}} e^{-j\frac{2\pi}{\lambda f}(x \cdot x' + y \cdot y')} dx' dy'$$

Champ en entrée de la lentille

Soit au point focal : $d = f$

$$\Phi_P(x, y, t) \propto \iint_{-\infty}^{+\infty} Pup(x', y') \cdot M(x', y', t) \cdot e^{-j\frac{2\pi}{\lambda f}(x \cdot x' + y \cdot y')} dx' dy' \quad \rightarrow \quad \boxed{\Phi_P(x, y) \propto TF_{2D}(M)\left(x = \frac{x_M}{\lambda f}, y = \frac{y_M}{\lambda f}\right)}$$

Une lentille opère donc une transformation de Fourier + une homothétie

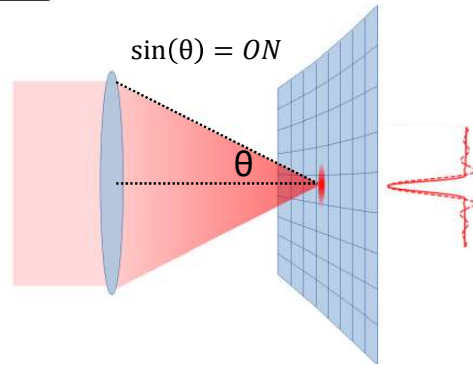
Focalisation : Applications

Onde plane :

$$\Phi_P(x, y, z) = TF_{2D}(Pup(x, y)) = \left(\frac{ON^2}{2\pi\lambda}\right)^2 \left| \int_0^{2\pi} J_0\left(\frac{ON}{\lambda} \sqrt{x^2 + y^2} \rho\right) e^{-i \frac{ON^2 z \rho^2}{4\pi n \lambda}} \rho d\rho \right|^2$$

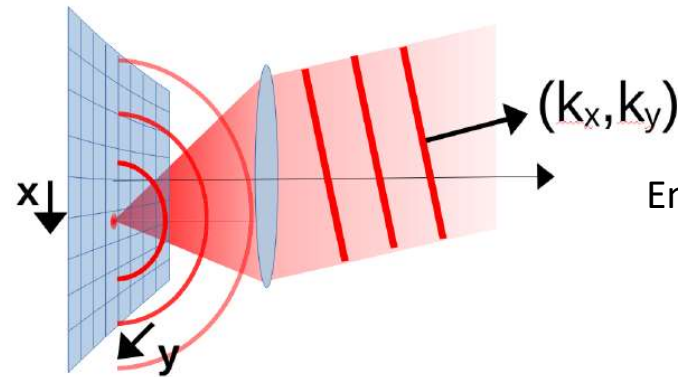
$$\simeq \frac{J_1\left(\frac{2\pi ON \sqrt{x^2 + y^2}}{\lambda}\right)}{\frac{2\pi ON \sqrt{x^2 + y^2}}{\lambda}}$$

Largeur minimale
= Tâche d'Airy
définit la limite de diffraction



Diffuseur ponctuel :

$$\Phi_P(x, y) = TF_{2D}(\delta(x_M)\delta(y_M)) = e^{-j\left(\frac{2\pi x_M}{\lambda f}x + \frac{2\pi y_M}{\lambda f}y\right)} = e^{-j\vec{k} \cdot \vec{r}}$$



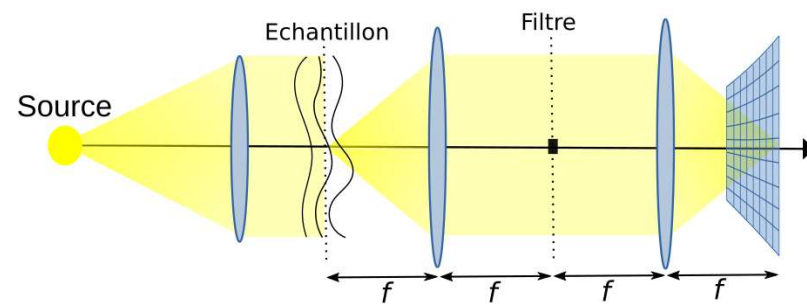
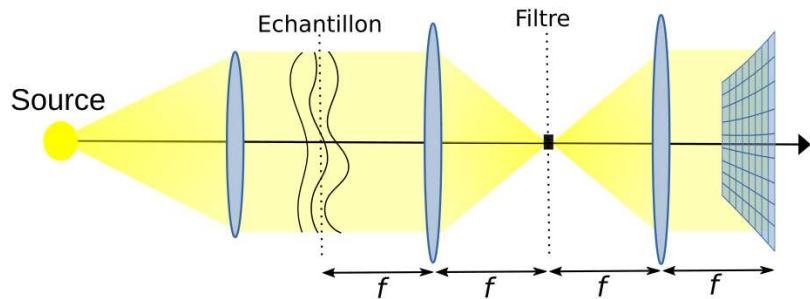
Encodage de la position
en vecteur d'onde

Montage 4f, Filtrage :

Ex : strioscopie

On cherche à imager un objet faiblement déphasant : $t(x, y) = 1 + \varphi(x, y)$ avec $\varphi(x, y) \ll 1$

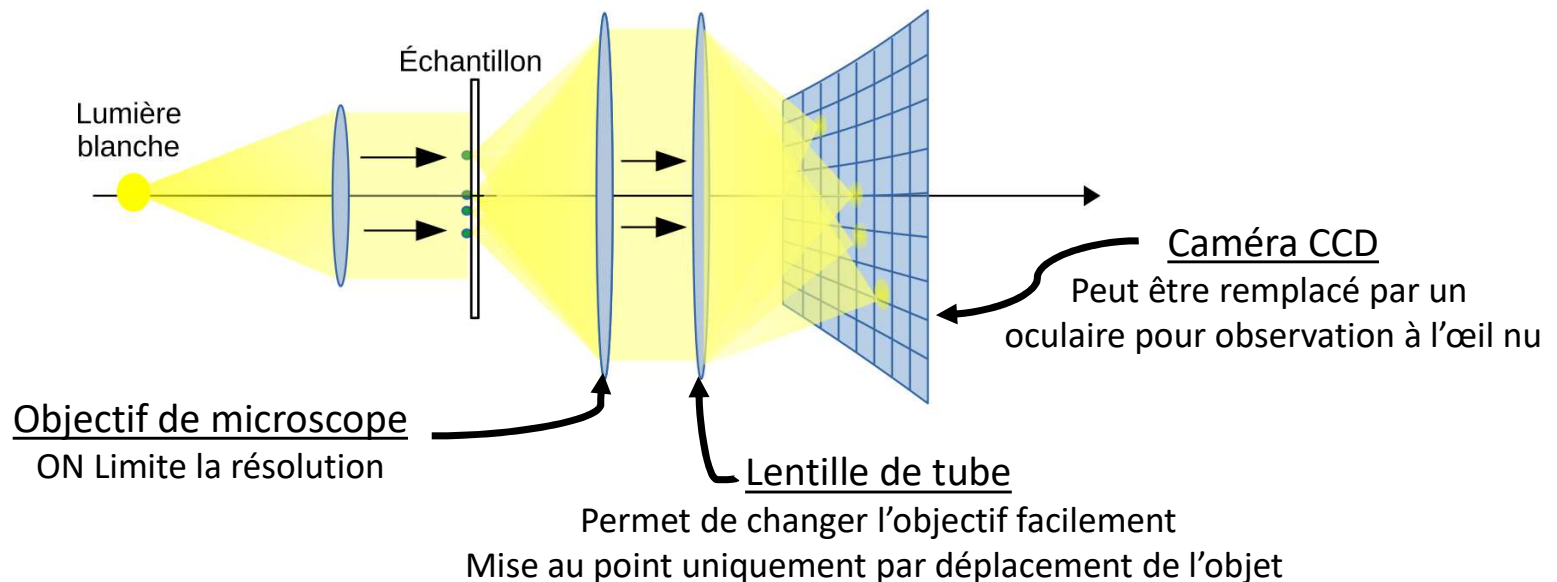
Plan de Fourier : $TF_{2D}(t(x, y)) \approx \delta(f_x)\delta(f_y) + i\tilde{\varphi}(f_x, f_y)$



Le microscope

Le microscope plein champ

Objet : - conjugué du plan d'observation
- éclairé uniformément



On peut rajouter des filtres dans le plan de Fourier de l'échantillon entre OM et lentille de tube :

- Microscopie de champ sombre (éq. striescopie)
- Microscopie à contraste de phase

Le microscope plein champ : réponse impulsionnelle

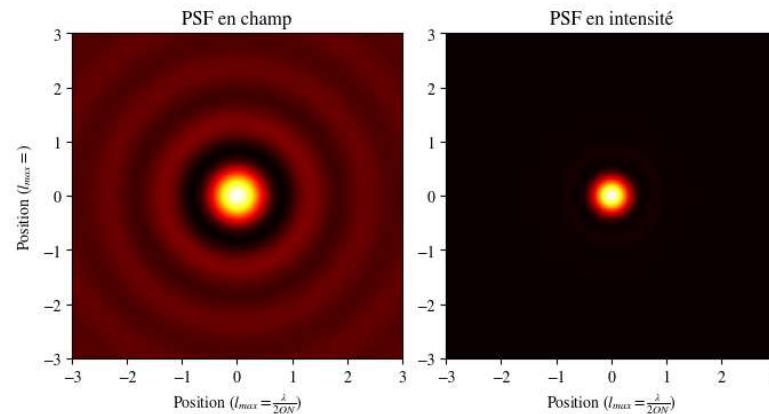
On va supposer l'éclairage cohérent

$$\Phi_P(x, y, z) = TF_{2D}(Pup(x, y))$$

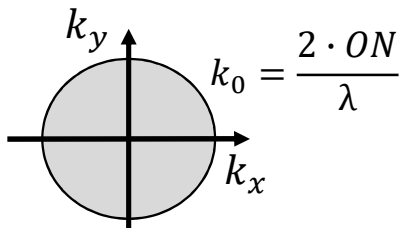
$$\simeq \frac{J_1\left(\frac{2\pi ON \sqrt{x^2+y^2}}{\lambda}\right)}{\frac{2\pi ON \sqrt{x^2+y^2}}{\lambda}}$$

Tâche d'Airy

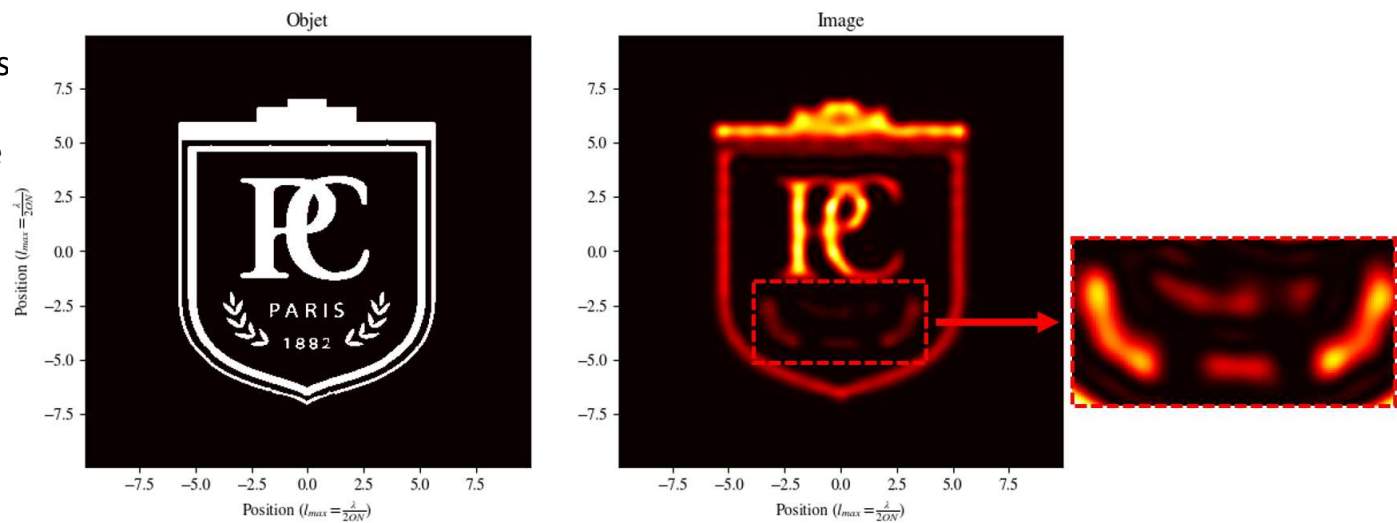
Largeur caractéristique $\lambda/2ON$



On travaille aussi dans l'espace de Fourier
en considérant les fréquences spatiales transmises
 $OTF = TF_{2D}(PSF)$
forcément de même forme que la fonction pupille

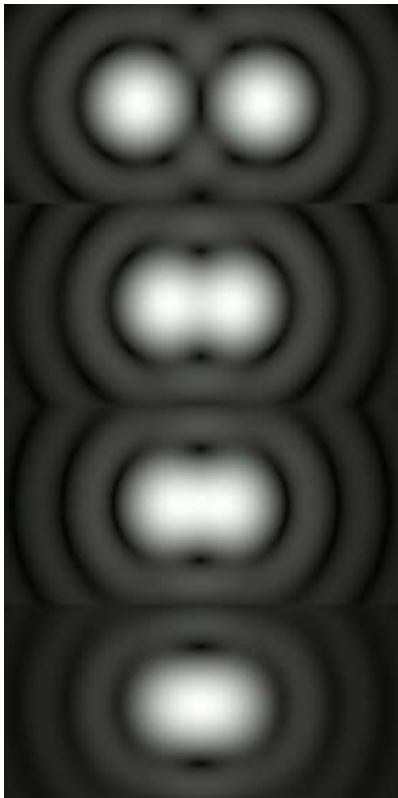


Des fréquences spatiales élevées sont perdues



Critères de résolution

Nécessaire de définir des critères quantitatifs pour déterminer si les objets sont résolus ou pas
2 objets ponctuels : à quel distance peut on les séparer



Objets parfaitement discernables : critère de Schuster, les lobes centraux ne se superposent pas
$$\frac{2,44\lambda}{20N}$$

Objets discernables : **critère de Rayleigh**, le zéro d'une tâche coïncide avec le max de l'autre tâche
$$\frac{1,22\lambda}{20N}$$

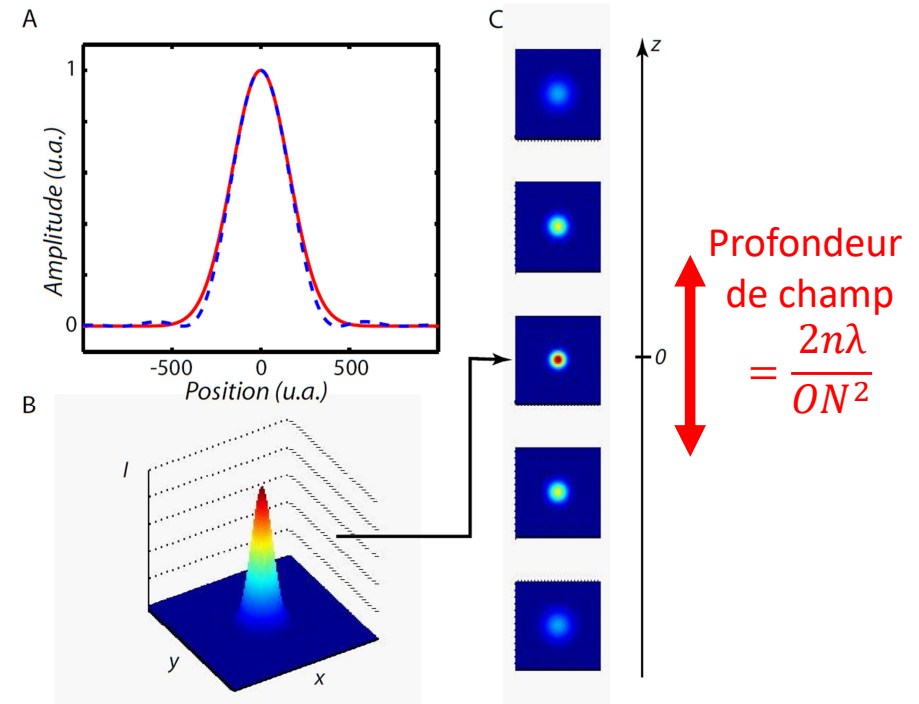
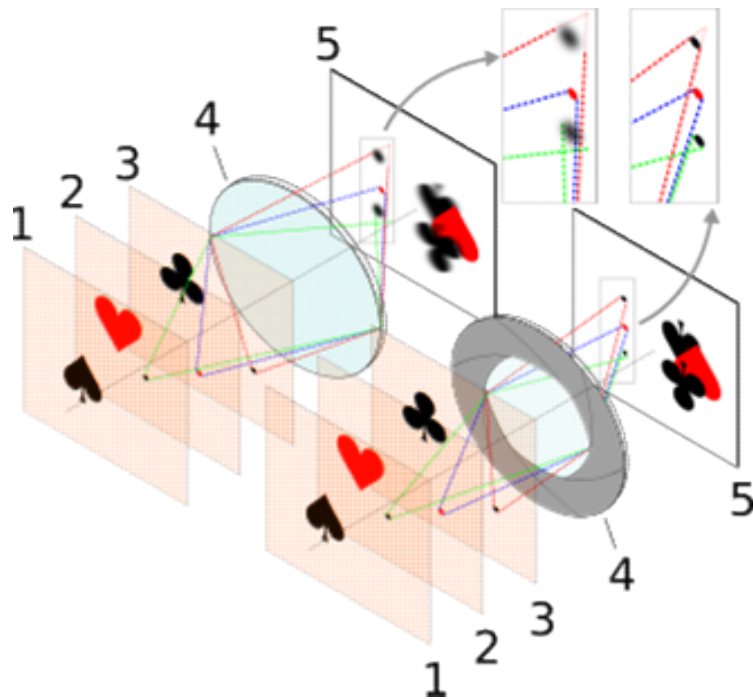
Objets discernables : critère de Sparrow, point d'inflexion de l'éclairement entre les deux tâches
$$\frac{1,02\lambda}{20N}$$

Objets indiscernables

Le microscope plein champ : profondeur de champ

D'où vient la lumière collecté ?

Pas uniquement d'une seule tranche de l'échantillon : brouillage des images



Le réglage de l'ouverture numérique fait aussi varier la profondeur de champ

Dans un milieu biologique la diffusion multiple accentue encore le phénomène

Sectionnement optique

Le microscope plein champ : notion d'aberrations

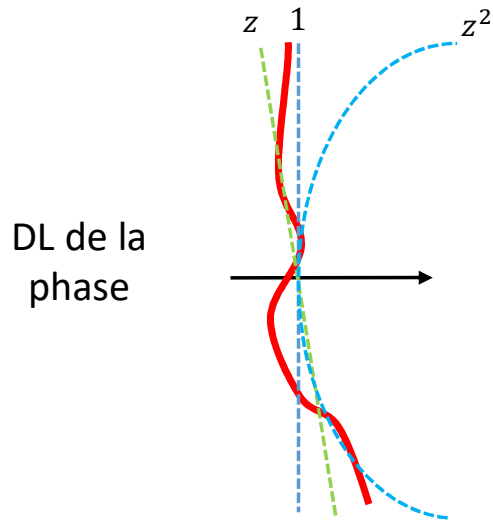
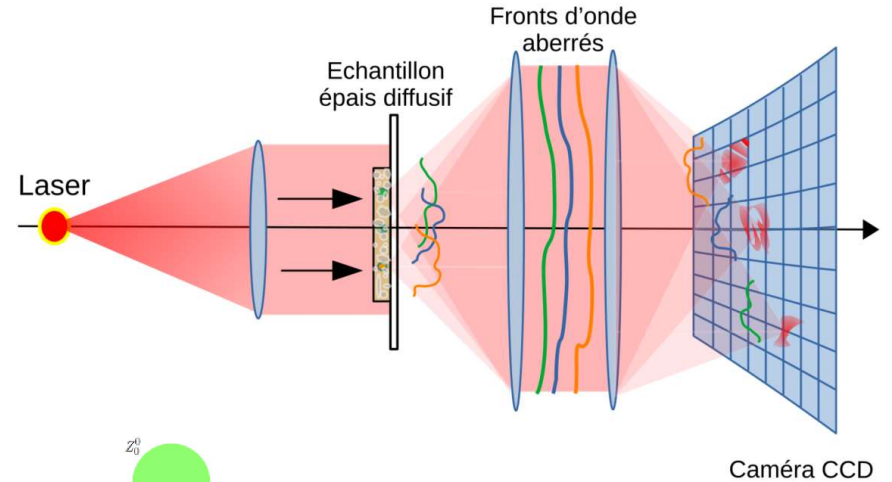
Ecart au front d'onde plan idéal : l'image d'un point n'est plus un point mais une tâche

Problématique astronomique à l'origine :
traversée de l'atmosphère

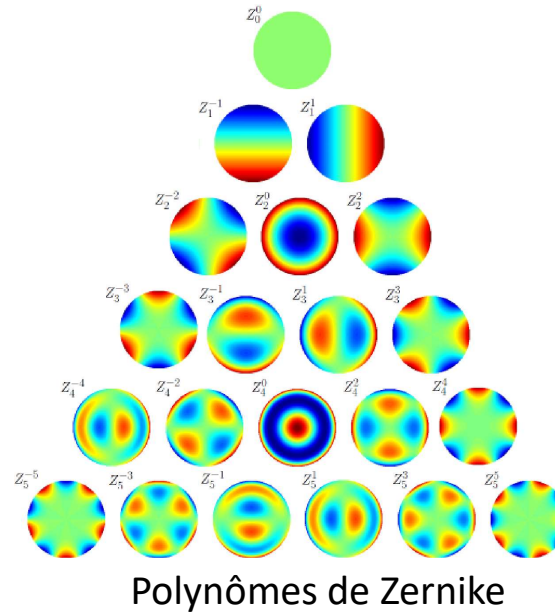


Images du télescope Hubble :
avant et après correction des aberrations

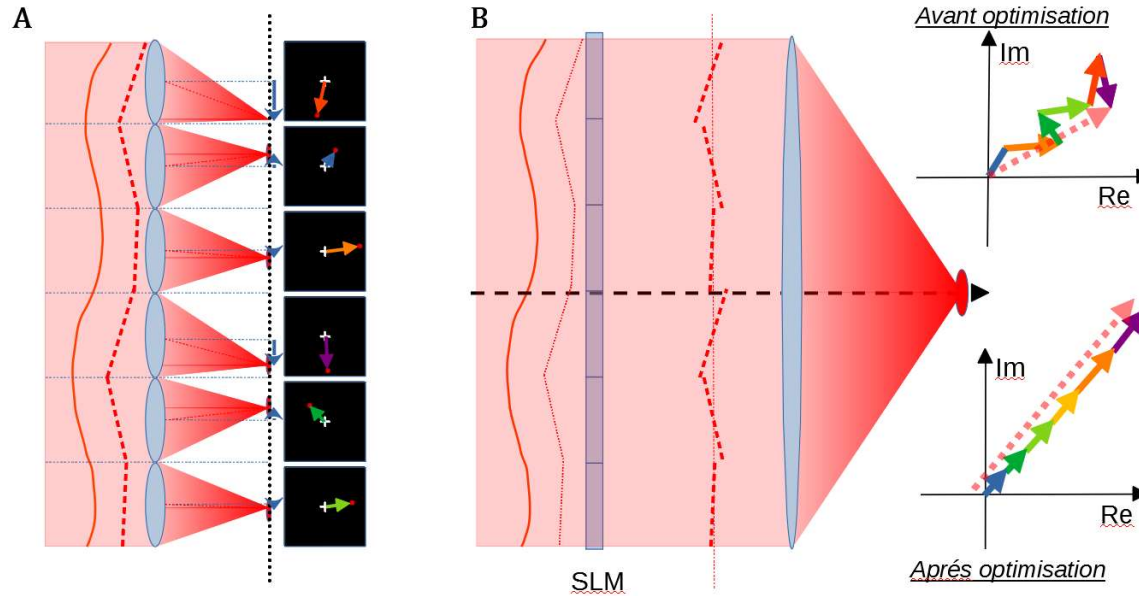
En microscopie on observe le même
phénomène pendant la traversée
d'échantillon épais



À 3D en
symétrie
cylindrique



Correction d'aberrations

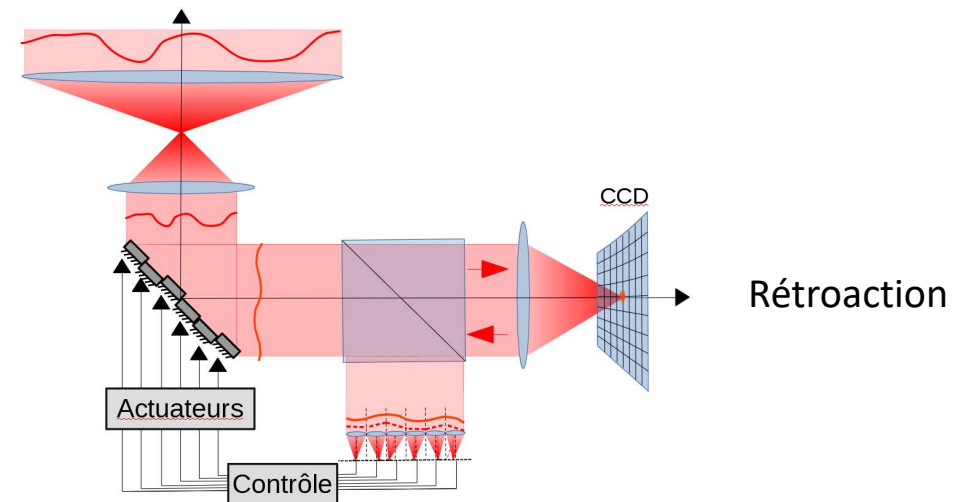


Quantifier les déformations

Compenser les déformations

2 types d'aberrations :

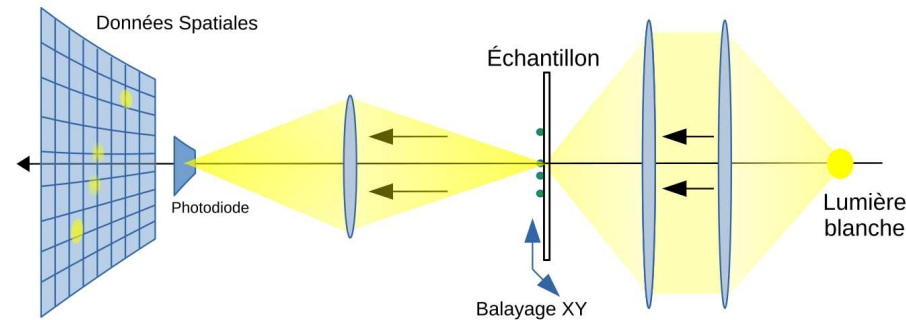
- Statique (éléments optiques défectueux, diffusion multiple)
- Dynamique (traversée d'un milieu dépendant du temps :
atmosphère, peau, oeil)



Du microscope plein champ au microscope confocal

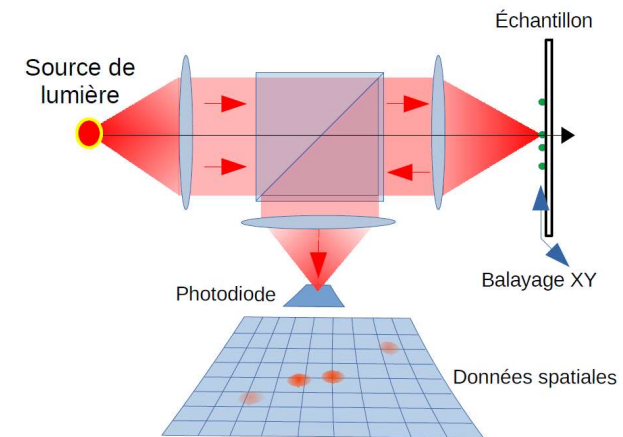
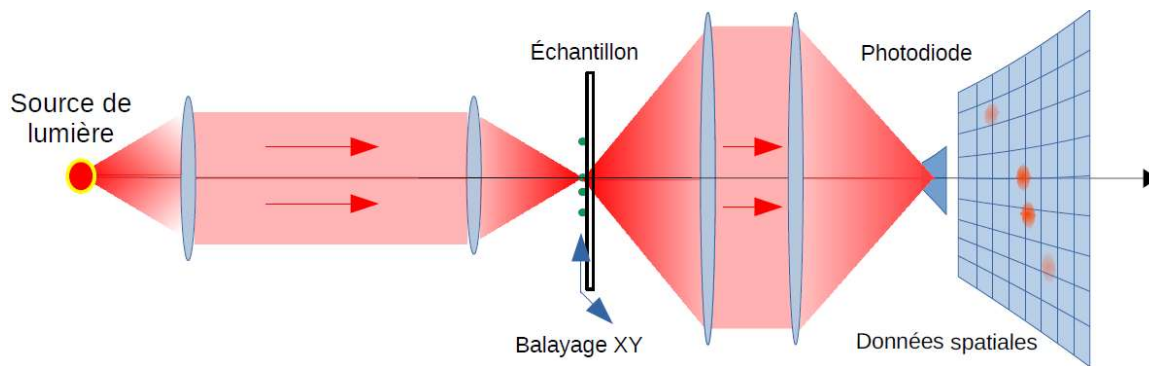
En éclairant un seul point de l'échantillon on élimine la contribution des autres plans/objets voisins
Par contre il faut scanner pour faire une image

'Inversion du sens de propagation de la lumière'



La résolution sera identique à celle du microscope plein champ mais l'acquisition d'une image n'est plus instantanée

Si l'on sélectionne uniquement la lumière venant d'un point précis alors on a encore un filtrage supplémentaire



Plus fréquent en réflexion

Impose de diminuer la taille de la photodiode

$$PSF_{tot} = PSF_{illumination} \cdot PSF_{collection} = PSF_{aller} \cdot PSF_{retour} = PSF_{plein\ champ}^2$$

Le microscope confocal : résolution

Champ dans le plan de la photodiode

$$Im_{pc}(x_i, y_i) = (Ill \cdot Obj) \otimes PSF_{pc} = \iint_{-\infty}^{\infty} Ill(x', y') \cdot Obj(x', y') \cdot PSF_{pc}(x' - x_i, y' - y_i) dx' dy'$$

Que mesure t'on ?

On suppose la

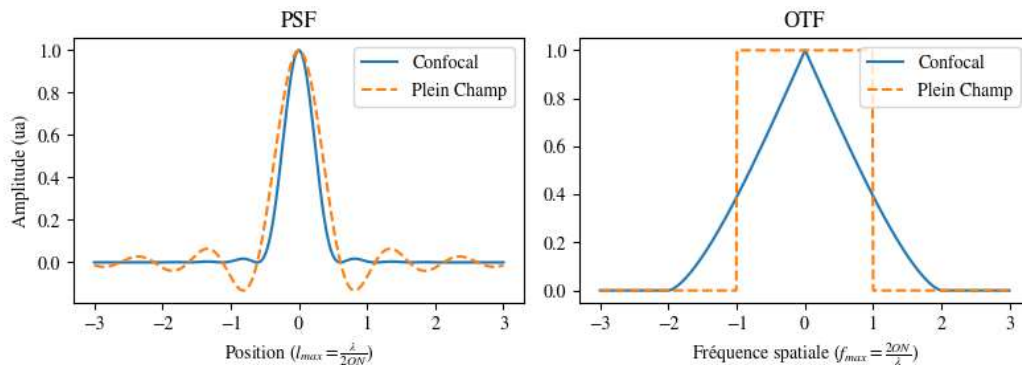
photodiode ponctuelle

$$\begin{aligned} Im_{conf}(0, 0) &= \iint_{-\infty}^{\infty} Det(x_i, y_i) \cdot |Im_{pc}(x_i, y_i)|^2 dx_i dy_i \\ &= \iint_{-\infty}^{\infty} Det(x_i, y_i) \left| \iint_{-\infty}^{\infty} Ill(x', y') \cdot Obj(x', y') \cdot PSF_{pc}(x_i - x', y_i - y') dx' dy' \right|^2 dx_i dy_i \end{aligned}$$

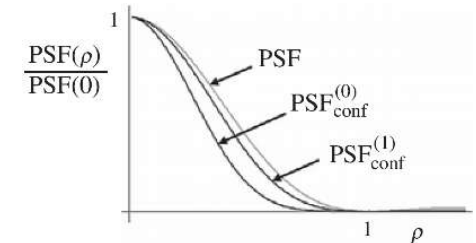
Il faut rajouter la translation

$$Im_{conf}(x_o, y_o) = \left| \iint_{-\infty}^{\infty} Ill(x', y') \cdot Obj(x' + x_o, y' + y_o) \cdot PSF_{pc}(x', y') dx' dy' \right|^2 = |Im|^2$$

On retrouve un système convolutif alors que ça n'a rien d'évident, La convolution vient ici de la translation et pas de la conjugaison optique.



Dans le cas idéal où on a un récepteur parfaitement ponctuel : pas réaliste pour des raisons de SNR

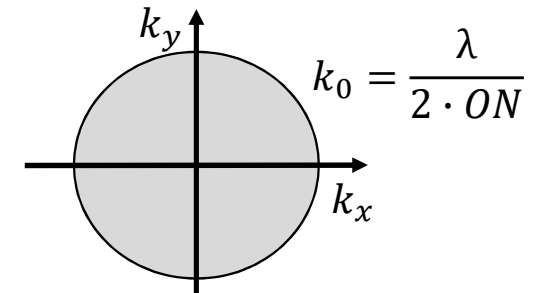


J.Mertz, Introduction to optical microscopy, 2019

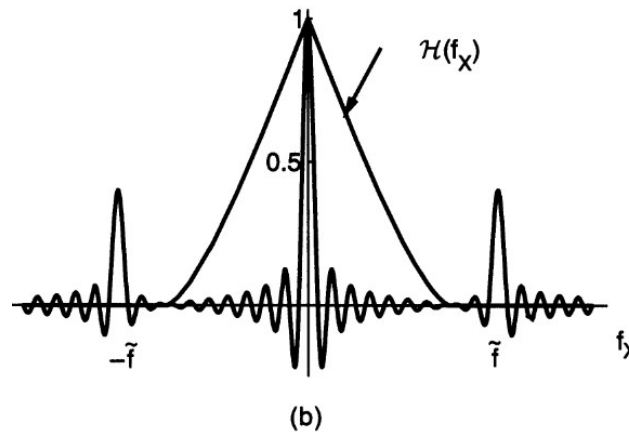
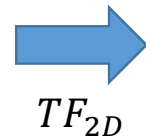
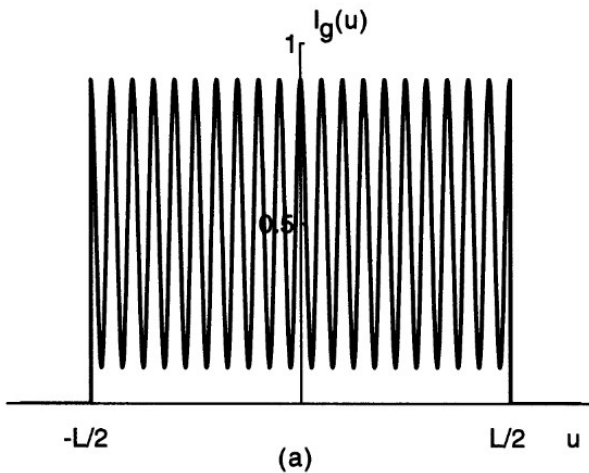
Les bases mathématiques

Problème inverse : on connaît l'image et on veut déterminer l'objet

Ici la diffraction et l'ouverture numérique limitée agissent comme un filtre passe-bas



- La TF_{2D} d'un objet de taille finie est *analytique*
- Si une fonction analytique est parfaitement connue sur un domaine de l'espace alors on peut la connaître partout par *extension* → **Résolution uniquement limitée par le SNR**



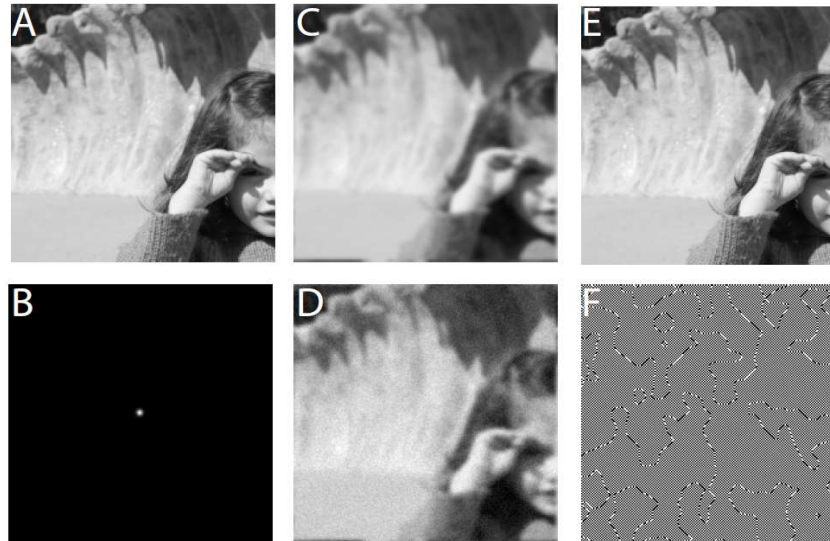
Dans la BP on a quand même de 'petites oscillations' correspondantes aux pics de fréquences élevés

Approche analytique

Modèle parfaitement déterministe

$$Im = PSF \otimes Obj \quad \text{ou dans le domaine de Fourier : } \widetilde{Im} = \widetilde{PSF} \cdot \widetilde{Obj}$$

Sans bruit



Avec bruit

Déconvolution :

$$\widetilde{Obj}_R = \widetilde{PSF}^{-1} \cdot \widetilde{Im}$$

$$Obj_R = PSF^{-1} \otimes Im$$

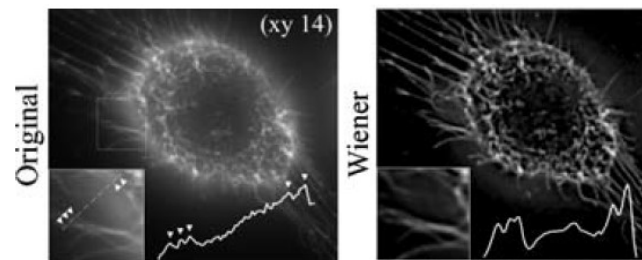
La présence de bruit rend cette approche non stable

Le problème vient des zones où la PSF est trop faible et où son inversion devient grande.

On peut tenter de la limiter dans ces zones : **Régularisation**

Filtrage de Wiener
ou Tikhonov-Miller

$$i\widetilde{PSF} = (\overline{\widetilde{PSF}} \cdot \widetilde{PSF} + \sigma)^{-1} \cdot \widetilde{PSF} \quad \sigma = SNR$$



Approche bayésienne

Parfois on a pas accès à l'objet et on ne sait pas forcément ce que l'on va trouver : astronomie, médecine....

Implémentation probabiliste
du modèle direct Information a priori sur l'objet

Information a posteriori $p(Obj|Im; \mathcal{M}) = \frac{p(Im|Obj; \mathcal{M}) \cdot p(Obj; \mathcal{M})}{p(Im; \mathcal{M})}$

Probabilité d'observer l'image Im dans le cadre du modèle

On peut choisir différentes reconstructions pour l'objet :

$$Obj_R = \underset{Obj}{\operatorname{argmax}} \{p(Obj|Im; \mathcal{M})\} \quad Obj_R = \int Obj \cdot p(Obj|Im; \mathcal{M}) dObj$$

On peut en plus donner un écart-type, régulariser les données, estimer le SNR, valider le modèle, optimiser sur un paramètre du modèle....

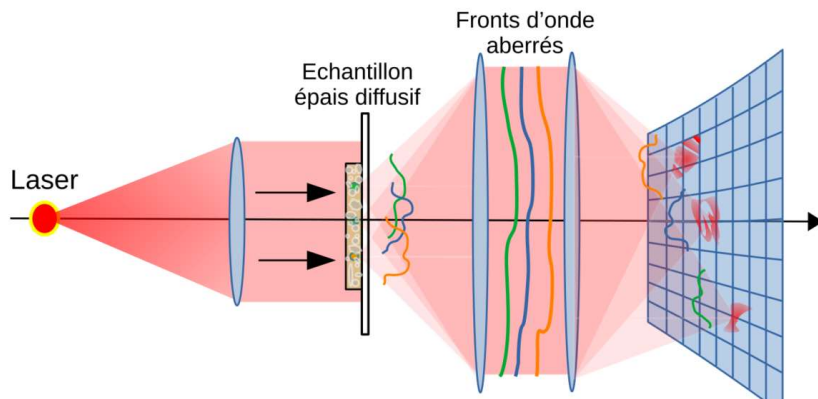
Application : $p(Obj, \mathcal{M}) \propto \exp\left(-\frac{\|Obj\|_2^2}{2\sigma_{Obj}^2}\right) \quad p(Im|Obj, \mathcal{M}) \propto \exp\left(-\frac{\|Im - A \cdot Obj\|_2^2}{2\sigma_{Im}^2}\right)$

$$\begin{aligned} Obj_R &= \underset{Obj}{\operatorname{argmax}} \{p(Obj|Im; \mathcal{M})\} = \underset{Obj}{\operatorname{argmax}} \{p(Im|Obj; \mathcal{M})p(Obj; \mathcal{M})\} \\ &= \underset{Obj}{\operatorname{argmax}} \left\{ \exp\left(-\frac{\|Im - A \cdot Obj\|_2^2}{2\sigma_{Im}^2} - \frac{\|Obj\|_2^2}{2\sigma_{Obj}^2}\right) \right\} \end{aligned} \quad \longrightarrow \quad \underset{Obj}{\operatorname{argmin}} \left\{ \frac{\|Im - A \cdot Obj\|_2^2}{2\sigma_{Im}^2} + \frac{\|Obj\|_2^2}{2\sigma_{Obj}^2} \right\}$$

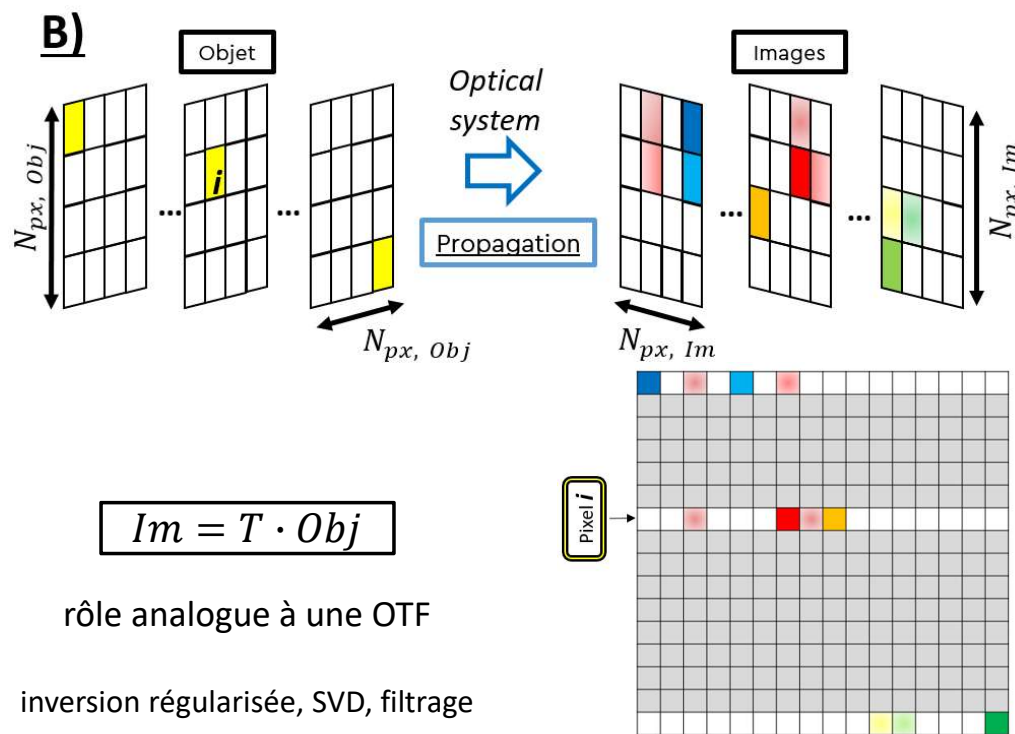
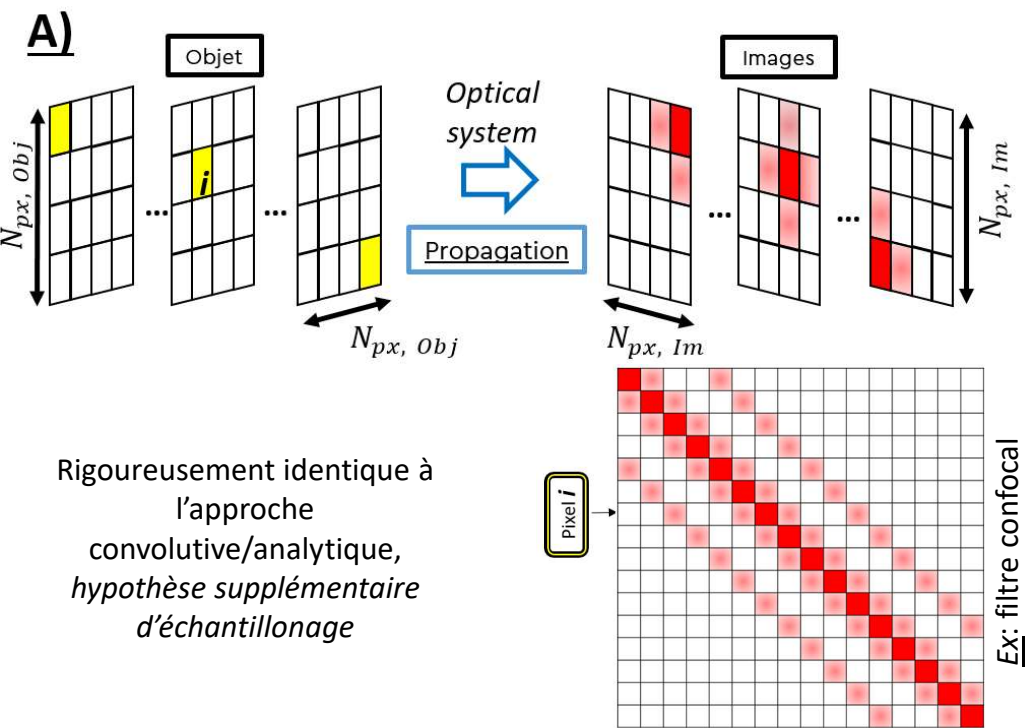
On retrouve la régularisation Tikhonov

Approche matricielle

Que faire quand l'imagerie n'est plus vraiment convolutive ?
Exemple d'un milieu avec des aberrations



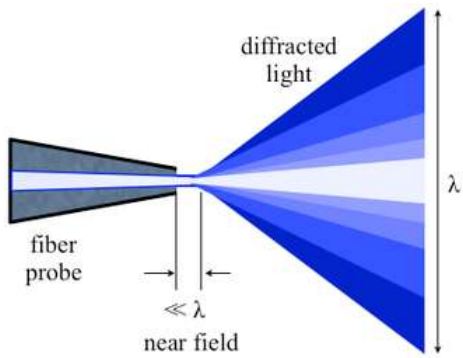
On peut mettre de côté la réponse en chaque point du milieu



Super-résolution

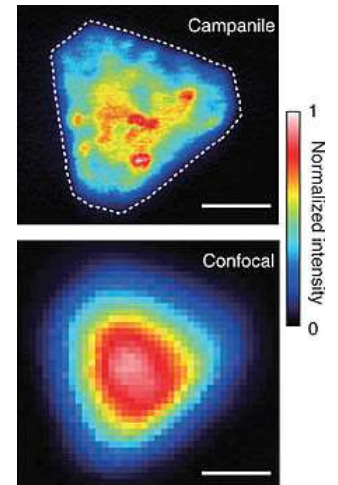
Microscopie de champ proche

Si on envoie des ondes dans une ouverture sub-longueur d'onde alors on force localement la présence d'onde possédant des fréquences spatiales plus élevées que la limite de diffraction



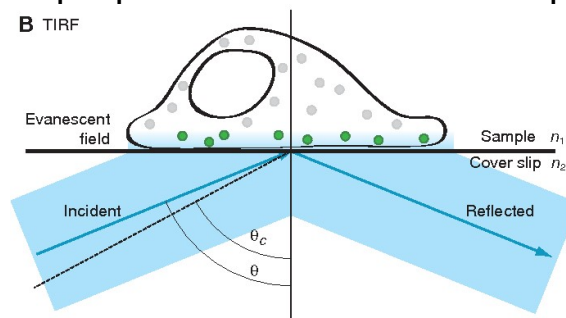
$$U_{MHF}(z) \propto \begin{cases} \left(1 + \frac{k}{\sqrt{k^2 - k_{\perp}^2}}\right) e^{i\sqrt{k^2 - k_{\perp}^2} z} & \text{si } k_{\perp} < k \\ \frac{k_{\perp}}{\sqrt{k_{\perp}^2 - k^2}} e^{i \cdot \arctan\left(\frac{k}{\sqrt{k_{\perp}^2 - k^2}}\right)} \cdot e^{-\sqrt{k_{\perp}^2 - k^2} z} & \text{si } k_{\perp} > k \end{cases}$$

Seul le contenu basse fréquence se propage, le reste forme des ondes évanescentes au voisinage de la surface



Si on arrive à maintenir une fibre optique au voisinage de la surface d'un objet alors on est plus limité par la diffraction De plus dans une fibre on peut avoir des modes propres avec un contenu fréquentiel plus élevé qu'en espace libre ou amplifier

Par une réflexion on peut exciter des ondes évanescentes : permet d'imager au voisinage d'une surface



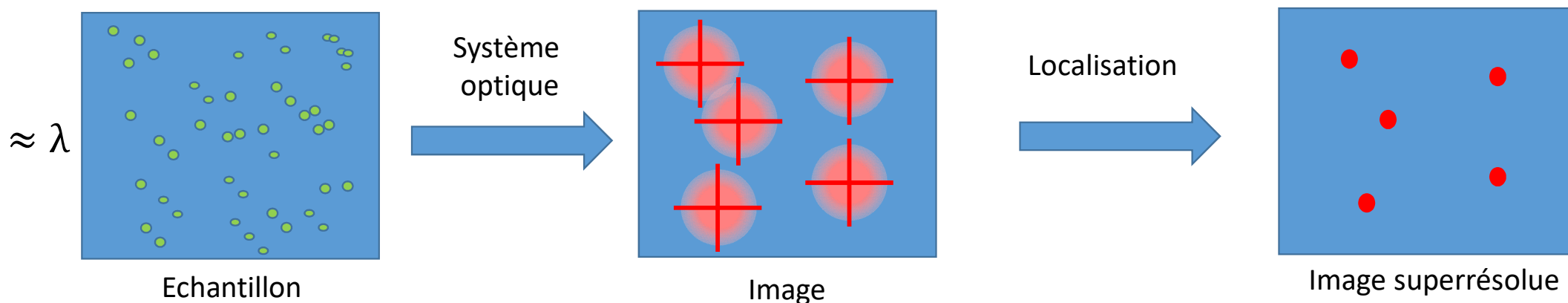
Sectionnement optique

Microscopie de fluorescence

La **précision** de la mesure n'est pas forcément directement lié à la **résolution** optique

On marque un échantillon avec des molécules fluorescentes

Si l'on peut exciter uniquement quelques molécules fluorescentes : position localisable mieux que la résolution

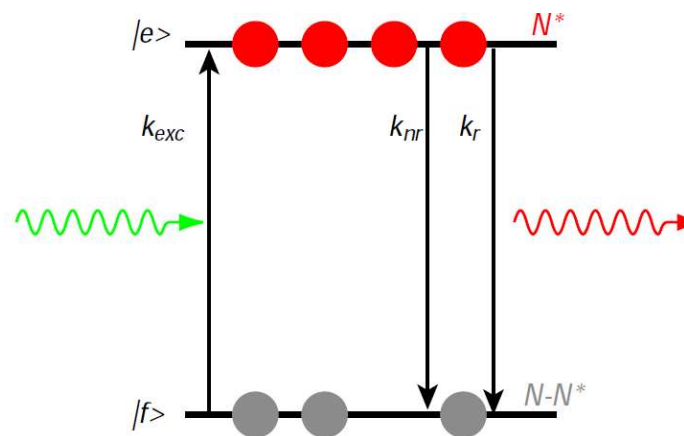


Equivalent à l'application d'un **filtre/matrice non linéaire** (Seuillage), hypothèse de **parcimonie** (sparsité) dans l'*info a priori*

En négligeant les autres bruits on suppose que les photons sont localisés dans l'espace avec une probabilité gaussienne

$$\text{(approx.PSF)} : \sigma_{loc} = \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$$

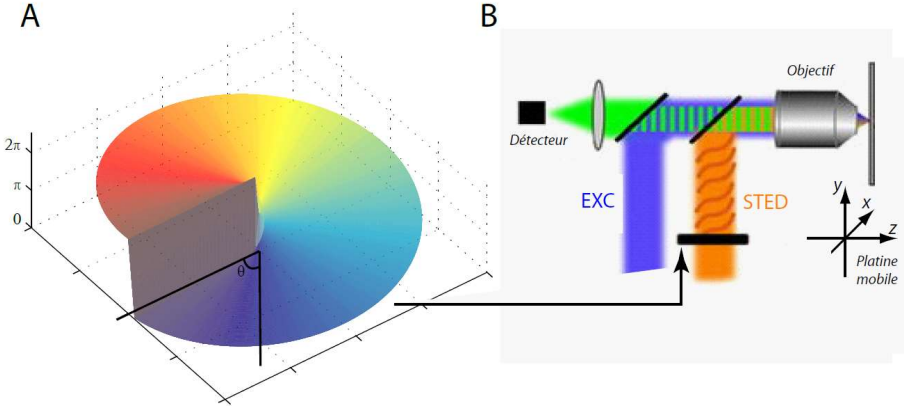
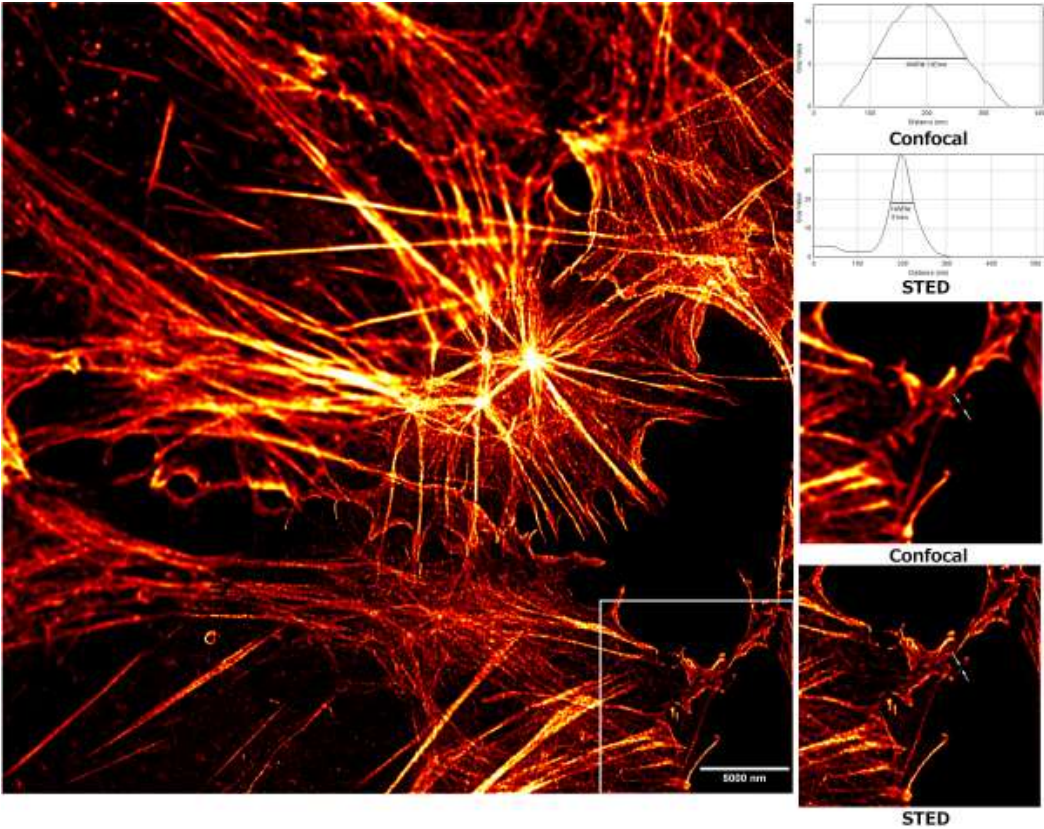
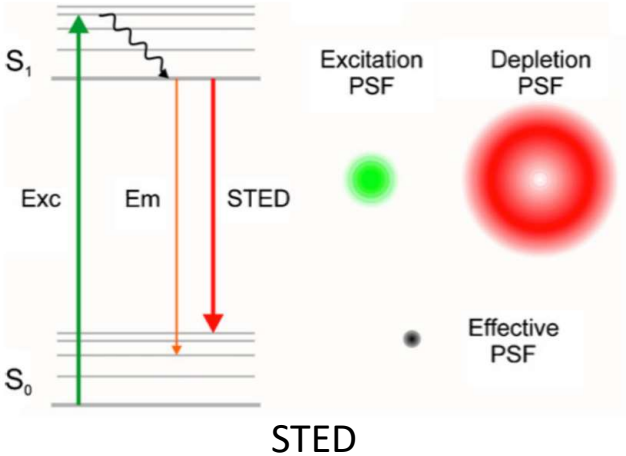
N correspond au nombres de photons émis



OG $10^5 - 10^8$
puis **photoblanchiment**

Microscopie de fluorescence : Molécules uniques, excitation déterministe

On peut exciter localement des fluorophores

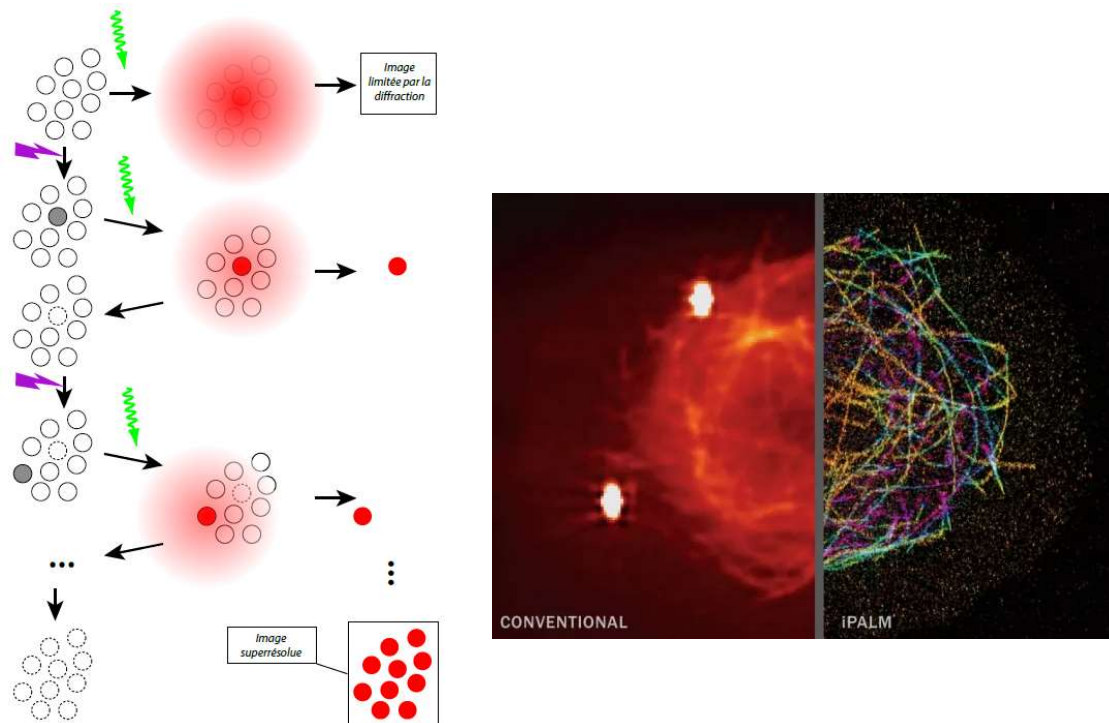


Montage, on crée une singularité de phase au centre du faisceau

Aussi possible en 3D : **segmentation**

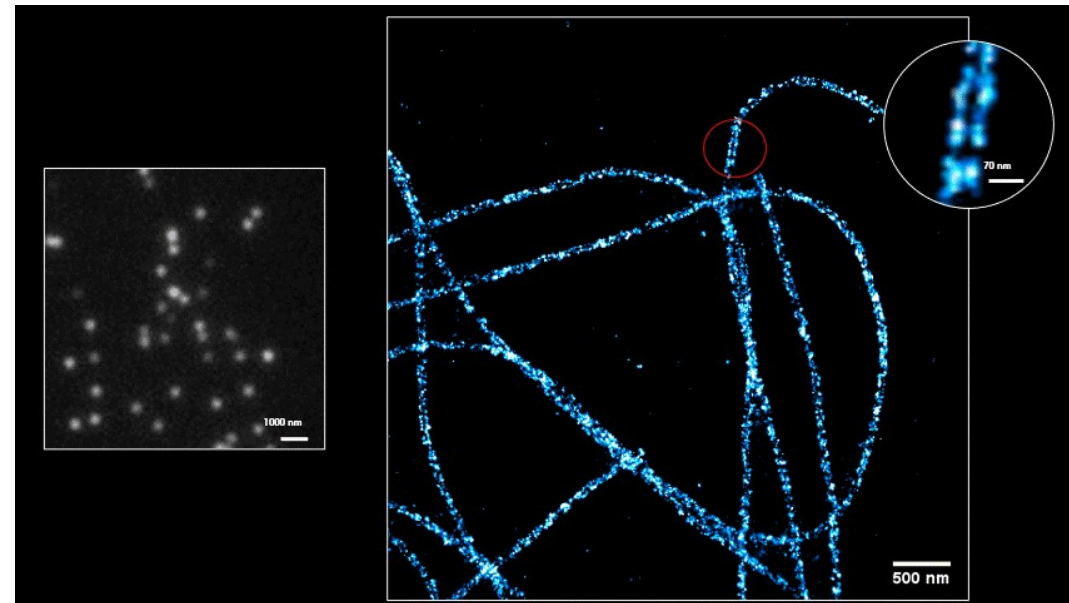
Microscopie de fluorescence : Molécules uniques, excitation stochastique

Utilisation de molécule photoactivable PALM



Utilisation du photoblanchiment STORM

Avec des séquences d'illumination plus compliquées ou des couplages entre molécules on excite les fluorophores les uns après les autres

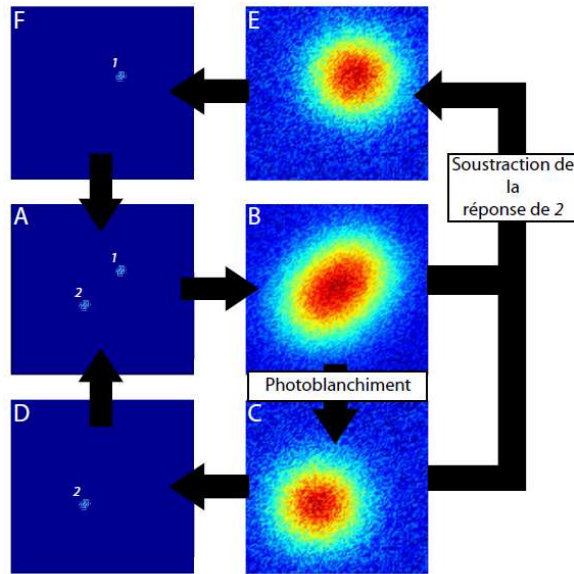


Microscopie de fluorescence : Variations de fluorescence

SHRImP

Acquisition d'un pile d'images

En faisant la soustraction de deux images 'séparées' par un évènement de photoblanchiment



SOFI

On regarde les variations dans le détails

On suppose $Im(\vec{r}, t) = \sum_{k=1}^N s_k PSF(\vec{r} - \vec{r}_k)$, en définissant $\delta Im(\vec{r}, t) = Im(\vec{r}, t) - \langle Im(\vec{r}, t) \rangle$ on peut regarder les corrélations des signaux :

$$C_2(\vec{r}, \tau) = \langle \delta Im(\vec{r}, t) \cdot \delta Im(\vec{r}, t + \tau) \rangle$$

$$= \sum_{k=1}^N \sum_{m=1}^N \langle \delta s_k(t) \delta s_m(t + \tau) \rangle PSF(\vec{r} - \vec{r}_k) PSF(\vec{r} - \vec{r}_m)$$

En supposant les variations d'émissions des fluorophores sont indépendantes on a $\langle \delta s_k(t) \delta s_m(t + \tau) \rangle \propto v_k(\tau)$ alors :

$$C_2(\vec{r}, \tau) = \sum_{k=1}^N v_k(\tau) PSF(\vec{r} - \vec{r}_k)^2$$

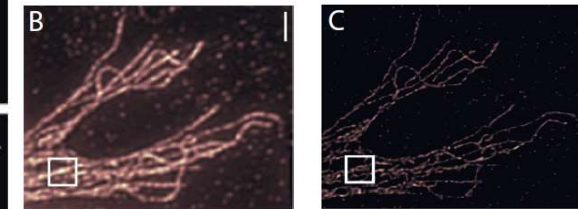
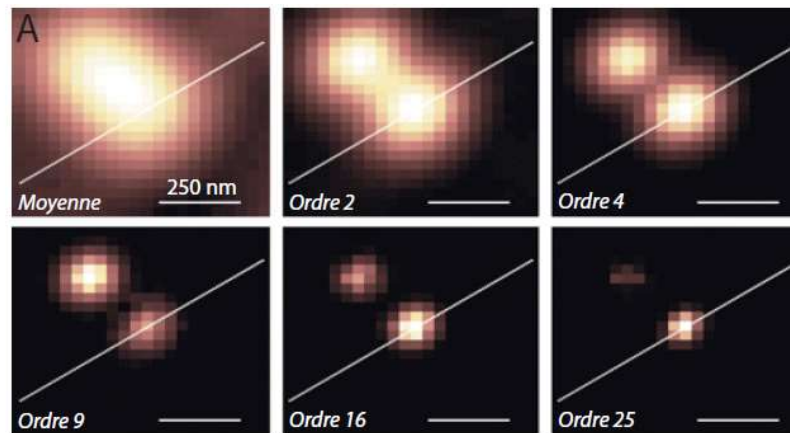
De manière générale on peut écrire : $C_n(\vec{r}, \tau) = \sum_{k=1}^N v_k(\tau) PSF(\vec{r} - \vec{r}_k)^n$

Problème : en faisant des différences d'images les bruits s'additionnent

Solution suréchantillonnage ou meilleur algo (bayésien)

BALM

Résolution légèrement moins bonne que les autres techniques mais plus à implémenter

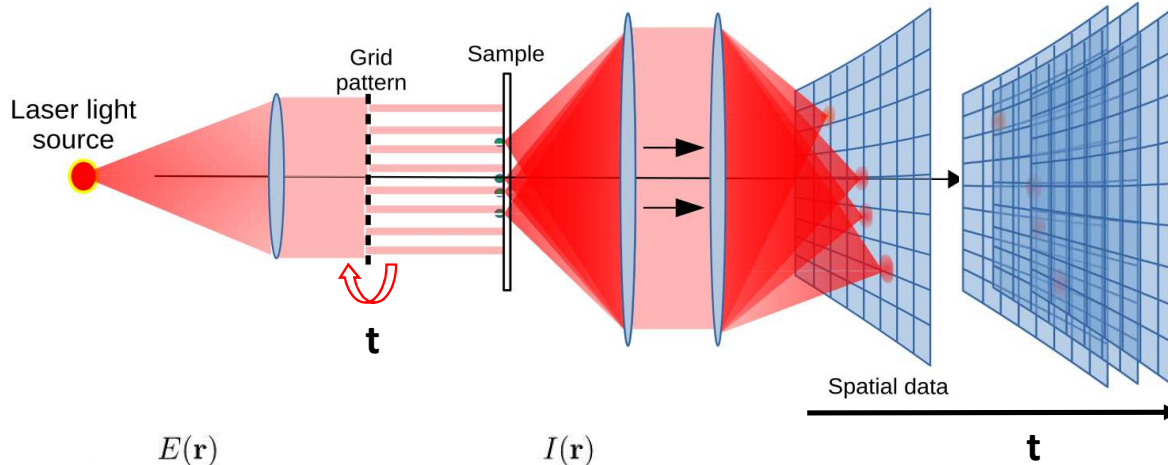


Epifluo PC

SOFI

Illumination structurée

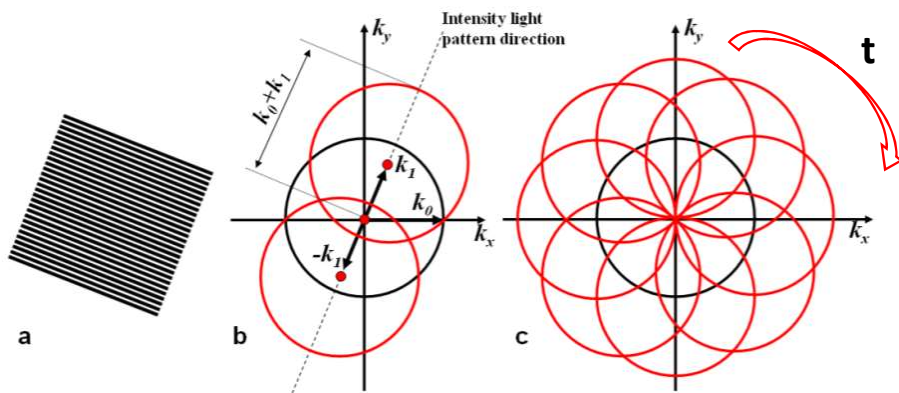
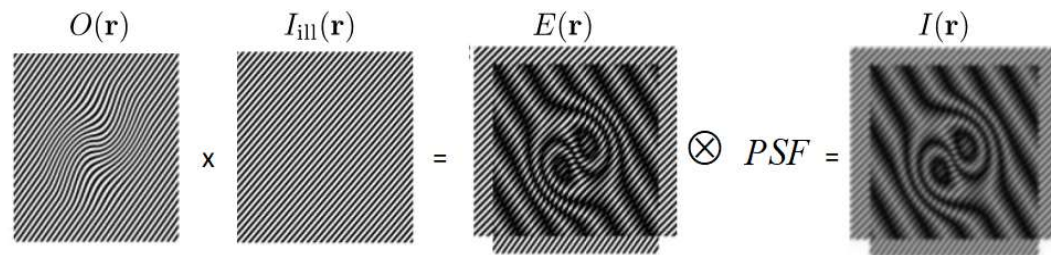
On projette un motif limité par la diffraction



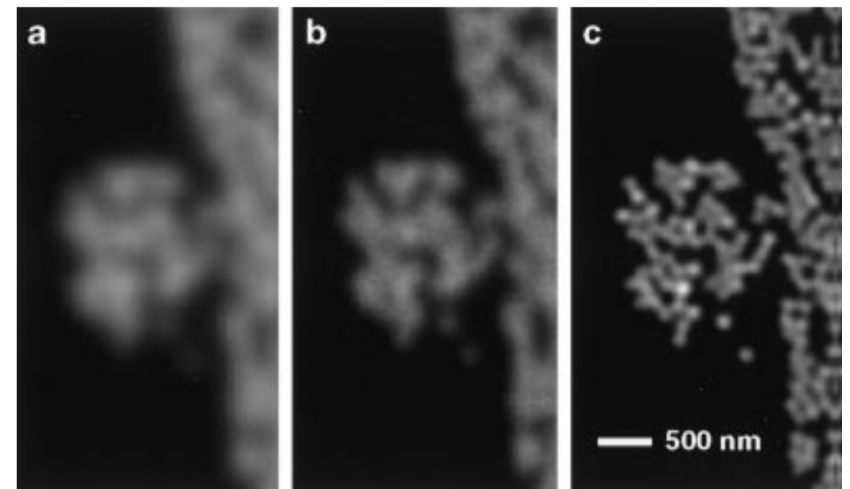
Technique de plein champ

$$Im = (Ill \times Obj) \otimes PSF$$

Mélange de fréquence



Accessible Fourier space increased by 2



Illumination structurée : non linéaire

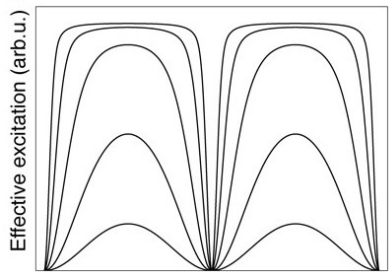
On peut se servir de la non-linéarité du phénomène de fluorescence pour ajouter des fréquences spatiales

$$Im = (Em(ILL) \times Obj) \otimes PSF$$

où $Em(ILL)$ est le profil d'émission qui dépend de l'illumination ILL

La densité de fluorophores ne permet que d'absorber une puissance maximale d'illumination

Au-delà d'une certaine puissance le profil d'émission est écrêté : introduit des **hautes fréquences spatiales** dans le profil d'émission



$$Em(\vec{r}) = \frac{ILL(\vec{r})}{ILL(\vec{r}) + I_{sat}} Obj(\vec{r})$$

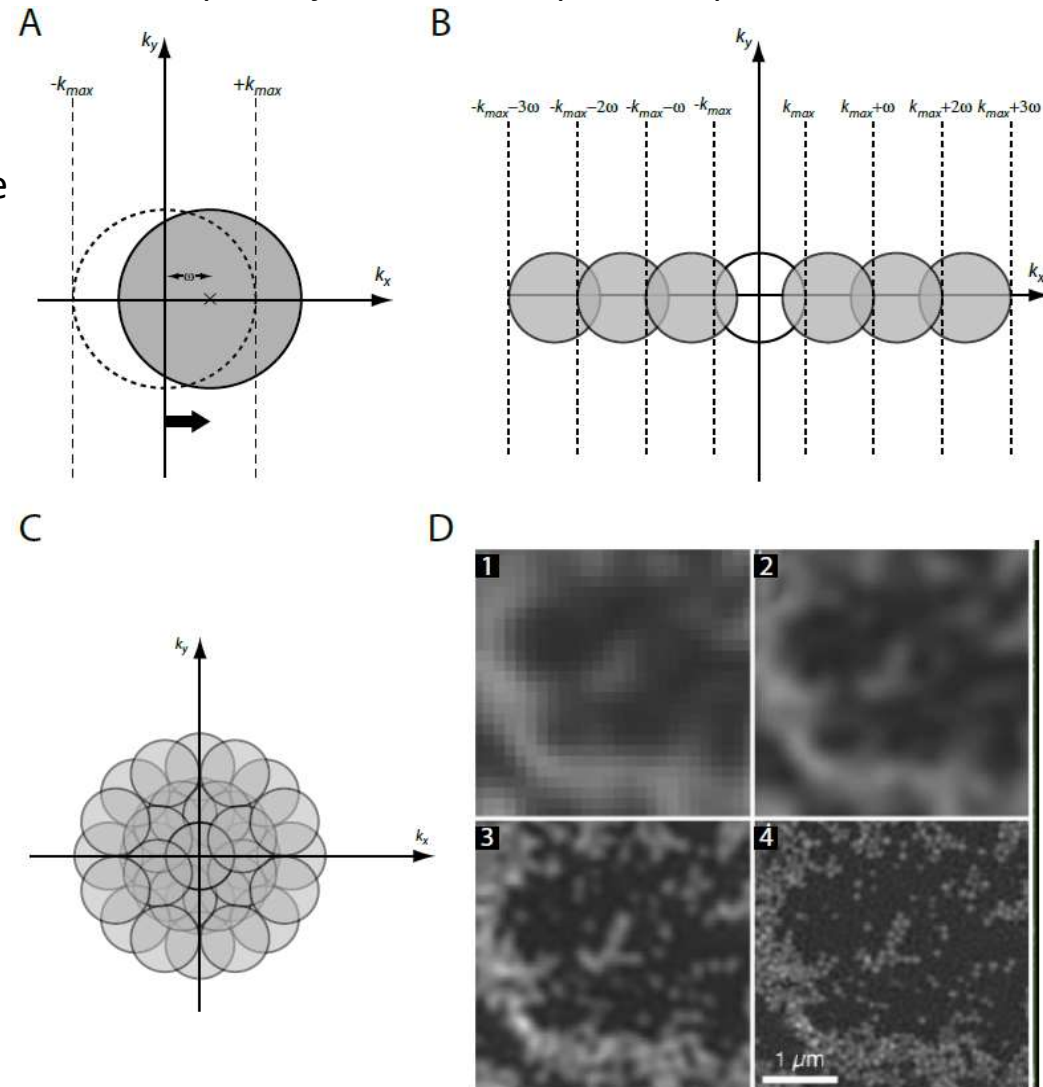
$$\approx \sum (-1)^n \left(\frac{ILL(\vec{r})}{I_{sat}}\right)^{n+1}$$

En prenant $Em(\vec{r}) \propto e^{-i\omega x}$ on a :

$$Em(x) \propto \sum \alpha_n e^{-in\omega x} Obj = \sum Em_n$$

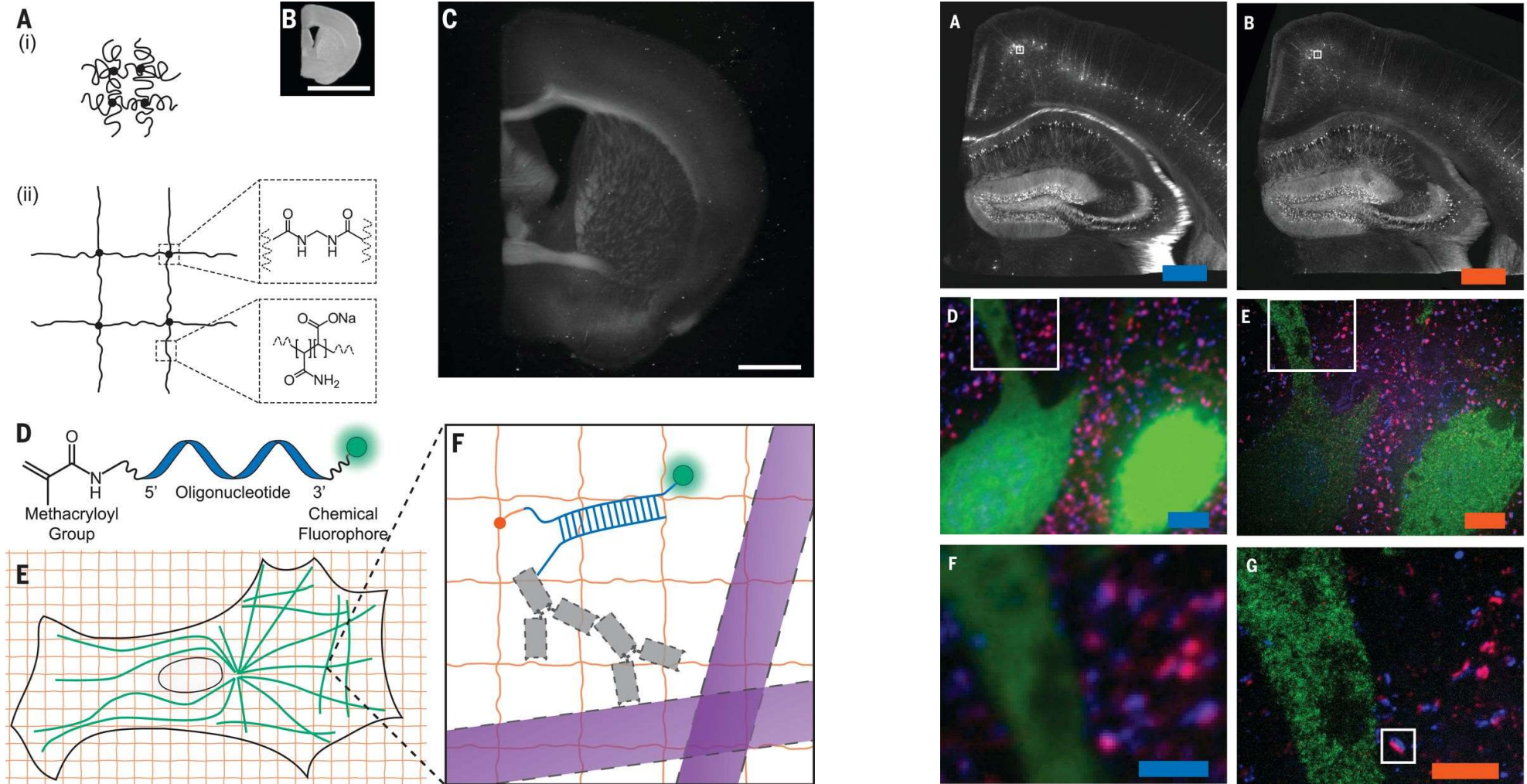


$$Im_n \propto \alpha_n e^{-in\omega x} \int_{-k_{max}+n\omega}^{k_{max}+n\omega} \widetilde{Obj}(k_x, k_y) e^{ikx} dk$$



Microscopie à expansion

Grossir les objets au lieu de travailler sur l'optique, possible grâce à des polymères/hydrogels



Rend du matériel biologique qui était caché accessible

Imagerie en milieu diffusant