



HAL
open science

Echantillonnage compressif appliqué à la microscopie de fluorescence et à la microscopie de super résolution

Makhlad Chahid

► **To cite this version:**

Makhlad Chahid. Echantillonnage compressif appliqué à la microscopie de fluorescence et à la microscopie de super résolution. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0426 . tel-01211402

HAL Id: tel-01211402

<https://theses.hal.science/tel-01211402>

Submitted on 5 Oct 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ (SVS)
SPÉCIALITÉ : BIOIMAGERIE

Par Makhlad, CHAHID

**ÉCHANTILLONNAGE COMPRESSIF
APPLIQUÉ À LA MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE
ET À LA MICROSCOPIE DE SUPER RÉOLUTION**

Sous la direction de : Vincent STUDER et Maxime DAHAN

Soutenue le 19 décembre 2014

Membres du jury :

M. Valentin NÄGERL	Interdisciplinary Institute for Neuroscience	Président
Mme Laure BLANC FÉRAUD	Université de Nice Sophia-Antipolis, I3S	Rapporteur
M. Sylvain GIGAN	École Normale Supérieure, LKB	Rapporteur
M. Florent KRZAKALA	École Normale Supérieure, LPS	Examineur
M. Vincent STUDER	Interdisciplinary Institute for Neuroscience	Directeur de thèse
M. Maxime DAHAN	Institut Curie, Physico-Chimie	Directeur de thèse

À mes parents...

Remerciements

Je tiens à remercier ici l'ensemble des acteurs qui ont permis de près ou de loin que ma thèse puisse se faire, que ce soit par leur soutien mais aussi par leurs compétences scientifiques.

Mes premiers remerciements s'adressent à mon jury de thèse que je remercie d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse, c'est un honneur pour moi. Merci donc à Pr. Valentin Nägerl, Pr. Laure Blanc-Féraud, Pr. Sylvain Gigan et Pr. Florent Krzakala pour leur expertise.

Je remercie également le directeur du laboratoire Daniel Choquet de m'avoir accepté et accueilli pour effectuer mes travaux de thèse au sein de son laboratoire et Jean Baptiste Sibarita, chef de l'équipe d'avoir également accepté que j'intègre son équipe.

Je souhaite adresser un remerciement très particulier à Vincent Studer et Maxime Dahan, mes deux directeurs de thèses. Ils ont très logiquement eu un rôle décisif dans l'accomplissement de ce long périple. Ils m'ont permis d'effectuer mes travaux de thèse sur un sujet particulièrement passionnant. Nouveau poisson dans l'océan des Sciences, je reste toujours impressionné après quatre années à leurs côtés de l'étendue de leurs connaissances et également de leur esprit scientifique. La localisation géographique a naturellement favorisé mes interactions avec Vincent. L'ambiance a toujours été chaleureuse et particulièrement agréable. Je veux qu'il reçoive par ces quelques lignes toute l'expression de ma sincère gratitude. Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité, merci de m'avoir fait confiance, merci pour tout !

J'adresse un grand merci aux collaborateurs de ce projet qui ont fortement contribué dans ma thèse, notamment Jérôme Bobin, qui a mis à ma disposition des instruments très performants à la base de mes résultats scientifiques.

Je veux également remercier par ces quelques lignes, l'ensemble de l'équipe Sibarita : Florian, Philippe, Isabelle, Ammar, Marouen, Ghislain, Rémi, Anne, Yohan, et particulièrement deux doctorants de l'équipe : Adel et Corey pour leurs contributions scientifiques à mes recherches. Plus généralement, je remercie tous les membres de l'institut avec qui j'ai pu interagir et partager des discussions. Me retrouver dans un laboratoire de neurosciences a été une formidable expérience. L'univers très inter-

disciplinaire y a été très intéressant et a donné une dimension particulière aux recherches que j'ai mené.

Enfin, je ne pouvais finir sans remercier particulièrement ma famille et mes amis, les deux sont presque indissociables. J'ai vécu de très belles choses durant ma thèse et je garde un excellent souvenir des moments que j'ai passé avec eux, ils m'ont soutenu, supporté et encouragé. Alors un très grand merci à eux d'avoir cru en moi, c'est une expérience marquante qui je l'espère laissera place à de plus belles choses encore dans ma vie et ma carrière.

Résumé

Mes travaux de thèse portent sur l'application de la théorie de l'échantillonnage compressif (Compressed Sensing ou Compressive Sampling, CS) à la microscopie de fluorescence, domaine en constante évolution et outil privilégié de la recherche fondamentale en biologie. La récente théorie du CS a démontré que pour des signaux particuliers, dits parcimonieux, il est possible de réduire la fréquence d'échantillonnage de l'information à une valeur bien plus faible que ne le prédit la théorie classique de l'échantillonnage. La théorie du CS stipule qu'il est possible de reconstruire un signal, sans perte d'information, à partir de mesures aléatoires fortement incomplètes et/ou corrompues de ce signal à la seule condition que celui-ci présente une structure parcimonieuse.

Nous avons développé une approche expérimentale inédite de la théorie du CS à la microscopie de fluorescence, domaine où les signaux sont naturellement parcimonieux. La méthode est basée sur l'association d'une illumination dynamique structurée à champs large et d'une détection rapide à point unique. Cette modalité permet d'inclure l'étape de compression pendant l'acquisition. En outre, nous avons montré que l'introduction de dimensions supplémentaires (2D+couleur) augmente la redondance du signal, qui peut être pleinement exploitée par le CS afin d'atteindre des taux de compression très importants.

Dans la continuité de ces travaux, nous nous sommes intéressés à une autre application du CS à la microscopie de super résolution, par localisation de molécules individuelles (PALM/STORM). Ces nouvelles techniques de microscopie de fluorescence ont permis de s'affranchir de la limite de diffraction pour atteindre des résolutions nanométriques. Nous avons exploré la possibilité d'exploiter le CS pour réduire drastiquement les temps d'acquisition et de traitement.

Mots clefs : échantillonnage compressif, microscopie de fluorescence, parcimonie, microscopie de super résolution, redondance, traitement du signal, localisation de molécules uniques, bio-imagerie

Abstract

My PhD work deals with the application of Compressed Sensing (or Compressive Sampling, CS) in fluorescence microscopy as a powerful toolkit for fundamental biological research. The recent mathematical theory of CS has demonstrated that, for a particular type of signal, called sparse, it is possible to reduce the sampling frequency to rates well below that which the sampling theorem classically requires. Its central result states it is possible to losslessly reconstruct a signal from highly incomplete and/or inaccurate measurements if the original signal possesses a sparse representation.

We developed a unique experimental approach of a CS implementation in fluorescence microscopy, where most signals are naturally sparse. Our CS microscope combines dynamic structured wide-field illumination with fast and sensitive single-point fluorescence detection. In this scheme, the compression is directly integrated in the measurement process. Additionally, we showed that introducing extra dimensions (2D+color) results in extreme redundancy that is fully exploited by CS to greatly increase compression ratios.

The second purpose of this thesis is another appealing application of CS for super-resolution microscopy using single molecule localization techniques (e.g. PALM/STORM). This new powerful tool has allowed to break the diffraction barrier down to nanometric resolutions. We explored the possibility of using CS to drastically reduce acquisition and processing times.

Key words: compressed sensing, compressive sampling, fluorescence microscopy, sparsity, signal processing, single molecule localization microscopy, biological imaging, super resolution microscopy.

Title : Compressive fluorescence microscopy for biological imaging and super resolution microscopy.

Abbréviations

A^T : Transposée de la matrice A
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
BP : Basis Pursuit
CAN : Conversion Analogique Numérique
CCD : Charge Coupled Microscopy
CFM : Compressive Fluorescence Microscopy
CFP : Cyan Fluorescent Protein
CMOS : Complementary Metal Oxide Semiconductor
CoSaMP : Compressive Sampling Matching Pursuit
CPU : Central Processing Unit
CS : Compressed Sensing ou Compressive Sampling
Cy3,5 : Cyanine 3, Cyanine 5
DMD : Digital Micromirror Device
dSTORM : direct STochastic Optical Reconstruction Microscopy
EMCCD : Electron Multiplying Charge Coupled Microscopy
FRAP : Fluorescent Recovery After Photobleaching
FWHM : Full Width at Half Maximium
GFP : Green Fluorescent Protein
GPU : Graphics Processing Unit
IHT : Iterative Hard Thresholding
JPEG : Joint Photographic Experts Group
MPEG : Moving Picture Experts Group
OMP : Ortogonal Matching Pursuit
ON : Ouverture Numérique
OTF : Optical Transfer Function
PAFPs : PhotoActivatable Fluorescent Proteins
PALM : PhotoActivated Localization Microscopy
PIR : Principe d'Incertitude Robuste
PSF : Point Spread Function
PMT : PhotoMultiplier Tube

RIP : Restricted Isometry Property
RSB : Rapport Signal sur Bruit
SIM : Structured Illumination Microscopy
STED : STimulated Emission Depletion
STORM : STochastic Optical Reconstruction Microscopy
TIFF : Tagged Image File Format
TIRF : Total Internal Reflection Fluorescence
TF : Transformée de Fourier
UV : Ultra Violet
YFP : Yellow Fluorescent Protein
wGFP : wild type Green Fluorescent Protein

Table des matières

Introduction	1
Introduction générale	3
1 Microscopie de fluorescence	9
1.1 Principe	10
1.1.1 Montage du microscope à champs large	10
1.1.2 Principe de la fluorescence	11
1.1.3 Principales limitations	16
1.2 Ouverture numérique	18
1.3 Résolution spatiale	19
1.3.1 Image d'un point et fonction de transfert	19
1.3.2 Résolution théorique du microscope photonique	22
1.4 Comparaison du montage en champs large et confocal	23
2 Numérisation en microscopie de fluorescence	27
2.1 De l'analogique au numérique	28
2.1.1 Discrétisation	29
2.1.2 Quantification	31
2.1.3 Théorème de l'échantillonnage	33
2.2 Capteurs	34
2.2.1 CCD	34
2.2.2 EMCCD	36
2.2.3 Tube photo-multiplicateur (PMT)	37
2.3 Sources de bruits	38
2.3.1 Bruit thermique	38
2.3.2 Bruit de lecture	38
2.3.3 Bruit de photons	38
2.3.4 Efficacité quantique d'un capteur	39
2.3.5 Rapport signal à bruit	41

Table des matières

3	Échantillonnage Compressif	43
3.1	Compression des données	45
3.2	Théorie de l'échantillonnage compressif	47
3.2.1	Principe	47
3.2.2	Parcimonie	48
3.2.3	Incohérence	49
3.2.4	Principe d'incertitude	50
3.2.5	Sous-échantillonnage	51
3.2.6	Principe d'Isométrie Restreinte	54
3.3	Algorithme de reconstruction	54
	Microscopie de fluorescence compressive	57
4	Résumé et publication	59
4.1	Compressed Sensing framework	63
4.2	Compressed Fluorescence Microscopy : Implementation	63
4.2.1	Experimental Setup	63
4.2.2	Choice of the illumination patterns	64
4.2.3	Computational reconstruction	64
4.3	Sparse Fluorescence images Beads Cells and Tissues	65
4.3.1	Fluorescent Beads	65
4.3.2	Lily anther slice	66
4.3.3	Zyxin mEOS2 COS7 cells	66
4.4	Hyperspectral Imaging in CFM	67
4.5	Discussions and perspectives	67
4.5.1	Point spread function and its modeling	67
4.5.2	Noise and MSE	68
4.5.3	Impact of the sample thickness	69
4.5.4	Conclusions and prospect	69
4.6	Appendix	69
4.7	Aknowledgments	70
5	Compléments	71
5.1	Montage du microscope CS	71
5.2	Contrôle de l'illumination	72
5.2.1	DMD	73
5.2.2	Système anti-speckle	76
5.3	Alignement du système	78
5.4	Acquisitions	80
5.4.1	Principe	80

5.4.2 Mesures	80
5.5 L'algorithme de reconstruction NESTA	85
Microscopie de Super-Résolution	87
6 État de l'art	89
6.1 Introduction	89
6.2 PALM/STORM	93
6.2.1 Principe	93
6.2.2 Fluorescence photo-modulable	95
6.2.3 Acquisition des données	97
6.2.4 Algorithmes de localisation	100
7 Localisation de molécules uniques en microscopie	103
7.1 Introduction	103
7.2 Algorithme de reconstruction - Fast IHT	105
7.2.1 Fonctionnement	105
7.2.2 Entrées - Sorties	106
7.3 Simulations	107
7.3.1 Génération d'images simulées	108
7.3.2 Localisation des molécules	112
7.3.3 Reconstructions	113
7.4 Données expérimentales	119
7.4.1 Influence de la PSF	119
7.4.2 Données ISBI	121
7.4.3 Neurologine biotynilée AF647	127
Conclusions	129
8 Conclusions et perspectives	131
Bibliographie	135

Introduction **Partie**

Introduction générale

LA microscopie de fluorescence est un outil fondamental pour la recherche biomédicale, avec un nombre très important d'applications, *in vitro* et *in vivo*. Un aspect très attrayant de la détection par fluorescence est la possibilité d'utiliser plusieurs fluorophores et une détection multicolore. C'est par exemple le cas en biologie cellulaire où la machinerie de la cellule peut être étudiée en temps réel grâce à des marqueurs fluorescents génétiquement codés et distinguables par leur couleur. De façon générale, l'imagerie hyperspectrale et le multiplexage spectral sont considérés comme des technologies clés dans de nombreux contextes de la recherche biomédicale fondamentale ou appliquée.

Dans cette thèse, nous avons adopté une approche radicalement nouvelle de la bio-imagerie de fluorescence basée sur les concepts de la théorie de l'*échantillonnage compressif* ou *Compressive Sensing* (CS). Traditionnellement, les conditions d'échantillonnage d'un signal (image ou séquence temporelle) sont déterminées par le théorème de Shannon-Nyquist, qui stipule que la fréquence d'échantillonnage doit être au moins égale à deux fois la largeur de la bande passante du signal. Cependant, dans de nombreux cas, le signal numérisé est compressible, de sorte qu'il est possible de le représenter avec un nombre de mesures fortement restreint. La récente théorie du Compressed Sensing (initiée en partie par E. Candes), a apporté une réponse positive à cette question et a indiqué les moyens pratiques pour y parvenir. Le principe du CS est de faire des mesures en projetant le signal sur une base de fonctions qui ne sont pas corrélées avec la base dans laquelle elle est compressible. Le résultat central de la théorie est qu'il est possible d'obtenir toute l'information contenue dans le signal avec un nombre de mesures beaucoup plus faible qu'en utilisant des techniques conventionnelles.

Le CS représente incontestablement un changement de paradigme dans l'acquisition des données et a une large gamme d'applications. Historiquement, les premières applications ont concerné l'imagerie par résonance magnétique nucléaire. Les premiers résultats à ce sujet ont montré la possibilité de réduire notablement les temps d'acquisitions tout en maintenant un haut degré de résolution finale de l'imagerie. Par la suite, les applications n'ont cessé d'augmenter et traduisent un fort

intérêt pour la théorie du CS. Le CS ouvre de nouvelles perspectives en sciences de l'information et plus généralement dans tous les domaines où le traitement du signal tient une place importante, notamment l'imagerie par microscopie de fluorescence, sujet de ma thèse. Dans ce domaine, lui aussi en forte évolution, des développements récents permettant d'accroître fortement la résolution spatiale induisent de fortes contraintes en terme de *bande passante d'acquisition*. Cette augmentation de quantité de données peut conduire à des temps d'acquisitions parfois prohibitifs. L'objet de cette thèse est d'adapter la théorie du CS à la microscopie de fluorescence. Dans un premier temps, j'ai complété les premiers travaux initiés au laboratoire dont le but est de démontrer la possibilité d'appliquer la théorie de l'échantillonnage compressif pour réduire la bande passante d'acquisition en microscopie de fluorescence. Dans ce domaine, on peut opposer deux schémas principaux que sont la microscopie à champs large et la microscopie confocale. Dans les deux cas, on observe des signaux fluorescents qui reposent sur plusieurs éléments clés : une lumière d'excitation, un ou des fluorophores, des filtres pour pouvoir séparer les photons d'émissions des photons d'excitation et enfin un détecteur qui enregistre la fluorescence émise. Cette fluorescence est transformée par la suite et codée pour obtenir une image ou photographie de l'échantillon. Classiquement, dans le premier cas, un échantillon biologique est illuminé dans sa totalité et un capteur de type CCD enregistre la fluorescence résultante de l'excitation. Dans le second schéma (confocal), un laser excite un volume très réduit de l'échantillon d'intérêt au travers d'un iris avec un capteur à point unique de type PMT (PhotoMultiplier Tube) qui enregistre simultanément la fluorescence émise ; puis par balayages successifs de l'intégralité de l'échantillon, on obtient une image de ce dernier. Chacune des modalités présente des avantages et des défauts inhérents à leur fonctionnement. En effet, la microscopie à champs large est clairement plus rapide puisque les opérations d'excitation et d'enregistrement n'ont lieu qu'une seule fois et de façon simultanée. Cette modalité a également comme intérêt d'être plus sensible avec une valeur de bruit plus faible. En microscopie confocale, l'image est obtenue beaucoup plus lentement puisqu'il est nécessaire d'illuminer, point par point, une région équivalente à celle obtenue en champs large. En revanche, dans ce schéma, les modalités de détecteurs sont multiples (spectrales) et moins coûteuses avec une résolution plus grande qu'en microscopie à champs large notamment par l'obtention d'images *sectionnées*. Cela veut dire qu'on arrive à isoler uniquement la contribution d'un plan très fin sans la contribution de fluorescence hors du plan focale. **Dans les deux cas, l'acquisition est indépendante de l'information contenue dans l'image mais doit satisfaire au théorème de Shannon-Nyquist.**

Nous avons couplé le schéma d'illumination du microscope à champs large avec un détecteur à point unique utilisé en microscopie confocale pour tirer partie des

avantages liés aux deux modalités d'acquisition en plus de ce que permet l'application de la théorie du CS. Un élément clé du montage consiste à utiliser un DMD, ou matrice de micro-miroirs, qui permet de créer des motifs d'illuminations structurées à haute fréquence. Cet élément permet d'adapter la théorie du CS à notre montage, par projection du signal dans une base de fonctions qui ne sont pas ou peu corrélées avec la base de parcimonie. On procède à la reconstruction du signal via un algorithme adapté à la théorie du CS en n'utilisant qu'une partie des projections. En réduisant successivement le nombre de ces projections, dans le processus de reconstruction, on atteint une limite en dessous de laquelle il n'est plus possible de reconstruire sans perte d'information notre signal de départ. Ceci nous permet d'établir, une fois pour toute, le meilleur taux de compression que l'on peut obtenir en pratique, et ne faire l'acquisition que d'une partie réduite du signal, équivalente au meilleur taux de compression obtenu. On réalise ainsi un schéma d'acquisition où la compression des données a lieu au moment de l'acquisition et non a posteriori puisque une fois que nous connaissons les limites de compression, nous pouvons nous permettre de travailler à cette valeur optimale.

La dynamique cellulaire est très complexe et fait intervenir de nombreuses interactions entre différentes protéines. Il est alors très utile de pouvoir étudier les mécanismes intracellulaires de plusieurs protéines en même temps. Cela nécessite d'être capable de les dissocier en utilisant notamment des marqueurs fluorescents de différentes couleurs mais aussi et surtout de pouvoir en suivre l'évolution simultanément. Il s'agit du défi que nous avons cherché à relever en explorant la possibilité d'effectuer des acquisitions multi-couleurs et hyperspectrales (où toute une partie du spectre d'émission de fluorescence de l'échantillon peut être enregistrée) grâce au CS. Par ailleurs, la théorie du CS démontre qu'en introduisant une dimension supplémentaire, le degré de redondance du signal est augmenté ce qui doit permettre une augmentation du taux de compression final.

L'utilisation combinée d'un modèle à trois dimensions et la possibilité d'atteindre des taux de compression d'autant plus importants se complètent dans ce manuscrit par l'application du CS à la microscopie de super résolution. Dans une dernière partie nous avons essayé d'appliquer la théorie du CS à la reconstruction d'images de super résolution. En effet, les mécanismes cellulaires font intervenir des interactions d'éléments de tailles bien inférieures à la limite de résolution classique des microscopes photoniques conventionnels. La limite de résolution optique pour distinguer deux éléments très proches est définie par la distance de Rayleigh ($1,22\lambda/2ON$). En microscopie optique classique il est impossible de résoudre, c'est-à-dire de distinguer, deux molécules situées à une distance inférieure à la distance de Rayleigh. Depuis plusieurs années maintenant, des techniques basées sur la localisation de molécules uniques ont permis de s'affranchir de cette limite. Ces techniques per-

mettent la détection et la localisation de molécules uniques marquées avec une très bonne précision inférieure à la limite de résolution optique. Cependant, si plusieurs molécules se trouvent trop proches, leur localisation n'est plus possible. Les techniques de microscopie STORM (ou PALM) sont basées sur ce principe [15, 82, 120]. Pour chaque acquisition, seule une fraction des molécules fluorescentes est activée afin de pouvoir distinguer chaque molécule émettrice. En accumulant les acquisitions, il est possible de reconstituer entièrement une image super résolue à la manière d'une image pointilliste. L'essor des sondes fluorescentes photo-modulables [115, 138] a permis à ces nouvelles stratégies de microscopie super-résolutives stochastiques de voir le jour en permettant de contrôler le taux de clignotements de molécules uniques. En effet, par activation stochastique de quelques molécules uniques (suffisamment éloignées les unes des autres) et la possibilité de les localiser avec une très grande précision, ces techniques permettent de reconstruire des images super résolues avec pour principal inconvénient la nécessité de devoir répéter l'opération d'activation plusieurs milliers de fois. Cela implique des temps d'acquisitions longs et surtout de grands espaces de stockage.

Récemment, des résultats ont montré la possibilité d'utiliser le CS pour drastiquement réduire le nombre d'acquisitions nécessaires à la reconstruction d'images super résolues [151]. En augmentant la densité de molécules par plan d'acquisition il n'est plus nécessaire d'accumuler autant d'acquisitions. Nous avons essayé de mettre cela en œuvre dans cette dernière partie pour explorer cette nouvelle voie.

Ce manuscrit est organisé autour de trois parties principales. La première partie est consacrée à l'introduction des notions importantes sur lesquelles je m'appuie pour formuler les résultats développés dans la suite du manuscrit. Il s'agit de la microscopie de fluorescence, de la numérisation des signaux et d'une introduction à la théorie du CS. Dans la seconde partie, je présente les résultats que nous avons obtenus par l'application du CS en microscopie de fluorescence et les modifications apportées au schéma conventionnel (ou classique) pour y parvenir. Nous retrouvons dans cette partie la publication dont a fait l'objet nos résultats et un chapitre complémentaire où je précise plusieurs détails et développe l'aspect expérimental. La dernière et troisième partie du manuscrit est consacrée à l'autre modalité d'application du CS à la microscopie de fluorescence que j'ai étudié durant mes travaux : la microscopie de super résolution. Après avoir présenté le fonctionnement de quelques méthodes de microscopie de super résolution, notamment les techniques de PALM et STORM, je présente une nouvelle approche de reconstruction que nous avons exploré et les résultats que nous avons obtenu pour contribuer à l'accélération, et les améliorations envisagées, des acquisition de ce type. Enfin, je termine cet exercice en dressant le bilan de tous les résultats obtenus et j'expliquerai les objectifs et les perspectives que j'envisage d'explorer afin de compléter mes travaux.

Tout d'abord, afin de mieux aborder ces deux grandes thématiques, il est nécessaire d'une part de faire un état des lieux sur les notions de microscopie de fluorescence pour comprendre la particularité du microscope que nous avons élaboré et d'autre part sur les notions d'échantillonnage afin de comprendre comment à partir de la théorie de Shannon-Nyquist il est possible de s'affranchir des limites conventionnelles par l'utilisation de la théorie du CS et l'outillage numérique : une des clés de sa mise en œuvre dans mes recherches.

1 Microscopie de fluorescence

Le microscope est un système centré qui permet d'observer à fort grossissement des objets non visibles à l'œil nu et dont les détails internes sont de tailles nanométriques. La microscopie optique, dans son ensemble, a connu de grandes avancées ces vingt dernières années et est attractive dans de nombreuses disciplines, en particulier en biologie. De microscope à fond clair il est devenu microscope à fond noir, polarisant, à fluorescence, à contraste de phase, interférentiel, confocal etc. Il conserve néanmoins un schéma commun qui permet d'illustrer son fonctionnement général. Le microscope agit comme une loupe. Les caractéristiques essentielles de cet instrument sont son *grossissement*, par l'action de l'*objectif*, et sa *limite de résolution*, qui elle, est fonction de l'*ouverture numérique* de l'objectif mais aussi de la longueur d'onde de travail.

Certains éléments microscopiques observés ne permettent pas d'être clairement différenciés lorsqu'ils sont observés par des techniques de contraste ou d'interférométrie. En revanche, les propriétés de fluorescence de certains éléments biologiques s'avèrent d'un grand intérêt pour leur observation, permettant de différencier des objets apparemment identiques sous d'autres techniques de microscopie.

Sommaire

1.1 Principe	10
1.1.1 Montage du microscope à champs large	10
1.1.2 Principe de la fluorescence	11
1.1.3 Principales limitations	16
1.2 Ouverture numérique	18
1.3 Résolution spatiale	19
1.3.1 Image d'un point et fonction de transfert	19
1.3.2 Résolution théorique du microscope photonique	22
1.4 Comparaison du montage en champs large et confocal	23

1.1 Principe

Combinée à l'innovation dans les domaines de la physique, de l'optique, de la mécanique, de l'ingénierie électrotechnique et surtout des acquisitions numériques, cette technique de microscopie est devenue incontournable en imagerie biologique. En effet, cette technique présente plusieurs avantages et l'utilisation de protéines fluorescentes et d'anticorps fluorescents permet entre autre de marquer très sélectivement n'importe quelle protéine dans une cellule vivante.

1.1.1 Montage du microscope à champs large

Le microscope de fluorescence repose sur l'utilisation d'un système épiscopique qui permet de séparer la lumière d'excitation de la fluorescence émise par l'échantillon. Dans cette configuration, l'objectif joue à la fois le rôle du condenseur pour la source d'illumination et le rôle de l'objectif de collection de photons émis par l'échantillon. Dans un tel montage, il faut pouvoir diriger la lumière d'excitation à travers l'objectif du microscope et récupérer la fluorescence de l'échantillon en sachant que ces deux ondes lumineuses sont coaxiales et parallèles à l'axe de l'objectif. La lumière de fluorescence étant faible par rapport à l'onde incidente, il est nécessaire de réussir à séparer ces deux composantes, sous peine de ne pouvoir observer l'émission de fluorescence d'intensité beaucoup plus faible. La séparation de ces deux ondes est assurée par un miroir dichroïque (cf. figure 1.1a), dont les propriétés de réflexion ne sont pas les mêmes en fonction de l'angle d'incidence des faisceaux, et permet de séparer l'onde incidente de la lumière provenant de la fluorescence de l'échantillon avec un très bon taux de transmission. Il assure également un rôle de filtrage des ondes par sa composition ou le traitement de ses surfaces. Cette étape est complétée par l'utilisation conjointe de deux filtres. L'un agit sur la composante d'excitation et sélectionne une gamme très précise de longueurs d'onde pouvant le traverser et atteindre l'échantillon, l'autre agissant en sortie permet de filtrer, de la même manière, une bande spectrale précise d'observation. Cela permet, entre autre, de discriminer la diffusion (rétro-diffusion parasite) par l'échantillon qui peut compromettre l'observation de la fluorescence.

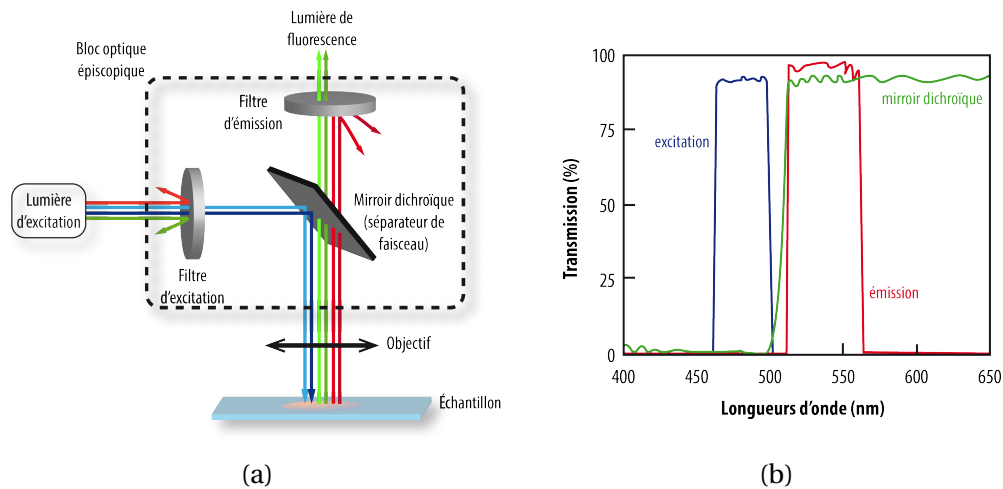


FIGURE 1.1 – Montage épiscopique du microscope de fluorescence qui permet de sélectionner très précisément les longueurs d'onde d'entrée et de sortie du système grâce à un système de filtrage 1.1a composé de filtres d'émission et d'excitation et d'un miroir dichroïque. 1.1b Les qualités de transmission et de réflexion de ces éléments constituent des filtres optiques très sélectifs. Cette combinaison permet de produire des images très brillantes fortement contrastée à un fond noir.

Ces étapes de séparation et de filtrage sont combinées dans un unique élément du microscope appelé *cube filtre* qui est l'élément principale et caractéristique de l'observation en microscopie de fluorescence permettant une observation très contrastée d'éléments lumineux sur fond noir.

1.1.2 Principe de la fluorescence

La luminescence provient de l'émission de lumière (transfert radiatif) lors de transitions électroniques, c'est à dire, lors du retour à l'état fondamental d'un élément porté à un état excité. Il existe plusieurs sous-catégories à ce phénomène dont la *fluorescence* et la *phosphorescence*. Ces deux phénomènes se distinguent par le type de transitions qui les gouvernent. En effet, concernant la fluorescence, les photons émis proviennent du transfert radiatif d'un état singulet ($\Delta S = 0$) tandis que la phosphorescence correspond au transfert radiatif d'un état triplet vers l'état fondamental (cf. figure 1.2).

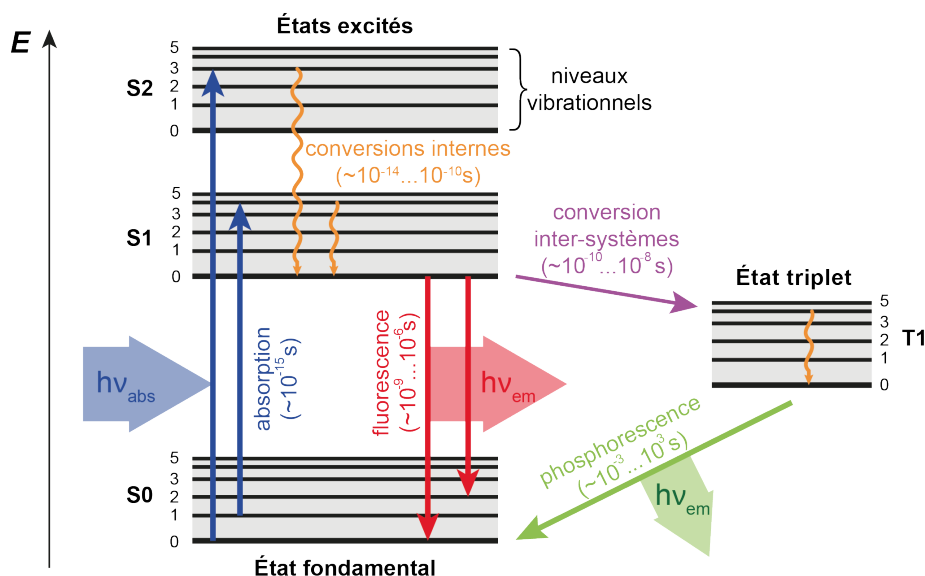


FIGURE 1.2 – Diagramme de Jablonski

Dans ce cas, le passage direct de l'état excité vers l'état fondamental est *interdit* et en passant par cet état intermédiaire triplet, il y a changement du spin. De plus, ces transitions électroniques s'opèrent à des vitesses différentes, les transitions de retour à l'équilibre sont nettement plus rapide en fluorescence ($10^{-12} - 10^{-6}$ s) qu'en phosphorescence ($10^{-6} - 10$ s). C'est ce qui explique que la phosphorescence peut s'observer assez longtemps après avoir cessé l'excitation. Notons également que le processus d'excitation est encore plus court, de l'ordre de 10^{-16} secondes. Dans le cadre de la fluorescence, qui est le phénomène qu'on souhaite observer, on note que le retour à l'état fondamental ne se fait pas forcément directement depuis l'état excité. Ceci explique qu'une molécule fluorescente s'excite à une longueur d'onde légèrement inférieure à la longueur d'onde où elle émet des photons. En effet, lorsque l'on excite une molécule à une longueur d'onde λ_{ex} appropriée pour la porter dans un état excité, il va d'abord s'opérer une relaxation vibrationnelle ou une conversion interne (au sein du même état excité) et non radiative vers le plus bas niveau de l'état excité concerné (cf. figure 1.2) et engendrer une dissipation de l'énergie par transfert de chaleur. Par la suite, il y a un retour à l'état fondamental avec émission d'un photon d'énergie $h\nu$ à une longueur d'onde λ_{em} . Il en ressort que $\lambda_{ex} - \lambda_{em} > 0$. En d'autres termes, la relaxation a lieu à une plus grande longueur d'onde. C'est l'effet Stokes schématisé sur la figure 1.3 et dont le décalage de longueur d'onde est propre à chaque fluorophore.

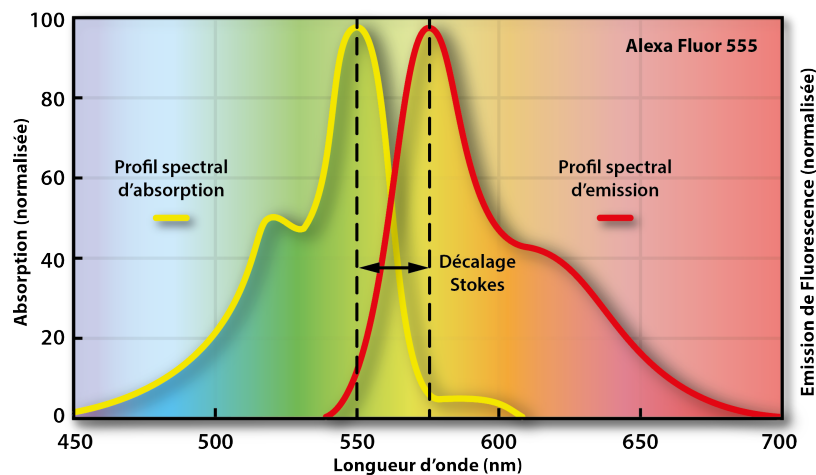


FIGURE 1.3 – Spectres d’absorption et d’émission de fluorescence : l’effet Stokes. Exemple de la molécule fluorescente Alexa Fluor 555.

C’est concrètement la subtilité qui rend la microscopie de fluorescence si puissante. En effet, la possibilité de dissocier la lumière d’excitation de la lumière d’émission (par le bloc filtre) permet de parfaitement isoler la fluorescence à observer. Des objets normalement indiscernables en microscopie de contraste deviennent parfaitement visibles en microscopie de fluorescence, en particulier les objets de très petites tailles.

Marquage cellulaire

La fluorescence observée est rarement naturelle (on dit également primaire) ni portée par les objets de la préparation. Dans la plupart des cas on utilise une fluorescence dite secondaire, introduite dans les échantillons lors de leur préparation. On utilise des fluorochromes que l’on peut fixer sélectivement sur certains éléments de la préparation, c’est le cas de l’immunofluorescence (cf. figure 1.4) qui est l’application biologique et médicale la plus importante de la microscopie à fluorescence. Cette technique permet la détection et la localisation d’une ou plusieurs protéines tissulaires grâce à l’utilisation d’anticorps spécifiques. Ainsi, en choisissant un anticorps, marqué avec un fluorochrome, on peut diriger le marquage d’une protéine spécifique en utilisant la réaction anticorps-antigène adéquat. Ce type d’immunomarquage peut être réalisé de manière directe (1.4a) ou indirecte (1.4b).

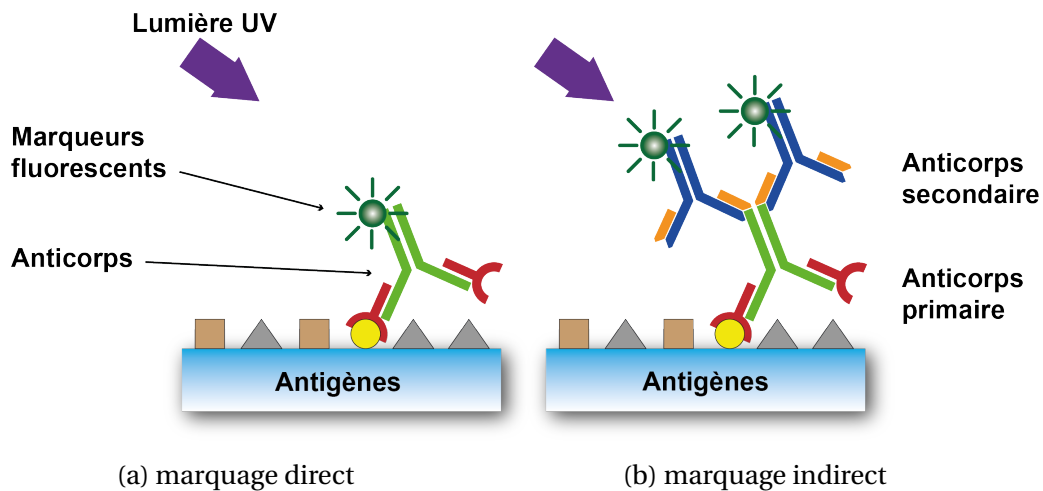


FIGURE 1.4 – Immunofluorescence

En immunofluorescence directe, un anticorps spécifique de l'antigène recherché est directement marqué avec un fluorophore, alors qu'en immunofluorescence indirecte, la détection s'effectue par l'intermédiaire d'un anticorps (marqué avec un fluorophore), dit *secondaire*, spécifique de l'anticorps *primaire* utilisé pour détecter l'antigène. C'est souvent cette deuxième option qui est utilisée car moins onéreuse.

La révolution des protéines fluorescentes

La découverte capitale est venue de la possibilité d'exprimer une protéine fluorescente, naturellement présente chez une espèce de méduse, dans un autre organisme vivant par la modification de son génome pour coder la fabrication de cette protéine [35]. A l'origine de cette innovation majeure, appelée la « révolution verte » [129], c'est la découverte de la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) chez l'espèce *aequorea victoria*, une méduse [126] capable de produire naturellement cette protéine fluorescente.

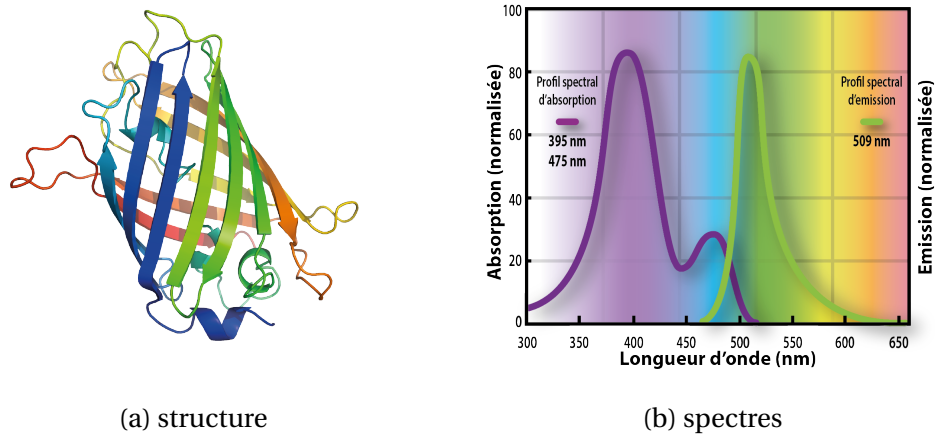


FIGURE 1.5 – 1.5a Structure moléculaire de la GFP, 1.5b spectres d'absorption et d'émission de la molécule fluorescente.

La structure de la GFP (cf. figure 1.5a) est constituée de 238 acides aminés organisés en 11 brins β antiparallèles avec une structure en tonneau repliée autour d'une hélice centrale sur laquelle se trouve la structure chimique responsable de la fluorescence : le chromophore. La GFP non modifiée, dite sauvage (wGFP pour wild type GFP), présente deux maxima d'absorption, le premier, mineur à 395 nm (dans l'UV) et le second, majeur à 475 nm pour un seul pic commun d'émission à 509 nm, de couleur vert (cf. figure 1.5b). Depuis sa découverte et les premières expériences liées à son utilisation, une quantité très variée de protéines fluorescentes, plus élaborées, ont pu être synthétisées et découvertes [103] avec de meilleures propriétés de fluorescence, par exemple, une meilleure résistance au phénomène de *photoblanchiment* (cf. sous-section 1.1.3) ou encore de couleurs différentes (YFP, CFP etc.). Ainsi, on est capable de marquer presque n'importe quelle protéine par une protéine fluorescente avec des procédures [95] aujourd'hui bien maîtrisées. La première étape de création du marquage est de joindre la séquence codant pour cette protéine de marquage à la protéine cible. On introduit ensuite cette protéine cible modifiée dans des cellules où sa transcription donne lieu à la synthèse d'une protéine de fusion. Un moyen courant d'y parvenir est de placer le gène sur un plasmide qui pourra être accepté et utilisé par une cellule. De tels plasmides existent pour une large gamme de protéines fluorescentes. La protéine de fusion s'exprime durant toute la vie de la cellule tant que la séquence introduite reste présente dans le noyau de la cellule. En l'absence de réaction (toxique) avec cette protéine cette procédure est viable dans la majorité des cas.

1.1.3 Principales limitations

Auto-fluorescence

Nous avons vu que la fluorescence est un outil très puissant pour la microscopie puisqu'elle permet d'obtenir des contrastes structuraux cellulaires très importants. Le marquage d'une zone très sélective d'un échantillon étant bien maîtrisé, il devient aisé de n'observer qu'une partie seulement de la cellule d'intérêt. Cependant, il arrive que cette cellule d'intérêt soit en partie constituée d'éléments ayant déjà des propriétés fluorescentes. Ainsi, le marquage peut se trouver confondu avec cette fluorescence naturellement présente dans la cellule, c'est le phénomène d'*auto-fluorescence*. Ce phénomène a été reporté dans de nombreux types de cellules dès les premières observations [65, 116, 137]. Elle est particulièrement visible dans les cellules végétales notamment à cause de la présence de chlorophylle, d'alkaloids et de flavonoids mais aussi dans les cellules animales et humaines.

Photoblanchiment

Le photoblanchiment des fluorochromes est un phénomène physique qui s'observe par une diminution *progressive* et *irréversible* de l'intensité lumineuse provenant de la molécule fluorescente lorsque l'on expose de façon continue l'échantillon contenant les fluorochromes à une excitation lumineuse. C'est ce que l'on observe sur la figure 1.6.

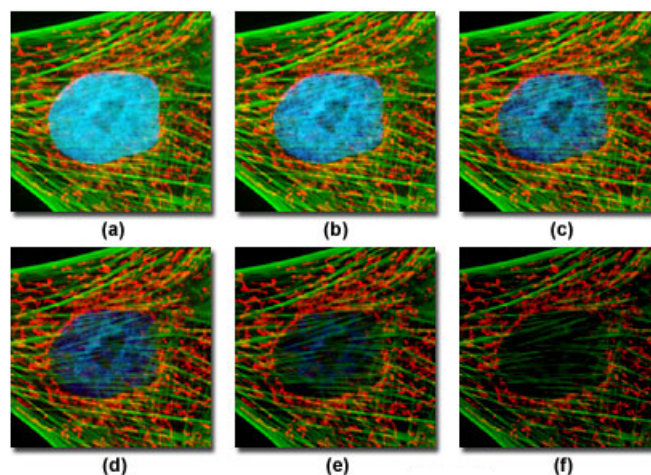


FIGURE 1.6 – Un exemple typique de photoblanchiment observé sur une série d'acquisitions effectuées à différents instants durant l'exposition. Les différentes acquisitions sont effectuées à deux minutes d'intervalle. On constate que les trois différents fluorophores utilisés ne se dégradent pas à la même vitesse. Source : [MicroscopyU](#)

Il s'agit, soit de la destruction de ces fluorochromes soit de la perte permanente ou momentanée de son caractère fluorescent. C'est une des principales limitations de cette technique qui a tout de même été exploitée à son avantage, dans certains cas, comme en microscopie FRAP¹ [94]. Ce phénomène est relativement complexe et la cinétique de destruction est propre à chaque fluorophore mais dépend également du type d'excitation imposée à la molécule concernée. Le mécanisme de photo-destruction provient du phénomène d'oxydation de ces mêmes molécules lorsqu'elles sont illuminées (photo-oxydation). De manière générale, on décrit ce phénomène, en microscopie à champs large, par une décroissance exponentielle de premier ordre [13, 87, 89] de l'intensité de fluorescence, telle que :

$$I = I_0 \cdot \exp^{-k_a t} + B \quad (1.1)$$

avec I l'intensité de fluorescence, B une composante d'offset due à la présence potentielle de bruit de fond, I_0 l'intensité de fluorescence à l'état initial, et k_a le taux d'absorption de photons par un fluorophore de section efficace σ_a telle que $k_a = \sigma_a [H \cdot \lambda_{ex} / (hc)]$ où H est l'irradiance de la lumière d'excitation exprimée en $W \cdot cm^{-2}$ et λ_{ex} la longueur d'onde d'excitation.

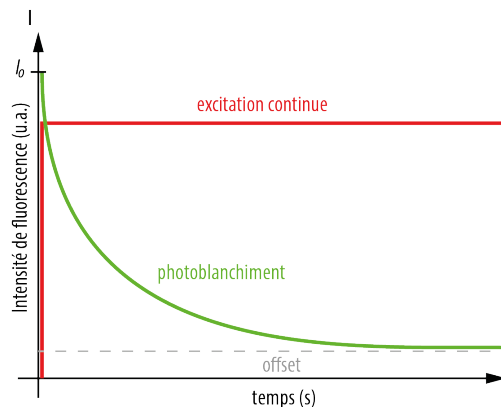


FIGURE 1.7 – Courbes représentatives du processus de photoblanchiment des fluorophores. Lorsque ces derniers sont exposés à une excitation continue (courbe rouge), l'intensité de fluorescence décroît exponentiellement (courbe verte) traduisant la photo-destruction des fluorophores.

On est capable de limiter significativement le processus par l'utilisation de montages dégazés. Mais le processus reste inévitable. On peut appliquer d'autres règles élémentaires pour le diminuer le plus possible. On utilise de manière générale des

1. Fluorescence Recovery After Photobleaching.

molécules dont le photoblanchiment est le plus faible possible et excitées à une énergie optimale tout en conservant une plage dynamique d'observation suffisante. On veille également à conserver l'échantillon dans un milieu froid, à l'abri de la lumière (recouvert d'un film opaque) et surtout de limiter l'exposition sous microscope au stricte nécessaire.

1.2 Ouverture numérique

L'ouverture numérique, qui découle directement des propriétés de l'objectif, est sans doute la donnée la plus importante du montage du microscope. Par définition, l'ouverture numérique d'un système centré est le produit de l'indice de réfraction n du milieu en contact avec la surface du système d'observation (l'objectif) et du sinus de l'angle α sous lequel l'objet, placé au foyer image du système, voit la lentille frontale du système (1.2) ; c'est l'angle solide qui définit le cône des rayons lumineux qu'accepte le système optique.

$$ON = n \cdot \sin \alpha \quad (1.2)$$

Ce qu'il est important de retenir c'est que c'est cette valeur qui fixe l'inclinaison par rapport à l'axe optique que peut accepter le système optique et donc la quantité maximale de lumière qui peut entrer dans le système (cf. figure 1.8a).

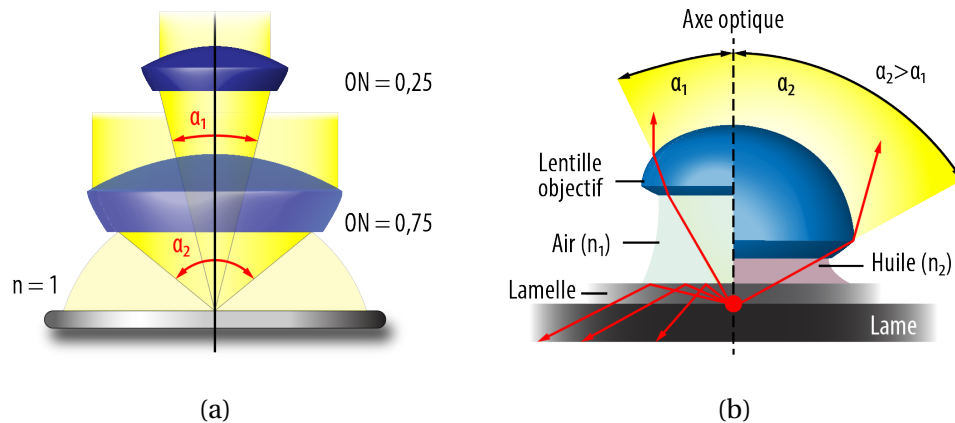


FIGURE 1.8 – L'ouverture numérique définit un cône dans lequel les rayons lumineux atteignent la lentille frontale de l'objectif 1.8a. Le demi angle au sommet (α_1, α_2) est fixé par les caractéristiques de l'objectif tandis que l'indice de réfraction n caractérise le milieu traversé par la lumière entre l'échantillon et l'objectif. Le demi angle au sommet impose également la distance de travail de l'objectif. Plus l'angle est obtus, plus la distance de travail diminue. 1.8b On augmente la valeur de l'ouverture numérique, d'une part en utilisant des angles solides plus grand mais également en travaillant avec un milieu d'immersion dont l'indice de réfraction plus élevé que celui de l'air, permet à plus de rayons lumineux d'atteindre l'objectif (lois de Snell-Descartes). On utilise divers fluides (eau, huile, glycerol etc.), à l'interface {verre(objectif)-air-verre(lamme)}, dont l'indice de réfraction est proche de celui du verre. Ainsi, les rayons lumineux ne sont plus autant déviés et peuvent être tous collectés par l'objectif.

Outre que l'ouverture numérique régit la quantité de lumière entrant dans l'instrument, c'est surtout l'ouverture numérique qui définit sa profondeur de champ et sa **limite de résolution**.

1.3 Résolution spatiale

La résolution spatiale correspond au pouvoir séparateur du dispositif et décrit sa capacité à former deux images séparées, ou distinctes, de deux objets ponctuels que l'on sait être séparés dans l'espace.

1.3.1 Image d'un point et fonction de transfert

L'observation d'un objet ponctuel à travers un microscope ne correspond pas à une image ponctuelle de cet objet. C'est l'ouverture numérique limitée de l'objectif qui en est principalement responsable au travers de la *réponse impulsionnelle* du sys-

Chapitre 1. Microscopie de fluorescence

tème. La figure 1.9 issue d'une simulation numérique représente l'image d'un point (quelques nanomètres de diamètre) vu à travers le microscope. Comme on peut l'observer sur cette figure, l'image d'un objet ponctuel n'est pas un objet ponctuel. Son image est constituée d'un disque clair entouré d'une succession d'anneaux d'intensité décroissante. Il s'agit de la *tache d'Airy* (cf. figure 1.9a). Dans le plan axial, cette image prend la forme d'une ellipse (figure 1.9b) et constitue l'image de diffraction d'une source ponctuelle.

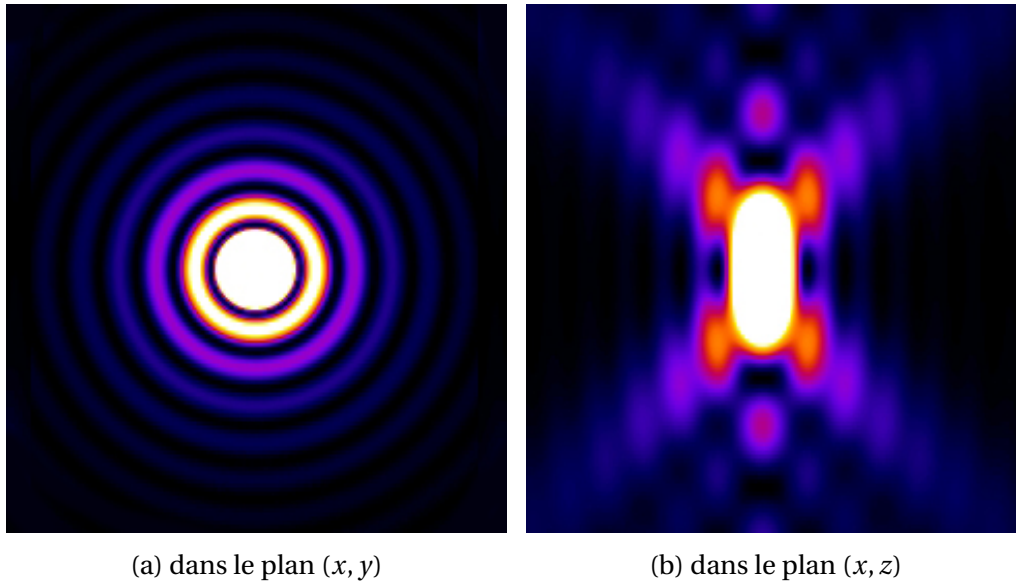


FIGURE 1.9 – Simulation de la réponse impulsionnelle d'un microscope. Source : plugin [PSF Lab](#) [106] ImageJ.

L'aspect de ces tâches varie avec la valeur de l'ouverture numérique du système imposée par l'objectif du microscope (cf. 1.10).

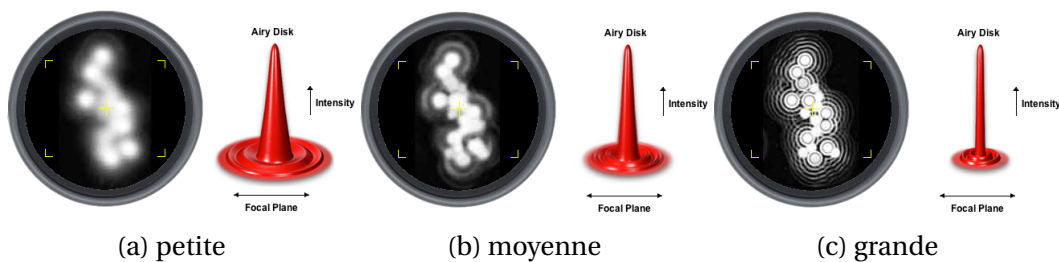


FIGURE 1.10 – Influence de l'ouverture numérique sur la fonction d'étalement du point. Plus l'ouverture numérique du système est grande, plus le spectre sera concentrée et donne une image plus ponctuelle des plus petits détails.

Ce spectre tridimensionnel (plan axial et plan longitudinal) porte le nom de *fonction d'étalement du point* (en anglais *Point Spread Function* : PSF). Les dimensions de ce

spectre sont bien connues et dépendent de l'ouverture numérique ON mais aussi de la longueur d'onde d'émission λ telle que :

$$D_{xy} = \frac{\lambda}{ON^2} \quad \text{et} \quad D_{x,z} = \frac{4\lambda}{ON^2} \quad (1.3)$$

On en déduit que plus l'ouverture numérique est grande, plus le volume central du spectre est petit et se rapproche d'une image ponctuelle, c'est ce que l'on recherche. Il est possible de travailler à de plus petites valeurs de λ mais ce n'est pas le paramètre sur lequel on peut le plus intervenir dans le contexte de la fluorescence. En effet, on reste tributaire des caractéristiques spectrales des fluorophores et du système de détection dans une gamme spectrale correspondant au spectre visible. En revanche, on peut intervenir sur l'ouverture numérique, produit de l'indice de réfraction du milieu et du sinus du demi angle d'ouverture du système (dont la valeur est de toute façon bornée entre 0 et 1). C'est la raison pour laquelle on utilise des objectifs à immersion d'eau ou encore mieux à immersion d'huile, fluides dont les indices de réfractons sont plus élevés que celui de l'air (cf. figure 1.8b), puisque c'est sur ce paramètre qu'on peut le plus intervenir. Mais ici encore, le mieux que l'on puisse faire, à l'heure actuelle, permet d'atteindre des ouvertures numériques de 1,49.

TABLE 1.1 – Ouvertures numériques de différents objectifs Nikon

Grossissement	Plan Achromat	Plan Fluorite	Plan Apochromat
0,5x	0,025	n/a	n/a
1x	0,04	n/a	n/a
2x	0,06	n/a	n/a
4x	0,10	0,13	0,20
10x	0,25	0,30	0,45
20x	0,40	0,50	0,75
40x	0,65	0,75	0,95
40x (huile)	n/a	1,30	1,00
60x	0,75	0,85	0,95
60x (huile)	n/a	n/a	1,40
100x (huile)	1,25	1,30	1,40
150x (huile)	n/a	n/a	0,90

Ces données sont très importantes puisqu'elles conditionnent directement la résolution théorique du microscope photonique et du pouvoir séparateur de celui-ci.

1.3.2 Résolution théorique du microscope photonique

Puisque l'image d'une source ponctuelle est en fait une figure de diffraction tri-dimensionnelle, on comprend que la résolution du microscope photonique dépend de sa capacité à former deux images distinctes de deux ou plusieurs figures de diffraction rapprochées et des relations spatiales qui les relient.

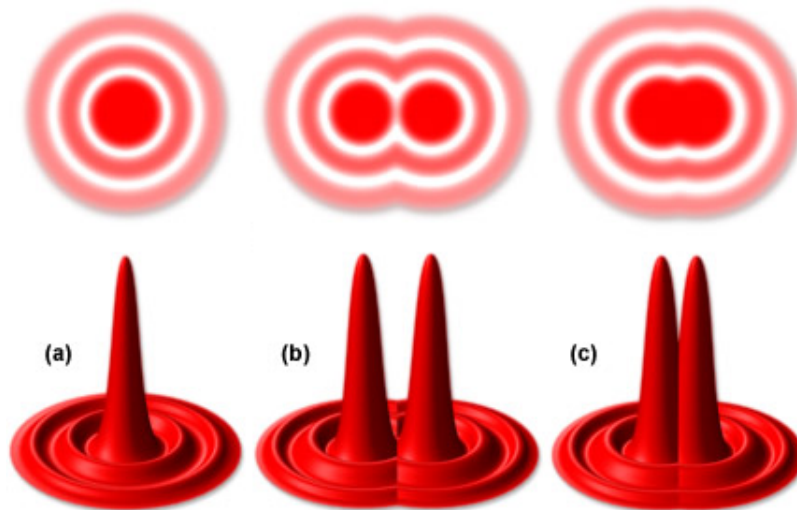


FIGURE 1.11 – La figure (a) représente une tache d'airy et sa distribution en intensité avec un pic central, appelé ordre zéro, et ses anneaux concentriques appelés ordres 1, 2, 3 etc. dont l'intensité diminue. Au milieu (b), deux taches d'Airy à la limite de résolution du microscope. Dans ce cas, la limite de résolution est supérieure au rayon des disques d'Airy, c'est pourquoi on dit qu'ils sont résolus, ce que l'on appelle couramment le critère de Rayleigh. A droite (c), les taches d'Airy se recouvrent fortement, la distance entre les deux pics centraux (les ordres zéros) est plus petite que la largeur des pics eux même, les deux taches d'Airy ne sont pas résolues.

On montre que deux taches d'Airy, images de deux sources ponctuelles distinctes ne sont résolues (i.e. séparées dans le plan longitudinal) que si elles sont séparées d'une distance au moins égale à :

$$d_{xy} = \frac{1,22\lambda}{2ON} \quad (1.4)$$

L'équation (1.4) porte communément le nom de *critère de Rayleigh*. Il en est de même pour la résolution dans le plan axial (x, z) dont la limite de résolution est donnée par la relation (1.5).

$$d_{xz} = \frac{2\lambda}{n \sin^2 \alpha} = \frac{2\lambda}{ON \sin \alpha} \quad (1.5)$$

1.4. Comparaison du montage en champs large et confocal

Ici encore, on voit l'influence directe de l'ouverture numérique ON et de la longueur d'onde d'émission λ de la source à observer. Notons que l'équation (1.4) est surtout valable dans le schéma de la microscopie épifluorescence, où l'objectif joue en plus de ce rôle celui du condenseur, c'est ce qui explique le facteur 2 du dénominateur correspondant au double passage des rayons lumineux. Finalement, l'image d'un objet vu à travers le microscope est fonction de la réponse impulsionnelle du système (en grande partie fonction des caractéristiques de l'objectif et de son ouverture numérique) et on peut définir mathématiquement l'image d'un objet comme :

$$\text{image}(r) = \text{objet}(r) * \text{PSF}(r) \quad (1.6)$$

où l'image est le résultat du produit de convolution (noté « * ») de l'objet par la PSF du système. Une façon plus aisée de manipuler l'équation (1.6) est de le faire dans l'espace de Fourier (domaine des fréquences). Puisque le produit de convolution est égale au produit standard de ses transformées de Fourier on obtient :

$$T.F[\text{image}(r)] = T.F[\text{objet}(r)] \times \text{OTF}(t) \quad (1.7)$$

où l'OTF, pour *Optical Transfer Function* en anglais, est la transformée de Fourier de la PSF. Ces quelques notions clés sont communes à tous les types de microscopes photoniques et donc plus particulièrement valable en microscopie de fluorescence.

1.4 Comparaison du montage en champs large et confocal

En microscopie de fluorescence, deux schémas d'acquisition principaux s'opposent : le schéma à *champs large* et le schéma à *balayage* confocal. Le schéma utilisé lors de mes recherches utilise schématiquement le modèle d'illumination à champs large et le modèle de détection confocale. Nous allons voir comment nous avons retenu les avantages des deux montages et ce qui les différencie. Dans le dispositif à champs large, le microscope illumine **toute** la surface de l'échantillon et un capteur CCD enregistre simultanément **toute** la fluorescence résultante de l'excitation des fluorophores (cf. figure 1.13). Dans cette modalité on collecte plus de photons et la sensibilité est plus importante. Cependant, bien que très rapide, dans ce type de microscopie conventionnelle, l'imagerie d'un plan objet entier impose de fortes contraintes qualitatives sur les optiques du système pour limiter les aberrations (chromatiques et géométriques). Aussi, une façon assez simple de limiter ces effets est de construire un microscope à balayage où l'échantillon est successivement

Chapitre 1. Microscopie de fluorescence

translaté dans le plan $(x, y)^2$ pour qu'un détecteur à un point (photomultiplicateur) enregistre l'information du point illuminé à chaque instant (cf. figure 1.13). C'est ainsi que les bases du microscope confocal ont été posées par Marvin Minsky dans le milieu des années cinquantes et brevetées en 1957 [101]. Par opposition au microscope photonique conventionnel (qu'il soit à transmission, à fluorescence ou réflexion) qui construit l'image d'un plan objet entier, le microscope confocal n'imagine qu'une partie très réduite de ce plan et permet d'obtenir une image entière du plan par balayage.

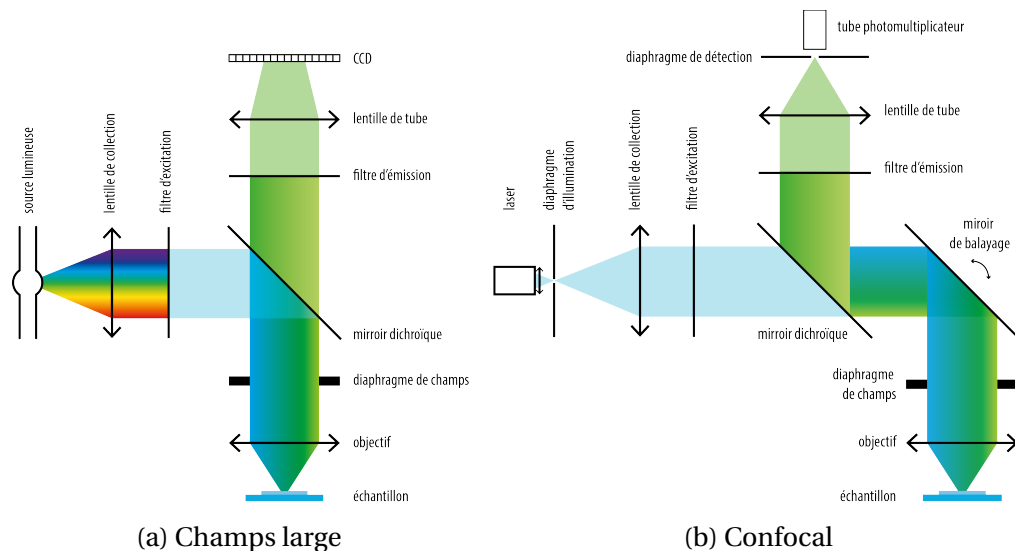


FIGURE 1.12 – Schémas des microscopes à champs large 1.12a et confocal 1.12b. Les chemins d'illumination apparaissent en bleu et les chemins de formation de l'image en vert pour modéliser l'excitation d'un échantillon biologique marqué à la GFP.

A tout instant le point objet est exactement situé dans l'axe optique. Chacun des points est enregistré en mémoire puis assemblé aux autres points par la machine de traitement pour être restitué sous forme d'une image (discrète) et de façon digitale. L'atout majeur du dispositif confocal est qu'il permet d'imager avec des coupes optiques très fines (~ 500 nm), on parle également d'images sectionnées (cf. figure 1.13). En effet, l'utilisation conjointe d'un diaphragme de champs et d'un autre diaphragme de détection permet de rejeter, en tout point, les composantes provenant de plans focaux voisins et plus profonds (d'où la terminologie confocale) comme le montre la représentation schématique de la figure 1.14a. De plus ce schéma présente l'avantage d'offrir un mode d'acquisition spectral avec une panoplie importante de détecteurs utilisables. Bien que très intéressant, ce dispositif, présente l'inconvénient

2. Pour accroître la vitesse d'acquisition, c'est le détecteur qui se déplace et un montage mécanique de miroirs oscillants projette chaque point image sur le détecteur.

1.4. Comparaison du montage en champs large et confocal

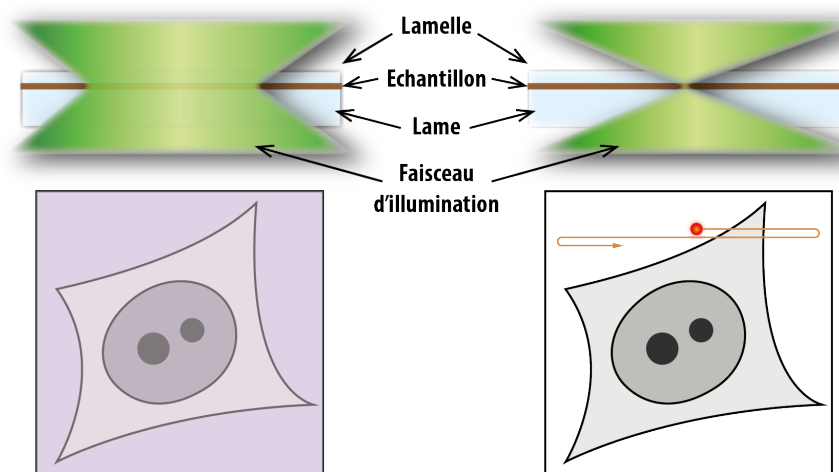


FIGURE 1.13 – Microscopie à champs large versus confocale

majeur d'être lent avec un rapport signal/bruit plus faible qu'en champs large et enfin un coût très élevé.

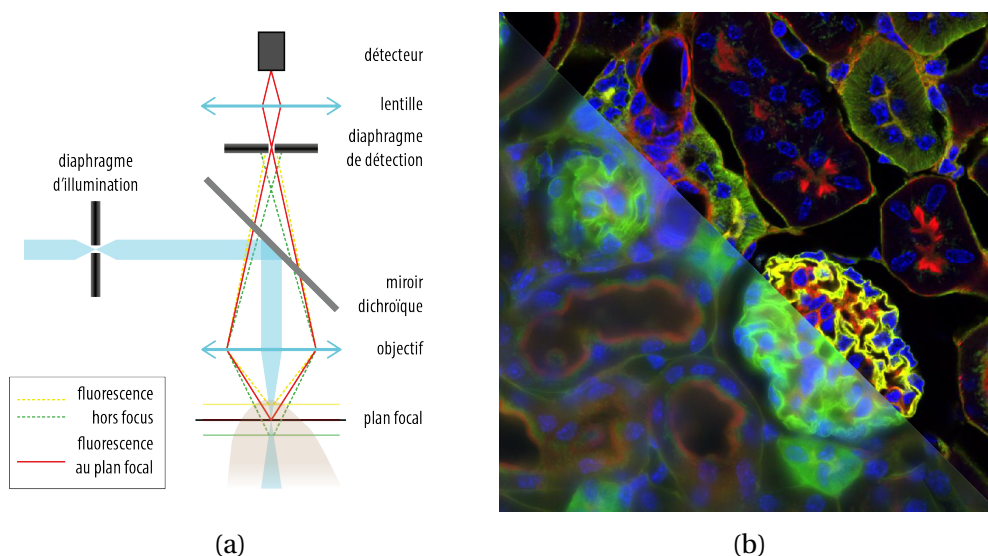


FIGURE 1.14 – 1.14a Principe de la microscopie confocale, un diaphragme de champs placé au niveau du détecteur permet de discriminer les rayons lumineux provenant des plans hors focus. 1.14b Exemple d'un échantillon marqué par différents fluorophores observé en microscopie à champs large (en dessous de la première diagonale) et en microscopie confocale (au dessus de la digonale). La technique confocale permet un sectionnement des images qui aboutit à des images plus nettes grâce une meilleure résolution (pouvoir séparateur plus élevé). Source : [Meyer Instruments](#).

Dans les deux cas, l'acquisition est indépendante de l'information contenue dans

Chapitre 1. Microscopie de fluorescence

l'image mais elle doit satisfaire au théorème de Shannon-Nyquist. En effet, classiquement, il est nécessaire de satisfaire à ce théorème afin de récupérer une image sans perte d'information. Nous allons voir plus en détail comment on passe du signal de fluorescence récolté à une image au format TIFF³ sans compression, résultat de l'enregistrement par un capteur usuellement utilisé et suivant un schéma classique.

3. Tagged Image File Format

2 Numérisation en microscopie de fluorescence

Un signal numérique, quelque soit sa source (audio, vidéo etc.) est composé d'une suite de 0 et de 1, appelés *bits*. Il est obtenu par la mesure d'un phénomène physique et par une série d'étapes de traitements. En microscopie de fluorescence, nous l'avons vu, la lumière traverse une multitude d'éléments optiques dans le microscope, qui vont finalement concentrer les rayons lumineux avant d'être projetés sur un support d'acquisition au plan focal pour obtenir une image en niveau de gris, résultat de la numérisation. Pour pouvoir correctement observer et surtout interpréter l'enregistrement numérique, le processus d'acquisition doit satisfaire aux principes de base de l'échantillonnage.

Sommaire

2.1 De l'analogique au numérique	28
2.1.1 Discrétisation	29
2.1.2 Quantification	31
2.1.3 Théorème de l'échantillonnage	33
2.2 Capteurs	34
2.2.1 CCD	34
2.2.2 EMCCD	36
2.2.3 Tube photo-multiplicateur (PMT)	37
2.3 Sources de bruits	38
2.3.1 Bruit thermique	38
2.3.2 Bruit de lecture	38
2.3.3 Bruit de photons	38
2.3.4 Efficacité quantique d'un capteur	39
2.3.5 Rapport signal à bruit	41

2.1 De l'analogique au numérique

L'implantation du numérique dans les microscopes modernes permet aujourd'hui de faire l'acquisition de données de très grandes tailles et multidimensionnelles. Il est donc nécessaire de bien comprendre comment l'imagerie numérique et ses outils génèrent les signaux observés pour mieux en comprendre les subtilités. On modélise le signal réel (ou encore analogique), l'intensité lumineuse de fluorescence, par une fonction continue $f : \mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{R}$, et $f(x, y)$ la représentation de l'intensité lumineuse au point de coordonnées (x, y) . La *conversion analogique-numérique (CAN)* de \mathbf{f} en un signal numérique \mathbf{g} peut être vue (de manière simplifiée) comme l'application successive de trois opérateurs telle que :

$$\mathbf{g} = Q(\Delta_{\Gamma}(h * \mathbf{f})) \quad (2.1)$$

où :

- $h * \mathbf{f}$ est la convolution de f avec h . La fonction h caractérise la qualité des éléments optiques sur le trajet lumineux, qui atténuent les variations rapides de f , elle agit souvent comme un *filtre* connu (comme la PSF),
- Δ_{Γ} représente la projection du signal sur une grille discrète Γ , c'est la *discrétisation* du signal selon plusieurs points de la grille,
- Q est une application de $\mathbb{R} \rightarrow M$ non-injective qui à chaque valeur réelle associe une valeur appartenant à un ensemble fini de valeurs, c'est l'étape de *quantification* où est attribué une moyenne de la mesure $h * \mathbf{f}$ au voisinage de chaque point de la grille.

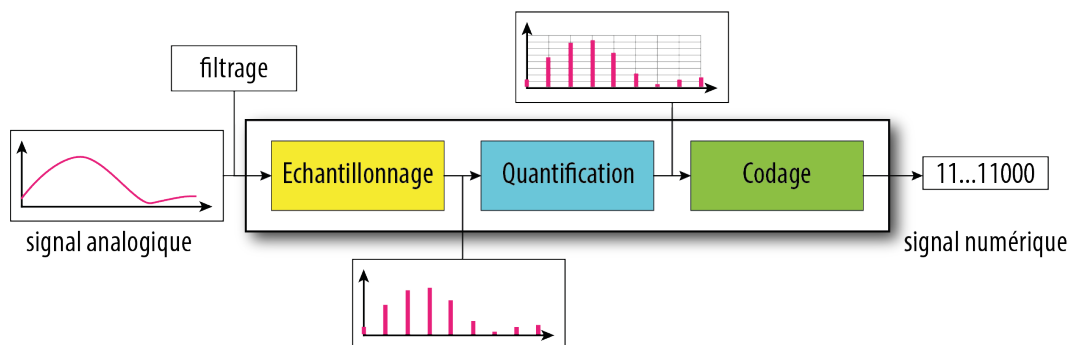


FIGURE 2.1 – Étapes de numérisation d'un signal continu en un signal numérique.

En toute rigueur, il faudrait appliquer à g d'autres opérateurs que nous négligeons par simplicité, tel que le bruit. On retiendra que l'acquisition correspond à trois grandes phases : l'échantillonnage (ou discrétisation) et la quantification.

2.1.1 Discrétisation

La discrétisation selon un axe (x par exemple) correspond à l'opération de subdivision de cet axe en une série de classes ordonnées et de largeur constante dx comme illustré sur la figure 2.2. Tous les points de l'espace réel compris dans l'intervalle $[0, dx[$ auront ainsi la même valeur, par projection sur cet axe. Cela rend impossible de différencier deux points réels de cet intervalle puisqu'ils sont inclus dans la même subdivision.

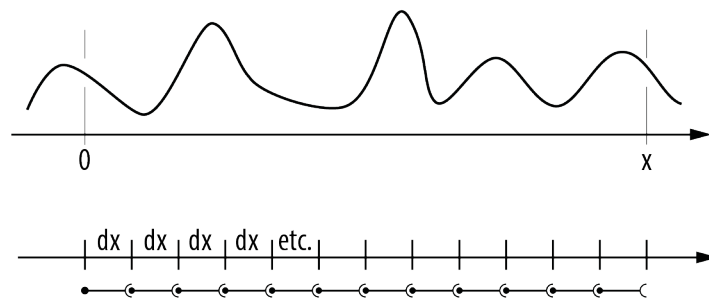


FIGURE 2.2 – Discrétisation d'un signal 1D continu par pas égaux de longueur dx .

L'échantillonnage idéal (on dit aussi parfait), suppose que le pas de discrétisation soit infiniment petit. Ceci est modélisé par la multiplication du signal par un *peigne de Dirac* $\delta(t)$ tel que :

$$g^*(t) = g(t) \cdot \delta_T(t) = g(t) \sum \delta(t - nT) \quad (2.2)$$

Cela revient à enregistrer des valeurs du signal par pas correctement choisis ou autrement dit à une fréquence donnée, égale à l'inverse du pas d'échantillonnage. Plaçons nous maintenant dans le plan (x, y) de l'espace réel \mathbb{R}^2 . En généralisant l'opération effectuée sur un seul axe précédemment, à l'espace (x, y) il est possible de discrétiser une image réelle par subdivision des données de l'image suivant les deux axes de l'espace comme illustré sur la figure 2.3. Ici encore, l'échantillonneur idéal est le produit de l'image de l'espace réel par un peigne de Dirac bidimensionnel.

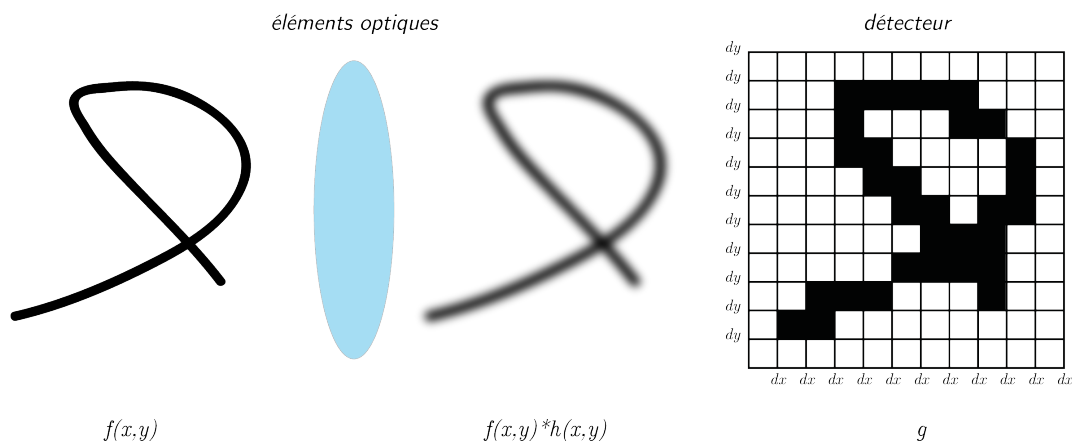


FIGURE 2.3 – Discrétisation d’un plan image par un détecteur matriciel.

En effet, s’agissant d’images, nous manipulons des signaux 2D provenant de l’acquisition par une caméra. Celle-ci image en utilisant une matrice 2D de capteurs appelés *pixels*¹. L’image numérique, résultat de l’acquisition, est alors formée par une matrice de pixels. Chacun de ses points possède des coordonnées spatiales, correspondant à leur position respective dans le plan image et une valeur de niveau de gris (comprise entre 0 et 255 dans le cas d’image 8 bits) ou une subdivision de valeurs colorimétriques. Cette représentation impose implicitement une représentation discrète de l’espace que nous percevons généralement comme continue puisqu’on peut faire l’hypothèse raisonnable que la précision du capteur est supérieure à celle de la perception humaine. On comprend rapidement que la qualité de la numérisation dépendra fortement de la surface allouée à chacune des subdivisions, suivant les axes x et y ; en définitive, en fonction de la surface couverte par un pixel (cf. figure 2.4). Notons, que nous n’avons pas imposé que ces subdivisions soient égales suivant les axes x et y mais en pratique ces subdivisions sont de tailles égales et représentent des carrés élémentaires. De même, la qualité de cette numérisation dépend du rapport entre la surface de l’image projetée et de la surface unitaire de la cible (caméra) utilisée.

1. Picture Elements.

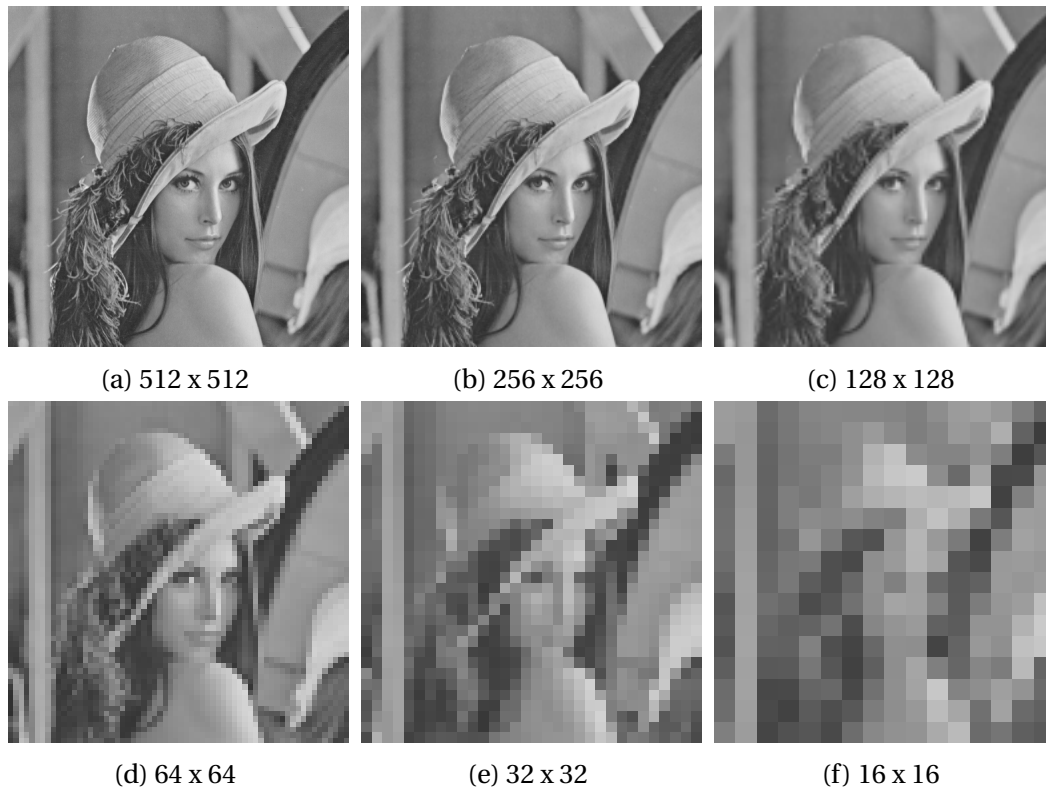


FIGURE 2.4 – Influence du pas d'échantillonnage sur la résolution spatiale d'une épreuve.

L'exemple de la figure 2.4 nous montre l'influence du pas d'échantillonnage sur la résolution d'une image numérique, par modification artificielle du pas. Si on ne voit pas de différence frappante entre l'échantillonnage original²(figure 2.4a) et l'échantillonnage avec un pas deux fois plus grand (figure 2.4b), en revanche, on commence à voir apparaître de petites structures carrées dès lors que le pas d'échantillonnage devient plus grand (figure 2.4c et 2.4d). Au delà, l'image est clairement sous-échantillonnée et il devient difficile de discerner les structures pourtant claires auparavant. On distingue, au contraire, clairement la matrice d'échantillonnage dont on peut même compter le nombre de colonnes.

2.1.2 Quantification

Nous venons de voir comment intervient la discrétisation d'une image réelle en une matrice de pixels. Il faut maintenant pouvoir attribuer une valeur d'intensité à ces coordonnées matricielles. La quantification complète l'étape d'échantillonnage en associant à la position d'un pixel une valeur appartenant à un ensemble *discret*

2. Sur cet exemple, l'image originale de Lena a) 512 x 512 est déjà sur-échantillonné pour la taille d'affichage sur le support papier.

dont le cardinal est bien souvent lié à la représentation binaire utilisée pour stocker la valeur quantifiée. Cette étape consiste donc à diviser la gamme dynamique des intensités en un nombre fini d'intervalles. L'œil humain est généralement capable de distinguer près de 220 tonalités différentes. Or, on sait que l'information est traitée et stockée sous forme binaire dans un ordinateur. Ce dernier ne traite pas l'information de façon décimale mais en base 2. Ainsi, la valeur la plus proche par excès de 220 est $2^8 = 256$. C'est pourquoi on dit d'une image qu'elle peut être codée en 8 bits ou encore un octet, valeur fréquemment rencontrée en traitement d'imagerie. Prenons l'exemple d'une image réelle dont les contrastes lumineux se situent entre deux extrema. Il y aura une valeur minimale et une valeur maximale entre lesquelles on observera une gamme réelle de contrastes lumineux qu'il faut convertir en signaux électriques puis numériques. L'étape de quantification permet d'approximer une valeur instantanée ou ponctuelle du signal à l'aide d'un ensemble de valeurs discrètes, séparées les unes des autres par un intervalle correspondant au pas de quantification. Dans l'exemple de la figure 2.5, un codage 8 bits (figure 2.5a) permet de restituer une photographie fidèle à l'original. Mais dès que l'on diminue la palette de tonalités à 4 bits (figure 2.5b) ($2^4 = 16$ nuances de gris) on note l'apparition de contours artificiels connus sous le nom de tramage³, caractéristique d'une quantification avec une plage dynamique insuffisante, qui devient flagrante lorsque l'on convertit l'image de départ en 1 bit, ne laissant alors que pour seules options une nuance blanche et l'autre noir (figure 2.5c).

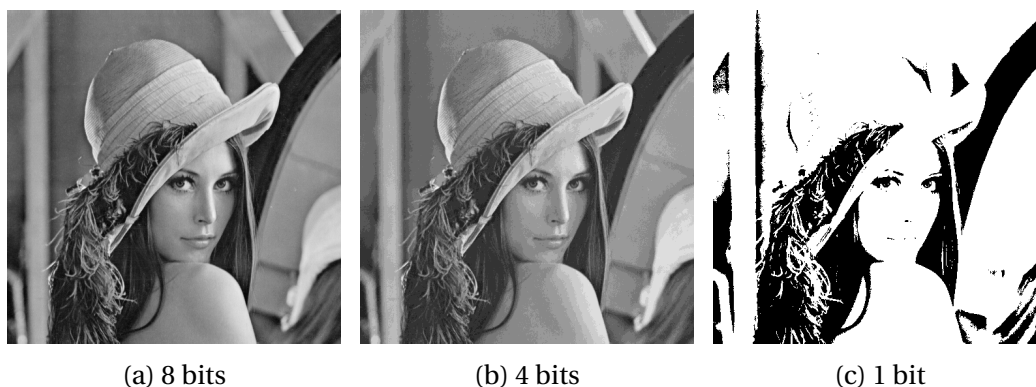


FIGURE 2.5 – Quantification sur différentes plages dynamiques.

Il faut donc ajuster la valeur L de niveaux de quantification en fonction de la mesure physique réalisée telle que $L = 2^N$ et N le nombre de bits. Plusieurs modèles

3. Ce phénomène dépend de la quantité de détails (ou de fréquences) contenus dans l'image. Les courbes d'isopréférences permettent d'établir l'impact visuel du nombre de nuances utilisées [61] et montrent que plus l'image contient de détails moins on a besoin d'utiliser de nuances différentes pour un résultat fidèle et inversement.

de codage existent et proposent d'utiliser plus ou moins d'impulsions binaires. Plus la plage dynamique contiendra de nuances, meilleur sera le résultat (réduction du bruit de quantification) au détriment de la taille du fichier à transmettre et stocker. Des solutions proposent de conserver une dynamique de bonne qualité en optimisant le rapport « dynamique/taille du fichier » en garantissant, par calcul de l'entropie des données, la limite fondamentale pour représenter sans distorsion une source d'information et en utilisant un nombre de données le plus faible possible.

2.1.3 Théorème de l'échantillonnage

On note $L^1(\mathbb{R}^d) = \{f : \mathbb{R}^d \rightarrow \mathbb{C}, \int_{\mathbb{R}^d} |f(x)| dx < +\infty\}$ l'ensemble des fonctions sommables de \mathbb{R}^d .

Définition 1 (Transformée de Fourier) Soit $f \in L^1(\mathbb{R}^d)$. On appelle transformée de Fourier (T.F) de f , la fonction notée \hat{f} à variable dans \mathbb{R}^d et à valeurs complexes définie par :

$$\hat{f}(\xi) = \int_{\mathbb{R}^d} f(x) e^{-i\xi \cdot x} dx \quad (2.3)$$

Définition 2 (Fréquence de coupure) Soit $f : \mathbb{R}^d \rightarrow \mathbb{C}$ une fonction sommable. On dit que f est à bande limitée si \hat{f} est nulle en dehors d'une boule de \mathbb{R}^d . On dit que $\nu_c > 0$ est une fréquence de coupure de f si \hat{f} est nulle en dehors de la boule de centre 0 et de rayon $2\pi\nu_c$.

En d'autres termes, une fonction à bande limitée représente un signal ne contenant pas de structures qui oscillent plus vite que sa fréquence de coupure.

Théorème 1 (Shannon-Whittaker) Soit f une fonction à bande limitée, de fréquence de coupure ν_c . Soit $w < \frac{1}{2\nu_c}$. Alors,

$$f(x) = \sum_{k \in \mathbb{Z}^d} f(wk) \operatorname{sinc}\left(\frac{\pi}{w}(x - kw)\right) \quad (2.4)$$

où la fonction sinc, sinus-cardinal, est définie par $\operatorname{sinc}(x) = \frac{\sin(x)}{x}$.

"If a function $f(t)$ contains no frequencies higher than W cps, it is completely determined by giving its ordinates at a series of points spaced $1/2W$ second apart. This is a fact which is common knowledge in the communication art. [121]"

C. SHANNON

En d'autres termes, le théorème de l'échantillonnage, aussi connu sous le nom de théorème de Shannon-Nyquist (Whittaker-Kotelnikov) [90, 112, 121, 145, 146], établi que pour échantillonner un signal (i.e. le représenter sous forme discrète sans distorsion), il est nécessaire de l'échantillonner à une fréquence f_e au moins égale au double de la fréquence maximale⁴ contenue dans le signal (2.5). Cette fréquence minimale est aussi appelée *fréquence de coupure* ou *fréquence de Nyquist* et notée ν_c .

$$f_e \geq 2 \times \nu_c \quad (2.5)$$

Dans le cadre de l'acquisition d'images il s'agit de signaux à deux dimensions et la fréquence en question est la fréquence spatiale⁵. La limite de diffraction (ou critère de Rayleigh énoncé au chapitre précédent) fixe la distance minimale entre deux objets pour qu'ils puissent être résolus. C'est donc l'inverse de cette longueur physique qui matérialise la fréquence de coupure dans le cadre de la microscopie. Le théorème de l'échantillonnage impose de discrétiser au double de la fréquence de coupure, ce qui se traduit dans le domaine spatial, par la nécessité d'utiliser un pas d'échantillonnage deux fois plus petit que la distance minimale de résolution. En appliquant (2.4) à (2.5) on obtient :

$$d_{max} < \frac{1,22\lambda}{4.ON} \quad (2.6)$$

où d_{max} est le pas (le plus grand) de discrétisation pour échantillonner à la fréquence de Nyquist. Pour une longueur d'onde de 500 nm et une ouverture numérique de 1,4, il est nécessaire d'échantillonner avec un pas de 108 nm. Autrement dit, un pixel de caméra devra au moins couvrir une distance de 108 nm dans le champs de l'échantillon pour satisfaire au théorème de l'échantillonnage dans cette configuration (longueur d'onde, ouverture numérique).

2.2 Capteurs

2.2.1 CCD

Une caméra CCD [21], de l'anglais *Charge-Coupled Device* pour dispositif à transfert de charge en français, est un capteur constitué par une matrice dense de pixels (en silicium) capables de convertir l'énergie des photons incidents en courant électrique grâce à l'*effet photoélectrique* décrit par l'équation (2.7).

4. On dit aussi au double de la bande passante du signal.

5. La définition de (2.4) est facilement extensible à un problème à deux dimensions par intégration sur deux variables.

$$E + \frac{1}{2}m_0v^2 = hv \quad (2.7)$$

où E est l'énergie de liaison des électrons arrachés par l'irradiation excitatrice, $1/2m_0v^2$ l'énergie cinétique des électrons de masse m_0 ⁶ et hv l'énergie du photon émis par l'effet photoélectrique. Les caméras CCD sont composées de plusieurs couches de matériaux semi-conducteurs à base de silicium et traitées en une série de couches photo-lithographiques complexes. Chacun des pixels peut être assimilé à une cellule photoélectrique couplée à une mémoire, avec par conséquent une *efficacité quantique* qui dépend notamment de la longueur d'onde des photons incidents. La courbe de réponse de cette conversion est relativement linéaire sur une gamme de longueurs d'ondes assez large (partie visible du spectre) ce qui en fait un outil très performant. Une des propriétés importantes des caméras CCD est le fonctionnement en série des cellules unitaires qui la composent. Pour ce type de capteur, les bits d'information représentent des paquets de charges électriques provenant de l'interaction lumière-matière. Ces charges électriques, une fois transférées dans la mémoire tampon du capteur, vont être lues (c'est la phase de *read-out* de la caméra) en une seule fois. Ces deux phases de transfert et de lecture peuvent être modifiées par l'utilisateur pour modifier le temps d'exposition par exemple et ainsi modifier le nombre de photo-électrons résultants. La qualité de l'imagerie numérique par la CCD peut être estimée selon quatre critères principaux :

- la résolution spatiale, elle détermine la capacité d'imager de fins détails sans effet de discrétisation (pixels visibles),
- la dynamique d'exposition, la plage dynamique ou le nombre de niveaux gris qu'il est possible de distinguer sur une acquisition,
- la résolution temporelle, c'est à dire le nombre d'images que la caméra est capable d'enregistrer en un temps donné,
- et enfin le rapport signal sur bruit (RSB) qui définit la qualité de séparation du signal d'intérêt, du fond contenant de l'information sans intérêt provenant du bruit (bruit de lecture, bruit noir, bruit de photons etc.).

Il est difficile d'optimiser simultanément ces critères en une seule acquisition et il faut régulièrement faire un compromis. Par exemple, pour augmenter la plage dynamique d'intensité, lors d'acquisitions à de faibles temps d'exposition, on pourra choisir de regrouper les pixels par 4, 8 ou 16, il s'agit du *binning*. Il est toutefois important de noter que deux paramètres fondamentaux sont déterminants quel que soit le type de caméra utilisée. Il s'agit du seuil de détection du bruit et de l'*efficacité*

6. $m_0 = 9.1094 \times 10^{-28}$ g

quantique de détection. Une nouvelle gamme de capteurs de type CCD ont vu le jour depuis une quinzaine d'années et permettent d'améliorer fortement la sensibilité de détection mais aussi de réduire le bruit. Ce sont les caméra EMCCD dont j'ai disposé pour mes recherches et qui sont largement utilisées en microscopie de fluorescence.

2.2.2 EMCCD

Introduite par Andor Technology en 2000, la caméra EMCCD, de l'anglais *Electron Multiplying Charge-Coupled Device*, est une nouvelle technologie ayant pour but d'offrir tous les avantages conférés par la caméra CCD avec la possibilité d'imager à de très faibles niveaux d'intensités lumineuses. C'est un dispositif qui comprend une caméra CCD modifiée. Même avec des systèmes de refroidissement (Pelletier, water-cooling), les capteurs CCD sont limités par les différentes sources de bruit. En effet, bruit thermique (ou bruit de courant noir) et bruit de lecture forment un bruit de fond suffisamment important pour qu'un signal de très faible intensité soit confondu avec ce bruit de fond. Cette nouvelle technologie utilise le même capteur CCD mais inclue un registre de multiplication des électrons (cf. figure 2.6).

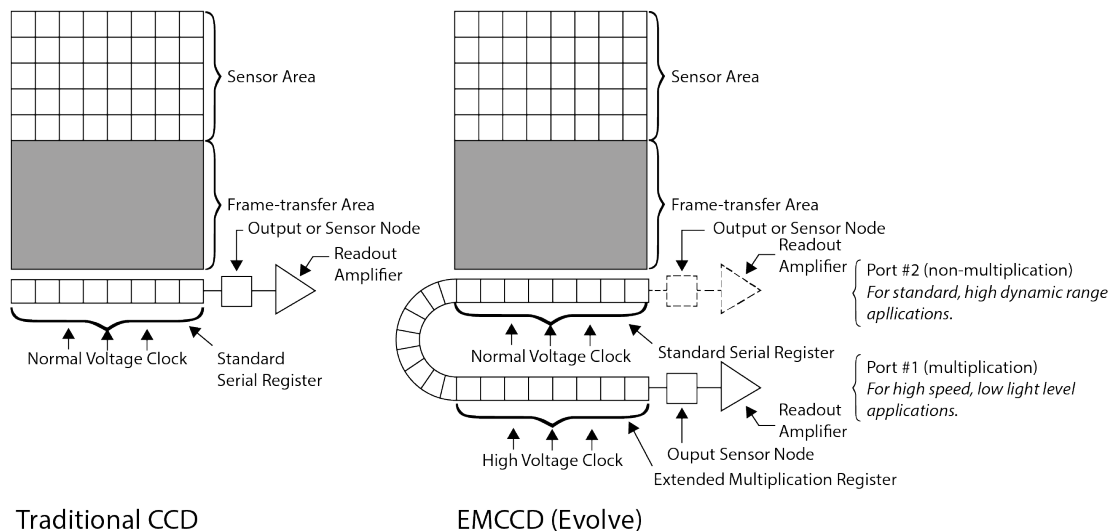


FIGURE 2.6 – Comparaison d'une caméra CCD standard et d'une caméra EMCCD (Evolve). Figure inspirée de [User Manual for Evolve 512](#).

Dans ce registre, *High Voltage Electron Multiplying Register*, les photo-électrons accumulés sont amplifiés par un processus d'*ionisation par impact*, du type effet d'avalanche, qui permet la génération de plusieurs milliers d'électrons par photo-électrons. Puis, les charges atteignent un amplificateur où elles sont converties en

potentiel électrique ensuite numérisé pour former une image numérique de haute qualité. Le processus d'ionisation par impact est le cœur du procédé d'amplification et donc du gain. Cette nouvelle gamme de caméra permet d'obtenir de haut niveaux de sensibilité, particulièrement adaptée à la microscopie de fluorescence et notamment pour la détection de molécules individuelles.

2.2.3 Tube photo-multiplieur (PMT)

L'autre détecteur que j'ai utilisé pour mes travaux de recherche est le tube photo-multiplieur (PMT⁷ [11]). C'est un photo-détecteur basé sur l'effet *photo-émisif*, association de l'effet photo-électrique [53,54,75] et de l'émission secondaire [26,127]. L'énergie incidente, si elle est suffisante, permet de libérer des photo-électrons, par effet photoélectrique. Les photo-électrons, arrachés à la photo-cathode, sont focalisés et dirigés vers une première dynode par l'électrode de focalisation (cf. figure 2.7). Tous n'y parviennent pas forcément. Certains seront réfléchis tandis que d'autres seront absorbés et pourront exciter des électrons secondaires. Le nombre, d'électrons réfléchis et secondaires, ramené au nombre d'électrons incidents définit la valeur du gain par dynode, noté g . Au total, une série de n dynodes (entre 8 et 12 portées à des potentiels supérieurs) est traversée avant que l'anode collecte la totalité des électrons générés. On comprend vite qu'avec ce principe, on atteint rapidement des gains très élevés, g^n atteignant rapidement des ordres de 10^6 à 10^8 .

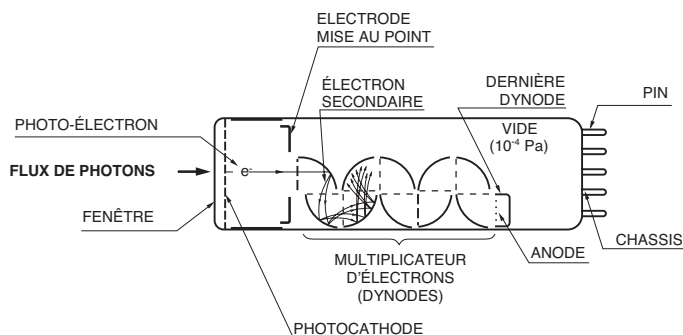


FIGURE 2.7 – Coupe longitudinale 2D du tube photo-multiplieur.

L'efficacité de conversion (sensibilité de la photo-cathode) varie avec la longueur d'onde de la lumière incidente, encore appelée réponse spectrale, caractéristique du matériau utilisé pour la fabrication de la photo-cathode.

7. PhotoMultiplier Tube

2.3 Sources de bruits

Le bruit est une notion très vaste que l'on retrouve partout en traitement du signal et qui fait référence à une perturbation qui peut provenir de diverses sources. Ce sont des signaux aléatoires qui viennent se superposer au signal que l'on souhaite mesurer. Il en existe principalement trois types pour les détecteurs utilisés dans notre montage (CCD [83, 119]) : bruit thermique, bruit de lecture et bruit de photons.

2.3.1 Bruit thermique

Le bruit thermique, également appelé *bruit noir* provient des variations statistiques de génération d'électrons par effet thermique au sein du silicium constituant les capteurs CCD. Il est fortement lié à la température du capteur et suit une distribution de Poisson, c'est à dire qu'il évolue comme la racine carré du *courant d'obscurité* durant une période d'exposition donnée.

$$\text{bruit thermique} = \sqrt{\text{courant d'obscurité}(\text{temps d'exposition})} \quad (2.8)$$

On peut facilement réduire sa contribution en refroidissant la caméra (effet Peltier, watercooling, azote liquide etc.). Les détecteurs ponctuels tel que le PMT y sont également sensible, essentiellement dû à l'agitation thermique des électrons sur la photo-cathode et à l'amplification de ce courant par l'ensemble des dynodes. Le refroidissement est aussi une solution dans ce cas pour le réduire considérablement.

2.3.2 Bruit de lecture

L'électronique embarquée dans un dispositif, telle une caméra CCD, contribue à la production de bruit. Les différents composants du système introduisent collectivement un bruit appelé *bruit de lecture*. Il représente l'erreur introduite durant le processus de quantification du signal électronique par la CCD. Sa principale contribution, de nature gaussienne, provient du bloc de pré-amplification embarqué sur la CCD elle même. L'avantage fondamentale des capteurs EMCCD provient de la technologie d'amplification par le gain EM, suffisante pour éliminer cette composante qui peut être limitante dans le cas des CCD classiques en situation de faibles intensités.

2.3.3 Bruit de photons

La caméra CCD permet de convertir les photons incidents qui interagissent pour créer des photo-électrons à l'interface du silicium qui compose la CCD. Ces photo-électrons constituent le signal d'intérêt mais répondent à des variations statistiques

(inhérente à la nature quantique des photons⁸) lors de leur arrivée en un point donné, c'est une propriété fondamentale et immuable des photons. C'est également la principale limitation des systèmes d'imagerie à très faible intensité. Cette variation statistique d'arrivée des photons en un point donné suit une distribution de Poisson. Considérons un flux de photons arrivant sur un détecteur (un pixel de CCD par exemple) avec un taux n_{ph} . Durant un temps t_{int} , le flux de particules génère un nombre de photons égal à $N_{ph} = n_{ph}t_{int}$. Ainsi, la probabilité de détecter n photons durant le temps d'intégration t_{int} suit la loi de probabilité (2.9).

$$P(n = N) = \exp(-n_{ph}t_{int}) \frac{(n_{ph}t_{int})^n}{n!} \quad (2.9)$$

La valeur moyenne de ce bruit est alors égale à :

$$E[n] = n_{ph}t_{int} = N_{ph} \quad (2.10)$$

et sa variance égale à :

$$\sigma_{ph}^2 = E[n^2] - (E[n])^2 = n_{ph}t_{int} = N_{ph} \quad (2.11)$$

La fluctuation du nombre de photons est donc proportionnelle à la racine carrée du nombre de photons lui même :

$$\sigma_{ph} = \sqrt{N_{ph}} \quad (2.12)$$

ou encore :

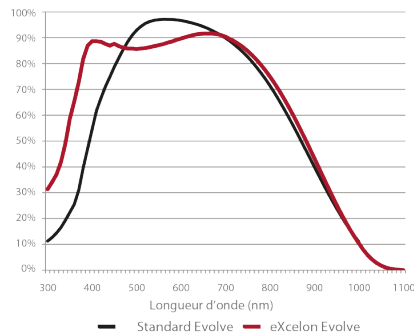
$$\text{bruit de photons} = \sqrt{\text{signal}} \quad (2.13)$$

Il est évident que sa contribution augmente avec l'intensité du signal, mais le rapport signal à bruit augmente également.

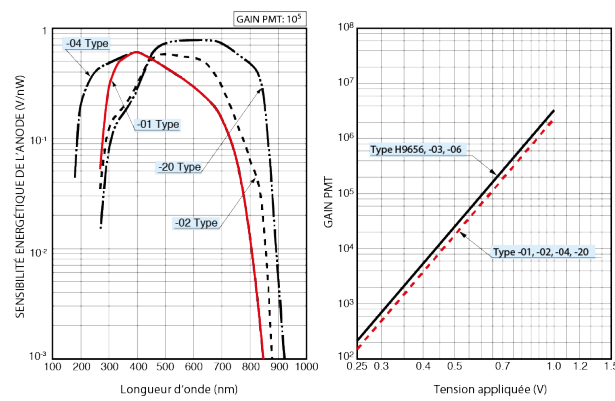
2.3.4 Efficacité quantique d'un capteur

L'efficacité quantique de détection (ou rendement quantique) d'un capteur, de type CCD et PMT, est le rapport entre le nombre de photons incidents et le nombre de photo-électrons générés (avant toute amplification). Sa valeur est bornée entre zéro, pour un rendement nul, et un, dans le cas d'une efficacité quantique parfaite (impossible à atteindre physiquement). Elle traduit l'efficacité du système à convertir un photon en un photo-électron et dépend de la longueur d'onde du flux de photons incident et de la sensibilité du capteur utilisé.

8. Son caractère corpusculaire.



(a) EMCCD



(b) PMT

FIGURE 2.8 – 2.8a Courbe d'efficacité quantique de la caméra EMCCD Evolve 512, en noir la version standard, en rouge la version utilisant la technologie eXcelon qui étend l'efficacité à presque 90% dans l'UV lointain. Source : [Evolve™ 512 Datasheet - Photometrics](#). 2.8b Efficacité quantique du PMT représentée par la sensibilité énergétique de l'anode en fonction de la longueur d'onde, courbes rouges. Sa valeur dépend du gain lui-même fonction de la tension imposée aux bornes des dynodes. Source : [Hamamatsu H9656-01 Datasheet](#).

En pratique, on atteint une efficacité quantique qui dépasse les 90 % avec le capteur EMCCD. L'efficacité quantique du PMT est directement liée à la sensibilité énergétique par la relation (2.14) :

$$Q_e = \frac{S \cdot E}{e} = \frac{hc}{e \lambda} S = 124 \times \frac{S}{\lambda} \quad (2.14)$$

où S est la sensibilité énergétique (en A/W), λ la longueur d'onde (en nm) et 124 la quantité hc/e avec h la constante de Planck⁹, c la vitesse de la lumière dans le vide¹⁰

9. $h = 6,62606957 \cdot 10^{-34}$ J.s

10. $c = 299792458$ m.s⁻¹

et e la charge élémentaire¹¹. Dans le cas le plus favorable, le PMT utilisé permet une efficacité quantique de détection de 18,6 % seulement, compensée par les gains très importants.

2.3.5 Rapport signal à bruit

Une bonne connaissance des différentes contributions du bruit contenues dans le signal nous permet de définir le rapport de signal sur bruit, qui quantifie la proportion de la perturbation par rapport au signal. Un peu différent de la notion électronique, le rapport signal à bruit est défini comme le rapport de l'intensité du signal d'intérêt sur la totalité des composantes du bruit que nous avons énuméré plus haut.

CCD Pour une caméra CCD ce rapport peut s'écrire :

$$RSB = \frac{N_{ph} Q_e t}{\sqrt{(N_{ph} + B) Q_e t + Dt + N_r^2}} \quad (2.15)$$

où N_{ph} est le flux de photons incidents sur la CCD (en photons/px/s), B le bruit de fond provenant de diverses sources (de la diffraction de la lumière ou de l'auto-fluorescence par exemple en photons/pixels/seconde), Q_e l'efficacité quantique de la CCD, t le temps d'exposition (en secondes), D le courant d'obscurité (en électrons/pixels/seconde) et N_r le bruit de lecture (en électrons(RMS)/pixel). Plus le RSB augmente, meilleure est la qualité et le contraste de l'image finale comme on peut l'observer sur l'exemple de la figure 2.9.

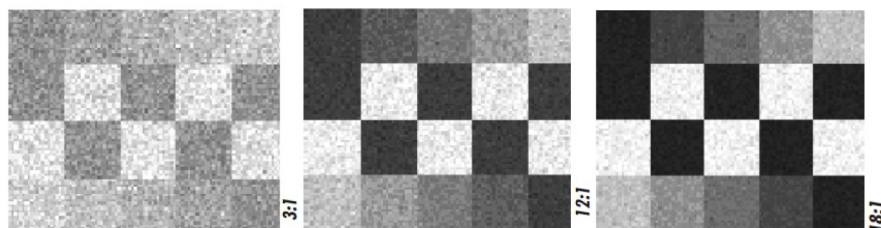


FIGURE 2.9 – Série d'acquisitions d'un masque de test à différentes valeur du rapport signal à bruit. Source : [Keep the noise down - Photometrics Technical Note](#).

PMT En ce qui concerne le capteur PMT, on peut également définir un rapport de signal à bruit en s'appuyant sur l'équation (2.13) qui donne :

11. $e = 1,602176565 \cdot 10^{-19}$ C

Chapitre 2. Numérisation en microscopie de fluorescence

$$RSB = \frac{i_{ph}}{\sqrt{2e(i_{ph} + i_{co})B}} \quad (2.16)$$

où i_{ph} est le courant de cathode lié aux flux de photons, e la charge élémentaire, i_{co} le courant d'obscurité et B la bande passante de la chaîne de détection.

3 Échantillonnage Compressif

L'entrée dans le deuxième millénaire a clairement été marquée par une révolution du monde numérique. Le développement et l'inondation massive des marchés de nouveaux systèmes d'acquisitions, à des résolutions jusque là encore jamais atteintes, a démultiplié les sources de données. Cette production massive de données est le résultat du théorème de l'échantillonnage, fruit des travaux de Kotelnikov, Shannon, Nyquist et Whittaker au cours du vingtième siècle. Il a ouvert une grande voie à la conversion analogique-numérique si bien que le « tout numérique » s'est largement imposé sur cette dernière décennie. Les raisons de ce passage au tout numérique sont multiples. La digitalisation a favorisé le développement de nouveaux systèmes d'acquisitions plus fiables, moins coûteux et par conséquent utilisés par un plus grand nombre. Malheureusement, dans de nombreuses applications, le critère d'échantillonnage (fréquence de Nyquist) est si grand qu'on aboutit à des fichiers de trop grande taille. De même, il arrive tout simplement que certaines acquisitions soient trop coûteuses voire physiquement impossible aux vues des coûts que peuvent représenter leur stockage ou leur transfert [67, 143]. L'augmentation des utilisateurs et des applications a conduit à un véritable déluge des données [10, 77] pointé par de nombreux indicateurs comme l'un des défis majeurs des années à venir. En effet, l'analyse actuelle et prévisionnelle de l'IDC (International Data Corporation), révèle qu'en 2013 il y avait 4,4 zettabits stockés dans l'univers digital et qu'en 2020 cette valeur atteindrait les 44 zettabits [84]. Ce constat pose plusieurs problèmes puisque à ce rythme la quantité de données générées dépassera inéluctablement l'espace de stockage disponible sans évoquer la problématique de sécurisation des données. La compression s'est rapidement imposée comme la solution aux problèmes des données de très grandes dimensions avec pour but de trouver la représentation la plus petite d'un signal pour arriver à le reconstruire avec le meilleur degré de fidélité. L'une des techniques les plus populaires est certainement le *transform coding*, technique essentiellement basée sur la recherche de représentations *parcimonieuses* ou *compressibles* des signaux d'intérêts [25, 45]. Schématiquement,

pour de tels signaux, cela revient à discriminer les coefficients nuls ou quasi-nuls pour ne retenir que les plus grands. C'est le procédé qui est à la base des formats de compressions les plus connus tels que le JPEG, JPEG2000, MPEG, MP3 etc. Inspiré de constat, l'*échantillonnage compressif* ou CS (pour *Compressive Sampling*) est apparu comme une nouvelle modalité d'acquisition des signaux et une nouvelle conception physique des détecteurs permettant de réduire de façon drastique la taille des acquisitions lorsque les signaux ont une représentation parcimonieuse ou compressible. Dans la pratique classique, le théorème de l'échantillonnage nous impose d'enregistrer un signal à une fréquence au moins égale au double de la fréquence de coupure de celui-ci, et donc d'enregistrer un nombre minimal d'information de ce signal pour le reconstruire sans perte. Si ce signal est parcimonieux dans une certaine base, on peut discriminer une très grande proportion du signal enregistré pour optimiser son espace de stockage (ex. JPEG). Par conséquent, la question naturelle, est de savoir si, pour de tels signaux, il n'est pas possible de faire mieux que la vision classique. C'est l'idée de base fondamentale du CS : plutôt que de faire l'acquisition complète de signaux à de grandes fréquences d'échantillonnage pour ensuite les compresser (entendons par là : jeter une grande partie des données) n'est-il pas possible de faire **directement** l'acquisition de ce signal sous sa forme compressée (ou à une fréquence moindre). C'est de cette idée qu'est née la théorie du CS initiée par Candès, Tao, Donoho et Romberg en 2001 [9, 28, 29, 31, 33, 34, 47]. Leurs travaux ont montré que pour des signaux parcimonieux, dans certaine base de représentation, il est possible de reconstruire **sans perte**, un signal à partir de mesures linéaires et fortement réduites du signal, le tout de manière non adaptative.

La théorie du CS est un véritable paradigme qui bouscule incontestablement les croyances dans le domaine du traitement du signal et de l'information. Ces nouvelles possibilités ont déjà eu d'importantes répercussions notamment dans le domaine de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) avec la possibilité de réduire fortement les temps d'acquisitions [97] mais également dans une multitude d'autres domaines où l'acquisition de données tient une place centrale [20, 27, 55, 57, 98, 102, 104, 142, 150]. C'est le cas en microscopie de fluorescence où on atteint des niveaux de résolutions de plus en plus grands et surtout avec des modalités de détecteurs multi-dimensionnelles (3D [114], multi-spectrales [78], résolution temporelle [58, 132]). Ce sont de véritables enjeux en recherche bio-médicale, où la compréhension des mécanismes sub-cellulaires passe par l'observation des propriétés dynamiques de ces éléments. Ainsi, en microscopie de fluorescence il est possible d'observer, par marquage fluorescent d'une molécule, sa morphologie, son activité au sein de la cellule ou encore sa localisation. C'est le cas en neurobiologie [134] où la plupart des acquisitions pour caractériser les mouvements de différents récepteurs impliqués dans l'activité neuronale n'ont pu être effectuées qu'avec une couleur par acquisition. Ce-

pendant, de plus en plus d'applications nécessitent l'analyse quantitative et simultanée de plusieurs protéines en même temps. Il faut donc pouvoir suivre l'évolution de plusieurs molécules (échelle nanométrique) marquées à l'aide de différents fluorophores, au même moment et dans un même échantillon (i.e. au sein d'une même acquisition). Cet assemblage dimensionnel représente un véritable enjeu dans les modalités d'acquisitions en microscopie de fluorescence où le CS apparait comme une solution adaptée. En effet, la possibilité de relaxer les contraintes de bande passante d'acquisition, en tirant partie de la redondance des signaux, offre la possibilité de cumuler les canaux dimensionnels d'acquisitions sans corrompre la résolution finale d'imagerie ni même au détriment des temps d'acquisitions, des taux de transferts ou encore de l'espace de stockage.

Sommaire

3.1 Compression des données	45
3.2 Théorie de l'échantillonnage compressif	47
3.2.1 Principe	47
3.2.2 Parcimonie	48
3.2.3 Incohérence	49
3.2.4 Principe d'incertitude	50
3.2.5 Sous-échantillonnage	51
3.2.6 Principe d'Isométrie Restreinte	54
3.3 Algorithme de reconstruction	54

3.1 Compression des données

Pour répondre à ce type de problématique, nous avons souvent recours à la compression de données qui revient à chercher la représentation la plus petite de ces données pour arriver au résultat avec une dégradation acceptable. Une des techniques les plus populaires est le *codage par transformation* [99], technique qui exploite le fait qu'un signal d'intérêt possède une représentation *parcimonieuse* dans une certaine base Ψ [48] (ou *compressible*). Cela signifie que l'énergie du signal est majoritairement concentrée dans une faible portion de ses coefficients. Par exemple, nous savons que les signaux réguliers, ou lisses par morceaux, ont des représentations parcimonieuses, respectivement dans les bases de Fourier et des ondelettes. Cette parcimonie est directement exploitée dans les formats d'encodage les plus connus [140] : JPEG, JPEG2000 [135], MP3. La procédure standard d'acquisition en codage par transformation est la suivante :

- i la totalité des N coefficients x_i du signal sont enregistrés,

Chapitre 3. Échantillonnage Compressif

- ii on réalise la transformation $\{\theta(n)\}$ de ces coefficients par projection de tous les coefficients sur la base de parcimonie supposée $\theta(n) = \langle \psi_n, x \rangle$,
- iii les K coefficients significatifs sont localisés et retenus, tandis que les (nombreux) coefficients les plus faibles sont rejetés,
- iv enfin, on encode les valeurs et localisations des coefficients les plus grands.

Cette procédure s'avère inefficace pour des signaux de grande taille puisque lors de la conversion analogique-numérique, la majorité du produit de conversion est rejetée (bien que la fraction à retenir ne soit pas *a priori* connue). Pourtant, il s'agit du processus commun à de nombreux encodages de compression, comme celui contenus dans nos appareils photographiques.

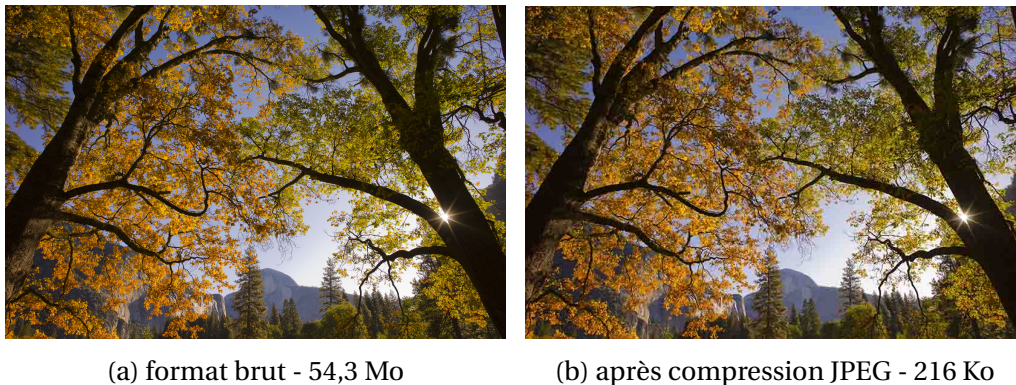


FIGURE 3.1 – Format brut vs. compression JPEG.

La plupart de nos foyers sont équipés d'appareils photographiques numériques, dont l'un des arguments de vente les plus utilisés est le nombre de méga pixels (millions de pixels) que contiennent leur capteurs. Un appareil standard de 10 méga pixels capture pas moins de 30 mégabits (MB), un bit pour chaque canal (rouge, vert et bleu), pour une photographie de 10 millions de pixels. Cependant, lorsqu'on télécharge ces photographies sur un ordinateur, on s'aperçoit que le fichier final ne représente que 3 mégabits. Ce n'est pas moins de 90% de l'information qui a été jetée avant même que l'on ait pu voir le résultat. Si le gain d'espace de stockage est souhaitable et apprécié, on peut tout de même se poser la question de l'utilité d'avoir fait l'acquisition d'autant de données pour un résultat très satisfaisant une fois que 90% de l'information contenue ait été écartée. La figure 3.1 illustre ce propos en comparant le format brut d'acquisition 3.1a, d'un appareil photographique numérique, au format JPEG 3.1b de compression de ce même cliché. Le résultat visuel est identique. Cependant, le format brut nécessite 54,3 Mo d'espace de stockage alors que le format JPEG ne nécessite que 216 Ko (soit 99,6% d'espace de stockage en moins).

« One can regard the possibility of digital compression as a failure of sensor design. If it is possible to compress measured data, one might argue that too many measurement were taken. » [22]

DAVID BRADY

Cette phrase résume le problème lié à la compression telle qu'elle est vue de nos jours. Pour s'en convaincre il suffit de prendre l'exemple de l'IRM, qui par application du CS a donné d'étonnant résultats en terme d'accélération de l'acquisition pour une qualité équivalente.

3.2 Théorie de l'échantillonnage compressif

Enregistrer et compresser une image nécessite classiquement de l'échantillonner à la fréquence de Nyquist, d'en calculer la représentation dans une certaine base et de n'en retenir que les coefficients les plus significatifs après transformation. Cette modalité conduit à un double gaspillage : en terme d'échantillonnage, puisqu'on fait l'acquisition de tout le signal, et en terme de complexité et de ressources puisqu'on traite tout le signal pour n'en retenir qu'une petite fraction. Contrairement à la compression telle que nous venons de l'évoquer, le CS propose de faire l'acquisition d'un signal dans sa forme déjà compressée [29, 49]. La théorie stipule qu'il est possible de reconstruire un signal à partir d'un nombre de mesures moins nombreuses (incomplètes) que ne le suggère la méthode traditionnelle qui consiste à faire l'acquisition d'un signal entier pour en diminuer la taille après coup (coût).

3.2.1 Principe

De nombreux domaines des sciences et technologies nécessitent l'étude quantitative de signaux mesurés : c'est le cas en imagerie. Lorsque le processus d'acquisition est linéaire, la reconstruction est obtenue par résolution d'un système linéaire d'équations. Autrement dit, la mesure $\mathbf{y} \in \mathbb{C}^M$ est directement reliée au signal $\mathbf{x} \in \mathbb{C}^N$ par une relation mathématique :

$$\mathbf{Ax} = \mathbf{y} \tag{3.1}$$

La matrice $\mathbf{A} \in \mathbb{C}^{M \times N}$ modélise le processus de mesure linéaire de l'information et tient compte de la modalité d'acquisition. La pratique conventionnelle pour résoudre de tels systèmes nécessite l'acquisition de M mesures où M est au moins aussi grand que le nombre N décrivant la taille du signal. C'est la condition mathématique pour

résoudre un système d'équations modélisé par (3.1). Dans le cas où $M < N$, le système est sous-indéterminé au sens de l'algèbre linéaire classique et il existe une infinité de solutions à (3.1). Il est impossible de résoudre classiquement ce type de problème. Le théorème de l'échantillonnage implique également un nombre minimal de mesures pour qu'un signal puisse être reconstruit correctement avec la possibilité d'en réduire la taille après acquisition. La théorie récente du CS affirme cependant que sous certaines hypothèses, il est possible en réalité de reconstruire un signal lorsque le nombre de mesures disponibles M est plus faible que la taille N du signal. L'hypothèse fondamentale qui rend possible la résolution d'un tel problème est la *parcimonie*. Cette hypothèse permet de redéfinir tout le processus d'acquisition pour le mesurer directement sous sa forme compressée et mesurer ce qui doit l'être sans autre a priori.

Dans ce qui suit, le mécanisme d'acquisition fait référence à l'acquisition de données à partir d'un signal $f(x)$ obtenu par enregistrement des valeurs :

$$y_k = \langle f, \phi_k \rangle, \quad k = 1, \dots, m \quad \text{ou} \quad \mathbf{y} = \Phi f \quad (3.2)$$

avec \mathbf{y} l'observation, c'est-à-dire, l'image composée des données enregistrées par le détecteur dans l'espace des ϕ_k formé par les pixels du détecteur.

3.2.2 Parcimonie

La parcimonie est une notion devenue centrale dans le traitement des signaux et d'autant plus fondamentale concernant la théorie du CS qui tire partie de cette hypothèse et du fait qu'un grand nombre de signaux possèdent naturellement cette propriété, comme c'est le cas en microscopie de fluorescence. Par ailleurs, presque tous les signaux ont une représentation parcimonieuse dans une certaine base qu'il convient de choisir¹. Par définition, un signal (de taille N) est dit parcimonieux si seulement un nombre réduits de ses valeurs K sont non-nulles (cf. figure 3.2a) telles que $K \ll N$ dans une certaine base de représentation. Vue autrement, la parcimonie exprime l'idée que la fréquence d'un signal *continu* est en fait beaucoup plus petite que ne le suggère sa bande passante ou bien encore qu'un signal *discret* dépend d'un nombre de degrés de liberté bien plus faible que sa longueur.

1. C'est le cas de la base des ondelettes, procédé utilisé pour la compression en JPEG et JPEG2000

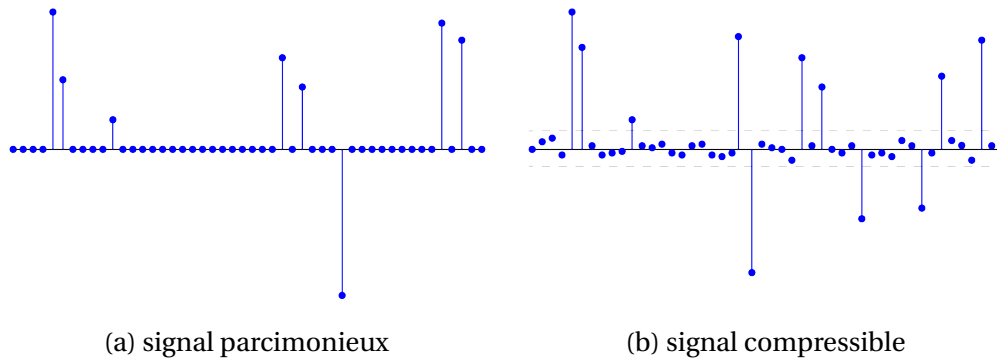


FIGURE 3.2 – Exemples de signaux parcimonieux 3.2a et compressible 3.2b.

Cette notion de parcimonie est généralisée aux signaux dits *compressibles*, c'est-à-dire des signaux dont on peut négliger les plus faibles entrées proches de zéro (cf. figure 3.2b). Ces signaux sont dits *K-parcimonieux* avec K le nombre de ses entrées non nulles. Considérons un signal continu mathématiquement représenté par une fonction $f \in \mathbb{R}^N$ où N représente les N pixels d'une image. Soit Ψ une base orthonormale où $f : p \mapsto f(p)$ y ait une représentation parcimonieuse telle que :

$$f(p) = \sum_{i=1}^n x_i \psi_i(p) = \Psi \mathbf{x} \quad (3.3)$$

où Ψ est la base de parcimonie dans laquelle le signal a une représentation parcimonieuse après projection sur $[\psi_1, \psi_2, \dots, \psi_n]$ les vecteurs de la base de parcimonie. \mathbf{x} sont les composantes de f avec $x_i = \langle f, \psi_i \rangle$. Essayer de prélever un nombre réduit de coefficients du signal dans une telle base pour être capable de le reconstruire n'est pas chose aisée pour ne pas dire impossible. En revanche, si on trouve une base dans laquelle f n'a plus une représentation parcimonieuse mais au contraire étalée, alors on comprend qu'il devient plus facile d'y prélever de l'information utile. Prenons l'exemple d'une image parcimonieuse avec pour seule composante non nulle un dirac. Si on projette sa représentation dans l'espace fréquentiel (ou espace de Fourier), on sait que l'information sera complètement étalée (répartie) dans cet espace et non plus concentrée en un seul dirac. Il est donc plus aisé de penser prélever de l'information utile dans cette configuration. L'information contenue est la même mais représentée différemment. On dit alors que ces deux bases sont incohérentes. Cette hypothèse fondamentale découle directement de la propriété de parcimonie.

3.2.3 Incohérence

Nous avons vu la dualité qu'il existe entre la base de représentation parcimonieuse Ψ et une autre base dans laquelle un même signal a une représentation au contraire étalée. Cette dualité traduit la notion d'*incohérence* et permet intuitivement

déjà de mieux comprendre la possibilité d'acquérir de manière plus efficiente un signal parcimonieux. On définit alors systématiquement une base Φ incohérente avec la base de parcimonie Ψ du signal concerné. Il devient évident que l'acquisition sera effectuée dans cette nouvelle base, la probabilité d'y mesurer de l'information utile étant élevée. On définit alors, la cohérence de la base d'acquisition Φ avec la base de représentation Ψ par la relation suivante :

$$\mu(\Phi, \Psi) = \sqrt{N} \max_{1 \leq k, j \leq N} |\langle \phi_k, \psi_j \rangle| \quad (3.4)$$

Cette relation permet de quantifier la cohérence (ou l'incohérence) entre deux bases et traduit le niveau de corrélation qu'il existe entre elles. En tout état de cause μ est bornée entre 1, sa valeur minimale, traduisant une incohérence totale, et \sqrt{N} puisque le produit scalaire $|\langle \phi_k, \psi_j \rangle|$ a pour maximum la valeur 1 (Φ et Ψ étant orthonormales dans notre exemple). L'information contenue dans un signal parcimonieux est d'autant plus répartie que l'incohérence est proche de un, condition idéale. Certaines bases sont connues pour être naturellement incohérentes à toutes autres bases telle que la base des vecteurs d'Hadamard que nous avons exploité dans le cadre de ma thèse.

3.2.4 Principe d'incertitude

L'incohérence du système est une mesure simple et utile de la performance de l'opérateur d'échantillonnage. On note l'analogie de cette configuration au principe d'incertitude de Weyl-Heisenberg, qui stipule qu'un signal continu dans le temps ne peut être exactement localisé simultanément en temps et en fréquence Si la plupart de l'énergie d'un signal f est concentrée dans un intervalle de temps Δt et que presque toute son énergie est concentrée dans un intervalle $\Delta \omega$ de l'espace fréquentiel alors :

$$\Delta t \cdot \Delta \omega \geq 1 \quad (3.5)$$

L'analogie à ce principe, introduite dans un premier temps par Donoho et Stark [50], a finalement été formalisée sous la forme adaptée au problème du CS [31, 33] : c'est le *principe d'incertitude robuste*. Soit Ψ_1 et Ψ_2 deux bases orthonormales. Leur cohérence est définie d'après (3.4) telle que :

$$\mu(\Psi_1, \Psi_2) = \max_{\phi \in \Psi_1, \psi \in \Psi_2} |\langle \phi, \psi \rangle| \quad (3.6)$$

alors si α_1 est l'unique représentation de f dans la base Ψ_1 avec $\Gamma_1 = \text{sup } \alpha_1$, et α_2 la représentation dans Ψ_2 alors ceux-ci doivent obéir à la relation :

$$|\Gamma_1| + |\Gamma_2| \geq \frac{2}{\mu(\Phi_1, \Phi_2)} \quad (3.7)$$

3.2.5 Sous-échantillonnage

Si on se place dans les conditions décrites plus haut, alors on cherche à reconstruire une image à partir de l'acquisition de M mesures du signal sur les N totales. C'est-à-dire sans faire l'acquisition de tout le signal et tout en étant sûr de pouvoir le reconstruire. C'est la réponse centrale qui est donnée par le CS [29, 31, 32] pour la reconstruction à partir d'un nombre incomplet de mesures d'un signal : on utilise fréquemment la norme d'un signal pour en mesurer son intensité ou encore pour mesurer la taille d'une erreur.

Définition 3 (Norme) Pour tout vecteur $\mathbf{x} \in \mathbb{R}^N$ et $q \in \mathbb{R}_+^*$,

$$\|\mathbf{x}\|_q := \left(\sum_n |x[N]|^q \right)^{1/q} \quad (3.8)$$

définit une norme pour $q \geq 1$ et une quasi-norme pour $q < 1$.

Vision géométrique Supposons un signal $\mathbf{x} \in \mathbb{R}^2$ que l'on souhaite approximer par un point dans un espace affine E à une dimension. Si on mesure l'approximation de l'erreur en utilisant une norme l_q , alors il s'agit de trouver $\hat{\mathbf{x}} \in E$ qui minimise la norme $\|\mathbf{x} - \hat{\mathbf{x}}\|_q$. Le choix de q aura d'importantes répercussions sur le résultat de l'approximation de l'erreur comme le montre la figure 3.3.

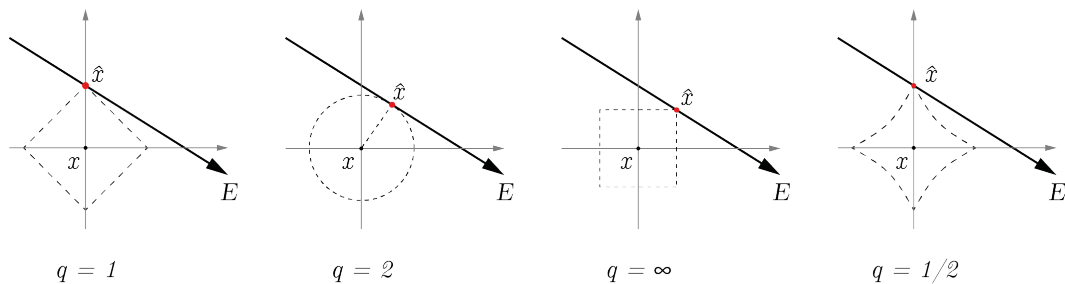


FIGURE 3.3 – Approximation de l'erreur en fonction du choix de la norme.

Pour trouver $\hat{\mathbf{x}}$ qui approxime \mathbf{x} , on imagine faire suffisamment grandir la sphère l_q centrée en \mathbf{x} jusqu'à ce qu'elle intercepte E , c'est le point $\hat{\mathbf{x}}$. Ce point est le plus proche de \mathbf{x} suivant la valeur q de la norme. On remarque que plus q est grand, plus l'erreur tend à se partager suivant les deux axes, tandis que plus q est petit, plus l'erreur se projette sur un seul des deux axes et tend à devenir parcimonieuse. On comprend

Chapitre 3. Échantillonnage Compressif

mieux intuitivement l'importance du choix de la norme pour le calcul de l'erreur. Cette approche se généralise aux dimensions supérieures et permet de mieux comprendre le résultat qui suit.

Théorème 2 Soit $f \in \mathbb{R}^N$ et \mathbf{x} la séquence des coefficients de f dans une base Ψ dans laquelle sa représentation est K -parcimonieuse. Prenons M mesures de ce signal dans la base incohérente Φ , choisies de façon uniformément aléatoire. Si :

$$M \geq C \cdot \mu^2(\Phi, \Psi) \cdot K \cdot \log N \quad (3.9)$$

où C est une constante positive, K le degré de parcimonie du signal et μ l'incohérence des bases Φ et Ψ , alors il est possible de reconstruire **exactement** le signal \mathbf{x} avec une probabilité écrasante.

Tout aussi intéressant qu'il soit, ce résultat (3.9) n'explique pas comment on résout le problème. En effet, à ce stade, on dispose d'un système clairement sous-indéterminé. La clé se trouve dans le caractère parcimonieux du signal. En effet, il existe une infinité de solutions à un tel problème. Cependant, la parcimonie nous permet de savoir que si elle existe, la solution sera celle dont la norme est la plus faible (cf. figure 3.3). Cette contrainte supplémentaire permet de résoudre ce système sous-indéterminé en résolvant un problème d'optimisation convexe aujourd'hui bien connu sous le nom de *Basis Pursuit (BP)* [37]. C'est le deuxième résultat important de la théorie du CS : il est possible de reconstruire avec exactitude un signal tel que défini précédemment en minimisant sa *norme l1*. La *norme l1* de $\tilde{\mathbf{x}}$ s'écrivant alors :

$$\|\tilde{\mathbf{x}}\|_{l_1} := \sum_{i=1}^m |\tilde{x}_i| \quad (3.10)$$

Théorème 3 (théorème 2 bis) Soit m tel que dans 3.9, alors la solution pour reconstruire le signal revient à résoudre 3.11 :

$$(P1) \quad \min_{\mathbf{x} \in \mathbb{R}^n} \|\mathbf{x}\|_{l_1} \quad \text{sous la contrainte} \quad y_k = \langle \phi_k, \Psi \tilde{\mathbf{x}} \rangle, \quad \forall k \in M. \quad (3.11)$$

Sans rentrer dans les détails, on montre que la minimisation de la norme l_1 est la solution la plus simple, la plus stable et qui converge à la solution au problème (P1). La minimisation de la norme l_1 permet souvent de redéfinir (P1) en un problème d'optimisation convexe lui-même traduisible en un problème linéaire numérique [32]. Puisque l'on travaille avec des images, il est judicieux de projeter le problème sous une forme matricielle qui reproduit la numérisation par pixel d'un détecteur. L'observation se réécrit :

3.2. Théorie de l'échantillonnage compressif

$$\mathbf{y} = \mathbf{A}\mathbf{x} \quad (3.12)$$

avec A la matrice de mesures (ou encore matrice de sensing) de taille $M \times N$. Le problème (P1) peut ainsi s'illustrer sous la forme introduite dans la figure 3.4.

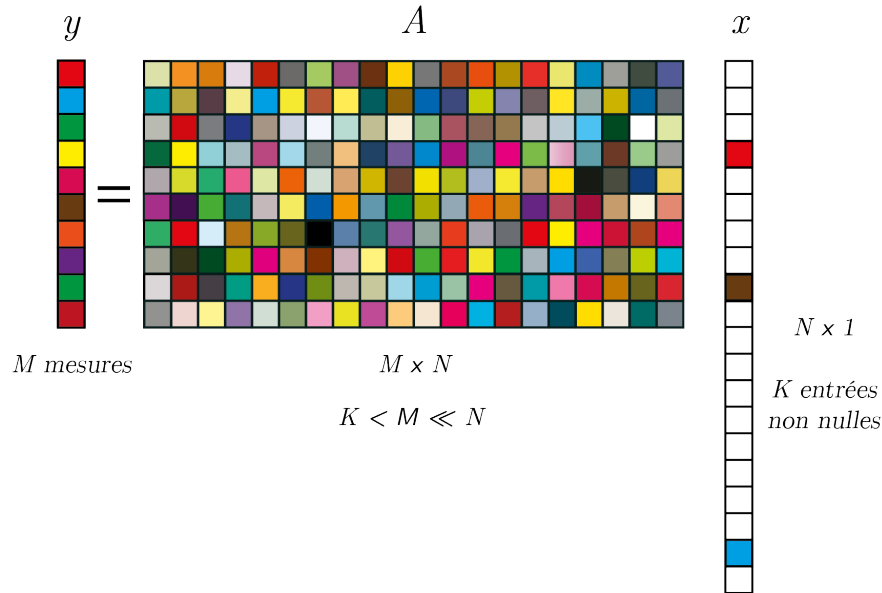


FIGURE 3.4 – Modélisation du processus de mesures en CS. x représente le signal parcimonieux sous forme d'un vecteur colonne (pixels blancs = coefficients nuls). Chaque ligne de la matrice A (base d'échantillonnage) représente un motif de modulation spatiale unique et différent. La multiplication d'une ligne de la matrice A et du vecteur x correspond à une projection dans la base d'incohérence et est représentée par un pixel du vecteur y . Le produit complet de chaque ligne de la matrice A par le vecteur x a pour résultat le vecteur colonne y . La procédure de reconstruction (par un algorithme) nécessite la connaissance de y (les mesures disponibles) et A (matrice ou opérateur d'échantillonnage représentant l'étape physique d'acquisition du signal).

On démontre que si la matrice A satisfait à la *propriété d'isométrie restreinte* [29, 30, 32] alors on peut reconstruire le signal \mathbf{x} exactement comme défini dans (3.13).

$$\min \|\mathbf{x}\|_{l_1} \quad \text{sous la contrainte} \quad \mathbf{A}\mathbf{x} = \mathbf{y} \quad (3.13)$$

Enfin, on montre également qu'il est possible de reconstruire un signal si celui-ci est corrompu, c'est-à-dire si celui-ci n'est pas strictement parcimonieux (ou bien encore si celui-ci contient du bruit). On considère alors l'observation $\mathbf{y} = \mathbf{A}\mathbf{x} + \mathbf{e}$ avec \mathbf{e} la

perturbation du signal contenue dans la quantité ϵ et $\|e\|_{l_2} \leq \epsilon$. Le problème (P1) devient alors :

$$(P2) \quad \min \|x\|_{l_1} \quad \text{sous la contrainte} \quad \|Ax - y\|_{l_2} \leq \epsilon \quad (3.14)$$

Cette formulation est celle qui est pertinente pour notre application.

3.2.6 Principe d'Isométrie Restreinte

Une mesure plus fine du concept de principe d'incertitude a été formulée pour formaliser les hypothèses nécessaires des opérateurs d'échantillonnages et leur performance. Il s'agit de la propriété d'isométrie restreinte.

Définition 4 (Constante d'isométrie) *Pour tout entier naturel $K = 1, 2, \dots$, on définit la constante d'isométrie δ_K d'une matrice Φ comme le plus petit nombre tel que :*

$$(1 - \delta_K) \|x\|_{l_2}^2 \leq \|\Phi x\|_{l_2}^2 \leq (1 + \delta_K) \|x\|_{l_2}^2 \quad (3.15)$$

est valable pour tout vecteur K -parcimonieux.

Le principal problème relatif à la reconstruction de nos images repose sur le dimensionnement des matrices d'échantillonnage utilisées dans l'algorithme de reconstruction. Peu importe le choix effectué, les matrices doivent satisfaire à la propriété d'isométrie restreinte (notée RIP pour *Restricted Isometry Property*).

Théorème 4 *La solution au problème (P2) a une solution exacte si x est suffisamment parcimonieux et si la matrice Φ obéit à la RIP.*

Afin de reconstruire les signaux de nos acquisitions, nous avons recours à l'utilisation d'algorithmes de reconstruction. Il en existe une multitude et s'adaptent plus ou moins bien à certaines situations. Dans le cadre de l'acquisition d'images comportant des milliers voir des millions de pixels, le plupart des algorithmes proposés ne sont pas capables de résoudre (P2) avec précision sans engager d'importantes ressources informatiques.

3.3 Algorithme de reconstruction

La reconstruction à partir de mesures fortement sous échantillonnées, corrompues et incomplètes est un problème combinatoire qui n'est généralement pas soluble. Néanmoins, sous certaines conditions d'échantillonnage du système et notamment de la parcimonie du signal, il existe plusieurs classes d'algorithmes avec différentes stratégies permettant la reconstruction de tels signaux [34, 43] tels que :

$$y = \Phi x + e \quad (3.16)$$

avec y la mesure, Φ l'opérateur d'échantillonnage et e la représentation du bruit telle que $\|e\|_{l_2} = \epsilon$. On peut regrouper les différentes stratégies en trois catégories [107] :

les algorithmes gloutons : leur principe repose sur l'approximation pas-à-pas en choisissant un maximum optimal local à chaque étape, tels que les algorithmes du type Orthogonal Matching Pursuit (OMP) [51, 108, 109, 136], Compressive Sampling Matching Pursuit (CoSaMP), LASSO ou encore par une méthode de seuillage dur itératif (Iterative Hard Thresholding) [44],

les algorithmes d'optimisation combinatoire : par test de la meilleure solution parmi un sous ensemble de solutions réalisables [40, 59, 60],

les algorithmes à relaxation convexe : qui reposent sur la résolution d'un problème convexe par, minimisation de la norme du signal et sont connus pour correctement approximer sa représentation (tels que NESTA [12] ou encore CVX [62, 63]) ou par projection de gradient [56].

Microscopie de fluorescence **Partie**
compressive

4 Résumé et publication

Nous avons développé un microscope de fluorescence basé sur le CS qui augmente la sensibilité et réduit la complexité de l'acquisition hyperspectrale. Ce projet est une collaboration entre trois équipes aux compétences complémentaires en mathématiques appliquées, traitement du signal, en instrumentation optique et en imagerie biologique. Ensemble, nous avons réalisé une preuve de concept de microscopie de fluorescence hyperspectrale par CS. Nos résultats ont été publiés en 2012 dans la revue PNAS. J'ai débuté mes travaux de thèse sur cette thématique. Il est question d'utiliser la forte compressibilité des signaux issus de la fluorescence d'échantillons biologiques. Le but a donc été de montrer la faisabilité d'un schéma de microscopie de fluorescence où l'illumination se fait en champs large et la détection à point unique. On allie ainsi l'avantage de la méthode d'illumination à champs large (meilleure sensibilité, bruit réduit) avec ceux de la détection à point unique (rapidité, coût), en utilisant un tube photo-multiplicateur.

Sommaire

4.1 Compressed Sensing framework	63
4.2 Compressed Fluorescence Microscopy : Implementation	63
4.2.1 Experimental Setup	63
4.2.2 Choice of the illumination patterns	64
4.2.3 Computational reconstruction	64
4.3 Sparse Fluorescence images Beads Cells and Tissues	65
4.3.1 Fluorescent Beads	65
4.3.2 Lily anther slice	66
4.3.3 Zyxin mEOS2 COS7 cells	66
4.4 Hyperspectral Imaging in CFM	67
4.5 Discussions and perspectives	67
4.5.1 Point spread function and its modeling	67
4.5.2 Noise and MSE	68
4.5.3 Impact of the sample thickness	69

4.5.4 Conclusions and prospect	69
4.6 Appendix	69
4.7 Acknowledgments	70

Images fluorescentes parcimonieuse : billes, cellules et tissus. Comme nous l'avons vu, l'application du CS est rendu possible par le caractère parcimonieux des signaux. C'est le cas de l'observation de billes fluorescentes et des échantillons biologiques contenant des marqueurs fluorescents. Il a donc été nécessaire de réunir la seconde condition nécessaire en CS, effectuer l'acquisition des données dans une base incohérente. L'utilisation d'un DMD (Digital Micromirror Device), matrice de micro-miroirs permettant de réfléchir la lumière incidente de manière structurée, a permis d'obtenir cette dernière condition en projetant successivement des motifs, correspondants aux vecteurs qui constituent la base d'Hadamard, sur l'échantillon étudié. Le choix de cette base est motivé pour la qualité d'incohérence de cette base de vecteurs avec la plupart des autres bases, dont notamment celle d'observation (la base directe). Le détecteur, ici un PMT, collecte successivement la fluorescence, émise par l'échantillon illuminé comme nous venons de le décrire, préalablement focalisée par une lentille de collimation pour que le détecteur à point unique enregistre successivement, la fluorescence émanant de chaque projection dans la base d'Hadamard. En définitive, on obtient un spectre des N projections que l'on utilise pour reconstruire une image. Ces reconstructions ont été effectuées en utilisant un algorithme de minimisation de la norme-11 (NESTA) et en utilisant le moins de coefficients possibles M de ce spectre (i.e. le moins de mesures M). Ainsi, en introduisant le taux de compression $\frac{N}{M}$, où N est le nombre de pixels de l'image¹ à reconstruire et M le nombre de mesures utilisées pour la reconstruction, nous avons montré qu'il est possible de reconstruire les images, sans perte d'information, jusqu'à un taux de 32, soit en utilisant seulement 3% de l'information totale. Au delà de ce taux, les reconstructions présentent des pertes d'information et/ou des artefacts. Confortés par ces résultats de cette étape de validation, nous avons reproduit ces expérimentations sur des échantillons plus pertinents d'un point de vue biologique, des cellules de pollen ainsi que des cellules de lignée COS-7. Les reconstructions de cellules ont validé nos résultats préliminaires puisque nous avons favorablement pu reconstruire les images de ces échantillons biologiques à des taux néanmoins plus faibles, jusqu'à 8 (i.e. en utilisant seulement 2048 projections des vecteurs d'Hadamard, soit 12,5% de l'information totale). Cet écart peut s'expliquer en partie par, le bruit de photons plus conséquent que lors des acquisitions sur billes fluorescentes, ainsi que par l'épaisseur des échantillons biologiques de type cellulaire qui introduisent de la

1. qui est aussi le nombre total de projections pour former la base complète des vecteurs d'Hadamard

fluorescence provenant hors du plan focal de modulation des motifs structurés.

Imagerie hyperspectrale. La localisation de protéines et leurs interactions sont des applications de plus en plus étudiées en biologie afin de mieux comprendre leur rôle dans de nombreux mécanismes biologiques. Il est nécessaire d'adopter une approche quantitative de différentes molécules différenciables par l'utilisation de différents marqueurs fluorescents au sein d'un même échantillon et lors d'une même acquisition. Il est alors judicieux d'exploiter la théorie de l'échantillonnage compressif pour effectuer de telles mesures qui sont compliquées à mettre en œuvre en microscopie de fluorescence en raison notamment des limitations des détecteurs et des temps d'acquisitions qui deviennent rapidement prohibitifs. A contrario, l'introduction d'une dimension supplémentaire (la couleur) a pour effet d'introduire plus de redondance dans le signal à mesurer ce qui augmente les performances de compression dans notre approche. Une modification du schéma d'acquisition nous a permis d'effectuer l'acquisition des spectres d'émissions d'un mélange de billes fluorescentes contenant trois fluorophores différents dont les spectres d'émissions sont compris entre 520 nm et 640nm. La totalité du spectre est enregistré en utilisant un réseau de diffraction en sortie du microscope couplé à une caméra EMCCD où le spectre est focalisé sur une ligne de la caméra permettant ainsi de coder le signal sur 128 pixels. De la même façon que précédemment, les 256×256 projections des vecteurs de la base d'Hadamard, sont successivement projetés sur l'échantillon afin d'enregistrer les spectres d'émissions résultants. Les reconstructions sont opérées en adaptant l'algorithme pour effectuer la minimisation de la norme l_1 des spectres de fluorescence pris sous la forme du cube $2D-\lambda$. On exploite ainsi la parcimonie spatiale du signal mais également la parcimonie spectrale. On obtient ainsi la reconstruction d'images hyperspectrales à un taux maximum de 64 sans perte d'information. On démontre de cette manière qu'en introduisant une dimension supplémentaire, le taux de compression est plus important puisqu'on exploite pleinement la redondance des signaux de plus grandes dimensions.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication [131] qui suit et qui précise en détails le principe, les résultats et les limitations de la technique ouvrant à la discussion des améliorations potentielles.

Compressive fluorescence microscopy for biological and hyperspectral imaging

Vincent Studer^{a,b,1}, Jérôme Bobin^c, Makhlad Chahid^{a,b}, Hamed Shams Mousavi^{a,b}, Emmanuel Candes^{d,1}, and Maxime Dahan^{e,1}

^aUniversité Bordeaux 2, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, Unité Mixte de Recherche 5297, F-33000 Bordeaux, France; ^bCentre National de la Recherche Scientifique, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, Unité Mixte de Recherche 5297, F-33000 Bordeaux, France; ^cCommissariat à l'Énergie Atomique Saclay, Institut de Recherche sur les lois Fondamentales de l'Univers/Service d'Électronique des Détecteurs et d'Informatique–Service d'Astrophysique, F-91191 Gif sur Yvette Cedex, France; ^dDepartments of Mathematics, of Statistics, and of Electrical Engineering, Stanford University, Stanford, CA 94305; and ^eLaboratoire Kastler Brossel, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8552, École Normale Supérieure, Université Pierre et Marie Curie–Paris 6, 75005 Paris, France

Edited by* George C. Papanicolaou, Stanford University, Stanford, CA, and approved May 1, 2012 (received for review December 7, 2011)

The mathematical theory of compressed sensing (CS) asserts that one can acquire signals from measurements whose rate is much lower than the total bandwidth. Whereas the CS theory is now well developed, challenges concerning hardware implementations of CS-based acquisition devices—especially in optics—have only started being addressed. This paper presents an implementation of compressive sensing in fluorescence microscopy and its applications to biomedical imaging. Our CS microscope combines a dynamic structured wide-field illumination and a fast and sensitive single-point fluorescence detection to enable reconstructions of images of fluorescent beads, cells, and tissues with undersampling ratios (between the number of pixels and number of measurements) up to 32. We further demonstrate a hyperspectral mode and record images with 128 spectral channels and undersampling ratios up to 64, illustrating the potential benefits of CS acquisition for higher-dimensional signals, which typically exhibits extreme redundancy. Altogether, our results emphasize the interest of CS schemes for acquisition at a significantly reduced rate and point to some remaining challenges for CS fluorescence microscopy.

biological imaging | compressed sensing | computational imaging | sparse signals

Fluorescence microscopy is a fundamental tool in basic and applied biomedical research. Because of its optical sensitivity and molecular specificity, fluorescence imaging is employed in an increasing number of applications which, in turn, are continuously driving the development of advanced microscopy systems that provide imaging data with ever higher spatio-temporal resolution and multiplexing capabilities. In fluorescence microscopy, one can schematically distinguish two kinds of imaging approaches, differing by their excitation and detection modalities (1). In wide-field (WF) microscopy, a large sample area is illuminated and the emitted light is recorded on a multidetector array, such as a CCD camera. In contrast, in raster scan (RS) microscopy, a point excitation is scanned through the sample and a point detector is used to detect the fluorescence signal at each position.

While very distinct in their implementation and applications, these imaging modalities have in common that the acquisition is independent of the information content of the image. Rather, the number of measurements, either serial in RS or parallel in WF, is imposed by the Nyquist-Shannon theorem. This theorem states that the sampling frequency (namely the inverse of the image pixel size) must be twice the bandwidth of the signal, which is determined by the diffraction limit of the microscope lens equal to $\lambda/2NA$ (λ is the optical wavelength and NA the objective numerical aperture). Yet, most images, including those of biological interest, can be described by a number of parameters much lower than the total number of pixels. In everyday's world, a striking consequence of this compressibility is the ability of consumer cameras with several megapixel detectors to routinely reduce the number of bits in a raw data file by an order of magnitude or two

without substantial information loss. To quote from David Brady: “if it is possible to compress measured data, one might argue that too many measurements were taken” (2).

The recent mathematical theory of *compressed* or *compressive sensing* (CS—see refs. 3, 4) has addressed this challenge and shown how the sensing modality could be modified to reduce the sampling rate of objects which are sparse in the sense that their information content is lower than the total bandwidth or the number of pixels suggest. The fact that one can sample such signals nonadaptively and without much information loss—if any at all—at a rate close to the image information content (instead of the total bandwidth) has important consequences, especially in applications where sensing modalities are slow or costly. To be sure, the applications of CS theory to data acquisition are rapidly growing in fields as diverse as medical resonance imaging (5, 6), analog-to-digital conversion (7), or astronomy (8).

In optics, the interest in CS has been originally spurred by the demonstration of the so-called “single-pixel camera” (9). Since then, reports have explored the potential of CS for visible and infrared imaging (10, 11), holography (12), or ghost imaging (13). In microscopy, the feasibility of CS measurements has recently been demonstrated (14). Altogether, these results open exciting prospects, notably for the important case of biomedical imaging. Yet, there are very few results about the performance of CS hardware devices on relevant biological samples. As such samples often have low fluorescence, it is especially important to understand how the associated noise will affect the acquisition and reconstruction schemes.

In this paper, we describe Compressive Fluorescence Microscopy (CFM), a unique modality for fluorescence biological and hyperspectral imaging based on the concepts of CS theory. In CFM, the sample is excited with a patterned illumination and its fluorescence is collected on a point detector. Images are computationally reconstructed from measurements corresponding to a set of appropriately chosen patterns. Therefore, CFM benefits from many advantages associated with RS techniques, namely, high dynamic range, facilitated multiplexing, and wide spectral range (from the UV to the IR). In truth, the benefits of CS are particularly appealing in biology where fast, high-resolution, and multicolor imaging is highly sought after.

The paper is organized as follows. We begin by recalling the principles of CS theory for optical imaging. We then turn to the description of the practical implementation of CFM and of

Author contributions: V.S., J.B., E.C., and M.D. designed research; V.S., J.B., M.C., H.S.M., and M.D. performed research; V.S., J.B., and E.C. contributed new reagents/analytic tools; V.S., J.B., E.C., and M.D. analyzed data; and V.S., J.B., E.C., and M.D. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

*This Direct Submission article had a prearranged editor.

¹To whom correspondence may be addressed. E-mail: vincent.studer@u-bordeaux2.fr, candes@stanford.edu, or Maxime.dahan@lkb.ens.fr.

See Author Summary on page 10136 (volume 109, number 26).

the sensing protocol. Our techniques are subsequently applied to image several relevant samples, including fluorescent beads, cultured cells and tissues. By extending our implementation, we further demonstrate the possibility of hyperspectral acquisition with up to 128 different spectral channels. A final contribution is a careful study of various noise trade-offs for CFM. We conclude the paper with a discussion of prospective CFM developments.

Compressed Sensing Framework

We wish to image a two-dimensional sample $\mathbf{x} = \{x[i]\}$, a distribution of fluorescent probes, in which $x[i]$ is the value of \mathbf{x} at the pixel/location i (thus one can view pixel intensities $x[i]$ as the coefficients of the image \mathbf{x} in a basis of localized functions, namely, the Dirac basis). We represent this object in a basis \mathbf{W} of our choosing and write

$$\mathbf{x} = \sum_p c[p] \mathbf{w}_p = \mathbf{W} \mathbf{c},$$

where the \mathbf{w}_p 's are (orthogonal) basis functions and the $c[p]$'s are the coefficients of \mathbf{x} in the expansion. We say that the signal is K -sparse if at most K of these coefficients are nonzero. An empirical fact is that most images of interest are well approximated by K -sparse expansions with K much less than the number of pixels N , and this is the reason why data compression is effective; one can store and transmit quantizations of the large coefficients, ignore the small ones, and suffer little distortion.

In our imaging setup, we measure correlations between the image of interest \mathbf{x} and sensing waveforms ϕ_k taken from another basis Φ ; that is, we measure

$$y_k = \langle \mathbf{x}, \phi_k \rangle = \sum_i x[i] \phi_k[i]. \quad [1]$$

Here, ϕ_k is an illumination or intensity pattern so that y_k is obtained by collecting all the fluorescence corresponding to those pixels that have been illuminated on a single-point detector. Wide-field and point-like excitation are two extreme cases, corresponding respectively to a uniform sensing waveform ($\phi_k[i] = 1$ for all i) and to a spike or Dirac waveform.

In its simplest form, CS theory asserts that if the signal \mathbf{x} is sparse in the representation \mathbf{W} , then only few measurements of the form [1] are sufficient for perfect recovery provided the sensing and representation waveforms, respectively ϕ_k and \mathbf{w}_p , are *incoherent* (4, 15). Two systems are said to be incoherent if any element in one of the two cannot be expressed as a sparse linear combination of elements taken from the other. Formally, the coherence between two orthobases \mathbf{W} and Φ of \mathbb{R}^N is measured by the parameter $\mu(\mathbf{W}, \Phi)$ ranging between 1 and N :

$$\mu(\mathbf{W}, \Phi) = N \max_{p,k} |\langle \mathbf{w}_p, \phi_k \rangle|^2. \quad [2]$$

The Fourier and Dirac bases are in this sense maximally incoherent (we need many spikes to synthesize a sinusoid and vice versa) and $\mu = 1$. On the opposite, two identical bases are maximally coherent and, in this case, $\mu = N$. Hence, incoherence expresses the idea of the level of dissimilarity between any two representations of a signal. With this notion in mind, one perceives how each incoherent measurement—a projection on an element of the basis Φ —conveys a little bit of information about all the entries of the coefficient vector \mathbf{c} . An important result in CS theory states that K -sparse signals can be recovered exactly from comparably few measurements in an incoherent system. Further, recovery is achieved by solving a tractable optimization program—a linear program. One solves

$$\min_{\mathbf{c} \in \mathbb{R}^N} \|\mathbf{c}\|_{\ell_1} \text{ subject to } y_k = \langle \phi_k, \mathbf{W} \mathbf{c} \rangle, \text{ for all } k = 1 \dots M. \quad [3]$$

When M measurements are chosen uniformly at random from the basis Φ , the recovery is exact with very high probability; that is, the solution sequence $\hat{\mathbf{c}}$ obeys $\hat{\mathbf{x}} = \sum_p \hat{c}[p] \mathbf{w}_p = \mathbf{x}$, provided that

$$M \geq C \mu(\Phi, \mathbf{W}) K \log N, \quad [4]$$

where C is a constant on the order of unity. This result emphasizes both the role of the coherence and the potential gain for large images due to the logarithmic dependence in the pixel size. For incoherent pairs, we only need on the order of $K \log N$ random samples.

We have discussed sparse signals above for ease of exposition. However, the theory extends to approximately sparse signals and to noisy data. For instance, if the signal is well approximated by a K -sparse signal (some would say that it is compressible), then the reconstruction error is shown to be small. Further, the recovery is not sensitive to noise in the sense that the error degrades gracefully as the signal-to-noise ratio decreases. We refer to ref. 16 and references therein for quantitative statements.

Compressive Fluorescence Microscopy: Implementation

Experimental Setup. Our setup is based on a standard epifluorescence inverted microscope (Nikon Ti-E) as shown in Fig. 1A. To generate spatially modulated excitation patterns, we incorporated a Digital Micromirror Device (DMD) in a conjugate image plane of the excitation path. The DMD is a 1,024-by-768 array of micromirrors (Texas-Instrument Discovery 4100) of size $13.68 \times 13.68 \mu\text{m}$ each, and which can be shifted between two positions oriented at $+12^\circ$ or -12° with respect to the DMD surface. The

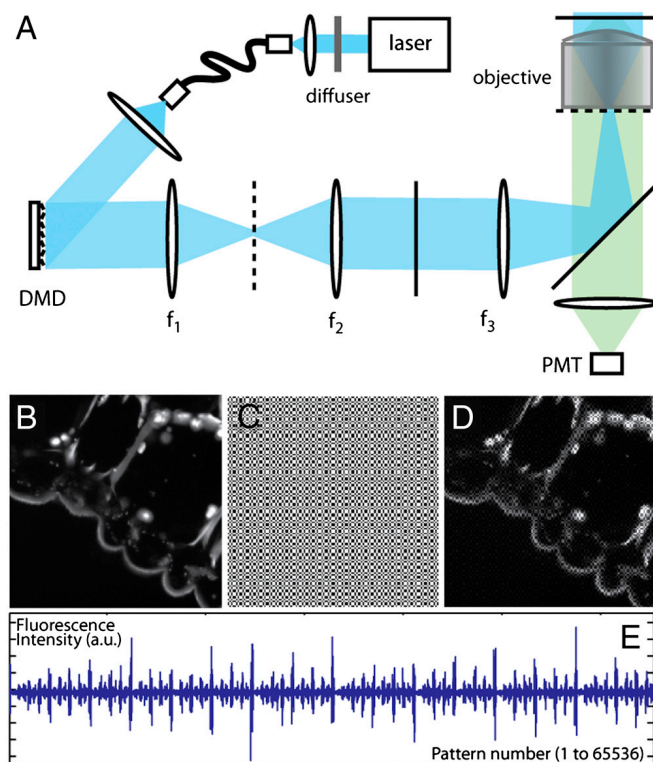


Fig. 1. (A) Experimental setup. The dotted and plain segments correspond to planes respectively conjugated to the pupil and sample planes. (B) Slice of lily anther (endogenous fluorescence with epifluorescence microscopy image recorded on a CCD camera). (C) Projection of a Hadamard pattern on a uniform fluorescent sample. (D) Projection of the same Hadamard pattern on the biological sample. (E) Fluorescence intensity during an acquisition sequence.

micromirrors are all independently configurable at frequency up to 20 kHz. The DMD is carefully positioned so that the optical axis [defined by the microscope lens and the dichroic mirror DM (Fig. 1A)] is orthogonal to the plane of the DMD.

As light source, we used a laser bench (Roper Scientific) equipped with two superimposed continuous-wave laser ($\lambda = 488$ nm, Coherent and $\lambda = 561$ nm, Cobolt). The laser beam first passed through a rotating diffuser or a phase scrambler (Dyoptika) in order to reduce the spatial coherence and was then coupled to a 200 μm multimode fiber. At the fiber output, the laser beam was expanded into a 2 cm diameter collimated beam. This beam was oriented toward the DMD at an angle of incidence corresponding to twice the tilting angle of the DMD mirrors (approx. 24°); a micromirror oriented at +12° would reflect the light into the microscope and appear as a bright pixel in the sample plane and, inversely, micromirrors oriented at -12° appear as dark pixels. Depending on the samples, we used an air (Nikon, 20X, Plan Apo VC NA 0.75) or an oil-immersion objective (Nikon, 60X Plan Apo Tif, NA 1.45). When the 20X air lens was used, the imaging lenses (lenses f_1, f_2, f_3 in Fig. 1A) were chosen to introduce a 1.5X reduction. The overall magnification of the image of the DMD on the sample was 1/30 and the size of a single micromirror equal to 456 nm. When the 60X lens was used, a different set of imaging lenses was chosen which only served as a 1x relay; here, the image size of a single micromirror in the sample plane was equal to 228 nm. Upon illumination with an intensity pattern (excitation intensity approximately 20 to 60 W/cm^2), the sample fluorescence was detected on a photomultiplier tube PMT (Hamamatsu) and sampled using an analog-digital converter board (PCI-4462, National Instruments) (Fig. 1B–D). Depending on the brightness of the sample, the pattern projection frequency was 1 or 10 kHz, while the sampling frequency of the PMT signal was 96 kHz. This oversampling of the PMT signal allowed us to remove the portion of the signal corresponding to the transition of the micromirrors between two patterns. In CS measurements, the information on the sample is thus contained in the variations of the intensity signal as a function of the illumination pattern (Fig. 1E). The WF image of the sample could also be directly formed on a camera (ImagEM) placed on the output port of the microscope. For hyperspectral imaging, the PMT was replaced by a fast and sensitive spectral detector described later in the paper. Note that the role of the DMD in our set-up differs from that in the “single-pixel camera” (9) or in some other microscopy setups (14). In the latter, the modulator is placed between the sample and the detector, meaning that it is used to select some of the light within the total signal, rather than to control the excitation pattern. Our choice is motivated by the low level of fluorescence encountered in biological samples such as living cells labeled with fluorescent proteins. Indeed, the overall efficiency of a DMD is 68% and falls down to 34% when only one half of the mirrors are tilted. In our case, the photon collection efficiency is only limited by the numerical aperture of the microscope lens and the quantum yield of the detector as in conventional epifluorescence microscopy.

Choice of the Illumination Patterns. For the practical implementation of a CS-based image acquisition system, it is essential to determine which incoherent basis should be used when no prior information on the signal is available. There are measurement ensembles, such as the partial Fourier or Hadamard systems, known to be highly incoherent with the bases in which most natural images are sparse. When excitation patterns are generated by micromirrors, $\phi_k[i]$ is a binary waveform taking on the two values 0 or 1. An appealing choice for Φ is then the Hadamard system known to be incoherent with the Dirac basis and fine scale wavelets. Since each entry of a Hadamard pattern \mathbf{h}_k is either -1 or +1, one defines ϕ_k as a shifted and rescaled version of \mathbf{h}_k via $\phi_k = (\mathbf{h}_k + 1)/2$, which can be simply encoded on the DMD.

We used patterns of size 256×256 and 128×128 obtained by binning 2×2 and 4×4 groups of micromirrors. The actual pattern \mathbf{h}_k formed in the sample plane is in fact the convolution of the ideal pattern \mathbf{h}_k with the point spread function of the microscope P_{exc} in the excitation path. Fig. 1C and D represent WF images of a Hadamard pattern projected on a uniform and on a biological sample. A specificity of optical imaging is that the sensing elements ϕ_k represent light intensities and are thus non-negative which, as discussed later, has important practical implications.

Hadamard waveforms have a sort of spatial frequency (like sinusoids) which grossly depends on the typical block size of the patterns. As the power spectrum of most biological images is generally concentrated at low frequencies, the flexibility in frequency selection is important. We introduce two distinct pattern selection strategies based on the expected spatial content of the sample:

- When the sample we wish to acquire is sparse in the pixel domain as in the case of single molecule or bead imaging, no typical frequency range needs to be favored and Hadamard patterns are selected uniformly at random.
- More complex samples have a power spectrum typically decaying like a power law. This a priori information suggests that we should balance low—and high-frequency measurements in order to accurately acquire the low-frequency part of the image, which accounts for a significant part of the total variance. The *half-half* strategy then projects the $m/2$ patterns with the lowest spatial frequencies to acquire a low-resolution image of the sample; the high-resolution content of the image is randomly sampled by choosing $m/2$ measurements among the $N - m/2$ remaining high-frequency Hadamard patterns. Such an adaptive strategy guarantees an accurate determination of the low-frequency content while allowing for the estimation of details at a finer scale.

It should be noted that Hadamard matrices are not the only possible choice. For instance, some recent work in compressed sensing theory has focused on special cases of structured matrices inspired by low-density parity check codes (32) or statistical physics (33). While preliminary results seem very promising in terms of sensing/reconstruction performance, it is not yet clear how it can be efficiently adapted to acquire biologically relevant samples.

Computational Reconstruction. In CS, it is essential to enforce the sparsity of the reconstructed signal in some representation \mathbf{W} that is chosen a priori. The choice of \mathbf{W} highly depends on the spatial structures of the signal to be reconstructed. One would typically use a Fourier representation for oscillatory features, wavelets for pointwise singularities, curvelets for contour-like or filamentary structures (17), and so on. One could also use a concatenation of all these representations. (If one intends on using the Fourier basis as a sparsity basis, one would need to scramble the columns of the Hadamard basis because it would otherwise be coherent with sinusoids.)

After recording the fluorescence intensity during a sequence of up to 65,536 consecutive patterns (Fig. 1C), one can imagine recovering the signal \mathbf{x} from these data by solving the optimization problem [3]. Because our measurements are noisy, it is actually better to relax the constraints into

$$\min_{\mathbf{x} \in \mathbb{R}^N} \|\mathbf{W}^T \mathbf{x}\|_{\ell_1} \text{ subject to } \|\mathbf{y} - \Phi \mathbf{x}\|_{\ell_2} \leq \epsilon; \quad [5]$$

we ask that the fit holds up to the noise level. In the following, \mathbf{W} will be either an orthonormal basis (e.g., Dirac basis) or an over-complete signal representation (e.g., undecimated wavelet frame or curvelet frame). The corresponding choice will be clearly spe-

cified for each individual reconstruction result. For computational reasons, we find it convenient to solve a relaxed version of this problem, namely,

$$\min_{\mathbf{x} \in \mathbb{R}^N} \|\mathbf{W}^T \mathbf{x}\|_{\ell_1} + \frac{\alpha}{2} \|\mathbf{y} - \Phi \mathbf{x}\|_{\ell_2}^2. \quad [6]$$

As is well known, there is a value $\alpha(\epsilon)$ such that the two programs coincide. For our experiments, we used the NESTA solver (31) and the regularization parameter α is chosen empirically depending on the noise level. When the signal is nearly sparse and the noise level low, it is known that this program finds a reconstruction with a low mean squared error (MSE).

Sparse Fluorescence Images: Beads, Cells and Tissues

Fluorescent Beads. We first tested our CS microscope (with the 20x objective) on a sample of fluorescent beads (diameter 2 μm , peak emission at 520 nm, Fluorospheres Invitrogen) deposited on a glass coverslip. At a low density of beads, the WF image is the superposition of a few fluorescence spots on a dark background, a signal similar to that of single molecule imaging data in biology (18). As for the sparsity basis W , we obtained nearly equivalent results using the Dirac basis or a wavelet transform. Here we show images reconstructed with the wavelet transform and using a number of random 256×256 Hadamard patterns decreasing from 16,384 down to 512. (To be complete, we used a weighted ℓ_1 norm in [6] where the weight of each coefficient is inversely proportional to scale.) In the following, the undersampling ratio is the ratio between the number N of pixels and the number M of measurements. As shown in Fig. 2, most of the bead positions are recovered with undersampling ratios up to 64, corresponding to $M \sim 1.5\%$ of N . At higher undersampling ratios, beads with low intensities are lost.

To quantify the distortion of the reconstructed image as a function of the undersampling ratio, we calculated the Peak Signal-to-Noise Ratio, $\text{PSNR} = 10 \log(d^2/\text{MSE})$ where $\text{MSE} = N^{-1} \|\hat{\mathbf{x}} - \mathbf{x}_{\text{ref}}\|_2^2$, the squared distance between the reconstructed image from all the 256×256 possible measurements and that which only uses a fraction. Above, d is the dynamical range of the

reconstruction obtained from a full sample. As shown in Fig. 2A, the PSNR decreases with the undersampling ratio (blue curve) and seems to reach a plateau at ratios above 64 where most of the beads are lost. Because our CS microscope is based on an active patterned illumination and the fluorescent signal emitted by the sample varies linearly (at least for moderate illumination powers) with the excitation intensity, we can adjust the SNR of our CS measurements in a very straightforward manner by controlling the excitation laser power. This situation is different from other CS-based imaging techniques such as the single pixel camera. In particular, the ability to vary the excitation intensity allows us to test the effect of the SNR of the measurements on the image reconstruction. We thus acquired a second set of measurements with an excitation light intensity divided by 100 to assess the effect of illumination on compression efficiency.

The red curve in Fig. 2A represents the PSNR of the reconstructed images as a function of the undersampling ratio. As expected, the PSNR is lower than that for the nominal illumination and reaches a plateau at an undersampling ratio of about 10, where almost all the beads are lost, clearly showing that the distortion of the reconstructed image is strongly affected by the amount of detected fluorescent photons. Indeed at such low intensities, photon noise (also termed, shot noise) may be significant.

To further explore the impact of photon noise on the compression efficiency, we performed numerical simulations on an artificial image of fluorescent beads made of 50 Gaussian spots (FWHM 3 pixels) randomly positioned in the field of view of size 256×256 pixels. The simulated nominal illumination intensity I_0 was set so that the resulting flux (i.e., the sum of the signals over all the pixels) was equal to $f_0 = 6.4e3$. Each measurement y_k was then computed as one realization of a Poisson process with mean $\langle \phi_{\mathbf{k}}, \mathbf{x} \rangle$.

Reconstructions are processed with intensities $I_0, I_0/10$ and $I_0/100$ for a range of undersampling ratios between 2 and 64. As shown by the PSNR curves (Fig. 2B), these simulations qualitatively reproduce the loss of compression efficiency for low-light levels but fail to quantitatively estimate the PSNR of the reconstructed images. This result suggests that photon noise is not the only source of image degradation in our imaging system.

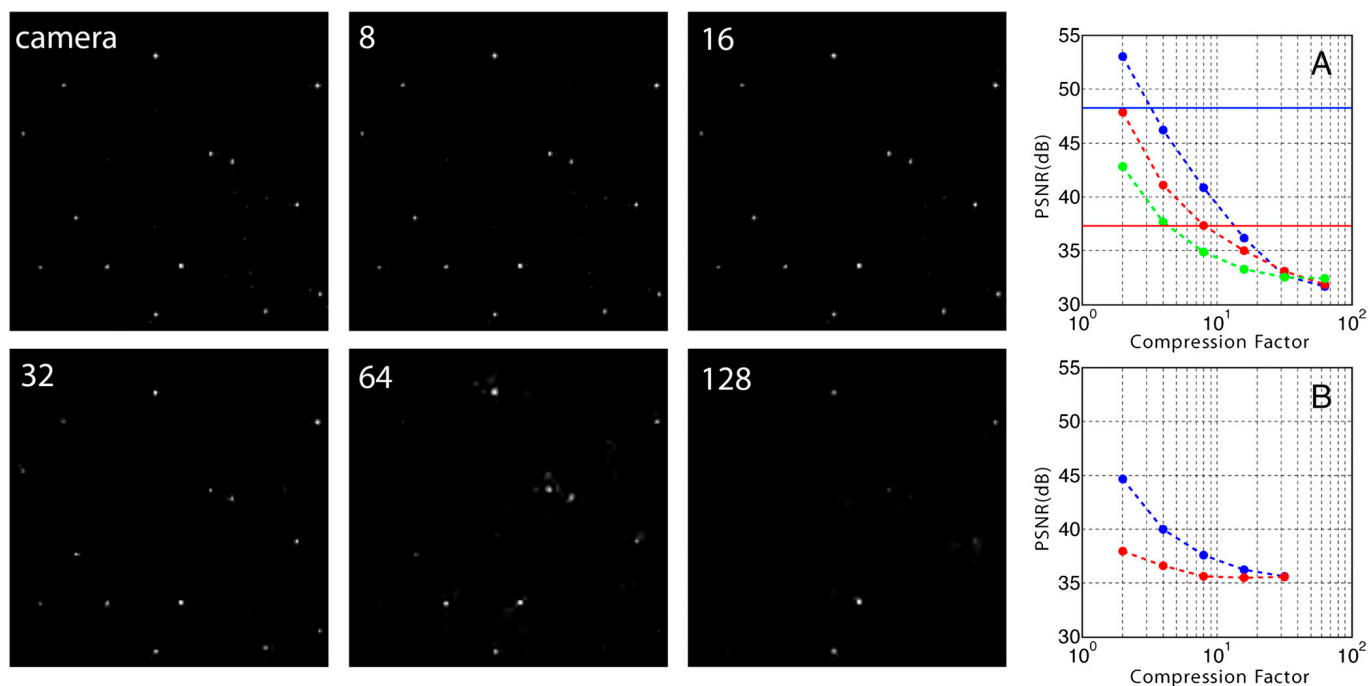


Fig. 2. Top left to bottom right: camera snapshot and reconstructed 256-by-256 bead images for values of the undersampling ratio equal to 8, 16, 32, 64, and 128. (A) Plot of the PSNR (see text) for a nominal illumination level (blue curve) and for the same level reduced by a factor 10 (red curve) and a factor of 100 (green curve) (simulated data). The solid lines correspond to the PSNR in raster scan for the same surfacic illumination. (B) Same as (A) for the experimental data.

A possible additional cause is the discrepancies between the theoretical patterns and the effective illumination profiles in the sample plane.

Lily Anther Slice. In order to investigate the potential of CFM for biological samples, we imaged slices of endogenously fluorescent lily anther (Carolina Biological Supply). A conventional epifluorescence image of a slice (Excitation 488 nm/Emission 520 nm) recorded on a CCD camera can be seen in Fig. 3 (upper left). The resolution of this image has been sampled down to 128×128 pixels. We recorded the same image with the CFM setup by illuminating the sample with $16,384 = 128^2$ different Hadamard patterns (complete basis). For this experiment, we used a 20x lens with a 0.75 NA. Further, we used curvelets as sparsity basis \mathbf{W} because they are known to sparsely encode contour-like structures together with the half-half strategy described earlier to account for both low-spatial frequencies shapes and higher frequencies details of the sample structure. (We again used a weighted ℓ_1 norm with weights inversely proportional to scale.) Reconstructed images with varying undersampling ratios from 1 to 8 are displayed in Fig. 3 (top). Here, the method reconstructs images satisfyingly up to an undersampling ratio of about 8. Compared to fluorescent beads, this lower figure can be primarily attributed to the lesser sparsity.

Another important issue is that this sample is not fully two-dimensional. Due to the thickness of the slice (about $50 \mu\text{m}$ in this case, compared to the focal depth approximately $1 \mu\text{m}$), the contrast of Hadamard patterns diminishes away from the focal plane. As a result, there is a nonmodulated background signal and, as further discussed below, the photon noise associated to this signal affects the image reconstruction by “hiding” the useful information contained in the intensity fluctuations due to the variations in the illumination patterns (Fig. 1E).

Zyxin-mEOS2 COS7 Cells. In many biological applications, it is essential to use high magnification and high NA optics and we thus aimed at testing CFM in these imaging conditions (oil-immersion objective 60x, NA 1.45). To overcome the limitations due to the short focal depth of a high NA objective, we used photoactivation techniques. COS7 cells were transfected with Zyxin-mEOS2 (20). Zyxin is a protein mainly expressed in the cellular focal adhesions, at the surface on which the cells are plated. The protein was fused to mEOS2, a genetically-encoded photoconvertible

fluorescent protein tag (19) widely used in superresolution microscopy, that has green fluorescence in its native state (Excitation 506 nm/Emission 519 nm) and can be converted to a red-emitting state (Excitation 573 nm/Emission 584 nm) upon illumination with violet light. The COS7 cells were plated at density of 100,000 cell/mL on 18 mm coverslips on a 12 well plate. The cells were transfected with Eos-Zyxin using chemical transfection (Fugene) 4–5 h after plating and experiments were performed on live cells 18–30 h after the transfection. By using an evanescent wave excitation with a laser at 405 nm, we could convert proteins situated at the vicinity (approximately 100 nm) of the glass coverslip. Therefore, in our sample, the green emitting fluorophores are located within the 3D cellular volume while red-emitting proteins constitute a 2D sample. The superimposed epifluorescence images in the green and red channels (256×256 pixels) are shown in Fig. 3 (bottom, left). The same 2D ensemble of photoconverted proteins was subsequently imaged with the CFM setup with 32,768 different 256×256 pixels Hadamard patterns (half of the full basis). For this set of data, the pixel size in the sample plane of each Hadamard pattern is 430 nm, about twice the diffraction limit. As for the bead images, we used a wavelet transform as sparsity basis \mathbf{W} .

The reconstructed images for undersampling ratios varying between 2 and 15 are displayed in the second row of Fig. 3. For direct comparison with the conventional epifluorescence WF image, a dual color image obtained by superposition of the red converted Zyxin-mEOS2 image and the green native Zyxin-mEOS2 image is shown in Fig. 3. It is noteworthy that even if the fluorescence emission of transfected COS7 cells is low compared to the lily anther slice (by about a factor of 10), the quality of the reconstructed CS images is good for undersampling ratios up to 8 and starts to be degraded at a ratio of about 15. The very low background of our 2D sample clearly enables a better reconstruction. Because fluorescent proteins are very sensitive to photobleaching, one has to use low illumination to minimize this effect during acquisition. Thus, photon noise effects, which manifested themselves only at reduced illumination intensities in the bead images, appear to be a limiting factor for CS imaging of less fluorescent and/or photo-damageable samples. The impact of photon noise on CFM is discussed in more details in a later section.

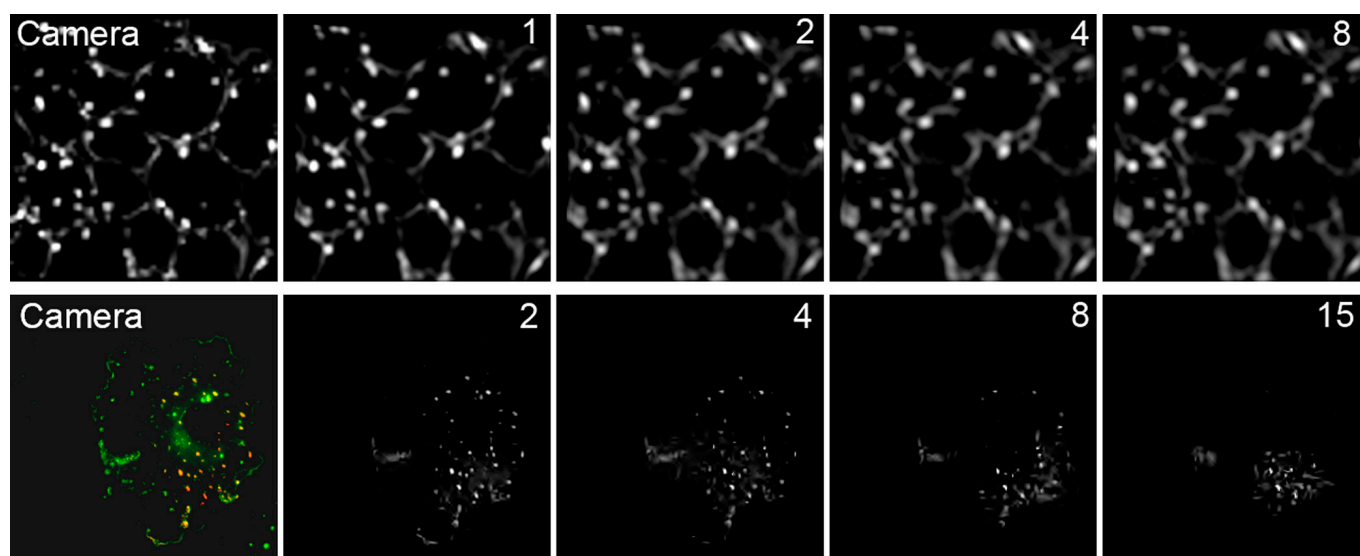


Fig. 3. Upper line: CS imaging of a slice of a lily anther. Left: Original image (128×128 pixels) by conventional epifluorescence microscopy. Left to right: the same sample imaged by CFM with undersampling ratios between 1 and 8. Lower line: CS imaging of COS7 cells expressing Zyxin-mEOS2. Left: superposition of the conventional epifluorescence images of the native (green) and converted form (red) of the markers. Left to right: CFM images of the converted form of the markers at undersampling ratios equal to 2, 4, 8, and 15.

Hyperspectral Imaging in CFM

Hyperspectral imaging is defined as the combined acquisition of spatial and spectral information. In biological imaging, a growing range of applications such as the study of protein localization and interactions require quantitative approaches that analyze several distinct fluorescent molecules at the same time in the same sample (22). These applications are in fact becoming ever more common with the availability of an increasing panel of fluorescent dyes and proteins with emission ranging from the UV to the far red (23).

Multicolor data are usually acquired by selecting a few distinct spectral bands. However, in many cases, the incomplete separation of the different color channels due to the presence of autofluorescence, along with cross-excitation and emission “bleed-through” of one color channel into the others render the interpretation of multiband images difficult and/or ambiguous. To overcome these limitations, it would often be preferable to record the full spectral information at each pixel of the image.

In this context, two elements make the potential benefits of CS particularly appealing for hyperspectral measurements. First, a full data acquisition can take up a very long time because the number of voxels N quickly gets very large. Second, the signal becomes comparably sparser as the dimension increases. To demonstrate the possibility of CFM for hyperspectral fluorescent imaging, we modified the setup and replaced the point detector by a spectrometer coupled to an EMCCD camera (Evolve 512, Photometrics USA). The entire spectrum between 520 nm and 640 nm is recorded on 128×1 pixels. We spin-coated on a glass coverslip a mixture of three types of fluorescent beads (TransFluo Beads, Invitrogen) with different emission spectra in our detection band (see Fig. 4*A* for a gray WF image of the sample). A complete set of 256×256 Hadamard patterns was subsequently projected on the sample and, for each projected pattern, we recorded the fluorescence spectrum.

The computational reconstruction of hyperspectral data can be performed in two different manners. The simplest one is a direct extension of the monochromatic case and consists in reconstructing each spectral band independently from the others. This approach, however, does not fully account for the particular structure of the hyperspectral data. Rather, it is worthwhile to exploit sparsity in both the spatial and spectral domains. Hence, we propose a computational reconstruction by solving the same problem as in [6] with the following modification: \mathbf{x} is now the full $2D-\lambda$ data cube and Φ and \mathbf{W} are waveforms $\phi_k[i, \lambda]$ of both space and wavelength. In these experiments, \mathbf{W} was obtained by tensorizing the Dirac basis in space—well adapted to pointwise structures like beads—with a wavelet basis along the spectral dimension which is well suited for smooth variations and occasional transients. A slice of the $2D-\lambda$ sensing matrix at a fixed λ is the same $2D$ partial Hadamard transform.

We obtained full color images by pooling the data cube—see Fig. 4—into three spectral bands: blue (500–530 nm), green (530–560 nm) and red (560–630 nm). Such multicolor images are shown for varying values of the undersampling ratio in Fig. 4. We observe that almost no degradation is seen for undersampling factors up to 16. Furthermore, hyperspectral reconstructions provide the spectrum of each individual bead from the reconstructed $2D-\lambda$ cube (the normalized spectra of three different beads are shown in Fig. 4*F*). The spectra are correctly reconstructed for undersampling factors up to 64. Interestingly, when reducing the number of measurements, the distortion primarily affects the low intensity parts of the spectra, similar to the effect of increasing undersampling on the dimmer beads in monochromatic images.

Discussion and Perspectives

We have developed an imaging approach based on the concepts of CS theory which, on samples relevant for biological imaging, allows the reconstruction of fluorescence images with undersam-

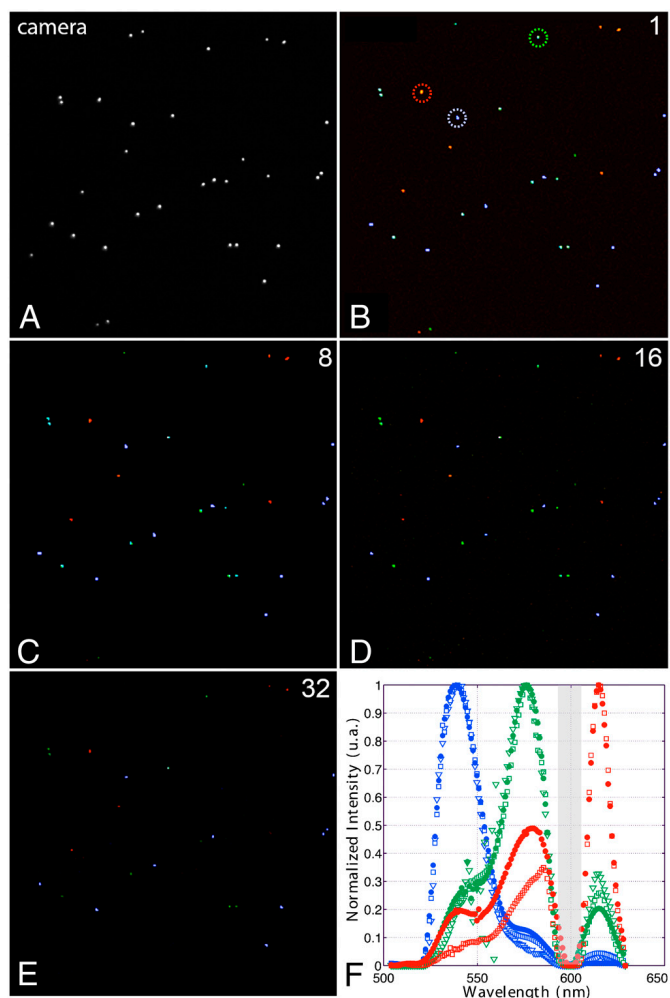


Fig. 4. (A–E) Camera snapshot and reconstructed 256-by-256 bead images for undersampling ratios equal to 1, 8, 16, and 32. (F) Normalized spectra (128 spectral lines) of three individual different beads circled in (B) for undersampling ratios equal to 1 (plain circles), 32 (squares), and 64 (triangles). The gray area in the spectrum represents a rejection band of the dichroic mirror used in our setup.

pling ratios up to 64. While our results constitute a significant gain over undersampling ratios achieved in prior CS-based imaging approaches, several factors (computational, instrumental, or noise-related) still contribute to limit the current performances of CFM. Below, we discuss these factors as well as the prospects for future developments and applications.

Point Spread Function and Its Modeling. In the current implementation of CFM, we neglected the role of the point spread function (PSF) of the excitation pathway (corresponding to the lenses f_1, f_2 and f_3 and the objective) and used the idealized matrix with zeros and ones (depending whether a pixel is illuminated or not) for the inversion. In reality, the PSF acts as a low pass filter, meaning that those patterns illuminating the sample are spatially smoother than their theoretical counterparts. In the framework of CS, it is well known that recovering a compressed signal from a sensing matrix that departs from the real one may, in general, dramatically degrade the reconstruction quality. In our case, however, this approximation only has minor consequences for essentially two reasons. In our experiments, the individual pixel size of the Hadamard patterns was at least twice as large as the diffraction-limit of the microscope. In other words, the PSF only has a minor filtering impact on the patterns. Second, neglecting the effect of the PSF in the reconstruction does not dramatically reduce the quality of reconstruction. To further emphasize this fact,

let \mathbf{f} be the PSF of the lens so that the collected fluorescence is of the form $y_k = \langle \phi_k * \mathbf{f}, \mathbf{x} \rangle$ (we measure the dot product between the object of interest and the theoretical patterns convolved with the PSF). If the PSF is symmetric around the origin, we have

$$\mathbf{y} = \Phi \mathbf{F} \mathbf{x}$$

in which \mathbf{F} is the linear convolution with the PSF. Hence, neglecting the PSF recovers a signal $\tilde{\mathbf{x}}$ obeying $\mathbf{y} = \Phi \tilde{\mathbf{x}}$; in other words, one gets $\tilde{\mathbf{x}} = \mathbf{F} \mathbf{x}$ which is \mathbf{x} at the resolution of the microscope. Indeed, assuming that the lenses the excitation and emission PSFs are identical, the CSM has the same resolution as its wide-field equivalent. Now if one wishes to account for the PSF, one would need to solve a joint decompression–deconvolution problem. If the deconvolution should provide a higher resolution image, it is well known that it is usually at the cost of noise amplification. Here again, the sparsity prior used for decompression should of course help regularizing this deconvolution step.

Noise and MSE. It is crucial to examine noise figures in our setup. There are two important facts affecting the quality of reconstruction: the noise distribution associated with CS-type data and the undersampling ratio.

We assume below that photonic noise is the limiting source of noise, an assumption which sets CS-based optical systems apart from the common theoretical CS framework (9, 24, 25). To understand the important trade-offs, we compare the respective situations of RS and CS, two point detection imaging techniques. Below, we put I_{RS} and I_{CS} for the excitation intensity per unit area and per unit time during RS and CS acquisition. Likewise, T_{RS} and T_{CS} are durations of excitation (for a single measurement). Finally, we set $\lambda_{RS} = I_{RS} \times T_{RS}$ and similarly for λ_{CS} . In practice, all these parameter values are adjusted according to factors that one wants to optimize (acquisition speed, sensitivity, photobleaching, and so on) and they must be evaluated on a case by case basis. Hence, rather than an exhaustive comparison of the relative merits of RS and CS acquisition, the discussion below aims at providing a general framework to understand the nature of the noise in CS measurements.

In the case of RS, the i th pixel measurement is distributed as a Poisson random variable with mean and variance $\lambda_{RS} \times x[i]$. Using the scaled observed data yields a per-pixel MSE equal to

$$\text{MSE(RS)} = N^{-1} \sum_i \mathbb{E}(\hat{x}[i] - x[i])^2 = \lambda_{RS}^{-1} \times \bar{x},$$

where $\bar{x} = N^{-1} \sum_i x[i]$. For CS, suppose first that we collect all Hadamard measurements (no undersampling). Each measurement is an independent Poisson variable with mean $\lambda_{CS} \times \langle \phi_k, \mathbf{x} \rangle$. With patterns of the form $\frac{1}{2}(1 + \mathbf{h}_k)$ where \mathbf{h}_k is a Hadamard sequence, one can decompose the mean value of y_k , as

$$\lambda_{CS} \times \langle \phi_k, \mathbf{x} \rangle = \frac{\lambda_{CS}}{2} [N\bar{x} + \langle \mathbf{h}_k, \mathbf{x} \rangle].$$

Hence, this is the sum of a DC offset and a Fourier-like component. The presence of the DC offset (which prevents the optical patterns from being negative) impacts the data SNR. Indeed, a possible source of concern is that for many high-frequency components, $N\bar{x}$ may be much greater than the magnitude of $\langle \mathbf{h}_k, \mathbf{x} \rangle$ —the DC component dominates the high-frequency coefficients. Therefore, when measuring a high-frequency component, we need to deal with a large amount of noise coming from the average fluorescence of the sample under study. This situation is arguably very different than in other applications—for instance, the acquisition of radio-frequency signals—where one can use sensing waveforms that take on negative values by switching

the phase of the object we wish to acquire (21). Inverting the Hadamard matrix gives a noisy image $\hat{x}[i]$ obeying

$$\mathbb{E}\hat{x}[i] = x[i] \quad \text{and} \quad \text{Var}(\hat{x}[i]) = \frac{2}{\lambda_{CS}} \bar{x}$$

(see *Appendix* for details). In contrast to RS microscopy, we see that CFM yields a spatially invariant noise level in the pixel domain. In other words, by measuring the image projection on an incoherent basis, the noise gets spread equally over all the pixels. Hence, before applying any processing, the CS situation is more favorable for recovering brighter areas but less so for dimmer regions. Summing up gives

$$\text{MSE(CS)} = 2\lambda_{CS}^{-1} \times \bar{x}.$$

This analysis also shows that it is essential to minimize the sources of signal which could contribute to a constant background and increase \bar{x} . This offset could be due to the nature of the sample itself but can also originate from stray light or out-of-focus fluorescence. These considerations explain, at least qualitatively, why the *beads* sample, where the background \bar{x} is low compared to the bright spots and is purely bidimensional, is favorable for CFM.

To consider the effect of statistical estimation procedures or data processing, consider the *beads* sample again in which sparsely distributed beads are located in the field of view. Each bead is an isolated bright spot surrounded by wide nonfluorescent areas. Suppose then that we were to apply a thresholding estimator, setting to zero all intensities below a certain level, and keeping those above threshold. Then one would obtain a very low MSE in the CS setting because dark pixels would be correctly set to zero while bright pixels would have a variance that is orders of magnitude lower than that achievable in the RS case. In short, thresholding would effectively filter out the off-support noise and the situation would be extremely favorable to the CS approach. Quantitatively, if there are K bright pixels, the error after estimation for RS and CS would behave like

$$\text{MSE(RS)} = \lambda_{RS}^{-1} \times \bar{x}, \quad \text{MSE(CS)} = 2\lambda_{CS}^{-1} \times \frac{K}{N} \times \bar{x}. \quad [7]$$

Note the potentially enormous reduction in MSE by the factor K/N . Conversely, RS would be more effective for smooth and bright images (sparse images in the frequency domain).

The comparisons between RS and CS microscopy above are valid as long as the same illumination intensity per pixel is assumed and the number of measurements M is equal to the number of pixels. We now discuss the effect of undersampling. Now the CS recovery is both an inversion and a denoising algorithm and the recovery error depends on the compressibility of the signal (on how sparse it is). For instance, in the fully sampled case where sparsity is assumed in the spatial domain, the CS recovery would essentially invert the Hadamard matrix and then apply soft-thresholding to the output. Now suppose for simplicity that the signal is K -sparse and that the number M of measurements is sufficient for perfect recovery from noiseless data. Then the squared recovery error from M noisy measurements as above would roughly scale like

$$\text{MSE(CS)} = C_0 \times \lambda_{CS}^{-1} \times \frac{K}{M} \times \bar{x}, \quad [8]$$

where C_0 is a small numerical constant (typically on the order of unity). Hence, the main difference with the MSE available from a full sample is a loss of a factor N/M —the undersampling ratio—in the MSE, compare [7]. In other words, halving the number of samples—everything else, namely, intensity and duration of excitation remaining the same—doubles the MSE. The same

conclusion applies for approximately sparse signals for which the variance component of the MSE dominates the squared bias. Here again, the more compressible the signal (the smaller K), the better the performance (e.g., the *beads* sample is favorable to CFM). We would like to also note that K/M is still much smaller than one so that even though we are sampling less, we may still end up with a much better MSE than in RS.

To summarize, CFM is effective when: (i) the most informative parts of the sample are brighter than its mean value and (ii) the sample is highly compressible. Notice that while these two requirements are sample dependent, the second gives some flexibility because one can select a representation in which a class of signals has an optimally sparse representation.

Impact of the Sample Thickness. One important issue in CFM has to do with the patterned illumination of thick fluorescent samples. Indeed, with a wide-field linear excitation, the illumination propagates throughout the sample and causes the entire volume to fluoresce. Because the optical transfer function of a circular aperture (such as a microscope lens) has a bandwidth that decreases with defocusing (1), the contrast of the pattern diminishes away from the focal plane. As a result, the fluorescence coming from out-of-focus planes is not modulated as a function of the patterns. In fact, this property serves as basis for optical sectioning in structured illumination microscopy (26). In the case of CFM, the off-focus signal contributes to an offset signal on the detector, which, as explained above, tends to significantly degrade the quality of the reconstruction. A few strategies can be considered to add sectioning capabilities to CS based imaging systems (14, 27, 28). One recently demonstrated approach is based on the rejection of the off-focus signal, in a way similar to that of a programmable array microscope (14). Another method is to avoid generating any off-focus signal at all. We demonstrated this method for photoactivation using an evanescent-wave (Fig. 3) and this can be extended to 2D activation within the sample volume with two-photon temporal focusing activation (29) or light sheet illumination (30). In the long term, an even better strategy is to illuminate with an incoherent basis of 3D patterns and, subsequently, to directly reconstruct the sample in 3D.

Conclusions and Prospect

This paper presented the principles and implementation of compressive sensing in fluorescence microscopy together with its applications in biomedical imaging. Our approach, which is based on a patterned excitation of the sample combined with a point-detection of the emitted fluorescence, readily allows for substantial undersampling gains when compared to traditional raster-scanning approaches. Given the rapidly diminishing price of DMDs, CFM also constitutes a low-cost alternative to conventional wide-field imaging techniques based on onerous cameras. CS microscopy could also be useful in situations, such as a diffusing media, where direct imaging on a multipixel detector is not possible. Furthermore, we have set forth a distinctive prospect for hyperspectral acquisition, which has great potential for multi-color single molecule imaging. Interestingly, other multidimensional imaging modalities could be implemented in CFM. This is in particular the case of Fluorescence Lifetime Imaging, which holds great potential in biomedical imaging. Current wide-field approaches suffer from a limited sensitivity and rely on expensive custom-made equipment (34). A CFM-based approach combining a wide-field illumination, a single-point detector in the time domain and a dedicated reconstruction algorithm could provide a powerful alternative.

More generally, the acquisition of 3D, 4D (three spatial dimensions and one spectral or temporal dimension) or even higher-dimensional signals puts unrealistic constraints on system resources. It is indeed hard to imagine that one would want to sample such huge data cubes at rates anywhere close to the Shan-

non rate. The key is that multidimensional signals become increasingly redundant in the sense that their information content grows at a much lower rate than the number of voxels. For example, movies are comparably far more compressible than still pictures. Likewise, hyperspectral movies are far more redundant than monochromatic movies, and so on. Expressed differently, the ratio between the number of degrees of freedom and the number of voxels decreases very rapidly as the dimension increases. The extreme sparsity of higher-dimensional signals cannot be ignored and we expect the advantages of CFM to become paramount in such applications.

Appendix

This short appendix justifies our SNR calculations, and we begin by introducing some notation. We denote by \mathbf{H} the Hadamard matrix and by $\mathbf{1}$ the vector with all entries equal to one. Hence, acquiring all Hadamard patterns gives us independent Poisson variables with means

$$\mathbf{d} = \mathbf{S}\mathbf{x} := \frac{1}{2}(\mathbf{1}\mathbf{1}^T + \mathbf{H})\mathbf{x}.$$

Here, we set $\lambda_{CS} = 1$ as the general case can be obtained via a simple rescaling. Hence, our estimate is of the form

$$\hat{\mathbf{x}} = \mathbf{S}^{-1}\mathbf{y},$$

and it is easy to verify that

$$\mathbf{S}^{-1} = \frac{2}{N} \left(\mathbf{H}^T - \frac{N}{2} \mathbf{e}_1 \mathbf{e}_1^T \right)$$

in which $\mathbf{e}_1 = (1, 0, \dots, 0)$. (Observe that the first entry is a bit special here—a pixel at this location is always illuminated—and that we could always shift the Hadamard matrix as to select any *special* pixel.) Because $\mathbb{E}\mathbf{y} = \mathbf{d} = \mathbf{S}\mathbf{x}$, we have $\mathbb{E}\hat{\mathbf{x}} = \mathbf{x}$. Further,

$$\text{Cov}(\hat{\mathbf{x}}) = \mathbf{S}^{-1} \text{Cov}(\mathbf{y}) \mathbf{S}^{-T},$$

where $\text{Cov}(\hat{\mathbf{x}})$ is the covariance matrix of the random vector $\hat{\mathbf{x}}$. Because $\text{Cov}(\mathbf{y})$ is the diagonal matrix with entries $\mathbf{d} = (d_1, d_2, \dots, d_N)$, we have

$$\text{Var}(\hat{x}[i]) = \sum_{j=1}^N |S^{-1}[i, j]|^2 d_j.$$

To proceed, one verifies that

$$\frac{N}{2} |S^{-1}[i, j]| = \begin{cases} \frac{N}{2} - 1, & (i, j) = (1, 1), \\ 1, & (i, j) \neq (1, 1), \end{cases}$$

and that $\sum_{j=1}^N d_j = \frac{1}{2}(N^2\bar{x} + Nx[1])$ together with $d_1 = N\bar{x}$. Plugging in gives

$$\text{Var}(\hat{x}[i]) = \begin{cases} (N-2)\bar{x} + \frac{2}{N}x[1], & i = 1, \\ 2\bar{x} + \frac{2}{N}x[1], & i \neq 1 \end{cases}$$

(again this highlights the role played by the special pixel). Now suppose that the special pixel is chosen so that there is no probe at this location (which can always be arranged). Then we would know that $x[1] = 0$ (and would not bother estimating the density at that location) and for $i \neq 1$, we would have

$$\text{Var}(\hat{x}[i]) = 2\bar{x}$$

as claimed.

ACKNOWLEDGMENTS. Deepak Nair is gratefully acknowledged for providing the Zyxin-mEOS2 transfected COS7 cells and for his careful reading of the manuscript. We thank an anonymous reviewer for pointing out the potential benefits of CFM-based methods for lifetime imaging. This work was supported by a grant from the European Aeronautic Defence and Space

Foundation. M.C. is supported by the EADS foundation and the conseil régional Aquitaine. E.C. is partially supported by National Science Foundation via grant CCF-0963835 and the 2006 Waterman Award, by Air Force Office of Scientific Research under Grant FA9550-09-1-0643 and by Office of Naval Research under Grant N00014-09-1-0258.

- Mertz J (2010) *Introduction to Optical Microscopy* (Roberts and Company Publishers, Greenwood Village, CO).
- Brady DJ (2010) *Optical Imaging and Spectroscopy* (Wiley, Hoboken, NJ).
- Donoho DL (2006) Compressed sensing. *IEEE T Inform Theory* 52:1289–1306.
- Candes E, Romberg J, Tao T (2006) Robust uncertainty principles: exact signal reconstruction from highly incomplete frequency information. *IEEE T Inform Theory* 52:489–509.
- Lustig M, Donoho D, Pauly P (2007) Sparse MRI: the application of compressed sensing for rapid MR imaging. *Magn Reson Med* 58:1182–1195.
- Trzasko J, Manduca A, Borisch B (2009) Highly undersampled magnetic resonance image reconstruction via homotopic ℓ_0 minimization. *IEEE T Med Imaging* 28:106–121.
- Mishali M, Eldar YC, Dounaevsky O, Shoshan E (2011) Xampling: analog to digital at sub-Nyquist rates. *IET Cir Device Syst* 5:8–20.
- Bobin J, Starck JL, Ottensamer R (2008) Compressed sensing in astronomy. *IEEE J Sel Top Signa* 2:718–726.
- Duarte MF, et al. (2008) Single-pixel imaging via compressive sampling. *IEEE Signal Proc Mag* 25:83–91.
- Pitsianis NP, et al. (2006) Compressive imaging sensors. *Proc SPIE* 6232.
- Gazit S, Szameit A, Eldar YC, Segev M (2009) Super-resolution and reconstruction of sparse sub-wavelength images. *Opt Express* 17:23920–23946.
- Brady DJ, Choi K, Marks DL, Horisaki R, Lim S (2009) Compressive holography. *Opt Express* 17:13040–13049.
- Katz O, Bromberg Y, Silberberg Y (2009) Compressive ghost imaging. *Appl Phys Lett* 95:131110.
- Wu Y, Ye P, Mirza IO, Arce GR, Prather DW (2010) Experimental demonstration of an optical-sectioning compressive sensing microscope (CSM). *Opt Express* 18:24565–24578.
- Candes E, Romberg J (2007) Sparsity and incoherence compressive sampling. *Inverse Probl* 23:969–985.
- Candes E, Plan Y (2011) A Probabilistic and RIPless theory of compressed sensing. *IEEE T Inform Theory* 57:7235–7254.
- Candes E, Donoho D (2004) New tight frames of curvelets and optimal representations of objects with piecewise C^2 singularities. *Commun Pur Appl Math* 57:219–266.
- Lord SJ, Lee HL, Moerner WE (2010) Single-molecule spectroscopy and imaging of biomolecules in living cells. *Anal Chem* 82:2192–2203.
- Wiedenmann J, et al. (2004) EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15905–15910.
- Shroff H, et al. (2007) Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:20308–20313.
- Yoo J, et al. (2012) Design and implementation of a fully integrated compressed-sensing signal acquisition system. *Proc IEEE Int Conf Acoust Speech Signal Process*, in press.
- Zimmermann T, Rietdorf J, Pepperkok R (2003) Spectral imaging and its applications in live cell microscopy. *FEBS Lett* 546:87–92.
- Giepmans BN, Adams SR, Ellisman MH, Tsien RY (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312:217–224.
- Willett R, Raginsky M (2011) Poisson compressed sensing. *Defense Applications of Signal Processing*, Available at <http://www.ee.duke.edu/~willett/papers/PCS.pdf>.
- Willett R, Marcia R, Nichols J (2011) Compressed sensing for practical optical systems: A tutorial. *Opt Eng* 50:072601.
- Mertz J (2011) Optical sectioning microscopy with planar or structured illumination. *Nat Methods* 8:811–819.
- Ye P, et al. (2009) Compressive confocal microscopy: 3D reconstruction algorithms. *Proc SPIE* 7210:72100G.
- Ye P, et al. (2009) Compressive confocal microscopy. *Proc IEEE Int Conf Acoust Speech Signal Process* pp 429–432.
- Vaziri A, Tang J, Shroff H, Shank CV (2008) Multilayer three-dimensional super resolution imaging of thick biological samples. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20221–20226.
- Huisken J, Swoger J, Del Bene F, Wittbrodt J, Stelzer EH (2004) Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science* 305:1007–1009.
- Becker S, Bobin J, Candes E (2011) NESTA: a fast and accurate first-order method for sparse recovery. *SIAM J Imaging Sci* 4:1–39.
- Baron D, Sarvotham S, Baraniuk RG (2010) Bayesian compressive sensing via belief propagation. *IEEE Trans Signal Process* 58:269–280.
- Krzakala F, Mezard M, Sausset F, Sun Y, Zdeborová L (2011) Statistical physics-based reconstruction in compressed sensing. [arXiv:1109.4424](https://arxiv.org/abs/1109.4424).
- Vitali M, et al. (2011) Wide-field multi-parameter FLIM: long-term minimal invasive observation of proteins in living cells. *PLoS One* 6(2):e15820.

5 Compléments

Ce chapitre a pour but de compléter les résultats du chapitre précédent, et plus particulièrement de développer l'aspect expérimental pour lequel j'ai contribué.

Sommaire

5.1 Montage du microscope CS	71
5.2 Contrôle de l'illumination	72
5.2.1 DMD	73
5.2.2 Système anti-speckle	76
5.3 Alignement du système	78
5.4 Acquisitions	80
5.4.1 Principe	80
5.4.2 Mesures	80
5.5 L'algorithme de reconstruction NESTA	85

5.1 Montage du microscope CS

Notre implémentation du CS à la microscopie de fluorescence s'appuie en partie sur les travaux de la *Single Pixel Camera* [52, 133, 141] développée au sein du groupe DSP de l'université Rice à Houston au Texas. Cette nouvelle approche associe, l'utilisation d'une matrice de micro-miroirs, appelée DMD (Digital Micromirror Device), à la théorie du CS. Nous avons dû opérer plusieurs modifications afin de correctement adapter le schéma d'acquisition à la microscopie de fluorescence.

Dans sa configuration d'origine, notre montage expérimental intègre un microscope inversé épi-fluorescent Nikon Ti-E couplé à une source lumineuse laser. Le faisceau laser en sortie de fibre traverse ensuite un diffuseur rotatif pour s'affranchir du speckle aussi appelé granularité laser ou tavelure. Il est ensuite élargi et orienté sur le DMD qui permet de renvoyer un motif d'illumination structurée qui traverse un système de lentilles $4f$ pour finalement illuminer l'échantillon. La fluorescence de

l'échantillon est enregistrée par un tube photo-multiplicateur couplé à un système de conversion analogique-numérique (ou une caméra dans le schéma d'acquisition hyper-spectrale).

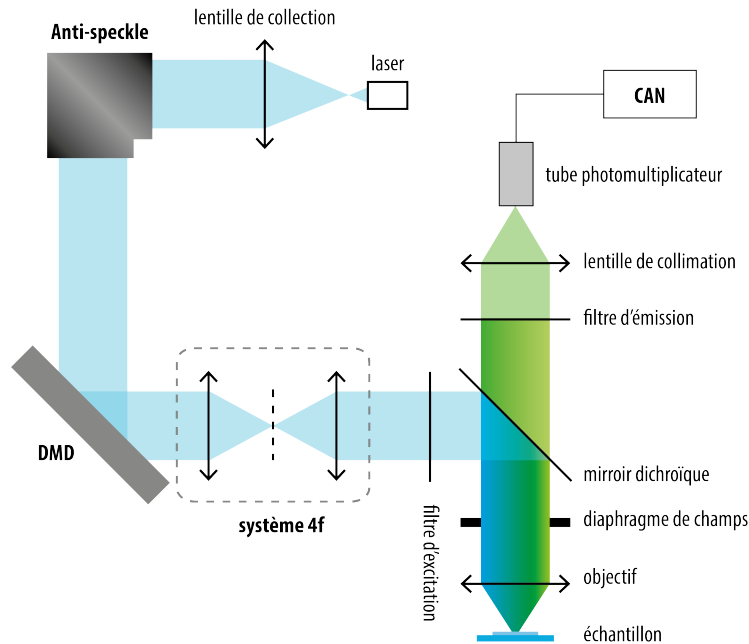


FIGURE 5.1 – Montage expérimental hybride. Dans cette configuration, nous employons un système d'illumination à champs large couplé à un système de détection à point unique.

L'application du CS dans notre montage est essentiellement basée sur l'utilisation d'un DMD qui permet de reproduire expérimentalement le produit scalaire du signal parcimonieux par les vecteurs qui forment la base d'incohérence à la base de parcimonie. Par ailleurs, l'utilisation de sources laser permet en théorie d'obtenir des puissances d'illumination importantes à des longueurs d'onde spécifiques pour un meilleur contraste. Toutefois un inconvénient majeur de l'illumination laser est le phénomène de speckle qui tend à dégrader le motif d'illumination issu du DMD.

5.2 Contrôle de l'illumination

Le contrôle du schéma d'illumination que nous avons envisagé est constitué de cinq éléments distincts : la source lumineuse laser, un diffuseur, un élargisseur de faisceau, le DMD et un système $4f$ de lentilles pour ajuster la taille du motif d'illumination sur l'échantillon en fonction du grossissement de l'objectif utilisé.

5.2.1 DMD

Le DMD est l'élément clé du montage expérimentale. Cette technologie inventée en 1987 par Texas Instrument (TI) a ensuite été brevetée par Larry Hornbeck en 1996 pour son utilisation dans des systèmes de vidéo-projection [80], c'est la technologie DLP™. Il s'agit d'une matrice de micro-miroirs permettant de créer des motifs d'illumination et la projection numérique.

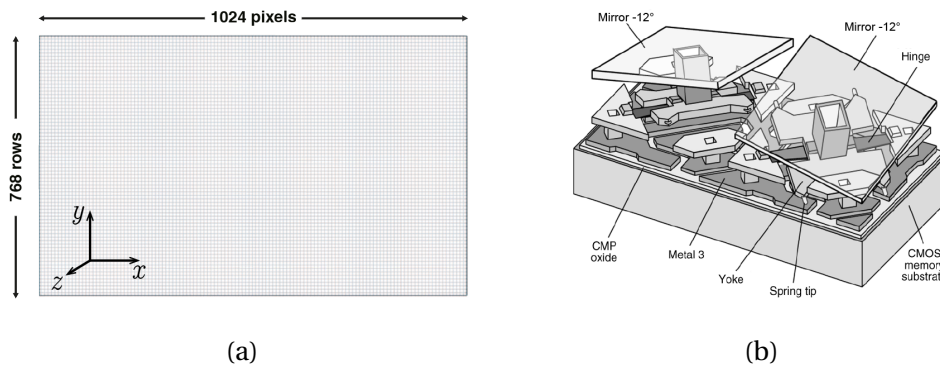


FIGURE 5.2 – 5.2a Matrice de micro-miroirs individuels également appelés pixels. Exemple du modèle XGA de 1024×768 pixels; figure tirée de *Application Report : DMD 101 : Introduction to Digital Micromirror Device (DMD) Technology*. 5.2b Structure de deux pixels voisins de la matrice DMD. Chaque miroir ou pixel (transparent sur le schéma) est indépendant et possède trois états suivant son angle d'inclinaison; figures adaptée de [81].

Le dispositif utilisé dans notre montage est formé par une matrice de 1024×768 micro-miroirs (cf. figure 5.2a), de forme carrée et de taille unitaire $13,68 \mu\text{m} \times 13,68 \mu\text{m}$ (Texas Instrument DLP Discovery 4100 Development Kit). Ces micro-miroirs, ou pixels, sont des éléments électromécaniques possédant trois états stables correspondants à leur inclinaison. Les pixels sont fixés sur une charnière électrostatique leur permettant de pivoter autour d'un axe confondu avec la première diagonale (diagonale descendante), indépendamment les uns des autres selon trois inclinaisons de $+12^\circ$, -12° et $+0^\circ$. Ces pixels sont également des éléments optomécaniques puisque leurs positions déterminent la direction de réflexion de la lumière. Les pixels orientés avec un angle de $+12^\circ$ sont dans un état « on » et la lumière incidente est réfléchiée dans l'axe optique, cette orientation réfléchiée la lumière dans l'axe d'illumination du microscope. Lorsqu'ils sont orientés avec un angle de -12° , correspondant à un état « off », la lumière est réfléchiée avec un angle de 48° par rapport à l'axe optique pour créer un champs sombre codant pour la couleur noire. Enfin, une dernière position correspond à l'état « flat » lorsque le contrôleur n'est plus alimenté,

les pixels définissent alors un angle de 0° avec l'axe optique¹. Bien que nous n'ayons pas eu recours à cette fonctionnalité dans cette application, il est possible de créer 8 bits de niveaux de gris par modulation des états (binaires) « on » et « off » à une fréquence suffisante (290 Hz maximum) pour être intégrée par un observateur (le détecteur). Le schéma d'orientation que nous venons de définir nécessite d'orienter le faisceau laser d'illumination avec un angle de -24° par rapport au plan (y, z) (cf. figure 5.3).

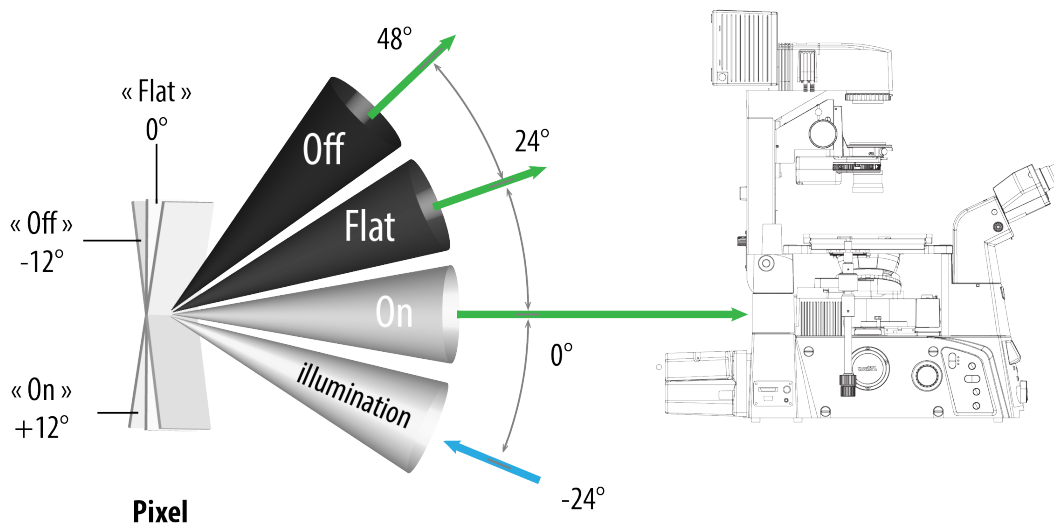


FIGURE 5.3 – Schéma simplifié du dispositif bistable de positions des pixels DMD. Figure inspirée de [Application Report : DLP™ System Optics](#).

En réalité, les pixels du DMD sont orientés orthogonalement sur la matrice et l'axe de rotation de chaque micro-miroir étant le long de la première diagonale, cette configuration impose d'illuminer le DMD avec un angle de -45° par rapport au plan (x, z) défini par la longueur de la matrice x et l'axe optique z . Chaque pixel est monté sur une cellule formée d'éléments à double mémoire CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) permettant de stocker et transmettre les instructions d'inclinaison dont les états bien que n'étant pas indépendants sont complémentaires de sorte que lorsqu'un élément a un état logique 1, le second a un état logique 0, vice versa. Lorsque la matrice est entièrement exploitée (768 lignes et 1024 colonnes), comme dans notre cas, le taux de rafraichissement maximale est de 20 kHz. Le traitement de surface des pixels permet également un très bon taux de transmission de la lumière dans le spectre visible atteignant plus de 98% entre 400 nm et 700 nm pour

1. Ce dernier état n'est jamais exploité en pratique, de plus, l'angle de 0° n'est pas totalement garanti par le constructeur.

différents angles d'incidences compris entre 0° et 30° ².

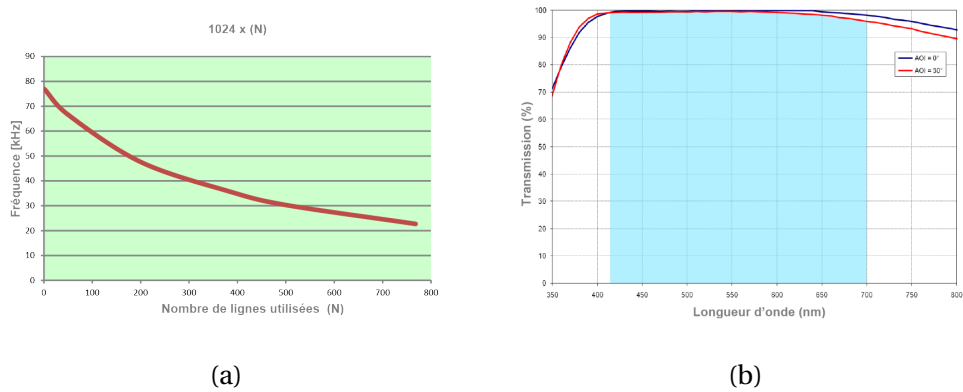


FIGURE 5.4 – Spécifications techniques du DMD. 5.4a Fréquence d'affichage en fonction du nombre de lignes utilisées. 5.4b Taux de transmission de la lumière en fonction de la longueur d'onde à différents angles d'incidence. Modèle DLP Discovery 4100 Development Kit - Texas Instrument.

Le pilotage du DMD est réalisé par l'exécution de commandes à partir de l'interface MATLAB en exploitant la bibliothèque logicielle DLL du contrôleur (qui est fournie par la société Vialux qui commercialise ce dispositif). Les instructions sont directement transmises par liaison USB avec le contrôleur. Celui-ci dispose d'une mémoire RAM (64 Bits DDR2 SODIMM DRAM) permettant de stocker les images. De cette façon, la fréquence d'affichage des images est plus élevée puisqu'il n'est pas nécessaire de transférer les données à la volée (opération qui peut s'avérer lente avec les taux de transfert en liaison USB). Toutefois, on reste limité par la taille de la mémoire qui permet de charger au maximum 32552 images binaires. Le contrôleur possède deux fonctionnalités de déclenchements sortants et entrants. On peut alors synchroniser l'affichage d'une image du DMD avec la lecture du détecteur par l'envoi d'impulsions TTL (Transistor-Transistor Logic) à la fréquence voulue et inversement. En effet, le contrôleur DMD permet de gérer précisément les paramètres d'affichage des images, en particulier :

- *IlluminateTime* la durée d'illumination ou durée d'affichage d'une image appartenant à une séquence,
- *PictureTime* la durée entre deux images consécutives,
- *TriggerDelay* la durée entre l'envoi de l'impulsion TTL sortante pour synchronisation et le début de l'affichage d'une image,

2. Une version plus adaptée à l'illumination UV existe permettant d'assurer les mêmes taux de réflexion que dans le visible grâce à un traitement de surface en argent.

- *TriggerPulseWidth* la durée de l'impulsion TTL sortante,
- *VdDelay* qui spécifie la durée entre l'arrivée d'une impulsion TTL entrante et l'affichage d'une image, lorsque le déclenchement est externe.

Dans notre configuration, nous projetons des images binaires (contenant les vecteurs modifiés de la base d'Hadamard) de taille 128×128 ou 256×256 pixels. Ces images sont centrées sur un fond noir de 1024×768 pixels pour pouvoir être reconnues par le contrôleur DMD. Nous utilisons ainsi en pratique toute la surface du DMD. La fréquence maximale d'affichage d'images par le DMD est alors de 20 kHz au maximum (cf. figure 5.4a).

5.2.2 Système anti-speckle

Le banc laser utilisé intègre plusieurs sources monochromatiques de longueurs d'onde différentes : 405 nm, 488 nm, 561 nm et 632 nm pour permettre l'excitation de plusieurs gammes de fluorophores. Ces différentes sources sont couplées par une fibre optique multimode. L'utilisation de sources lumineuses laser permet d'obtenir des puissances d'illumination plus importantes par longueur d'onde mais présente aussi l'inconvénient d'engendrer des textures dues à la nature cohérente de la lumière laser, le speckle.

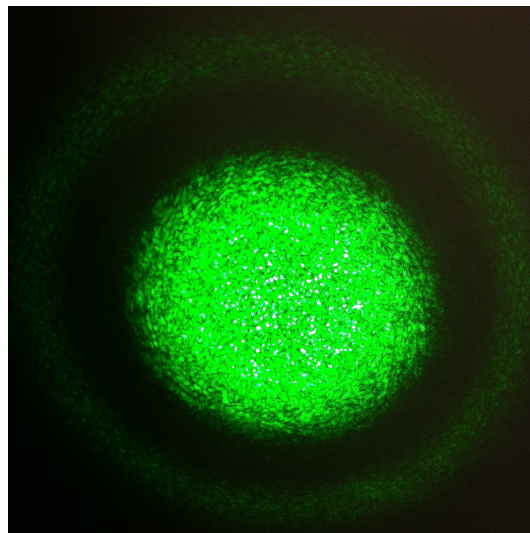


FIGURE 5.5 – Figure de speckle observée en sortie de fibre multimode du banc laser.

Le phénomène de speckle est causé par la diffusion de l'onde lumineuse cohérente spatialement par le milieu qu'elle traverse, dans notre cas l'âme (ou cœur) d'une

fibre optique multimode. Les points diffusés étant cohérents, on obtient une multitude d'interférences aléatoires comme illustré par la figure 5.5.

A l'origine, notre montage comportait un disque dépoli, monté sur moteur électrique rotatif, au travers duquel on faisait traverser la lumière en sortie de fibre multimode pour réduire le speckle. Cependant, lorsqu'on effectue des acquisitions à hautes fréquences, la vitesse de rotation du moteur n'est plus suffisante et on observe de nouveau les effets du speckle ainsi qu'une fluctuation sinusoïdale de l'amplitude des intensités de fluorescences. Nous avons alors remplacé le disque par un système récent de réduction du speckle. C'est un dispositif utilisant un miroir déformable à haute fréquence permettant de randomiser la phase de la lumière laser à une fréquence pouvant atteindre 500 kHz, tout en préservant la puissance lumineuse grâce à un taux de réflexion de plus de 99% dans le visible [123–125].

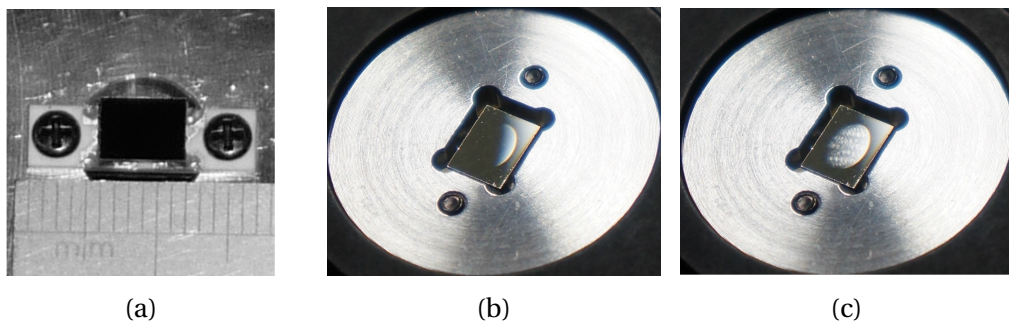


FIGURE 5.6 – Miroir déformable miniaturisé Dyoptyka. La surface active elliptique de taille 3,0 mm × 4,5 mm a reçu un traitement diélectrique pour améliorer le taux de réflectivité. 5.6b Miroir déformable inactif. 5.6c Miroir déformable actif, la surface présente des déformations aléatoires.

Ce dispositif est particulièrement intéressant puisqu'il améliore, la réduction du speckle par rapport au diffuseur circulaire, le taux de transmission, n'engendre pas de dispersion angulaire et permet d'effectuer des acquisitions à plus hautes fréquences permettant de mieux exploiter la rapidité du DMD et du détecteur (en particulier le PMT).

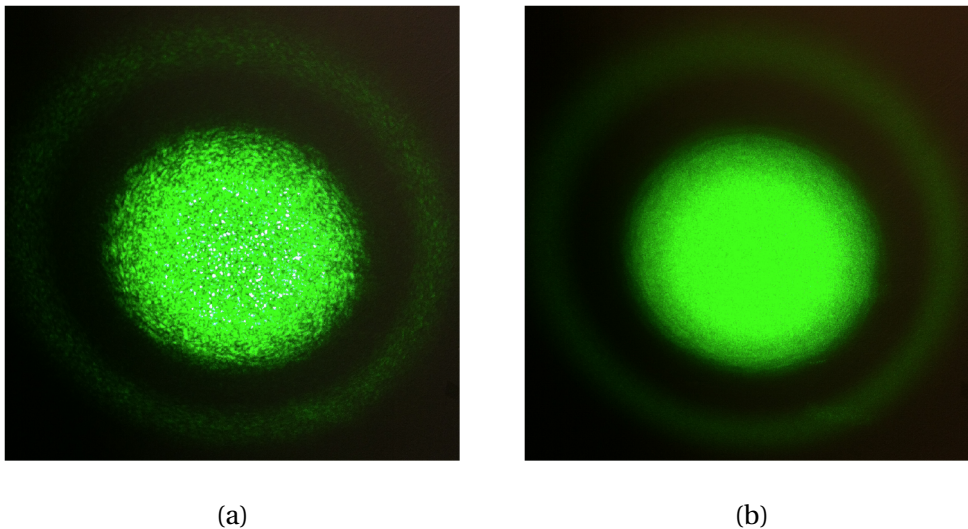


FIGURE 5.7 – Comparaison de la tâche focale du faisceau laser en sortie de fibre du dispositif Dyoptyka lorsque celui-ci est 5.7a inactif et 5.7b actif.

La figure ?? illustre l'effet du système de réduction du speckle sur la tâche focale du laser en sortie de fibre optique. On obtient une tâche focale homogène moins susceptible de dégrader les motifs de projection sur l'échantillon. Le faisceau traverse ensuite un élargisseur de faisceau qui permet d'obtenir un faisceau collimaté de deux centimètres de diamètre. Il est orienté sur la surface du DMD avec un angle de -24° par rapport au plan (y, z) , formé par la hauteur du DMD et l'axe optique du microscope, et un autre angle de -45° par rapport au plan (x, z) défini par la longueur du DMD et l'axe optique d'illumination du microscope. Le DMD réfléchit ensuite la lumière suivant l'axe optique avec la séquence ou le motif chargé dans la mémoire du DMD.

5.3 Alignement du système

La configuration spatiale du DMD et des trajets optiques nécessite un alignement minutieux des différents éléments optiques pour garantir une qualité optimale d'illumination. L'alignement est réalisé dans un premier temps assez grossièrement de sorte que l'on puisse faire passer la lumière laser incidente dans le microscope après réflexion sur le DMD. Ce dernier est préalablement positionné sur un rail confondu avec la projection de l'axe optique sur la table optique à une distance en accord avec le relais de lentille $4f$ utilisé. Ensuite, on affine au mieux le résultat en utilisant le principe de retour inverse de la lumière, c'est-à-dire que l'on commence le trajet optique à partir de l'emplacement de l'objectif du microscope. On utilise pour cela une diode laser parfaitement centrée dans un tube optique monté à la place de l'objectif

du microscope. Le trajet optique débute à une distance d'un mètre au dessus du microscope, traverse le cube filtre où il est réfléchi par le miroir dichroïque en direction de l'entrée arrière du microscope. Il traverse la lentille de tube (de focale 20 mm) et continue son trajet jusqu'au DMD. Celui-ci est paramétré pour que tous ses miroirs soient actifs à l'état « on » pour refléter la lumière vers les deux miroirs consécutifs permettant de réaliser une opération d'alignement par centrage et pointage en se servant de diaphragmes sur le chemin optique. Une façon plus simple de travailler avec les différents angles d'incidences de -24° et surtout de -45° , est de pivoter la base du DMD d'un angle de 45° dans le sens trigonométrique (ou anti-horaire) pour faciliter l'opération de centrage pointage alors un peu moins laborieuse et plus intuitive. On réalise cette opération pour faire correspondre, au mieux, les trajets aller et retour. Dans les faits, il est difficile, voire impossible, de parfaitement confondre ces trajets notamment à cause de la dispersion spectrale des éléments optiques et du fait que l'on n'utilise pas les mêmes sources (longueurs d'onde) lors du trajet aller et de retour inverse. On dispose ensuite le système $4f$ en déposant une à une les lentilles sur le trajet optique et en maintenant le passage par les différents diaphragmes de contrôle qui permettent de garantir qu'on ne modifie pas ou très peu le chemin optique du faisceau. Une autre façon de procéder plus directe que j'ai également employé consiste à directement faire parvenir le faisceau jusqu'à l'objectif du microscope (sans contrôle du retour inverse) et de réaliser l'optimisation du centrage-pointage en maximisant la puissance laser mesurée à l'aide d'un wattmètre en sortie d'objectif. Les deux méthodes procurent de bons résultats très comparables.

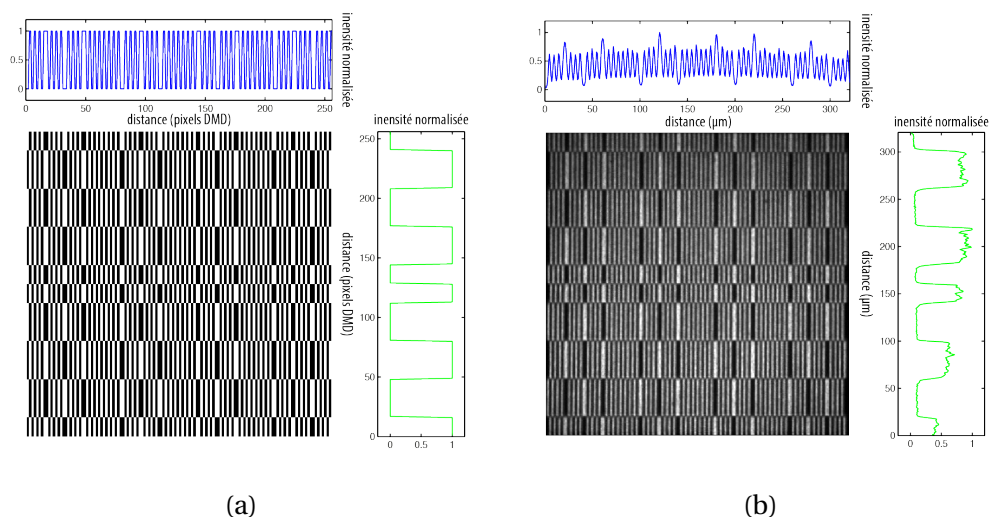


FIGURE 5.8 – Comparaison du modèle théorique 5.8a et du modèle expérimental 5.8b d'un motif d'Hadamard. Les profils d'intensités sont représentés selon les deux axes du plan.

L'alignement du montage optique est une étape cruciale de notre expérimentation puisqu'il conditionne fortement une partie de la résolution finale de notre montage. Lors de nos acquisitions CS, les séquences des vecteurs d'Hadamard sont directement responsables de la résolution de nos reconstructions puisqu'ils fixent, d'une manière différente qu'en imagerie conventionnelle, le pas de discrétisation du signal et in fine sa résolution. La figure 5.8 permet de visualiser l'écart d'un motif expérimental à celui d'un motif théorique. Cette dépendance justifie les choix opérés dans notre montage. L'illumination en champs large augmente, la quantité de photons émis et détectés, et le contraste final. Le système de réduction du speckle permet un éclairage uniforme du DMD sans endommager le motif d'illumination structurée (élément clé de l'application du CS dans notre montage). Enfin, l'alignement soigneux des différents éléments optiques du montage est une étape primordiale pour obtenir des motifs d'illumination contrastés et contenant le moins de distorsions possibles.

5.4 Acquisitions

5.4.1 Principe

Dans notre approche basée sur l'acquisition compressive de signaux naturellement parcimonieux, on se propose d'utiliser la base d'Hadamard comme base d'incohérence avec la base de parcimonie et d'effectuer la reconstruction de ces signaux via un algorithme de minimisation de la norme l_1 sous contrainte du bruit. Cette procédure doit nous permettre en théorie de reconstruire notre signal en utilisant seulement M mesures d'un signal de taille N avec $M \ll N$. Pour démontrer la faisabilité de cette approche, nous procédons dans un premier temps à l'acquisition des N mesures, soit la totalité du signal. Ensuite, nous utilisons successivement un nombre réduit décroissant M de mesures, choisies aléatoirement, pour la reconstruction jusqu'à l'obtention du plus petit nombre M de mesures utilisées et permettant la reconstruction sans perte du signal. On peut alors définir un taux de compression égale au rapport M/N du nombre de mesures utilisées et de la taille N du signal.

5.4.2 Mesures

Détection à un pixel

Pour l'acquisition d'images de taille 128×128 pixels et 256×256 pixels, on doit faire l'acquisition de toute la séquence des projections des vecteurs d'Hadamard sur l'échantillon à imager ce qui représente, respectivement, $(128 \times 128 =)$ 16384 et (256

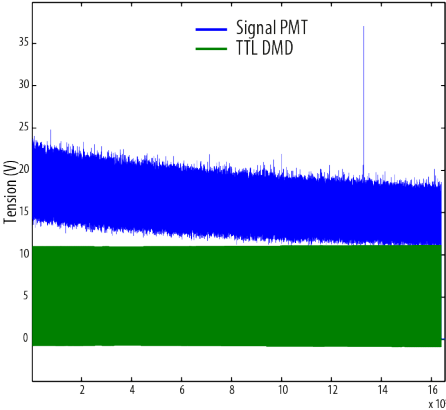
$\times 256 =$) 65536 motifs différents. Les projections successives de ces motifs (vecteurs de la base d'Hadamard sous forme 2D) sur l'échantillon fluorescent sont successivement enregistrées par le PMT. Le résultat d'une projection, une image dans le plan, est condensée par focalisation d'une lentille positionnée devant le PMT.

Nous avons simultanément enregistré le signal TTL du DMD et le signal électrique produit par le PMT. Ces signaux sont échantillonnés par une interface de conversion analogique-numérique (PCI-4462, National Instruments) pilotée par l'interface MATLAB via la toolbox Data Acquisition permettant la communication bidirectionnelle avec le PMT. La fréquence élevée d'échantillonnage autorisée par le PMT nous a permis d'exploiter au mieux la fréquence du DMD. La fréquence d'affichage des motifs par ce dernier est paramétrée pour enregistrer un signal de fluorescence suffisamment élevé (fréquences entre 1 et 10 kHz). Nous avons alors choisi de suréchantillonner l'acquisition PMT à une fréquence de 96 kHz qui permet de résoudre temporellement les différentes étapes d'affichage d'une séquence sur le DMD. Ainsi, un post-traitement des données automatisé par une routine sous Matlab, permet de récupérer l'intensité de fluorescence quantifiée pour chaque projection de la séquence sur l'échantillon.

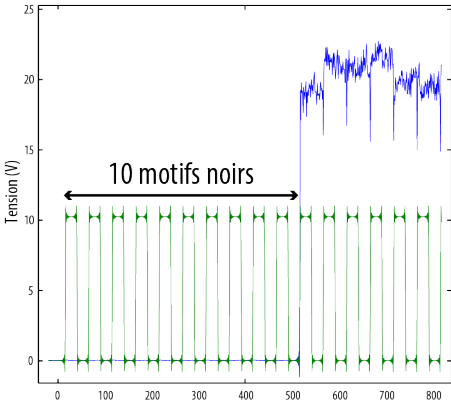
La figure 5.9 illustre les différentes étapes de traitement lors de l'acquisition avec le détecteur à point unique. On effectue l'enregistrement simultané du signal de synchronisation du DMD et du signal d'acquisition du PMT (cf. figure 5.9a). Afin de pallier à un éventuel saut de motifs de la séquence de projections (pas de synchronisation en temps réel) on rajoute dix motifs noirs en début et fin de séquence ce qui permet clairement de délimiter les signaux de fluorescence (cf. figure 5.9b). Grâce à un échantillonnage à haute fréquence, on retrouve les différentes durées paramétrées et transmises au contrôleur du DMD comme illustré sur la figure 5.9c :

1. la durée d'affichage d'un motif (*IlluminateTime*),
2. la durée du signal TTL de synchronisation (*TriggerDelay*),
3. la durée entre l'affichage de deux motifs consécutifs de la séquence (*PictureTime*).

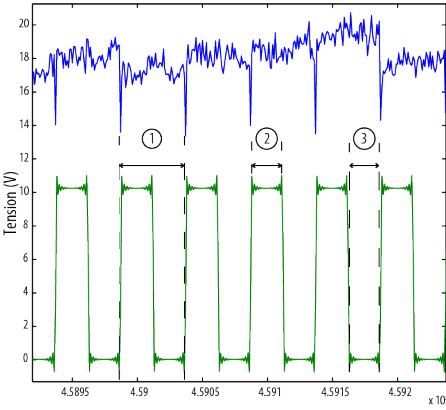
On effectue alors, pour chaque projection, la moyenne de l'intensité enregistrée durant toute la durée d'affichage d'un motif (moyenne de toutes les valeurs d'intensité sur une période du signal TTL). Nous obtenons les coefficients moyens des projections représentés sur la courbe de la figure 5.9d. La courbe de la figure 5.9e est divisée en deux parties correspondant à deux séquences de projections. En effet, nous avons vu que pour une image 256×256 pixels, la séquence complète comporte 65536 motifs différents. La mémoire embarquée du DMD ne permet de stocker qu'un peu plus de la moitié de cette séquence, c'est pourquoi nous l'avons divisé en deux parties égales chargées consécutivement dans la mémoire.



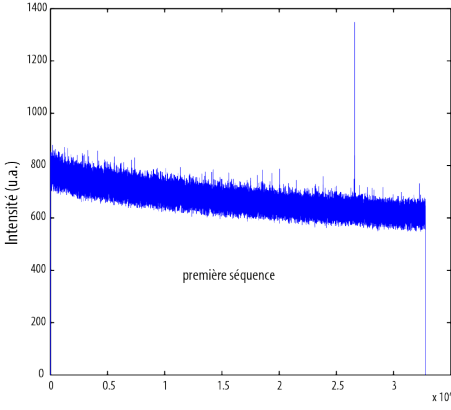
(a)



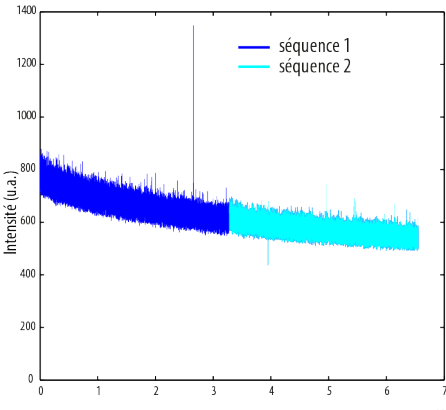
(b)



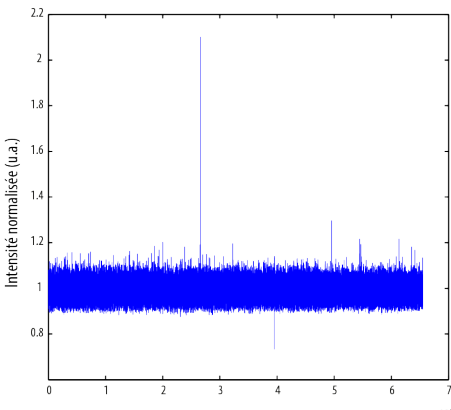
(c)



(d)



(e)



(f)

FIGURE 5.9 – Étapes de traitement des données d’acquisition PMT.

On note clairement le phénomène de photo-blanchiment qui se manifeste par une décroissance de l'intensité moyenne (et de l'amplitude) au cours du temps. Une dernière étape de post-traitement consiste à corriger le photo-blanchiment, par lissage de la courbe en utilisant une moyenne flottante de i éléments consécutifs suivie d'une normalisation du signal (cf. figure 5.9f). On note l'apparition, systématique, d'un pic d'intensité double, visible sur les courbes d'acquisitions. Il s'agit de la projection d'un des motifs de la séquence n'ayant pas la même valeur moyenne que les autres. En effet, tous les vecteurs d'Hadamard ont la même intensité moyenne (normalisée) égale à $1/2$ puisqu'au final la moitié des pixels du motif sont dans un état « on » et l'autre dans un état « off » (codant pour le noir) excepté pour un des motifs où tous les pixels sont à l'état « on ». On utilise alors M coefficients de ces N mesures pour effectuer nos reconstructions.

Détection hyperspectrale

Le montage permettant la détection hyperspectrale nécessite quelques modifications par rapport au montage précédent. Dans cette nouvelle modalité, une caméra EMCCD (Evolve 128 Photometrics) est utilisée pour enregistrer les spectres d'émission d'échantillons fluorescents.

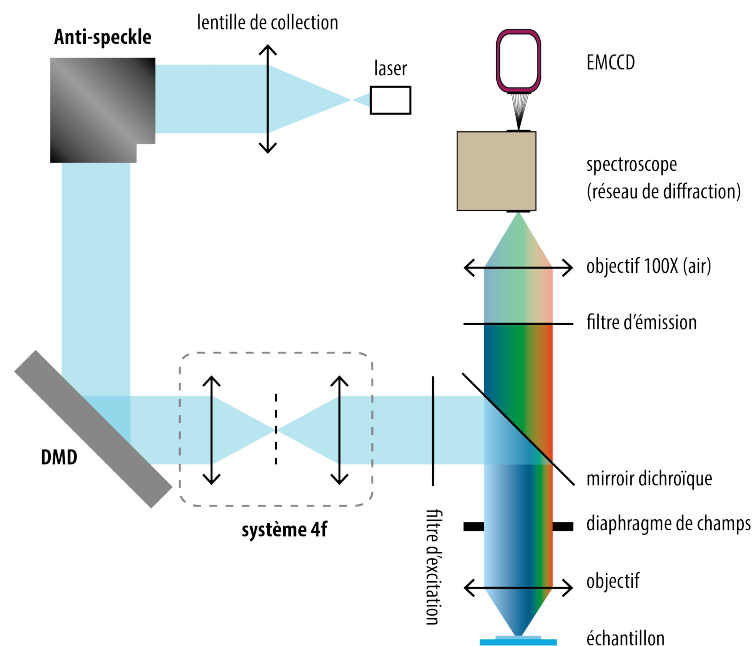


FIGURE 5.10 – Montage expérimental de l'acquisition compressive hyperspectrale. Dans cette configuration, nous employons un système d'illumination à champs large couplé à une caméra EMCCD.

On obtient les spectres de fluorescence en envoyant le faisceau d'émission à travers un réseau de diffraction qui disperse spectralement la lumière de fluorescence sur une gamme de longueurs d'onde comprises entre 520 et 640 nm. La taille du faisceau lumineux en sortie du microscope est initialement trop grande pour entièrement traverser le réseau de diffraction du spectroscopie ce qui explique l'utilisation d'un objectif 100X (air) pour condenser le faisceau. Les spectres sont alors enregistrés suivant le même procédé que précédemment mais en enregistrant chaque spectre sur une seule ligne de caméra. La caméra comporte une matrice EMCCD de 128×128 pixels. En utilisant une seule ligne de 128×1 pixels, on augmente la fréquence d'acquisition qui reste bien moins importante dans cette nouvelle configuration, notamment par la nécessité de détecter suffisamment de photons. Le processus d'acquisition est légèrement simplifié ici puisque la caméra offre la possibilité de synchroniser l'affichage de chaque motif par le DMD avec le déclenchement d'une exposition de la caméra. On dispose alors directement des mesures du signal, sans post-traitement, pour être reconstruit par l'algorithme de minimisation.

Résolution du microscope par échantillonnage compressif

Dans le schéma d'acquisition à point unique, nous avons utilisé un système $4f$ composé de deux lentilles (sans compter la lentille de tube du microscope) permettant d'introduire une augmentation de la taille des motifs structurés d'un facteur 1,5. L'utilisation de l'objectif 20X (Nikon, 20X Plan Apo VC NA 0,75) associée au facteur de grossissement de 1,5 représente un grossissement du pixel de DMD final de 30. La taille du pixel de DMD dans le plan d'imagerie est alors de $13680/30 = 456$ nm. Dans le second montage (hyperspectral), nous avons utilisé un objectif 60X à immersion d'huile (Nikon, 60X Plan Apo TIRF, NA 1,45) et un système $4f$ n'introduisant pas de grossissement. On obtient une taille du pixel de DMD de $13,68/60 = 228$ nm dans le plan focal d'imagerie. Dans les deux cas, ce sont les motifs d'illumination, en tant qu'opérateur d'échantillonnage, qui fixent une partie de la résolution spatiale des images. Pour chacune des modalités utilisées, on obtient des limites de résolution respectives de 422 nm et 218 nm. Ceci nécessite classiquement d'échantillonner avec des pas respectifs de 211 nm et 109 nm pour satisfaire au théorème de Shannon Nyquist. Bien que les tailles de pixels du DMD dans chacune des situations soient deux fois plus grandes que ces pas d'échantillonnage, nous n'avons pas observé de diminution significative de la résolution des images. La résolution n'a pas cependant été étudiée en particulier. De plus les échantillons utilisés ne présentent pas de structures suffisamment petites et visibles, aux grossissements utilisés, pour juger d'une potentielle dégradation. Néanmoins, cette étude pourrait être effectuée en utilisant une lame de calibration permettant d'explorer le pouvoir résolutif précis du microscope CS.

5.5 L'algorithme de reconstruction NESTA

Dans cette première partie de ma thèse, nous avons utilisé l'algorithme de reconstruction NESTA [12] créé en partie par deux collaborateurs (Jérôme BOBIN et Emmanuel Candes). La résolution de problèmes, par minimisation de la norme l_1 , où les signaux sont de très grandes dimensions représente un véritable défi. La majorité des techniques existantes ne permet pas de résoudre ce type de problème avec précision sans mettre les ressources informatiques en défaut. Le code NESTA propose la résolution de ces problèmes avec une haute précision et une complexité moins importante grâce au taux de convergence accéléré. NESTA représente une classe d'algorithmes capables de résoudre des problèmes à partir de mesures incomplètes du type $M \ll N$ que nous avons exposé. Codé en langage MATLAB, il permet notamment de résoudre le problème (P2) (vu en introduction) en résolvant une minimisation de la norme l_1 (sous contrainte du bruit) de notre signal. NESTA est un algorithme itératif basé sur les travaux précurseurs de Nesterov [110] utilisant des techniques de régularisation de fonctions convexes couplées à une méthode de gradient améliorée. Nous souhaitons résoudre le problème (P2) suivant :

$$\begin{aligned} & \text{minimisation} && \|x\|_{l_1} \\ & \text{sous la contrainte} && \|b - Ax\|_{l_2} \leq \epsilon \end{aligned} \quad (5.1)$$

Nous supposons que $A^T A$ est une matrice orthogonale, les lignes de A étant orthogonales. C'est souvent le cas des applications du CS qui utilisent fréquemment une construction de A à l'aide de sous-matrices de transformation unitaires qui admettent une transformée rapide, comme c'est le cas de la transformée d'Hadamard (on peut aussi cité le cas de la transformée de Fourier).

NESTA s'appuie sur la méthode de Nesterov de minimisation de fonctions convexes régulières de la forme :

$$f(x) = \max_{u \in Q_d} \langle u, x \rangle \quad (5.2)$$

où $x \in \mathbb{R}^n$, $u \in \mathbb{R}^p$ et $Q_d = \{u : \|u\|_\infty \leq 1\}$ l'ensemble formé par la boule l_∞ . On ne peut pas utiliser directement la fonction $f(x) = \|x\|_{l_1}$ puisqu'elle n'est pas régulière. Une approximation régulière naturelle de la norme l_1 :

$$f_\mu(x) = \max_{u \in Q_d} \langle u, x \rangle - \frac{\mu}{2} \|u\|_{l_2}^2 \quad (5.3)$$

peut être formulée et substituée à (5.2) pour ce problème avec u telle que :

$$\nabla f_\mu(x) = u_\mu(x) \quad (5.4)$$

Chapitre 5. Compléments

et finalement :

$$\nabla f_{\mu}(x)[i] = \begin{cases} \mu^{-1}x[i] & \text{si } |(x)[i]| < \mu, \\ \text{sgn}(x[i]) & \text{autrement.} \end{cases} \quad (5.5)$$

qui permet alors d'appliquer l'algorithme de Nesterov pour résoudre :

$$\min_{x \in Q_p} f_{\mu}(x) \quad (5.6)$$

avec $Q_p = \{x : \|b - Ax\|_{l_2} \leq \epsilon\}$.

Initialisation x_0 . Pour $k \geq 0$,

1. Calcul de $\nabla f_{\mu}(x_k)$.

2. Calcul de y_k :

$$y_k = \operatorname{argmin}_{x \in Q_p} \frac{L}{2} \|x - x_k\|_{l_2}^2 + \langle \nabla f_{\mu}(x_k), x - x_k \rangle,$$

3. Calcul de z_k :

$$z_k = \operatorname{argmin}_{x \in Q_p} L p_p(x) + \langle \sum_{i=0}^k \alpha_i \nabla f_{\mu}(x_i), x - x_k \rangle, \text{ où } \alpha_k = 1/2(k+1),$$

4. Mise à jour de x_k :

$$x_{k+1} = \tau_k z_k + (1 - \tau_k) y_k, \text{ où } \tau_k = 2/(k+3).$$

Arrêt dès qu'un critère donné est valide.

Le coût informatique de cet algorithme est très raisonnable bien que l'on travaille avec des matrices d'assez grande taille. Cela s'explique par le fait que les matrices ne sont jamais réellement exprimées directement. Dans mes travaux, nous avons utilisé des matrices d'Hadamard dont on a généré une fonction MATLAB permettant de ne pas l'exprimer mais de lui donner une forme fonctionnelle capable de générer les coefficients vectoriels à la demande. Tout ceci fait de NESTA un instrument très confortable, rapide, précis et flexible puisqu'il s'adapte à de nombreux problèmes convexes et différents supports.

Microscopie de Super-Résolution **Partie**

6 État de l'art

Sommaire

6.1 Introduction	89
6.2 PALM/STORM	93
6.2.1 Principe	93
6.2.2 Fluorescence photo-modulable	95
6.2.3 Acquisition des données	97
6.2.4 Algorithmes de localisation	100

6.1 Introduction

La compréhension des fonctions cellulaires nécessite une observation détaillée des éléments constitutifs de la cellule. Une part importante de la recherche en biologie cellulaire porte sur l'étude des interactions intra et extra-cellulaires entre ces éléments. Cela nécessite de pouvoir voir ce qui se passe à cette échelle, l'échelle nanométrique. Depuis les premières observations en biologie cellulaire par Robert Hooke et Antoni van Leeuwenhoek datant du XVII^e siècle, de nombreux progrès technologiques ont permis d'améliorer fortement la qualité des observations microscopiques. Ces avancées ont très vite atteint des limites physiques ultérieurement mises en évidence par les travaux d'Ernst Abbe [2] et Lord Rayleigh [118] à la fin du XIX^e siècle. En effet, le caractère ondulatoire de la lumière impose des limites de résolution comme je l'ai évoqué en introduction. Il s'agit de la limite de diffraction. Le résultat de cette limitation est facilement mis en évidence par l'étalement de la lumière lorsqu'on observe l'image formée par un point, de taille inférieure à la moitié de la longueur d'onde (dans le visible). Il en résulte une tâche circulaire de taille finie mais pourtant plus large que celle du point d'origine¹. Par conséquent, à cause de cette dif-

1. C'est également pour cette raison qu'il est impossible, sans action extérieure, de pouvoir focaliser la tâche focale d'un faisceau laser en dessous d'une taille inférieure à la moitié de sa longueur

fraction de la lumière, il est impossible de pouvoir représenter parfaitement les plus petits détails de certaines structures puisqu'il existe une valeur limite en dessous de laquelle le microscope n'est pas capable de résoudre. C'est aussi pour cette raison qu'il est impossible de résoudre deux éléments d'une même structure (cf. figure 6.1) s'ils se retrouvent séparés d'une distance inférieure à la moitié de la longueur d'onde d'émission dans le plan latéral (x,y) mais également dans le plan longitudinal (z) et de manière encore moins favorable.

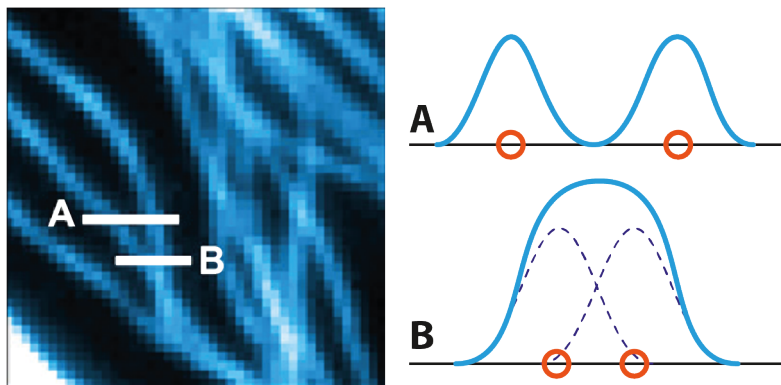


FIGURE 6.1 – Limite de diffraction en microscopie à champs large ; à gauche : image de microtubules résolus en (A) et non résolus en (B) ; à droite : représentation schématique des profils d'intensité en (A) et (B). Inspirée de (Huang et al., 2010, Cell, 143, 1047-57).

Nous l'avons vu ce phénomène se manifeste par l'apparition d'une figure de diffraction tridimensionnelle en forme d'ellipsoïde qui prend la forme d'une tâche d'Airy dans le plan (x,y), caractéristique des interférences constructives et destructives résultat du caractère ondulatoire de la lumière. La taille de la tâche est fonction de la longueur d'onde ainsi que de l'ouverture numérique de l'objectif utilisé. C'est ce que l'on appelle couramment la PSF. Même dans les meilleures conditions (grande ouverture numérique, faibles longueurs d'onde), rarement atteintes en réalité, la résolution latérale reste limitée à un niveau modeste de quelques 200 à 350 nm (selon que l'on travaille dans le bleu lointain ou le rouge lointain) et comprise entre 500 et 800 nm dans le plan longitudinal (x,z). Il s'agit, en substance, de dimensions un peu plus grandes que la taille d'un grand nombre de molécules cellulaires, rendant opaque ces échelles d'observations microscopiques (cf. figure 6.2).

d'onde.

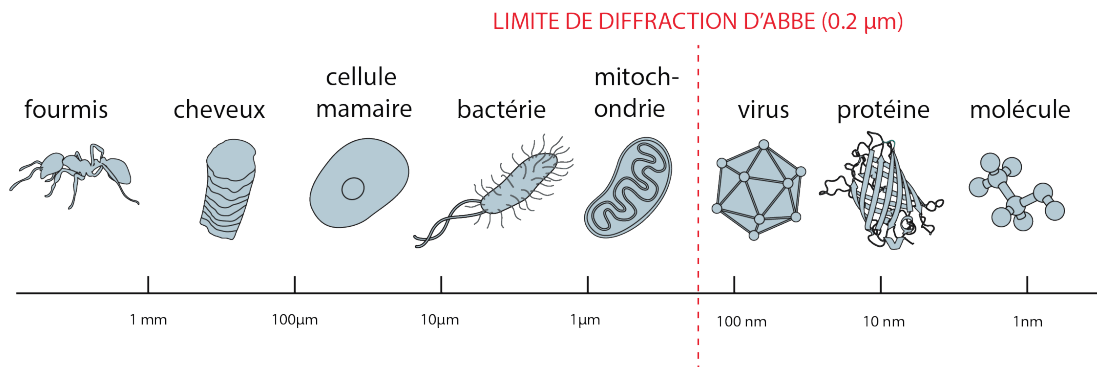


FIGURE 6.2 – Limite de diffraction en microscopie optique conventionnelle comparée à la taille de divers organismes et structures. Illustration modifiée de Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences.

Les premières améliorations sont venues avec les progrès en microscopie confocale [23, 41, 122], puis en microscopie multi-photons [73, 152] et microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) [5–7]; trois techniques permettant la suppression de la fluorescence d'arrière plan (et plus tard pour la spectroscopie de molécules uniques). De nombreuses avancées remarquables ont pu faire entrevoir la possibilité de réduire significativement les résolutions notamment en microscopie SIM (Structured Illumination Microscopy) [64, 70] permettant de réduire par un facteur deux les limites de résolution. La véritable révolution est intervenue par l'arrivée de deux nouveaux systèmes de microscopie permettant de descendre bien en dessous de la limite de diffraction. Il s'agit des techniques de microscopie STED (STimulated Emission Depletion) et microscopie PALM/STORM (PhotoActivated Localization Microscopy et STochastic Optical Reconstruction Microscopy). La première technique, microscopie STED [71, 72], est de type confocale à balayage. Sa principale caractéristique repose sur l'utilisation conjointe d'un laser classique d'excitation avec un laser de déplétion en forme de « donut » qui permet de réduire la taille de la tâche focale du faisceau d'excitation. Ainsi, il a été possible de réduire par un facteur six, en dessous de la limite de diffraction, la taille de la tâche focale dans le plan axial ainsi que par un facteur deux dans le plan longitudinal pour un spot tridimensionnel presque sphérique de diamètre 90 à 110 nm soit 18 fois plus petit qu'en microscopie confocale conventionnelle [88].

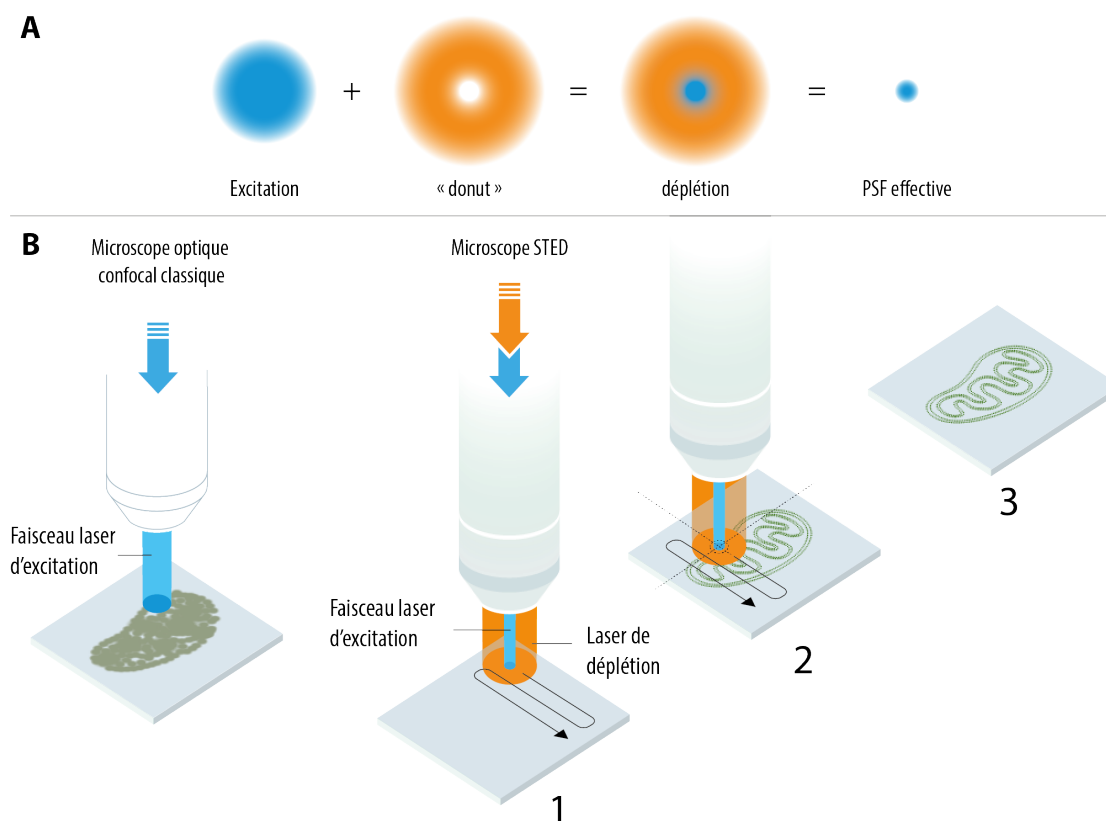


FIGURE 6.3 – Concept de super résolution en microscopie STED. (A) la tâche focale bleue d'excitation est superposée au laser de déplétion STED en forme de « donut » orange pour fortement réduire la taille effective de la PSF, (B) montage schématique du microscope confocal STED. Illustration inspirée de Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences.

L'autre concept, que je détaille dans la section suivante, est la microscopie PALM/STORM. Elle est de type champs large et repose sur deux principes :

- la possibilité de localiser très précisément la position de points sources, par estimation du centre de leur PSF [14],
- et la possibilité de contrôler optiquement des protéines fluorescentes entre deux états actif et inactif par des procédés de photo-chimie [46, 105].

La découverte de ces deux nouvelles techniques et les propriétés photo-modulables des nouvelles molécules fluorescentes a été récemment récompensée par le prix Nobel de chimie 2014 attribué à Eric Betzig, Stefan Hell et William Moerner « pour le développement de la microscopie de fluorescence en super-résolution » le 8 octobre 2014 [1, 38, 139]. Ce prix reflète l'avancée majeure que permettent ces nouvelles modalités et les répercussions dans le milieu de la bio-imagerie et plus

globalement dans la recherche médicale où une compréhension approfondie et plus précise des mécanismes cellulaires à l'échelle des molécules individuelles ouvre la voie à de nouvelles perspectives.

6.2 PALM/STORM

La microscopie PALM [15, 76] puis STORM [120] sont des techniques basées sur la localisation de molécules individuelles pour la microscopie de super résolution qui s'avèrent particulièrement puissantes pour l'analyse des interactions et des mécanismes subcellulaires.

6.2.1 Principe

L'idée en elle même est assez simple. Elle repose sur le fait qu'il est possible de déterminer avec précision la position d'une molécule individuelle fluorescente (de seulement 1 nm de diamètre) qui émet une quantité de photons suffisante. En effet, un simple processus d'identification du centroïde de la PSF, représentant l'image de la molécule unique, permet de remonter avec une très grande précision à la position de celle-ci, comme le présente la figure 6.4.

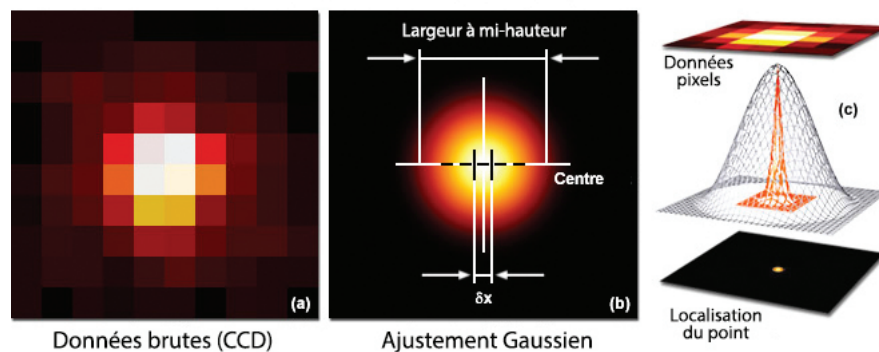


FIGURE 6.4 – Processus simplifié de localisation d'une molécule individuelle, (a) Simulation d'une image CCD d'un point source avec bruit de photons, (b) modélisation de la l'ajustement Gaussien de a, (c) récapitulatif du processus d'ajustement gaussien des données brutes par une PSF pour retrouver la localisation d'une molécule unique. Figure adaptée de [Zeiss Campus](#).

Supposons maintenant que l'on effectue un marquage cellulaire, très sélectif, avec des molécules fluorescentes afin de les localiser de la manière que l'on vient d'évoquer. En microscopie conventionnelle, ces fluorophores sont trop proches (trop

denses) les uns des autres pour être résolus individuellement. Les premières tentatives proposaient alors de localiser plusieurs molécules sur une même observation en les dissociant par leurs caractéristiques spectrales [19] ou encore par la durée de vie de fluorescence [68] sans arriver pour autant à imager plus de quelques molécules, trop proches les unes des autres. L'envol de cette technique a vraiment eu lieu lorsque la dimension temporelle a été intégrée à ce processus afin de séparer les molécules individuelles et éviter leur recouvrement. En effet, la chance de détecter (résoudre) plusieurs molécules dont les PSF se recouvrent peut être ramenée presque à zéro en limitant le nombre de molécules émettant des photons simultanément. Seule une petite fraction des molécules sont actives simultanément. Cela a été rendu possible par l'utilisation de molécules *photoactivables* et *photoconvertibles* comme en microscopie PALM ou encore *photomodulables* comme en microscopie STORM.

Ainsi, en prenant une série d'images, à différents instants, ne contenant à chaque fois que quelques molécules individuelles émettant des photons, et dont la distance d les séparants soit plus grande que la résolution du microscope alors on se soustrait du critère de Rayleigh comme illustré sur la figure 6.5.

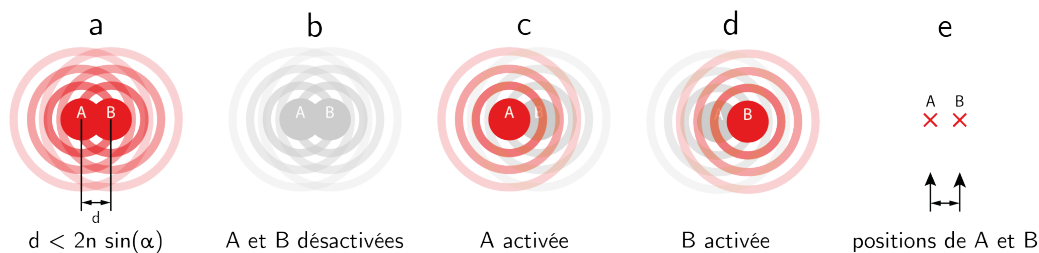


FIGURE 6.5 – Illustration de l'idée à la base des techniques de PALM et STORM. (a) La microscopie conventionnelle ne permet pas de dissocier deux objets A et B séparés d'une distance inférieure au critère de Rayleigh, (b) Configuration de départ en PALM et STORM, tous les fluorophores (A et B) sont désactivés. Les tâches d'Airy grisées n'ont pas de réalité physique, il s'agit seulement de représenter les molécules dans leur état inactif. (c, d) Les molécules sont stochastiquement activées de sorte que deux molécules proches l'une de l'autre ne se retrouvent pas dans un état de fluorescence simultanément, ainsi, il est possible de remonter jusqu'à leur position exacte (e) malgré leur proximité qui reste inchangée.

Notons qu'il est alors nécessaire d'effectuer une série d'acquisition de plusieurs centaines et même plusieurs milliers d'images pour obtenir suffisamment de fluorophores pour correctement décrire un objet cellulaire. Par la suite (ou simultanément) on fait l'analyse de chacune de ces images pour déterminer la position de chacune des molécules et ainsi reconstruire une image finale super résolue *pointilliste* comme

cela a été décrit [93] auparavant (cf. figure 6.6).

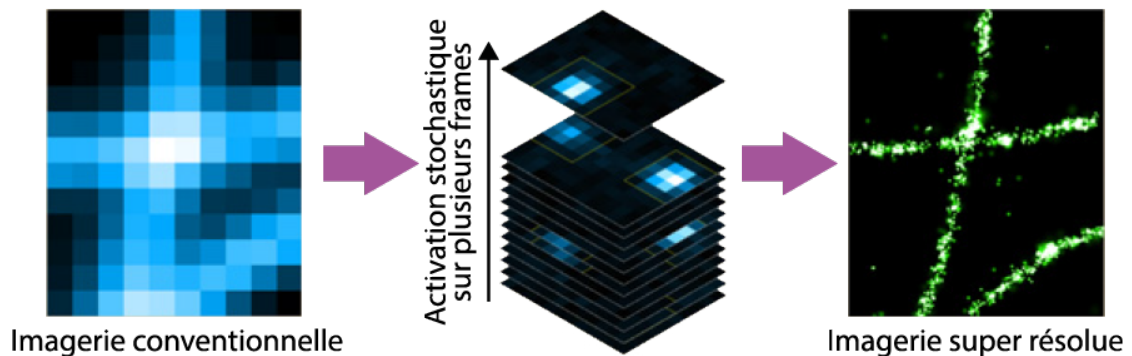


FIGURE 6.6 – Comparaison d’une image obtenue en microscopie de fluorescence conventionnelle et d’une reconstruction STORM de microtubules de cellules mammaires. Les localisations successives de molécules uniques fluorescentes sur les différents plans d’acquisition permet de fournir une image super résolution qui révèle des détails d’une grande finesse.

Ce n’est pas le pouvoir de résolution de l’instrument qui est amélioré, il reste inchangé. C’est la possibilité de localiser très précisément les molécules individuelles qui apporte une avancée spectaculaire en terme de résolution. Ces techniques ont l’avantage de ne dépendre que du bruit majoritairement photonique. Si on considère un modèle Gaussien alors la précision de localisation σ_x des molécules suit une loi Gaussienne telle que l’erreur sur la précision de localisation soit inversement proportionnelle à la racine carrée du nombre de photons détectés (équation (6.1)).

$$\sigma_x \geq \frac{s}{\sqrt{N}} \quad (6.1)$$

où N est le nombre total de photons détectés et s la déviation standard de la Gaussienne. En d’autres termes, plus on collecte de photons, meilleure est la résolution.

6.2.2 Fluorescence photo-modulable

L’avènement de ces techniques stochastiques repose sur la découverte des principes *photo-modulables* des fluorophores. En microscopie PALM et STORM on utilise la propriété que possèdent certaines protéines fluorescentes de pouvoir modifier leurs propriétés spectrales. Il s’agit de marqueurs respectivement *photoactivables* (PAFPs : PhotoActivable Fluorescent Proteins) et *photoconvertibles*. Le concept de précurseur de molécules photomodulables est apparu à la fin des années 70 (Engel et Schlaeger, 1977). Ces protéines fluorescentes sont capables de changements im-

portants et suffisants dans leurs propriétés spectrales en réponse à une irradiation lumineuse à une longueur d'onde et à une intensité spécifique. Certaines protéines passent d'un état peu ou pas fluorescent à un état très fluorescent, c'est une photoactivation ; alors que d'autres protéines changent de couleur de fluorescence, c'est une photoconversion [36, 96]. Dans le premier cas on utilise un premier laser d'excitation ou de photoactivation dans le proche UV (405 nm) qui fait passer la molécule dans un état de fluorescence alors qu'elle ne l'était pas. Puis on utilise un second laser pour l'excitation de la fluorescence, à une longueur d'onde appropriée aux nouvelles propriétés de la molécule impliquée. Enfin, on poursuit l'excitation pour photo-blanchir ces protéines afin d'être sûr qu'elle n'émettent plus de fluorescence. Dans le cas de la photoconversion, la molécule possède deux états de fluorescence. C'est-à-dire que la protéine est capable d'émettre de la fluorescence à une certaine longueur d'onde mais peut aussi émettre à une longueur d'onde différente dès lors qu'elle est soumise à une photoconversion par excitation dans l'UV. Ce passage est irréversible. Une fois la molécule photoconvertie, elle ne peut plus revenir dans son état de fluorescence naturelle.

Les molécules utilisées en microscopie STORM diffèrent un peu de ce que nous venons de voir puisqu'elles possèdent la capacité d'être photoconvertibles sans que le processus soit irréversible. On dit alors que la molécule est *photocommutable* (cf. figure 6.7).

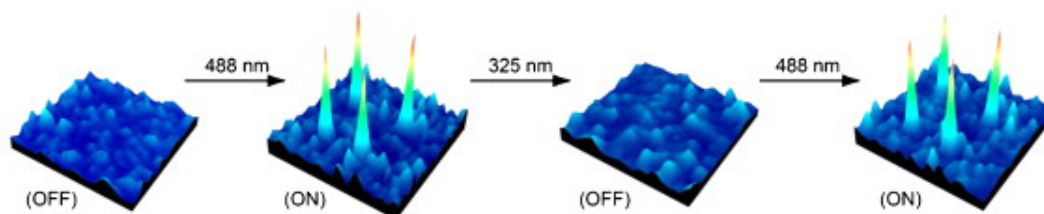


FIGURE 6.7 – (a) Images de fluorescence lors de la photocommutation, Figure adaptée de **J. Photochem. Photobiol. C. 12**, 3, 177-208 (2011).

Il existe des protéines présentant ces propriétés, telle que Dronpa et ses formes mutantes [4], mais avec une stabilité restreinte qui limite leur utilisation. C'est pourquoi on a recours à des molécules fluorescentes photocommutables artificielles aux propriétés similaires voire supérieures à la GFP. C'est le cas des molécules synthétiques carbocyanine telle que (Cy5) ou encore les molécules de la famille Alexa. Dans ce cas, la molécule possède un état « off », où elle n'émet pas de fluorescence, et un état « on », où au contraire elle émet de la fluorescence. Le passage d'un état à un autre se fait par le biais d'une excitation à une longueur d'onde spécifique. Il s'agit cette fois d'un immunomarquage (anticorps - antigène).

En réalité, lorsque l'approche a été décrite au départ [120], le STORM utilisait une paire de colorants cyanine photoconvertibles (Cy3) et (Cy5), le premier permettant d'activer (une fois excité) le second. Ce dernier étant photocommutable. Une variante du STORM, le dSTORM (direct STORM) [69] utilise un fluorophore unique dont l'état fondamental est dépleté en faveur d'un état triplet atteint par une excitation intense et en absence d'oxygène pour limiter le photoblanchiment (cf. figure 6.8). Les fluorophores se maintiennent dans cet état plusieurs secondes avant de revenir à l'état d'équilibre. On a ainsi fortement dépeuplé les fluorophores qui peuvent émettre de la fluorescence, tandis que la majorité est dans l'état triplet. Pour favoriser ce stockage à l'état triplet, on utilise un milieu spécifique permettant la réduction de l'oxygène.

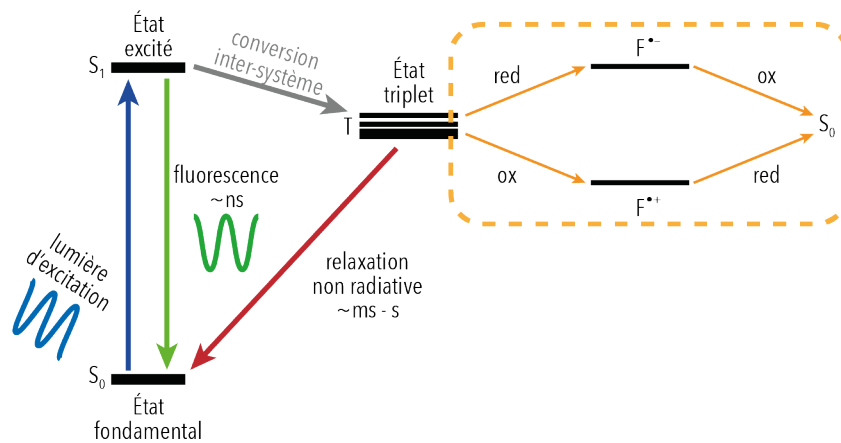


FIGURE 6.8 – Diagramme de Jablonsky simplifié. Lorsque les fluorophores photoconvertibles sont excités intensément, ils passent par un état triplet et peuvent y rester plusieurs secondes avant de revenir à l'état fondamental. L'ajout d'un milieu oxydoréducteur déplete l'état triplet par transfert d'électrons (encart orange). Il ne reste qu'une très faible fraction de fluorophores capable d'émettre des photons pour revenir à l'état fondamental pour permettre leur localisation.

Ces nouvelles molécules présentent de nombreux avantages. On dispose d'un large choix de couleurs et leur marquage est très spécifique ce qui permet une meilleure sensibilité de détection.

6.2.3 Acquisition des données

L'acquisition des images permettant la reconstruction d'images super résolues en PALM et STORM peut être réalisée avec un dispositif expérimental très semblable

à celui que l'on a utilisé en première partie (microscope épi-fluorescent). Le bloc microscope ne change pas. Il faut naturellement faire correspondre les caractéristiques physiques des molécules uniques avec celles du bloc d'illumination. L'une des nécessités absolues est de pouvoir détecter suffisamment de photons et donc d'avoir un système d'acquisition assez sensible. Pour cela, on utilise couramment une caméra EMCCD, capable à la fois de détecter de faibles intensités et d'enregistrer à grandes fréquences les multiples plans d'acquisition. Ainsi, pour une acquisition moyenne de 25000 plans à une fréquence de 50Hz, l'acquisition nécessite un peu plus de 8 minutes. On contrôle la densité de molécules par plan en ajustant la puissance de photomodulation des fluorophores et en utilisant une solution tampon adéquate. Il est possible de maintenir un nombre relativement constant de molécules en état de fluorescence par plan, tout en garantissant une probabilité d'éloignements suffisants pour ne pas obtenir de molécules trop rapprochées.

Par ailleurs, afin de réduire la contribution des molécules hors focus, c'est-à-dire situées dans l'échantillon mais dans une tranche plus profonde du tissu biologique, on a recours à l'utilisation de l'illumination TIRF [6] (Total Internal Reflection Fluorescence) plutôt que l'illumination conventionnelle en champs large. Il s'agit d'illuminer l'échantillon biologique avec un angle égale à l'*angle critique* de réflexion totale θ_c tel que défini par les lois de Snell-Descartes.

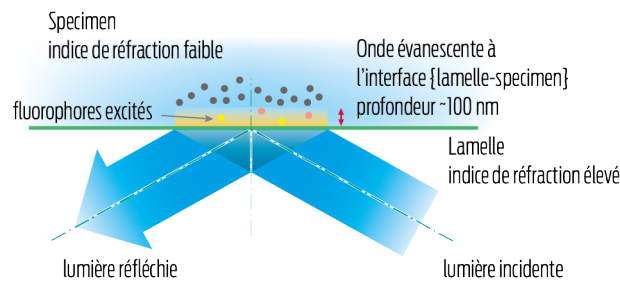


FIGURE 6.9 – Création d'une onde évanescente à l'interface verre-specimen permettant de contrôler la profondeur de pénétration de l'excitation des fluorophores.

De cette manière, la lumière sera totalement réfléchie à l'interface verre-milieu biologique puisque ce phénomène s'applique lorsque la lumière passe d'un milieu plus réfringent ($n_{\text{verre}} = 1,518$) à un milieu moins réfringent ($n_{\text{eau}} = 1,33$). Il subsiste une faible fraction de l'énergie lumineuse qui est convertie en une onde électromagnétique et qui traverse l'interface pour former une onde évanescente. De même fréquence que l'onde lumineuse dont elle issue, son amplitude décroît exponentiellement avec la profondeur de pénétration (6.2).

$$I(z) = I_0 \exp(-z/d_p) \quad (6.2)$$

où la profondeur de propagation d_p est fonction de l'angle θ d'incidence et λ la longueur d'onde de l'onde plane monochromatique avec :

$$d_p = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{(n_1 \sin \theta)^2 - n_2^2}} \quad (6.3)$$

Ainsi, les fluorophores se situant dans l'onde évanescente ne sont pas excités par l'interaction avec les photons mais bien par l'interaction avec l'onde électromagnétique (cf. figure 6.9). La profondeur de pénétration de l'onde se situe généralement entre 60 nm et jusqu'à 200 nm. Elle dépend de l'angle d'incidence, de la longueur d'onde et des indices de réfraction des milieux, ce qui nécessite plusieurs ajustements. En définitive, seuls les fluorophores se trouvant dans ce plan pourront être excités, diminuant ainsi fortement les contributions plus profondes de la fluorescence. Cette technique est utilisée au delà de la microscopie STORM et PALM puisqu'elle confère naturellement de meilleures observations en microscopie de fluorescence conventionnelle, grâce à un meilleur rapport de signal sur bruit et une maîtrise de la tranche tissulaire observée (cf. figure 6.10).

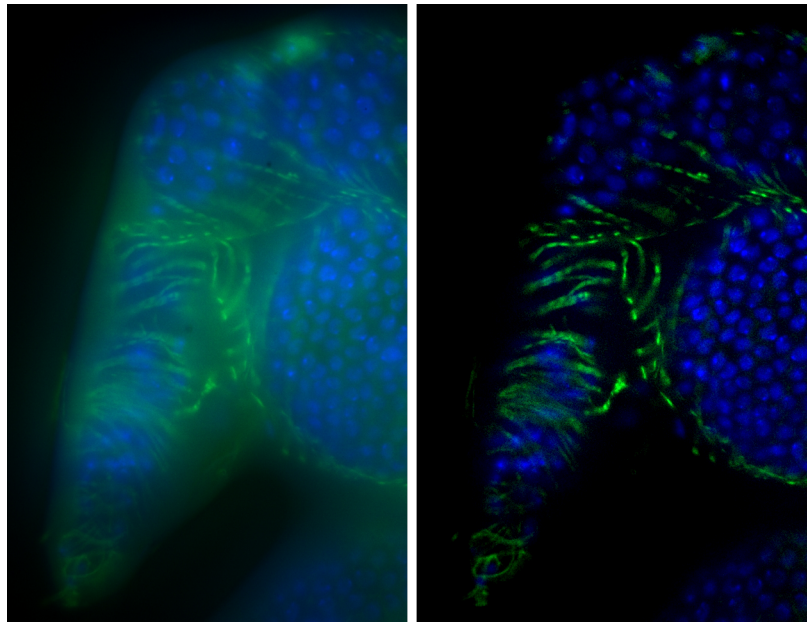


FIGURE 6.10 – Ovariole de *Drosophila melanogaster*. En vert : F-actine marquée par Alexa Fluor 488 ; en bleu : ADN marqué avec DAPI. A gauche l'imagerie en champs large classique. A droite, le même échantillon est illuminé en TIRF.

L'utilisation du TIRF révèle une image avec un contraste nettement amélioré en comparaison du flou produit par les plans hors focus issus de l'épi-illumination.

6.2.4 Algorithmes de localisation

Les algorithmes de localisation constituent la partie finale logicielle sur laquelle on peut intervenir pour contribuer à l'amélioration de la résolution. Ces algorithmes constituent la deuxième grande innovation sur laquelle repose la super résolution basée sur la localisation de molécules individuelles. Les difficultés de reconstruction d'images super résolues ne s'arrêtent pas au simple système d'acquisition puisqu'en sortie d'enregistrement il faut pouvoir réussir à correctement analyser les résultats. De nombreux algorithmes de localisation de molécules individuelles ont vu le jour depuis ces dernières années et proposent chacun des techniques différentes et s'appliquent à différents régimes de densités de molécules. De façon schématique, ils ont pour but de retrouver la position de chaque molécule contenue dans les différents plans d'acquisition avec la meilleure précision et évidemment une bonne performance. La localisation de molécules uniques est utilisée pour imager plusieurs types de structures cellulaires telles que des structures linéaires, où les molécules sont très proches le long d'une trajectoire mais très espacées perpendiculairement à ces lignes (par exemple des microtubules) ou au contraire pour imager des structures plus agrégées. Chaque situation comporte sa propre difficulté et relève d'un type particulier d'algorithme. Les modèles les plus précis proposent de localiser une molécule par ajustement gaussien (ou par une fonction d'Airy²) de la PSF résultant du processus d'imagerie. C'est le cas de l'algorithme PALMER [144]. L'inconvénient majeur de ce type d'algorithme est sans aucun doute le temps de calcul nécessaire qui peut devenir limitant. L'autre catégorie d'algorithme, sans ajustement, proposent de localiser les molécules individuelles par calcul du centroïde des PSE, tel que l'algorithme QuickPALM [74]. Ces algorithmes ont la particularité d'être moins précis que les algorithmes par ajustement mais sont connus pour être plus rapides. Cette dernière affirmation tend néanmoins à se contredire puisque ces dernières années, de nombreuses évolutions ont permis de paralléliser les calculs notamment avec l'utilisation du GPU et du *Cloud*.

Tous ces algorithmes permettent d'aboutir à la reconstruction d'une image super résolue en traitant un nombre, plus ou moins grand, de plans d'acquisition. En effet, afin de parvenir à une image super résolue avec suffisamment de détails, il est nécessaire d'enregistrer une grande quantité d'images (sous forme de pile) afin d'en extraire le positionnement des molécules. Selon le régime de fonctionnement de l'algorithme utilisé, c'est-à-dire la densité de molécules par unité de surface, il

2. Plus simple en terme de calcul.

est nécessaire d'ajuster la taille de la pile. Plus l'algorithme est capable de résoudre un grand nombre de molécules individuelles par image, moins grande sera la taille de la pile à enregistrer et inversement. Cet enjeu n'est pas des moindres. Les images étant traitées dans un format brut, la taille d'un fichier atteint rapidement plusieurs dizaines de giga octets. De même, plus la taille de la pile est grande et plus longue est l'acquisition.

7 Localisation de molécules uniques en microscopie

Sommaire

7.1 Introduction	103
7.2 Algorithme de reconstruction - Fast IHT	105
7.2.1 Fonctionnement	105
7.2.2 Entrées - Sorties	106
7.3 Simulations	107
7.3.1 Génération d'images simulées	108
7.3.2 Localisation des molécules	112
7.3.3 Reconstructions	113
7.4 Données expérimentales	119
7.4.1 Influence de la PSF	119
7.4.2 Données ISBI	121
7.4.3 Neurologine biotynillée AF647	127

7.1 Introduction

Malgré les récents progrès réalisés en microscopie de super résolution, l'imagerie cellulaire en temps réel reste un défi majeur. Basé sur les mêmes opérateurs d'échantillonnage qu'en microscopie conventionnelle, la microscopie de super résolution nécessite logiquement des temps d'acquisition plus longs et il est courant de faire un compromis entre la résolution temporelle et la résolution spatiale du processus d'imagerie. Cependant, les temps d'acquisition restent encore trop longs pour faire de l'imagerie cellulaire super résolue en temps réel. Ces acquisitions génèrent d'importantes quantités de données et impliquent à terme des problèmes de transfert, de stockage et surtout de traitement. Une façon de réduire les temps d'acquisition est d'accélérer les taux de changements d'états des molécules fluorescentes pour faire plus rapidement l'acquisition des piles d'images [86] mais avec pour conséquence

d'augmenter les phénomènes de photo-destructions. Une autre alternative consiste à augmenter la densité des molécules activées afin de récolter plus de molécules uniques par plan d'exposition pour diminuer la taille totale de la pile. Naturellement, on retombe sur le problème de départ puisqu'on obtient de nombreux recouvrements de PSF. Dans ces conditions, les algorithmes de localisation les plus courants ne sont pas capables d'analyser ce type d'images. Différentes méthodes ont été développées pour la localisation de molécules individuelles à haute densité et ont montré la possibilité de retrouver les positions de molécules fluorescentes dans ces conditions tel que l'algorithme DAOSTORM [79] adapté de travaux originalement conçus pour l'observation des champs stellaires et la localisation d'étoiles [3, 130]. Toutefois, ces méthodes ne permettent pas d'augmenter la densité au delà de $2 \mu\text{m}^{-2}$. Récemment, une approche inédite a proposé l'utilisation du CS pour augmenter la densité de molécules par image et ainsi réduire la taille des piles d'acquisition de plusieurs facteurs [151] avec succès jusqu'à $10 \mu\text{m}^{-2}$. Cependant, la complexité informatique (NP hard¹) et le coût de traitement reste important notamment à cause de l'utilisation d'une méthode de points intérieurs très gourmande en ressource informatique. A ce titre, la méthode utilisée ne permet pas de manipuler des images de grandes tailles sans augmenter dramatiquement les temps de reconstruction. En effet, ces premières reconstructions ont été opérées à l'aide du système CVX [62, 63] pour la résolution de programmes convexes où les opérateurs utilisés pour les reconstructions sont de tailles N^2 , avec N la taille des images. On comprend vite que pour des images de grandes tailles, les matrices exprimées deviennent rapidement gigantesques avec des temps de calculs prohibitifs [8] (plusieurs centaines d'heures pour reconstruire des images de taille typiques de $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$).

Notre approche est différente, puisque nous disposons d'un algorithme permettant d'exprimer analytiquement la matrice d'échantillonnage. Ainsi, il nous est possible de procéder à la reconstruction d'images super résolues de plus grandes tailles avec des temps de reconstructions acceptables. Dans cette seconde partie de ma thèse, nous avons utilisé un algorithme de reconstruction que nous avons adapté au problème de reconstruction de molécules uniques en microscopie de fluorescence et ainsi montrer la possibilité donnée par le CS pour réduire la taille des acquisitions STORM avec plusieurs perspectives.

1. Classe des problèmes qui peuvent être résolus en temps polynomial sur une machine non déterministe.

7.2 Algorithme de reconstruction - Fast IHT

7.2.1 Fonctionnement

Le but est d'effectuer une estimation correcte de \mathbf{x} ayant \mathbf{y} et Φ , problème connu pour être NP hard en général mais pouvant être résolu par approximation de la solution en adoptant une des stratégies citées plus haut. Pour cette étude nous avons utilisé un algorithme Iterative Hard Thresholding (IHT) développé par Jérôme BOBIN² et piloté depuis l'interface Matlab. Il permet de reconstruire des signaux à l'aide d'un nombre minimal de mesures en résolvant un problème d'optimisation par régularisation de la norme l_0 du signal³. Il s'agit d'un problème d'optimisation sous contrainte de la forme :

$$\min_x \|\mathbf{y} - \Phi\mathbf{x}\|_2^2 \quad \text{sous la contrainte} \quad \|\mathbf{x}\|_0 \leq K \quad (7.1)$$

c'est à dire que l'on cherche une solution telle que le nombre de coefficients non-nuls du signal soit inférieur ou égale à une certaine valeur, ici le degré de parcimonie du signal. Pour résoudre ce problème d'optimisation, nous dérivons (7.1) en un algorithme itératif de seuillage tel que :

$$x^{[n+1]} = H_K(x^{[n]} + \Phi^T(\mathbf{y} - \Phi x^{[n]})) \quad (7.2)$$

Le fonctionnement général de l'algorithme est assez simple. On part d'une condition de départ avec $\mathbf{x}^{[0]} = \mathbf{0}$ et les itérations suivantes définies par la relation de récurrence (7.2) avec $H_K(\mathbf{a})$ un opérateur non linéaire qui ramène à zéro tous les éléments sauf les K entrées de \mathbf{a} non négligeables : c'est l'opérateur de seuillage (7.3).

$$H_K(x_i) = \begin{cases} 0 & \text{si } |x_i| \leq K \\ x & \text{si } |x_i| > K \end{cases} \quad (7.3)$$

La convergence de ce type d'algorithme est démontrée si $\|\Phi\|_2 < 1$ [16–18]. Dans ce cas, notre algorithme converge en un minimum local de notre problème d'optimisation (7.1). Le fonctionnement et plus précisément les étapes suivies par cette classe d'algorithme est relativement simple.

Il requiert l'application successive des opérateurs Φ et Φ^T à chaque itération. Cette opération est peu coûteuse en terme de mémoires et de ressources informatiques dès

2. CEA Saclay - DSM/IRFU/SEDI/LCS

3. N.B. : Comme défini au chapitre précédent, en réalité il s'agit d'une quasi-norme que l'on nomme norme l_0 par abus de langage.

Algorithme IHT

Initialisation : $x_0 = 0$.

Itérations : Pour $i = 1$; Récurrence $i = i + 1$

Calcul de $x^{[n+1]} = H_K(x^{[n]} + \Phi^T(y - \Phi x^{[n]}))$

Arrêt dès qu'un critère est atteint ou après un nombre d'itérations défini.

lors que l'on peut analytiquement exprimer la forme de l'opérateur d'échantillonnage et sa transposée comme nous l'avons fait.

7.2.2 Entrées - Sorties

L'algorithme requiert un certain nombre d'entrées nécessaires à son fonctionnement dont notamment des paramètres de contraintes de fonctionnement :

- N la taille du signal,
- b le signal sous échantillonné (incomplet ou corrompu) à reconstruire,
- A la matrice ou opérateur d'échantillonnage et A^T sa transposée, sous forme analytique ou matricielle,
- le domaine de parcimonie (le domaine des pixels ou des ondelettes)
- la condition de positivité du signal,
- le nombre maximal d'itérations,
- le seuil de détection,
- la taille du masque d'exclusion.

Les opérateurs d'échantillonnage et sa transposée (A et A^T) constituent la base du fonctionnement de cet algorithme. On parle de pseudo-inverse car le problème n'est évidemment pas inversible au sens strict puisque dans ce cas les matrices seraient par définition carrées et par conséquent le problème serait aisément soluble.

Définition 5 (Matrice hermitienne) *Une matrice H est dite hermitienne si c'est une matrice carrée, à valeurs complexes et égale à la transposée de sa matrice conjuguée.*

Définition 6 (Pseudo-inverse (Moore-Penrose)) *Soit A une matrice complexe de taille (m,n) . On appelle matrice pseudo-inverse de A toute matrice B qui vérifie :*

- $ABA = A$,
- $BAB = B$,
- AB est hermitienne,
- BA est hermitienne.

L'opérateur d'échantillonnage traduit l'opération expérimentale d'acquisition. Dans notre investigation, l'opérateur d'échantillonnage A est constitué de deux sous-opérateurs. Le premier traduit la réponse impulsionnelle du microscope, c'est à dire le résultat de diffraction de la lumière par l'objectif qui donne l'image d'un point source (une molécule unique fluorescente) une tâche d'Airy, ici considérée comme une fonction gaussienne (7.6). Le second opérateur modélise le phénomène de sous-échantillonnage spatial de l'image qui traduit l'acquisition d'une image basse résolution par le détecteur. Ainsi, l'opérateur pseudo-inverse (dans notre cas sa transposée) effectue les opérations pseudo-inverses et matérialise l'opération de « déconvolution » de la PSF puis le changement d'espace de basse résolution vers l'espace de super résolution. Chaque itération de l'algorithme fait appel à ses deux opérateurs qui itération par itération affine le résultat pour converger vers la valeur optimale du problème (7.1) de minimisation de la norme l_0 du système. L'option du domaine de parcimonie permet de privilégier un espace de parcimonie selon la configuration du problème et surtout de la nature des données que l'on traite. En pratique, le domaine de super résolution est le domaine de parcimonie de notre signal qui est, par essence, positif puisqu'il s'agit de l'énergie portée par les photons à l'interface du détecteur CCD. Le nombre d'itérations est fixé en fonction de la vitesse de convergence du système. Le seuil de détection, bien que modulable est fixé empiriquement. Ainsi, une fois paramétré, l'algorithme réalise le nombre d'itérations commandé et donne en sortie le résultat de la récurrence sous forme d'une matrice que l'on interprète comme une image super résolue.

Afin de valider l'utilisation de cet algorithme, à l'origine non spécifique au problème de super résolution, j'ai effectué une première phase de tests sur des objets simulés dont je détaille le principe dans la section suivante.

7.3 Simulations

Nous avons vu, au chapitre 4, que le CS est un outil puissant et une nouvelle approche lorsque les signaux d'intérêts ont une représentation parcimonieuse ou peuvent prendre une telle représentation par projection de ses coefficients dans une base appropriée. Dans ce cas, le CS permet de reconstruire le signal à partir de mesures fortement bruitées (ou corrompues) et incomplètes (sous-échantillonnées). Ainsi, on pose souvent le problème sous la forme :

$$\mathbf{y} = \mathbf{A}\mathbf{x} \quad (7.4)$$

où \mathbf{y} représente les mesures corrompues du signal original \mathbf{x} et \mathbf{A} la matrice d'échantillonnage représentative de la fonction qui lie le processus de mesure au signal original.

7.3.1 Génération d'images simulées

Afin de valider le fonctionnement de l'algorithme de reconstruction et d'évaluer ses performances au problème de reconstruction d'images de super résolution il est nécessaire d'effectuer une phase de simulation dans laquelle on génère plusieurs jeux de données permettant de reproduire les différentes conditions expérimentales rencontrées en microscopie STORM. Cette phase nous permet de définir et ajuster correctement les paramètres de notre algorithme pour qu'il soit optimisé à ce type de reconstruction.

Dans un premier temps, nous avons généré un code (Matlab) permettant de simuler des images de hautes résolutions. Ici l'utilisation de Matlab facilite la manipulation des images représentées sous formes matricielles et ainsi établir une correspondance pixel d'image-coefficient de matrice. Le but de cette opération est de pouvoir partir d'un objet dont on maîtrise tous les paramètres (densité de molécules, intensité, distributions, positions etc.). On génère une matrice carrée de 512 pixels de côtés dont la taille du pixel est de 40 nm. Cette taille du pixel est utilisée pour correspondre aux conditions expérimentales que nous avons utilisé. On génère ensuite une distribution aléatoire de molécules, avec une intensité moyenne donnée ($\pm 10\%$). Pour une intensité moyenne de 1000 photons par molécules, on autorise des intensités comprises entre 900 et 1100 photons. Dans la pratique, lors d'acquisitions de super résolution par localisation, on utilise un détecteur de type caméra EMCCD pour collecter les photons émis par la fluorescence. La caméra EMCCD Evolve 512 dont nous disposons annonce un rendement quantique de 90% et dispose d'un système d'amplification relativement linéaire. Le signal mesuré par la caméra est une mesure en niveaux de gris ou ADU (Analog to Digital Unit) qu'il est alors intéressant de pouvoir convertir en nombre de photons pour simuler une situation expérimentale courante. Une bonne approximation de cette conversion est donnée par la relation (7.5).

$$N_{\text{ph}} = \frac{I_{\text{ADU}} \times g_a}{G_{e^-}} \quad (7.5)$$

où I_{ADU} est le signal mesuré par la caméra en ADU, g_a est le gain analogique exprimé en nombre d'électrons par ADU et G_{e^-} est le gain EM de la caméra exprimé en nombre d'électrons par photons incidents.

Configuration	Gain mesuré (e^-/ADU)
1	11,7
2	6,7
3	3,2

TABLE 7.1 – Tableau des gains analogiques pour la caméra EMCCD Evolve 512 Photometrics.

Le tableau 7.1 récapitule les valeurs des gains analogiques pour la caméra EMCCD Evolve 512 (données extraites du manuscrit de thèse de Adel Kechkar). Il vient alors une correspondance des intensités enregistrées par la caméra avec le nombre réel de photons pour une valeur du gain analogique de $11,7 e^-/ADU$ et un gain EM égal à $300 e^-/photons$ (cf. tableau 7.2).

I_{ADU} (ADU)	N_{ph} (photons)
5000	200
25000	1000
75000	3000

TABLE 7.2 – Tableau de correspondance de quelques valeurs d'intensité avec le nombre de photons.

Ainsi, on peut générer plusieurs jeux de données pour différentes densités de molécules par plan d'acquisition et différentes valeurs de SNR en fonction du nombre de photons. Notons que l'on applique la conversion (7.5) en dernier lieu (après avoir appliqué le bruit de photons). Pour éviter d'éventuels problèmes liés à la présence de molécules sur les bords des images, on crée un masque à 16 pixels des bords de l'image générée. On obtient alors une zone d'exclusion dans laquelle on ne permet pas la présence de molécules individuelles (cf. figure 7.1).

Cette image de haute résolution que l'on vient de générer devient notre base de travail. La taille des images, la zone d'exclusion, la distribution en intensité ou encore la densité de molécules sont des paramètres que l'on peut modifier en fonction de ce que l'on cherche à étudier précisément (cf. figure 7.3).

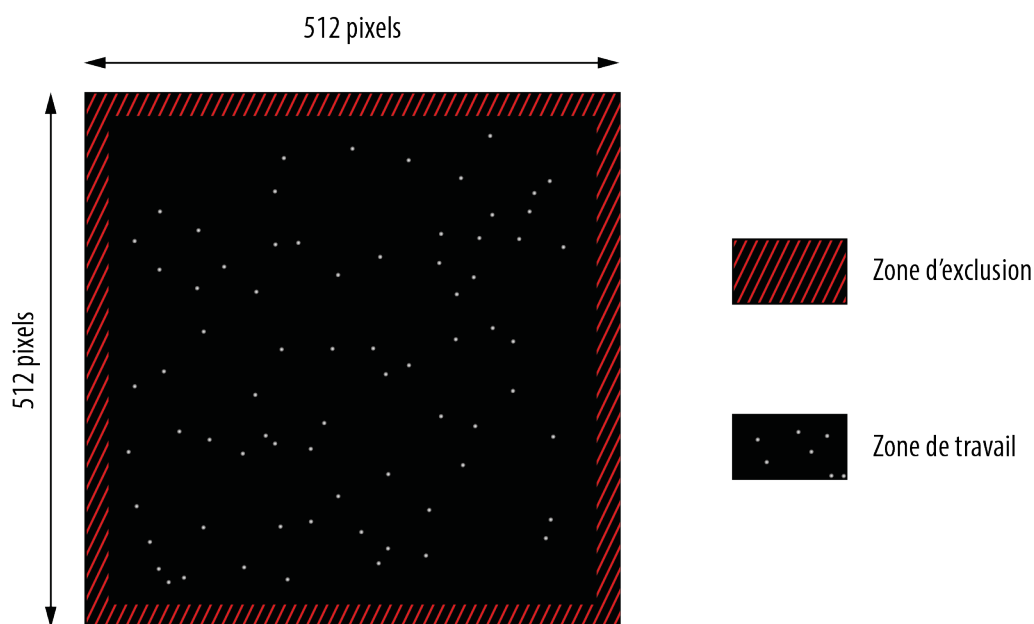


FIGURE 7.1 – Représentation schématique de la zone d'exclusion des molécules

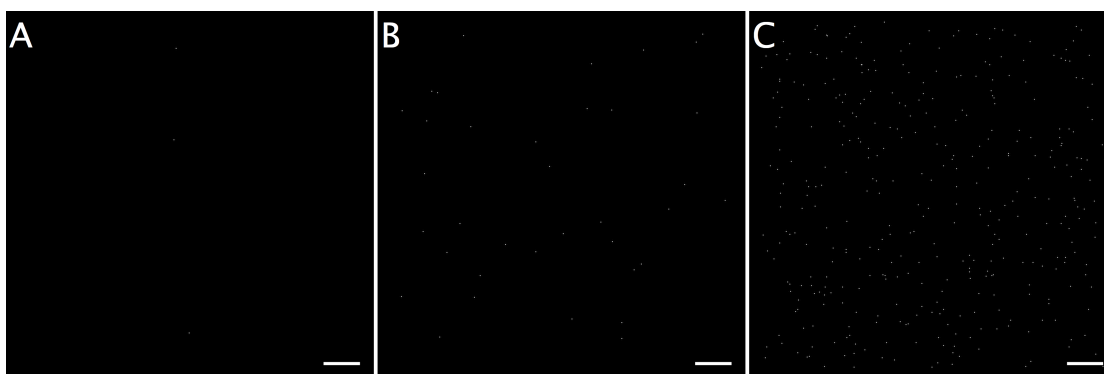


FIGURE 7.2 – Contrôle de la densité de molécules. Barre d'échelle, 2 μm . Exemples de densités égales à : A) 0,01 μm^{-2} , B) 0,1 μm^{-2} et C) 1 μm^{-2} sur des images de 512 pixels de côtés.

Dans un second temps, on applique la réponse impulsionnelle du microscope sous la forme d'un filtre gaussien dont on peut paramétrer avec exactitude la déviation standard selon les caractéristiques physiques du matériel utilisé expérimentalement (objectif).

On privilégie le modèle gaussien qui s'ajuste le mieux aux modèles de PSF expérimentales en comparaison du modèle classique d'Airy en raison de l'utilisation de

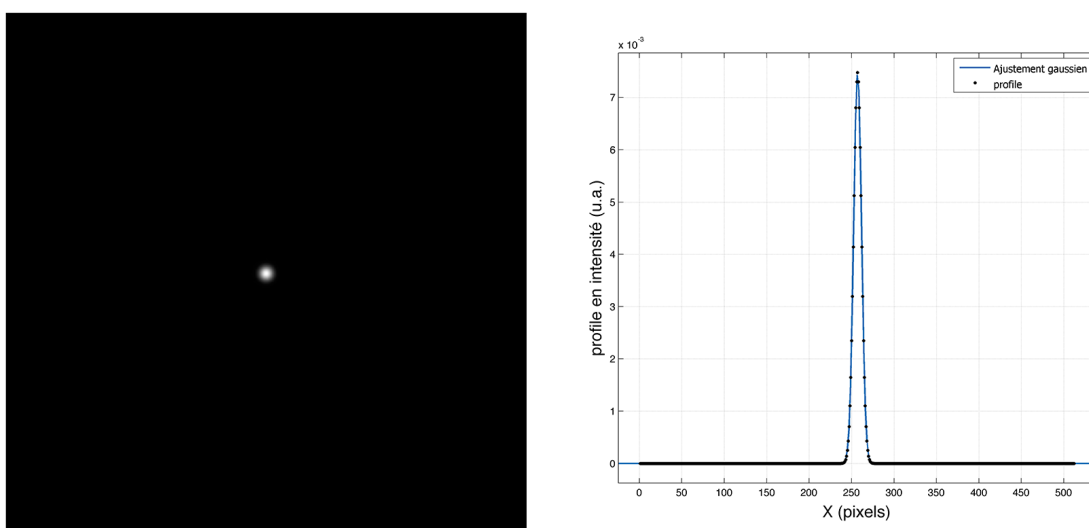


FIGURE 7.3 – Génération d’une PSF de modèle gaussien. A : Représentation 2D de la PSF appliquée aux images hautes résolutions, B : Profilé de la PSF et son ajustement gaussien.

grandes ouvertures numériques [128]. On utilise donc un modèle de PSF simplifié modélisé par une fonction gaussienne de la forme (7.6).

$$\text{PSF}(x) = I_0 \exp \left[- \left(\frac{x - c}{\sqrt{2}\sigma} \right)^2 \right] \quad (7.6)$$

où I_0 est l’intensité maximale (nominale), c le centre de la gaussienne et σ sa déviation standard (écart type). Afin de préserver la distribution en intensité des molécules uniques, on veille à choisir I_0 de sorte que l’intégrale de la PSF ne modifie pas le nombre de photons par molécule. Enfin, afin de se ramener à une image basse résolution on applique un opérateur de réduction à l’image qui moyenne les pixels par 4 pour obtenir une image carrée de 128 pixels de côtés dont la taille de pixel est égale à 160 nm. Bien que Matlab permette de réduire et agrandir la taille d’une image (via la commande *imresize*), il faut s’assurer que l’opération soit pseudo-inversible ce qui n’est pas le cas de cette fonction qui agit par interpolation. J’ai donc créé une matrice M qui permet la réduction et l’agrandissement d’images. C’est l’opérateur qui permet de passer de l’espace basse résolution vers l’espace de super résolution. Prenons un exemple d’une image 512×512 pixels que l’on souhaite réduire en une image 128×128 pixels en moyennant par 4 pixels connexes (à la manière de l’opération de binning des pixels d’une caméra CCD). Cela correspond à un facteur de réduction (ou d’agrandissement) égale à 4. La construction de la matrice M et sa transposée permet une parfaite symétrie de l’opération (7.7).

$$M = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 1 & & & & & & & & & & \vdots \\ \vdots & & & & & & & & \ddots & & & & & & & & & \vdots \\ \vdots & & & & & & & & & & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 1 \end{pmatrix} \quad (7.7)$$

C'est une matrice rectangulaire (pseudo-inverse), ici une matrice (128, 512), où le nombre de 1 par ligne est défini par le coefficient d'agrandissement (ou de réduction) que l'on souhaite appliquer. Dans notre cas précis, chaque ligne contient un bloc horizontal de quatre 1 consécutifs répété le long d'une diagonale modifiée. Ainsi, si on note S la matrice de super résolution, on obtient B la matrice de basse résolution par l'opération (7.8).

$$M \times S \times M^T = B \quad (7.8)$$

Ensuite, les images basses résolutions sont bruitées par application d'un bruit poissonien généré à partir des données de l'images afin de simuler le bruit de photons. La dernière étape consiste à ajuster les intensités en fonctions des paramètres réalistes de conversions de photons en intensité ADU réalisées par la caméra.

7.3.2 Localisation des molécules

Afin de comparer les résultats de reconstructions à l'objet initial, j'ai utilisé une collection d'algorithmes, essentiellement *pkfnd* et *cntrd* (disponibles sur la plateforme collaborative d'échange Mathworks), créées et adaptées aux images de microscopie de fluorescence par Eric R. Dufresne (Yale University) et inspirées des travaux de Crocker et Grier [42] sur la détection de micro-sphères. Elles permettent, entre autre, de récupérer très facilement les coordonnées de localisation des molécules reconstruites ainsi que leur intensité. De cette manière il devient aisé de comparer le nombre de molécules reconstruites mais aussi de quantifier les erreurs sur la précision de localisation après reconstructions.

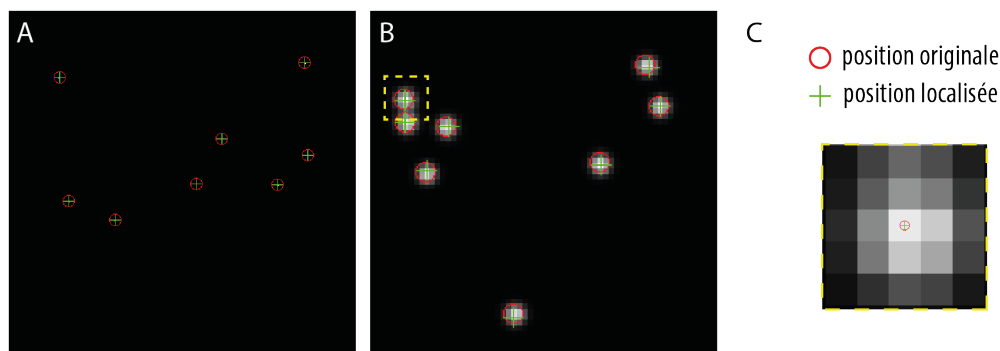


FIGURE 7.4 – Comparaison de la localisation par la routine *pkfnd* aux positions originales sur des données simulées. (A) Exemple de localisation sur des molécules dans l'espace de super résolution, où les positions coïncident parfaitement. (B) et (C) La détection est également possible dans l'espace basse résolution.

Cette phase de localisation des molécules est totalement indépendante du processus de reconstruction. Elle sert uniquement à évaluer la performance de nos reconstructions en localisant les positions des molécules après reconstruction avec la possibilité d'en extraire les coordonnées.

7.3.3 Reconstructions

Dans un premier temps il est nécessaire d'étudier plusieurs paramètres de l'algorithme pour définir une base commune à toutes les reconstructions et fixer définitivement ces paramètres. On garantit ainsi une homogénéité de traitement des données pour assurer un procédé non adaptatif. Plusieurs paramètres peuvent être fixés au préalable tel que le domaine de parcimonie (domaine des pixels) ainsi que la contrainte de positivité des résultats (grâce à la nature du phénomène physique observé). De même, le seuil de détection est fixé à une valeur (empirique) de 3. Afin de déterminer le nombre d'itérations nécessaires et suffisants, nous avons évalué le nombre de molécules identifiées en fonction du nombre d'itérations.

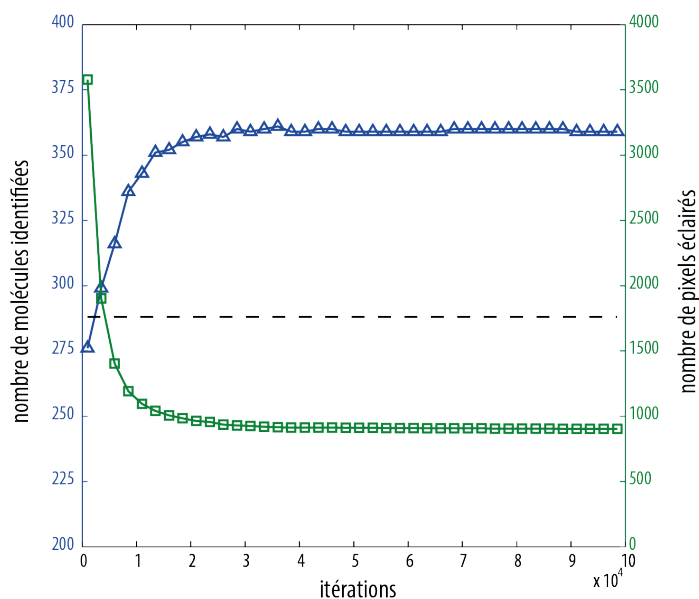


FIGURE 7.5 – Évolution du nombre de molécules identifiées en fonction du nombre d'itérations. Reconstructions effectuées à partir d'une image simulée à une densité de $2 \mu\text{m}^{-2}$ (soit 288 molécules). La courbe bleue représente le nombre de molécules identifiées après reconstruction, en vert la courbe représente le nombre de pixels total d'intensité non nulle.

Les courbes obtenues sur la figure 7.12 montrent que l'algorithme reconstruit plus de molécules que le nombre réel de molécules présentes et fini par converger vers une solution qui n'évolue presque plus au delà de 2000 itérations. Dans un même temps, on s'intéresse au nombre de pixels reconstruits, et on constate que leur nombre diminue à mesure que le nombre d'itérations augmente et converge également vers une valeur stable au delà de 2000 itérations. On fixe pour la suite un nombre maximal de 4000 itérations par reconstruction afin de s'assurer d'être dans la phase asymptotique où le nombre de molécules et de pixels reconstruits n'évoluent plus significativement.

Afin d'évaluer la précision des reconstructions nous avons mis en place un système statistique automatisé qui calcule la distance euclidienne entre les positions réelles et reconstruites des molécules individuelles. Seules les molécules dans un rayon de deux pixels autour d'une position réelle sont retenues et considérées comme valables (cf. figure 7.6). Chaque position réelle ne peut être associée qu'à une seule molécule. Si plusieurs molécules reconstruites satisfont à la condition de proximité (disque de tolérance) on retient la molécule dont la distance, à la position réelle, est la plus faible. Les molécules en dehors de tout disque de tolérance sont comptabilisées

comme des faux positifs. En revanche, toute molécule réelle (présente dans les données simulées) ne trouvant pas de correspondance dans les données reconstruites est considérée comme un faux négatif [92].

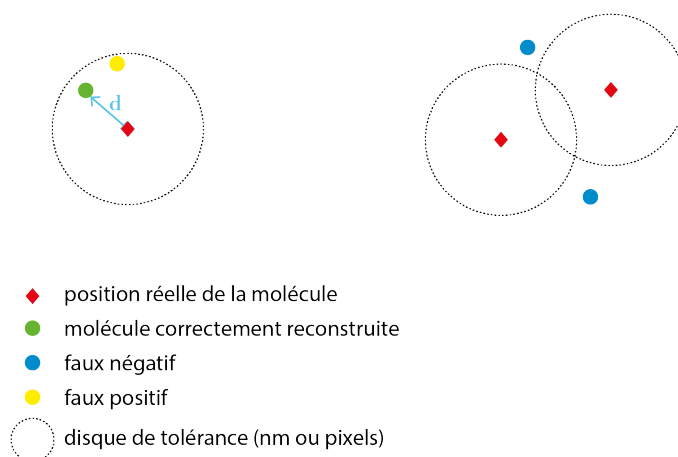


FIGURE 7.6 – Système d'évaluation des reconstructions de molécules uniques.

On définit la grandeur λ , qui correspond à l'opération de seuillage et qui représente également la contrainte de régularisation du bruit de l'algorithme de reconstruction :

$$\lambda = \alpha \langle |x - \langle x \rangle| \rangle \quad (7.9)$$

qui agit sur x sous la forme :

$$x = \begin{cases} 0 & \text{si } |x| \leq \lambda \\ x & \text{si } |x| > \lambda \end{cases} \quad (7.10)$$

Le taux de parcimonie de nos images n'étant pas le même selon la densité de molécules imposée, on s'intéresse à l'influence de la contrainte de régularisation du bruit sur la reconstruction de molécules et ces effets sur le taux de reconstruction. Nous avons généré plusieurs jeux de données correspondant à des densités de molécules de $0,1 \mu\text{m}^{-2}$, $4,5 \mu\text{m}^{-2}$ et $12 \mu\text{m}^{-2}$.

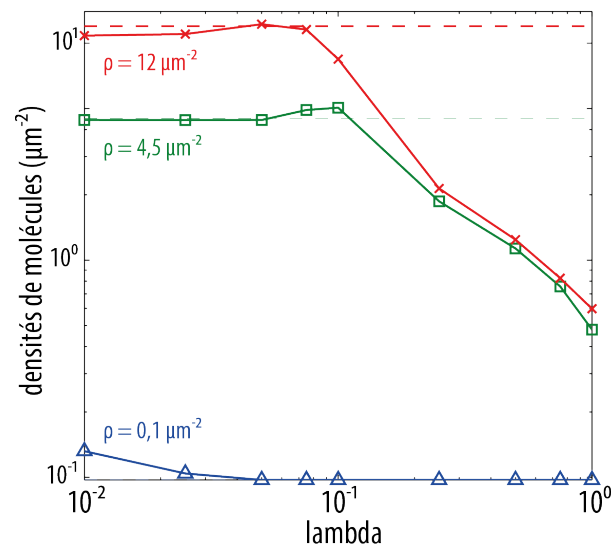


FIGURE 7.7 – Influence de la contrainte de régularisation λ , le seuil, sur le nombre de molécules reconstruites. En bleu, pour une faible densité de molécules ($0,1 \mu\text{m}^{-2}$), en vert pour une valeur intermédiaire ($4,5 \mu\text{m}^{-2}$) et en rouge pour une forte densité ($12 \mu\text{m}^{-2}$).

La valeur de λ permet d'ajuster la contrainte de régularisation du signal à reconstruire par rapport à la valeur moyenne du signal à chaque itération de l'algorithme. Ainsi, en diminuant la valeur de ce paramètre, on diminue la limite du seuil. Inversement, plus on augmente sa valeur, plus le seuil est élevé ce qui se traduit par une forte diminution du nombre de molécules reconstruites puisqu'on perd les molécules dont l'amplitude est moins élevée que la valeur du seuil (cf. figure 7.7). Bien que cette valeur du seuil soit ré-évaluée à chaque itération pour tenir compte de l'écart à l'itération précédente, l'étude quantitative sur ce paramètre nous a ainsi permis de déterminer une valeur optimale pour laquelle la valeur du seuil de départ est suffisante pour reconstruire un nombre de molécules voisins du nombre d'objets initialement générés et en minimisant les échecs induits par l'existence de faux positifs et de faux négatifs. Nous avons choisi d'effectuer le reste des reconstructions en utilisant une valeur de λ égale à 0,025 en maintenant un contrôle attentif des paramètres d'échecs. Ainsi, nous avons pu étudier les performances de reconstructions de notre algorithme sur plusieurs jeux de données différents en faisant varier les valeurs de densités de molécules dans un intervalle compris entre $0,1 \mu\text{m}^{-2}$ et $12 \mu\text{m}^{-2}$.

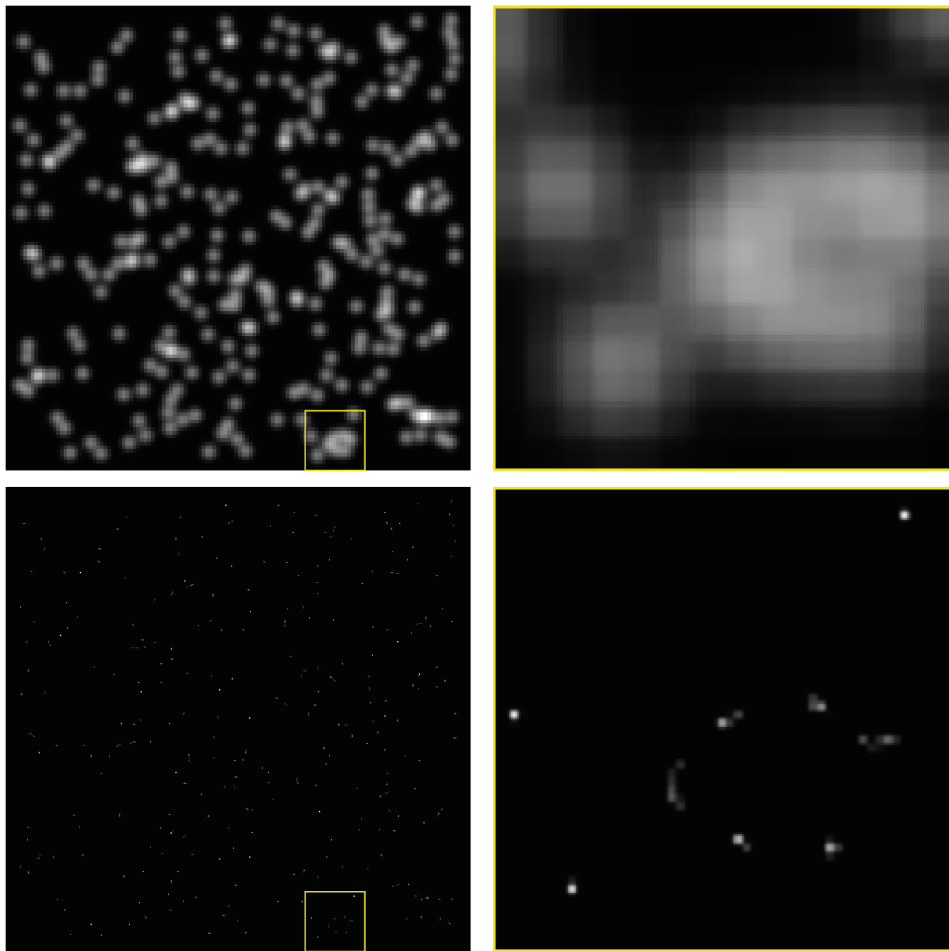


FIGURE 7.8 – Exemple d’une image simulée (en haut) de molécules individuelles qui présentent des recouvrements de PSF. La reconstruction (en bas) permet de correctement estimer la position des molécules uniques même dans cette configuration.

Bien que les images de molécules uniques présentent de forts recouvrements à moyennes et hautes densités (cf. exemple de la figure 7.8), nous avons été capables de correctement reconstruire leur position pour des densités comprises entre $0,1 \mu\text{m}^{-2}$ et $5 \mu\text{m}^{-2}$, ce sont les courbes bleues de la figure 7.9. Elles correspondent aux densités de molécules dont les molécules ont une correspondance à celles de l’image de référence avec une distance inférieure à 80 nm.

Chapitre 7. Localisation de molécules uniques

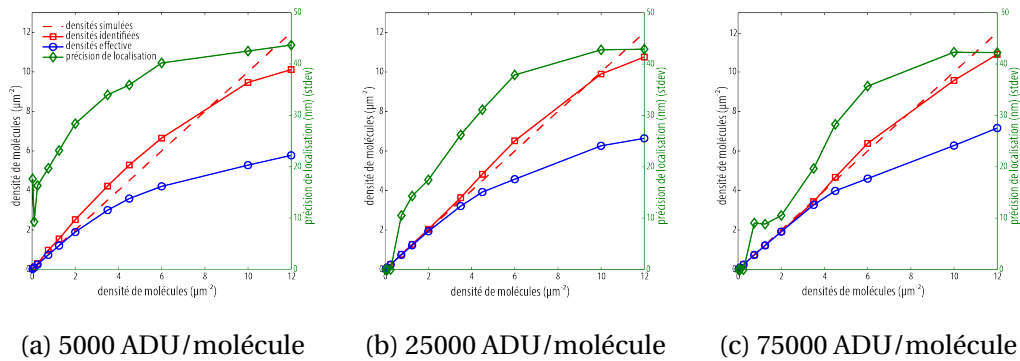


FIGURE 7.9 – Étude de l'efficacité de reconstruction des molécules uniques en fonction de la densité de molécules par image pour trois valeurs moyennes du nombre de photons par molécules.

Nos reconstructions révèlent également une précision de localisation qui reste en dessous de 40 nm et qui est plus petite, à densité égale, en fonction du nombre de photons détectés par molécule (courbes vertes de la figure 7.9). Ce résultat est surtout valable pour les densités les moins élevées, en effet, à partir d'une densité de $6 \mu\text{m}^{-2}$ la précision de localisation n'évolue plus beaucoup, probablement en raison de la grande proximité des molécules entre elles à de telles densités. Ces résultats sont sensiblement équivalents à ceux obtenus par deux autres algorithmes qui exploitent le CS pour la reconstruction de molécules uniques [8, 151].

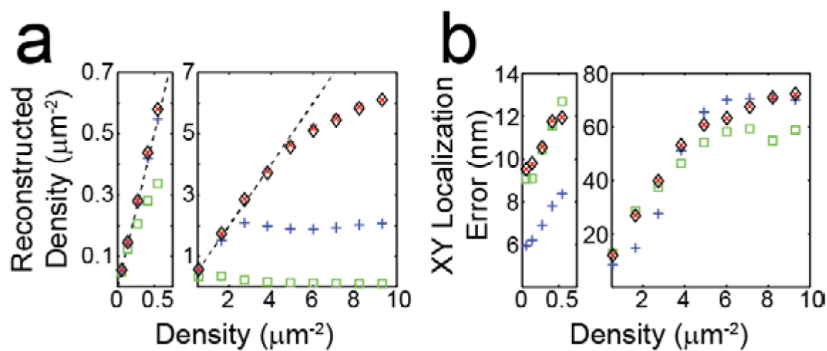


FIGURE 7.10 – Comparaison de reconstructions de molécules uniques en fonction de la densité et de la précision de localisation des algorithmes L1H (croix rouges), CVX (losanges noirs), un algorithme de fitting classique (carrés verts) et un algorithme de fitting de plusieurs émetteurs (croix bleues). (a) Densité reconstruite en fonction de la densité simulée. (b) Précision de localisation en fonction de la densité de molécules. Figure tirée de [8].

7.4 Données expérimentales

Les reconstructions sur données simulées nous ont permis de constituer une base solide de travail et de fixer les différents paramètres de l'algorithme de minimisation pour l'adapter à une large gamme de situations expérimentales et de densités de molécules. Nous avons ainsi pu montrer qu'il est possible, en utilisant le CS, de réduire la taille des piles d'acquisition du type PALM et STORM en augmentant la densité de molécules par plan d'acquisition et donc potentiellement de réduire les temps d'acquisitions. Afin d'étudier le comportement de notre algorithme sur données expérimentales nous avons testé ses performances sur plusieurs jeux de données expérimentales.

7.4.1 Influence de la PSF

Dans notre modèle de reconstruction CS sur données simulées, nous bénéficions de l'accès direct aux caractéristiques de la PSF implantée dans notre matrice d'échantillonnage. Ici, il est possible de calculer la hauteur à mi-largeur (FWHM) de la PSF théorique en utilisant (2.4) et (7.6).

$$FWHM(PSF) = 2\sigma\sqrt{2\ln 2} \quad (7.11)$$

Cette expression est souvent donnée sous forme réduite $FWHM(nm) \approx 2,35\sigma$ et permet d'accéder à la hauteur à mi-largeur d'une gaussienne connaissant son écart-type et inversement à la déviation standard de la gaussienne connaissant sa FWHM. Cependant, même si cette expression nous donne une bonne approximation du modèle de la PSF, elle ne prend pas en compte la réalité expérimentale du montage et de l'acquisition. En effet, le moindre écart, dû à l'expérimentation, aux conditions idéales théoriques engendre des distorsions [91] qui affectent la PSF.

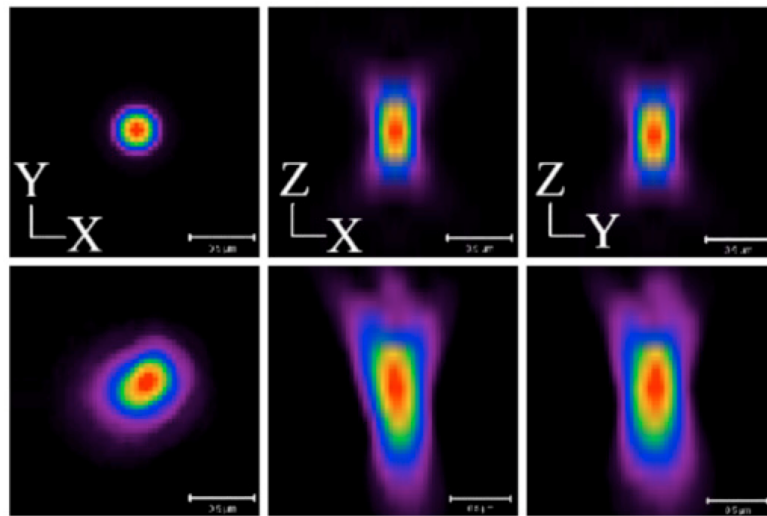


FIGURE 7.11 – Comparaison du modèle théorique et expérimental de la PSF. En haut, trois images d'un PSF théorique parfaitement symétrique selon les trois axes du plan, en bas, la mesure de la PSF expérimentale présente des distorsions dues aux différentes déviations des rayons dans les trois plans de l'espace. Figure provenant de Scientific Volume Imaging fournie par Louis Villeneuve de l'Institut de Cardiologie de Montreal.

La figure 7.11 illustre l'écart d'un modèle théorique au modèle mesuré expérimentalement dans les différents plans de l'espace. Ces écarts sont généralement la conséquence d'aberrations sphériques et notamment dues à l'écart qu'il peut exister entre la valeur de l'ouverture numérique d'un objectif à immersion et l'indice de réfraction réel du milieu d'immersion utilisé. Nous avons voulu étudier l'influence de l'erreur de précision sur les caractéristiques de la PSF utilisée dans notre matrice d'échantillonnage sur les résultats de reconstruction. On effectue plusieurs reconstructions sur une image simulée dont on connaît parfaitement les caractéristiques de la PSF. En faisant varier la largeur à mi-hauteur de la PSF contenue dans la matrice d'échantillonnage (A et A^T), on s'intéresse au nombre de molécules reconstruites pour chaque situation.

On prend l'exemple d'une image simulée de 321 molécules uniques dont la déviation standard de la PSF est égale à 184 nm, soit une largeur à mi-hauteur égale à 433,3 nm. On effectue plusieurs reconstructions de l'image simulée en utilisant différentes valeurs de largeurs à mi-hauteurs implantées successivement dans les matrices d'échantillonnage et sa transposée. La courbe bleue de la figure 7.12A représente le nombre de molécules identifiées après reconstruction pour chacune de ces implantations. On constate que les écarts à la valeur réelle, par valeurs inférieures, engendrent plus d'erreurs de reconstructions qu'une surestimation de la FWHM. En

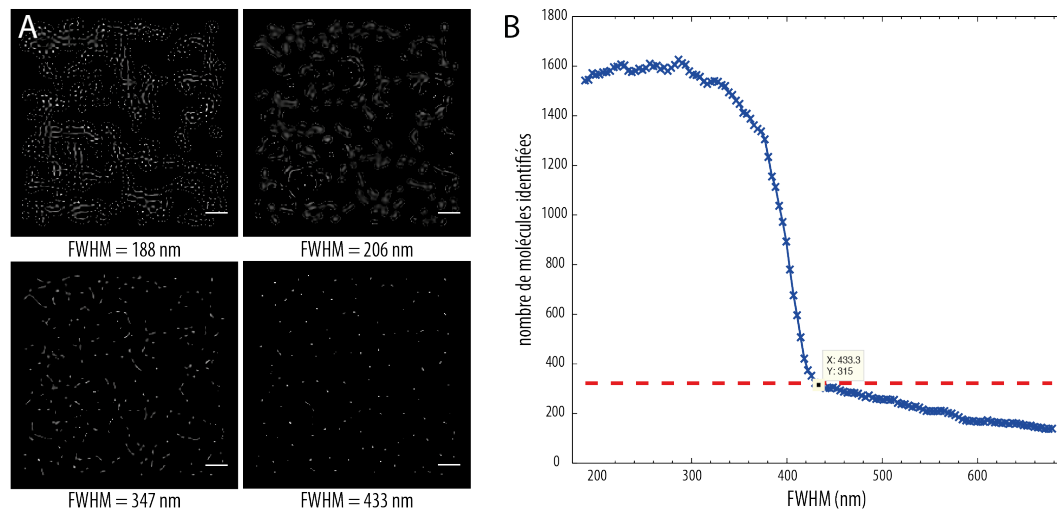


FIGURE 7.12 – Influence de l’erreur sur l’écart type de la PSF sur le nombre de molécules reconstruites. (A) Nombre de molécules uniques identifiées en fonction de la FWHM implantée pour reconstruire une image simulée contenant 321 molécules uniques et une FWHM fixe de 433,3 nm. La courbe bleue indique le nombre de molécules identifiées après reconstruction, la courbe rouge indique le nombre de molécules réellement présentes dans l’image simulée. (B) Aperçu des reconstructions pour quatre valeurs croissantes de la FWHM.

effet, pour des valeurs inférieures, la reconstruction d’une molécule aboutit à une structure circulaire étalée constituée de plusieurs pics d’intensités (cf. 7.12B) qui sont interprétés comme des molécules uniques à part entière lors de l’identification. Plus la valeur de la FWHM se rapproche de la valeur réelle simulée, plus les structures se concentrent et finissent par correctement représenter la position d’une molécule individuelle. Lorsque la valeur implantée coïncide avec la valeur réelle de la FWHM, nous retrouvons un nombre de molécules très proche du nombre réel (intersection des courbes bleue et rouge de la figure 7.12A). Ce nombre diminue ensuite assez linéairement pour des valeurs de FWHM plus grandes. Visuellement (figure 7.12A), certaines positions disparaissent sans modification de la structure des autres molécules individuelles.

7.4.2 Données ISBI

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la reconstruction de molécules uniques à partir de données expérimentales, disponibles sur le site du [Challenge ISBI 2013](#).

Conditions expérimentales		
Cadence de prise d'images	25	ips
Taille des images	128 x 128	pixels
Nombre de plans	500	images
Longueur d'onde d'émission	690	nm
Amplification CCD	1 coup~2photons	pas de gain
Taille du pixel	100	nm
Ouverture numérique	1,3	à immersion d'huile
Bruit thermique de la caméra	100	

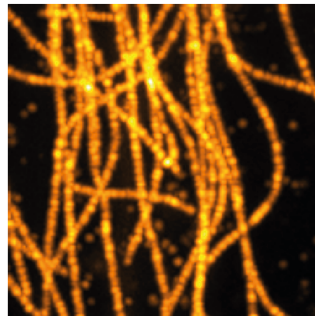


FIGURE 7.13 – Conditions expérimentales d'acquisition des données réelles d'un échantillon de microtubules marqués et aperçu de la projection des 500 plans d'acquisition. Ces données d'acquisition sont fournies par Nicolas Olivier, Debora Keller et Suliana Manley.

Il s'agit d'une pile d'acquisition haute densité constituée de 500 images, d'un échantillon de microtubules marqués, au format 128×128 pixels et une taille de pixel de 100 nm. Afin de constituer une base de comparaison à nos reconstruction, nous avons utilisé plusieurs algorithmes de localisation de molécules, QuickPALM [149], ThunderSTORM [113], CoG (Center of Gravity) et PALM-Tracer [85]. Ce dernier a été en partie développé au laboratoire. Il a la particularité de pouvoir reconstruire et localiser des molécules individuelles en utilisant, au choix, une méthode de *fitting* ou une méthode basée sur le calcul du centroïde des molécules. Les performances de cet algorithme sont parfaitement connues et permettent de l'utiliser comme référence pour comparer les données produites par notre algorithme CS. Nous avons donc procédé à la mesure expérimentale de la PSF des acquisitions réelles (figure 7.13). Cette mesure est réalisée en moyennant la FWHM de la PSF de plusieurs centaines de molécules isolées de l'échantillon. Nous avons ainsi trouvé une valeur expérimentale de l'écart type de 151 nm, valeur supérieure à la valeur théorique de 138 nm, précisément le cas de figure le plus défavorable sur les reconstructions que nous avons étudié dans la section précédente. Cette valeur expérimentale est alors implantée dans la matrice d'échantillonnage pour procéder à la reconstruction des acquisitions. Afin de tester la possibilité de réduction de la taille de la pile d'acquisition, nous avons artificiellement et *a posteriori* créé des piles de plus hautes densités, en sommant par 5, 10, 50, 100 et 500 les différents plans d'acquisition existants (cf. figures 7.14). Nous avons alors procédé à la reconstruction de ces différentes configurations dont nous avons comparé les résultats avec les autres algorithmes. La figure 7.16a présente l'efficacité de reconstruction des différents codes utilisés en fonction du nombre d'images utilisées, c'est à dire pour des nombres de molécules de moins en moins nombreuses par images. Notre algorithme reconstruit systématiquement

quement plus de molécules uniques par rapport aux autres techniques. Rapportées à la densité moyenne par image, la figure 7.16b représente la densité maximale reconstruite en fonction du nombre d'images utilisées. Là encore, on voit que l'algorithme CS que nous avons utilisé donne de meilleures performances à haute densité où les autres algorithmes semblent saturer à une valeur maximale de $1 \mu\text{m}$. La figure 7.15 illustre les reconstructions d'une image par groupe de projections. Bien que le nombre moyen de molécules reconstruites par images diminue à mesure que la densité augmente les reconstructions restent visuellement cohérentes jusqu'au groupement par 5 des images. Au delà, les premiers détails les plus fins disparaissent. De même, on constate sur la figure 7.17 que le niveau de détails fourni par nos reconstructions CS sont plus importants que ceux obtenus par PALM-Tracer sur les données les moins denses utilisant la totalité des 500 images.

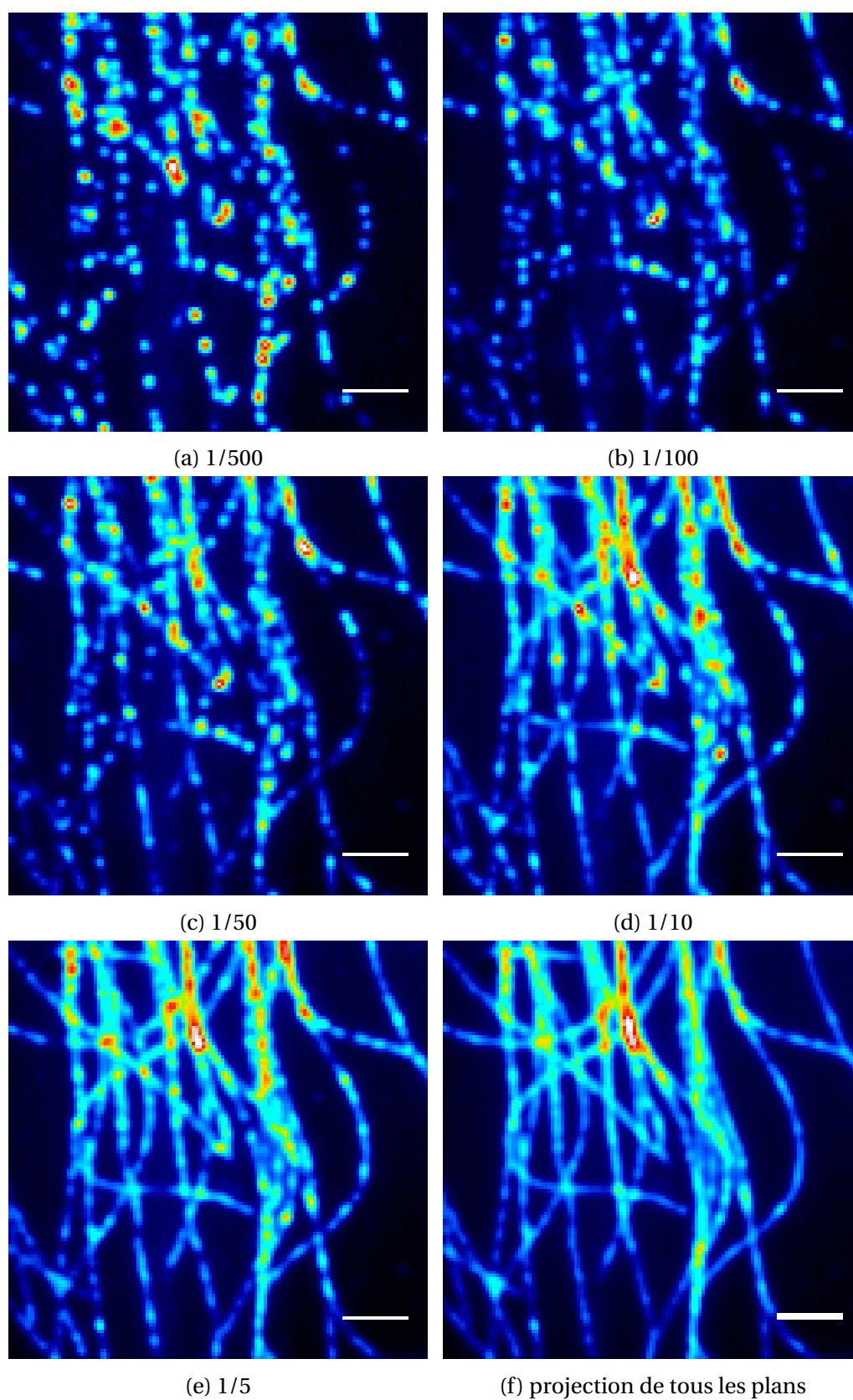


FIGURE 7.14 – Exemples d’images issues de projections par 1, 5, 10, 50, 100 et 500 à partir des données originales. Barre d’échelle : 2 μm .

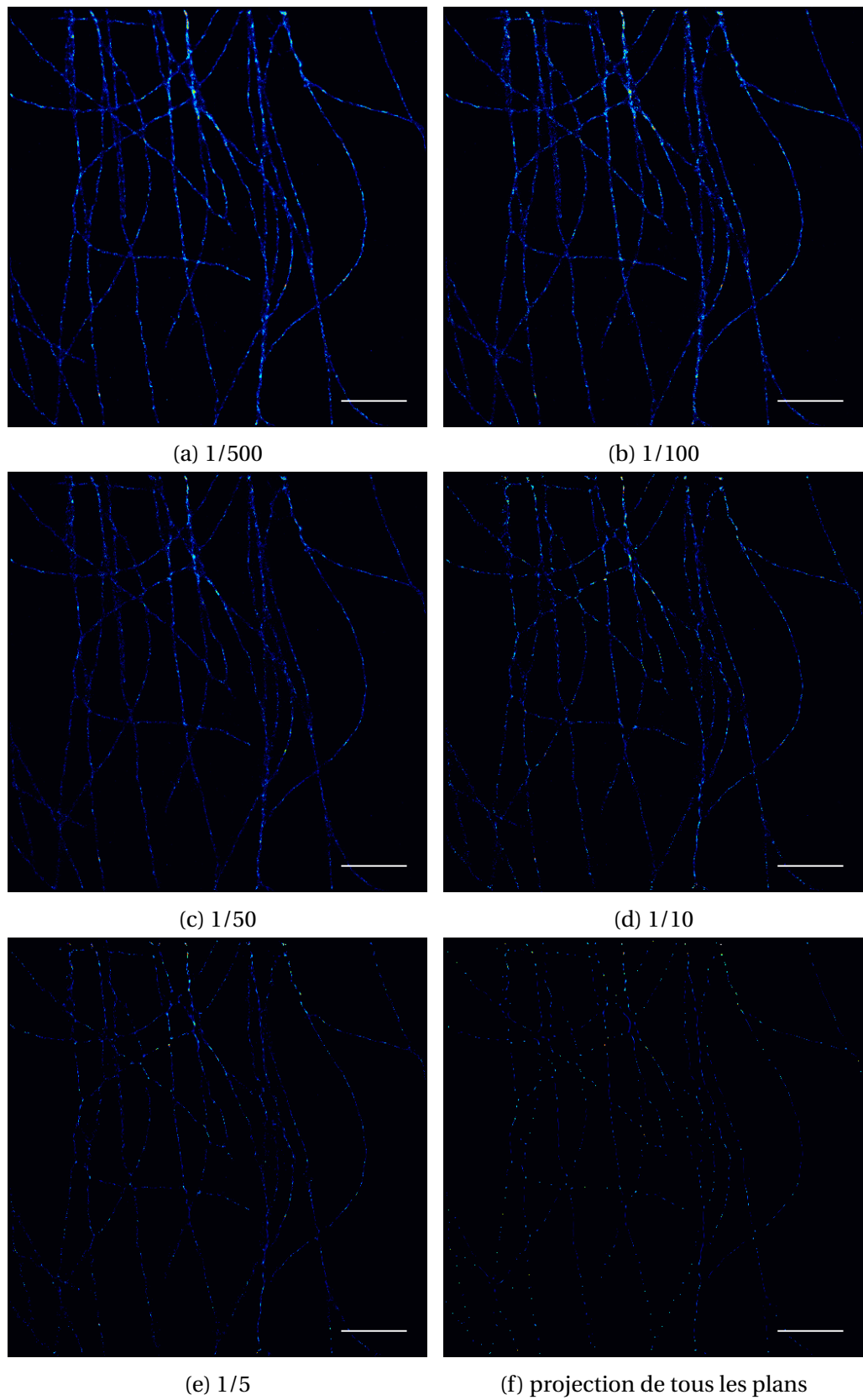


FIGURE 7.15 – Reconstructions super résolues des projections respectives par 1, 5, 10, 50, 100 et 500 images. Barre d'échelle : 2 μm .

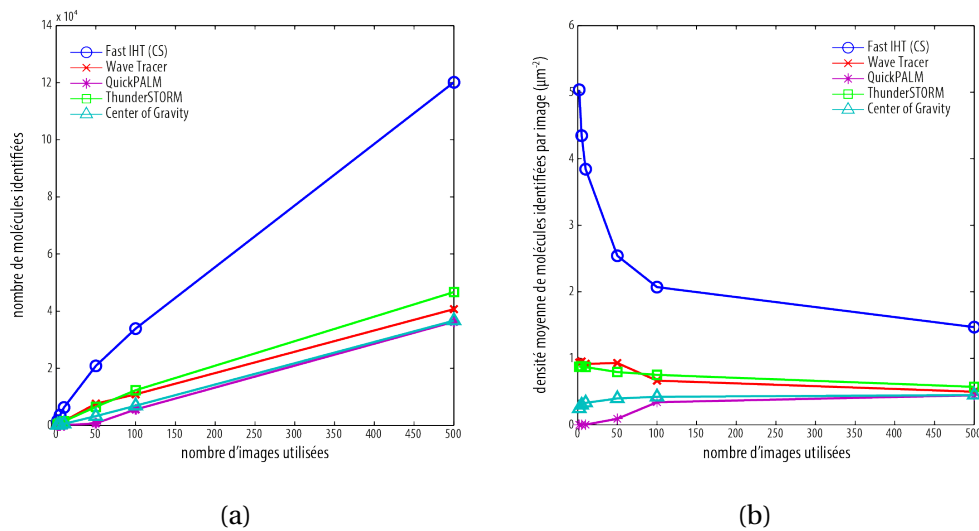


FIGURE 7.16 – Comparaison de l'efficacité de reconstruction des différents algorithmes en fonction du nombre d'images utilisées.

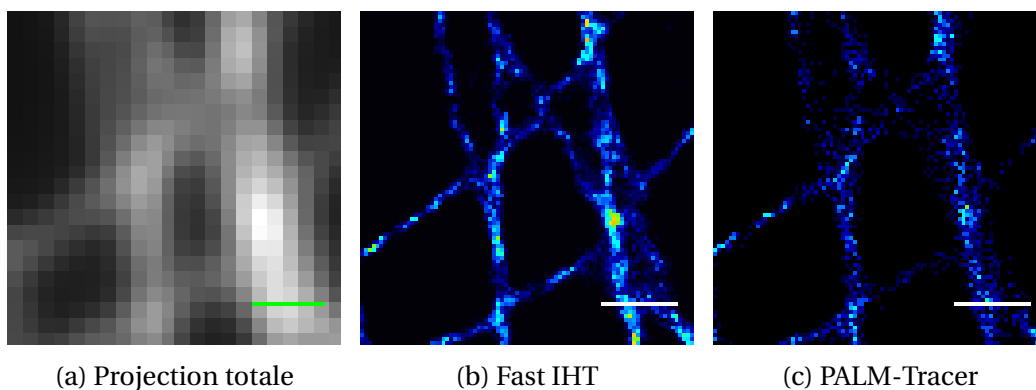


FIGURE 7.17 – 7.17a Agrandissement d'une zone de la projection des 500 images. Comparaison de la reconstruction de la zone sélectionnée 7.17b en CS utilisant les 500 images avec 7.17c une reconstruction réalisée par PALM-Tracer en utilisant le même nombre d'images. Barres d'échelle 500 nm.

L'analyse de la démarche utilisée, c'est-à-dire la projection des différents plans d'acquisition pour démontrer une potentielle réduction des piles d'acquisition PALM et STORM en augmentant la densité par plan, présente potentiellement une sous-estimation des résultats que l'on pourrait obtenir. En effet, en regroupant les plans d'acquisition (après l'acquisition) représente un cas défavorable du traitement des données en terme de bruit. Par exemple, regrouper par projection d'une dizaine d'images, présentant toute une contribution à peu près équivalente du bruit, est certainement moins favorable qu'une acquisition présentant nativement une densité

équivalente à la projection. Aussi, nous avons voulu confronter notre algorithme à cette réalité expérimentale.

7.4.3 Neuroligine biotynilée AF647

Nous avons réalisé l'acquisition dSTORM de cellules neuronales de l'hippocampe, plus précisément de neuroligine biotynilée marquée par la molécule Alexa 647 (échantillon fourni par Ingrid CHAMMA, IINS). La préparation est montée sur une lamelle de verre disposée dans une chambre Ludin (Life Imaging Services). Le montage expérimental est constitué d'un microscope inversé motorisé Nikon Ti-E équipé pour cette acquisition d'un objectif 100X à immersion d'huile et d'ouverture numérique 1,49. Le système d'imagerie est constitué d'une caméra EMCCD Evolve 512 refroidie à -60° directement contrôlée par l'interface MetaMorph (Molecular Device) qui permet de régler les paramètres d'exposition, de gain etc. L'acquisition a été réalisée avec des temps d'exposition de 20 ms par image. Nous avons procédé à l'enregistrement de quatre séquences de 1000 images de tailles 128×128 pixels pour différentes puissances du laser à 405 nm qui permet de contrôler le nombre moyen de molécules individuelles en état de fluorescence par image de la pile.

La valeur du pixel basse résolution est fixée par les conditions expérimentales. En effet, le capteur de la caméra EMCCD Evolve 512 contient une matrice de 512×512 pixels de taille carrée de $16 \mu\text{m}$ de côtés. Utilisé avec un objectif 100X, cela correspond à une taille du pixel caméra de 160 nm dans le plan focal d'observation (valeur un peu plus grande que le pas d'échantillonnage à Nyquist de 136 nm). Nous avons procédé aux reconstructions des images super résolues de taille 512×512 pixels avec une taille de pixel de 40 nm ce qui correspond à un facteur quatre en terme de gain de résolution. Les résultats de reconstruction (cf. figure 7.18) montrent que l'algorithme CS reconstruit une plus grande quantité de molécules uniques dans la plupart des cas. Cependant l'interprétation est rendue compliquée par le manque d'information sur les densités réelles de ces données. En effet, la densité moyenne maximale de molécules est obtenue pour les reconstructions CS (7.18(G)) avec 144903 molécules détectées. Cela représente une densité moyenne maximale de $0,35 \mu\text{m}^{-2}$ qui est une valeur relativement faible de densité et qui ne permet pas de conclure sur l'aspect de reconstructions à haute densité. Aucune procédure n'a encore été établie pour relier la puissance du laser de contrôle utilisée à la densité effective par images. Par ailleurs, la nature de l'échantillon nous suggère une dépendance en z qui constitue une condition expérimentale dégradée ne permettant pas l'utilisation d'une illumination TIRF qui pourrait assurer une section fine avec une moins grande fluctuation de la PSF.

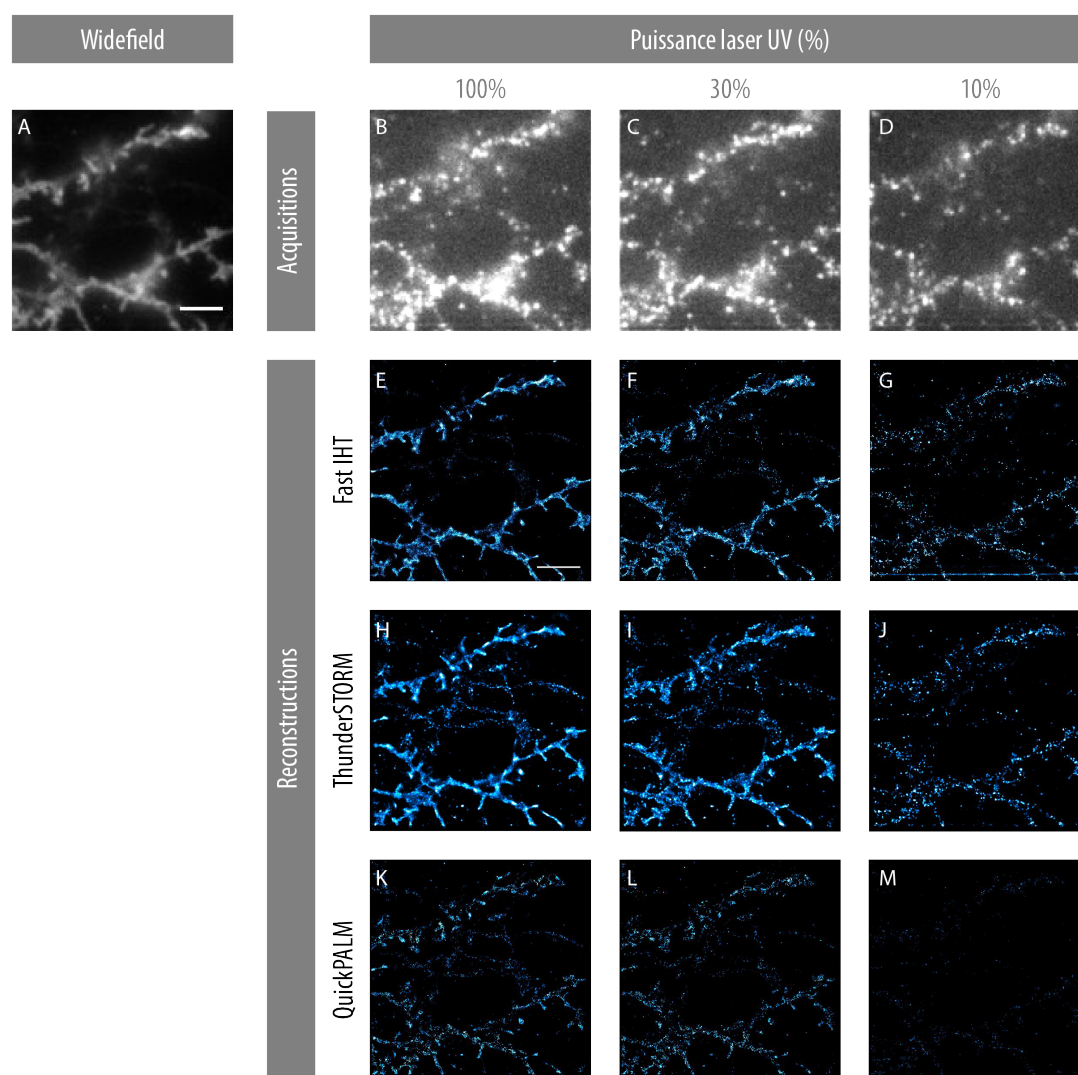


FIGURE 7.18 – (A) Imagerie à champs large de l'échantillon. (B-D) Imagerie dSTORM de l'échantillon pour quatre conditions d'illuminations de contrôle de la densité. (E-G) Reconstructions par l'algorithme Fast IHT. (H-J) Reconstructions par l'algorithme ThunderSTORM. (K-M) Reconstructions par l'algorithme QuickPALM. Barres d'échelles : 4 μm .

Conclusions **Partie**

8 Conclusions et perspectives

Durant ma thèse, je me suis intéressé à l'application du *Compressed Sensing* à la microscopie de fluorescence selon plusieurs modalités avec pour but de proposer une approche totalement nouvelle de l'acquisition en microscopie de fluorescence à champs large. J'ai principalement concentré mes efforts sur une implémentation expérimentale de l'échantillonnage compressif dans le cadre de l'acquisition d'images biologiques qui ont le plus souvent une représentation parcimonieuse dans la base d'observation directe. L'utilisation d'un dispositif de réflexion de motifs structurés, le DMD, joue un rôle central dans cette nouvelle modalité d'acquisition puisqu'il permet la projection de l'image parcimonieuse dans une base d'incohérence où l'information se retrouve étalée. Ce système, intégré à l'illumination en champs large du microscope et couplé à un système de détection à pixel unique constitue un nouveau dispositif d'imagerie par échantillonnage compressif. Cette nouvelle approche autorise des gains considérables de bande passante d'acquisition, conséquence de l'acquisition compressée (directe) des signaux, très en dessous du schéma classique dicté par le théorème de l'échantillonnage (Shannon Nyquist). Nous avons ainsi démontré la faisabilité de ce schéma d'acquisition avec des taux de compression jusqu'à 32 pour des images de 256×256 pixels à partir d'échantillons simples (billes fluorescentes). De même, nous avons complété cette étude en démontrant l'efficacité de ce système en utilisant des échantillons plus pertinents pour la biologie (cellules). Nous avons alors atteint des taux de compression un peu plus modestes allant jusqu'à 15. Nous avons mis en évidence plusieurs facteurs limitants. L'étude de l'influence de l'intensité détectée sur la qualité des reconstructions a montré une dépendance nette de l'illumination sur le taux de compression. Ainsi, on atteint des taux de compression plus petits pour des intensités d'illumination plus faibles. De même, les distorsions (artefacts) et la perte d'information touche en premier lieu les éléments les moins intenses au sein d'un même échantillon. L'autre limitation importante provient de l'excitation des tranches les plus profondes des échantillons biologiques qui produisent une fluorescence hors focus et non modulée par les motifs

d'illumination. Enfin, il est évident que la parcimonie de ces structures est plus faible et contribue à limiter la compression. Ces taux de compression significatifs nous ont conduit à exploiter le gain de bande passante d'acquisition pour faire de l'imagerie hyperspectrale. C'est une modalité très attrayante pour la biologie et notamment l'étude des interactions de plusieurs protéines différentes au sein d'un même échantillon et d'une même acquisition. Nous avons remplacé le détecteur à point unique par un spectroscopie associé à une caméra pour enregistrer les spectres de fluorescences d'échantillons fluorescents. Cette nouvelle modalité a montré la possibilité d'atteindre des taux de compression allant jusqu'à 64 sur des images de billes fluorescentes de différentes couleurs. L'introduction d'une dimension supplémentaire autorise des taux de compression plus importants par l'introduction de plus de redondance dans le signal. La prise en charge des mesures sous forme d'un cube $2D-\lambda$ permet alors d'exploiter la parcimonie spatiale mais également spectrale du signal, résultat prévisible en CS et qui favorise les acquisitions multi-dimensionnelles. L'étude hyperspectrale sur des échantillons plus pertinents pour la biologie (des cellules) n'a cependant pas positivement abouti et n'a pas donné de résultats exploitables. L'identification de plusieurs facteurs limitants laisse entrevoir plusieurs améliorations expérimentales et logicielles. Cette approche basée sur l'implantation du CS à la microscopie de fluorescence (monochrome) constitue une solution très efficace avec des gains de bandes passantes d'acquisition considérables. Il s'agit aussi d'une sérieuse alternative et moins coûteuse avec l'avènement de dispositifs DMD de moins en moins onéreux et le prix raisonnable des détecteurs à point uniques (alternative applicable dans d'autres domaines où l'utilisation d'un détecteur CCD n'est pas possible ou trop coûteuse). La détection hyperspectrale en CS est également une approche très intéressante notamment pour la biologie et est particulièrement bien exploitée par la théorie du CS qui tire partie de la redondance accrue des signaux multidimensionnels. Dans les deux cas, l'amélioration de l'instrumentation, l'accélération des reconstructions (parallélisation multi-CPU et GPU) et l'utilisation d'une nouvelle classe d'algorithmes (approche bayésienne) pourront constituer une solide base pour l'utilisation de ce type de dispositif en imagerie de microscopie à temps réel. Une autre perspective que nous souhaitons développer concerne l'application du CS à la microscopie hyperspectrale de super résolution par localisation de molécules uniques. Cette perspective a conduit mes recherches à se tourner vers la microscopie de super résolution qui est le deuxième volet de cette thèse.

Dans ce deuxième volet de ma thèse, je me suis intéressé à l'application de l'échantillonnage compressif à la microscopie de super résolution par localisation de molécules individuelles. Cette approche très récente de la microscopie de super résolution propose plusieurs alternatives aux schémas de reconstructions proposés par les différentes techniques conventionnelles (localisation par ajustement gaussien ou

par estimation du centroïde). De nombreux efforts ont permis de développer des solutions logicielles de traitements rapides des données pour la reconstruction d'images super résolues, notamment par la parallélisation massive de calculs (multi-CPU, GPU) que permettent ces techniques. De l'autre côté, les temps d'acquisition n'évoluent pas aussi vite et constituent un véritable obstacle à l'étude dynamique des protéines et des interactions qui règnent entre les plus petites molécules d'une cellule. L'utilisation de l'échantillonnage compressif dans ce contexte a montré dans une étude récente la possibilité de réduire la taille des acquisitions en augmentant la densité de molécules par images. Ces premiers résultats, bien qu'encourageant, souffre d'une extrême complexité de temps de calculs et nécessitent de grandes ressources informatiques. Nous avons voulu explorer cette voie en utilisant une nouvelle classe d'algorithme permettant de fortement réduire les temps de calculs tout en conservant un haut degré de précision. Nous avons alors développé une phase de simulations avec pour but de recréer les conditions expérimentales sur des données dont on maîtrise les paramètres de densité, d'intensité et de positions afin de correctement adapter notre algorithme de reconstructions à la problématique bien particulière de localisation de molécules uniques. Dans un premier temps, ces simulations nous ont permis d'évaluer l'efficacité de nos reconstructions et nous avons réussi à porter à $6 \mu\text{m}^{-2}$ la densité de molécules correctement reconstruite, soit près de cinq fois plus que ne le permettent les techniques basées sur la localisation par ajustement gaussien ou par calcul du barycentre. En effet, les forts recouvrements de PSF des molécules individuelles à des densités moyennes et élevées, ne sont pas compatibles avec les techniques conventionnelles qui n'arrivent tout simplement pas à résoudre ce type de problème. De même, notre méthode est beaucoup plus rapide que la première étude qui a proposé ce nouveau schéma (CS) de reconstructions pour la première fois et avec des précisions de localisation très comparables aux techniques par ajustement gaussien qui sont connues pour donner les meilleurs résultats en terme de précision.

Nous avons mis en évidence l'importance de la prise en charge précise du modèle de la PSF dans cette nouvelle modalité où de faibles écarts du modèle implanté dans notre algorithme a des conséquences très importantes et peut se traduire par une dégradation significative des reconstructions.

Nous avons également démontré que ce schéma, bien qu'utilisé ici pour augmenter la densité de molécules uniques par plan d'acquisition, reste valable aux plus faibles densités avec d'excellents résultats alors qu'il s'agit d'un cas normalement défavorable pour le CS. En effet, nous avons vu qu'une des clés de son utilisation réside dans la nécessité d'échantillonner le signal dans une base de représentation non parcimonieuse pour pouvoir le reconstruire sous sa forme parcimonieuse, avec une efficacité dépendant justement de l'incohérence des bases utilisées. Ce résultat

suggère qu'il est potentiellement envisageable de réduire encore la quantité d'information prélevée lors du processus d'acquisition pour libérer une partie de la bande passante d'acquisition.

Cette phase de simulation nous a permis de fixer une base de travail pour correctement envisager la reconstruction de données réelles. La première étude a clairement montré la possibilité de réduire la taille des piles d'acquisition STORM en augmentant la densité de molécules présentes sur chaque image. Nous avons montré qu'en regroupant les images d'acquisition par dix (sur une acquisition présentant déjà des hautes densités pour les schémas traditionnels), on continue à pouvoir reconstruire des images super résolues tout en maintenant un haut niveau de détails. Au delà, la structure générale est conservée mais ne permet plus de distinguer les détails les plus fins.

La dernière étude a consisté à réaliser l'augmentation de densités de molécules directement dans la phase d'acquisition. En effet l'augmentation de la densité, a posteriori, pose le problème de la prise en charge du bruit qui n'est plus réaliste et même défavorable puisqu'on somme leurs contributions. Cette dernière étude n'a pas permis d'aboutir à des résultats significatifs puisque nos résultats montrent que nous n'avons pas réussi à maîtriser le contrôle expérimental de la densité de molécules aussi facilement qu'on l'imaginait.

Toutefois, nous avons montré que nos résultats sont comparables aux autres méthodes classiques à basses densités, et nous avons également mis en évidence l'atout de cette nouvelle approche pour la reconstruction d'images super résolues en présence de densités de molécules plus importantes.

Nous avons déjà envisagé la poursuite de l'étude de cette approche en étendant le schéma à l'acquisition multi-dimensionnelle. En effet, un aspect très attrayant pour la microscopie de super résolution consiste à pouvoir imager plusieurs marqueurs fluorescents en même temps, pour étudier les interactions de différentes protéines au sein d'un même échantillon. Une solution consiste à utiliser un système 4Pi permettant, d'une part, l'observation classique d'un échantillon contenant plusieurs marqueurs fluorescents différents et, d'autre part, l'observation simultanée à travers un prisme permettant d'induire un décalage lié à la dispersion des longueurs d'onde. L'étude comparative de ces jeux de données doit permettre de différencier les différentes molécules et de préciser leur couleur. Un autre aspect pourra également être développé pour la reconstruction de molécules en trois dimensions qui est aussi potentiellement un cas d'application où le CS doit permettre d'obtenir de bons résultats en tirant partie de la redondance introduite par les dimensions supplémentaires. Cette nouvelle étude constitue une approche originale et une modalité très intéressante pour la biologie des fonctions cellulaires qui doit pouvoir à elle seule constituer la base d'une future publication.

Bibliographie

- [1] The Nobel Prize in Chemistry 2014. *The Royal Swedish Academy of Sciences*, pages 1–1, October 2014.
- [2] Ernst Abbe. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung - Springer. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 1873.
- [3] Amit Agrawal, Rajesh Deo, Geoffrey D Wang, May D Wang, and Shuming Nie. Nanometer-scale mapping and single-molecule detection with color-coded nanoparticle probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(9) :3298–3303, March 2008.
- [4] R Ando. Regulated Fast Nucleocytoplasmic Shuttling Observed by Reversible Protein Highlighting. *Science*, 306(5700) :1370–1373, November 2004.
- [5] D Axelrod. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *The Journal of cell biology*, 89(1) :141–145, April 1981.
- [6] Daniel Axelrod. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic*, 2(11) :764–774, 2001.
- [7] Daniel Axelrod, Thomas P Burghardt, and Nancy L Thompson. Total internal reflection fluorescence. *Annual review of biophysics and bioengineering*, 13(1) :247–268, 1984.
- [8] Hazen P Babcock, Jeffrey R Moffitt, Yunlong Cao, and Xiaowei Zhuang. Fast compressed sensing analysis for super-resolution imaging using L1-homotopy. *Optics Express*, 21(23) :28583, 2013.
- [9] Baraniuk. Compressive Sensing [Lecture Notes]. *Signal Processing Magazine, IEEE*, 24(4) :118–121, 2007.
- [10] R G Baraniuk. More Is Less : Signal Processing and the Data Deluge. *Science*, 331(6018) :717–719, February 2011.
- [11] Michael Bass, Eric W Van Stryland, David R Williams, and William L Wolfe. Handbook of Optics Volume I Fundamentals, Techniques, and Design 2nd edition. *Handbook of Optics Volume I Fundamentals*, I, 1995.

Bibliographie

- [12] Stephen Becker, Jérôme Bobin, and Emmanuel J Candes. NESTA : A Fast and Accurate First-Order Method for Sparse Recovery. *SIAM Journal on Imaging Sciences*, 4(1) :1–39, January 2011.
- [13] Douglas M Benson, Joseph Bryan, Anne L Plant, Antonio M Gotto, and Louis C Smith. Digital imaging fluorescence microscopy : spatial heterogeneity of photobleaching rate constants in individual cells. *The Journal of cell biology*, 100(4) :1309–1323, 1985.
- [14] E Betzig. Proposed method for molecular optical imaging. *Optics letters*, 20(3) :237–239, February 1995.
- [15] E Betzig, G.H. Patterson, R Sougrat, O W Lindwasser, S Olenych, J S Bonifacino, M W Davidson, J Lippincott-Schwartz, and H F Hess. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*, 313(5793) :1642–1645, September 2006.
- [16] Thomas Blumensath and Michael E Davies. How to use the iterative hard thresholding algorithm. 2009.
- [17] Thomas Blumensath and Mike E Davies. Iterative Thresholding for Sparse Approximations. *Journal of Fourier Analysis and Applications*, 14(5-6) :629–654, September 2008.
- [18] Thomas Blumensath and Mike E Davies. Iterative hard thresholding for compressed sensing. *Applied and Computational Harmonic Analysis*, 27(3) :265–274, 2009.
- [19] H Bornfleth, Kurt Saetzler, R Eils, and C Cremer. High-precision distance measurements and volume-conserving segmentation of objects near and below the resolution limit in three-dimensional confocal fluorescence microscopy. *Journal of microscopy*, 189(2) :118–136, 1998.
- [20] Petros T Boufounos and Richard G Baraniuk. 1-bit compressive sensing. pages 16–21, 2008.
- [21] W S Boyle and G E Smith. Charge coupled semiconductor devices. *Bell System Technical Journal*, 1970.
- [22] David J Brady. *Optical Imaging and Spectroscopy*. John Wiley & Sons, April 2009.
- [23] G J Brakenhoff, H T M van der Voort, E A van Spronsen, W A M Linnemans, and N Nanninga. Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy. *Nature*, 317(6) :748–749, October 1985.
- [24] C M Brown. Fluorescence microscopy avoiding the pitfalls. *Journal of Cell Science*, 120(19) :3488–3488, October 2007.

-
- [25] A M Bruckstein, D L Donoho, and M Elad. From sparse solutions of systems of equations to sparse modeling of signals and images. *SIAM review*, 2009.
- [26] H Bruining. Physics and applications of secondary electron emission - CERN Document Server. 1954.
- [27] Xiaojun Cai, Bian Hu, Ting Sun, Kevin F Kelly, and Steven Baldelli. Sum frequency generation-compressive sensing microscope. *The Journal of Chemical Physics*, 135(19) :194202, 2011.
- [28] E Candès. Compressive sampling. *Proceedings of the International Congress of ...*, 2006.
- [29] E Candes. Near-optimal signal recovery from random projections : Universal encoding strategies? *Information Theory*, 2006.
- [30] E Candès. The restricted isometry property and its implications for compressed sensing. *Comptes Rendus Mathématique*, 2008.
- [31] E J Candes, J Romberg, and T Tao. Robust uncertainty principles : exact signal reconstruction from highly incomplete frequency information. *IEEE Transactions on Information Theory*, 52(2) :489–509.
- [32] E J Candes and T Tao. Decoding by Linear Programming. *IEEE Transactions on Information Theory*, 51(12) :4203–4215, 2005.
- [33] Emmanuel J Candes and Justin Romberg. Quantitative Robust Uncertainty Principles and Optimally Sparse Decompositions. *Foundations of Computational Mathematics*, 6(2) :227–254, November 2007.
- [34] Emmanuel J Candes, Justin K Romberg, and Terence Tao. Stable signal recovery from incomplete and inaccurate measurements. *Communications on Pure and Applied Mathematics*, 59(8) :1207–1223, 2006.
- [35] Martin Chalfie, Yuan Tu, Ghia Euskirchen, William W Ward, and Douglas C Prasher. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148) :802–805, 1994.
- [36] Sean Chapman, Karl J Oparka, and Alison G Roberts. New tools for in vivo fluorescence tagging. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(6) :565–573, December 2005.
- [37] Shaobing Chen and D Donoho. Basis pursuit. In *1994 28th Asilomar Conference on Signals, Systems and Computers*, pages 41–44. IEEE Comput. Soc. Press, 1994.
- [38] D Clery. Light loophole wins laurels. *Science*, 346(6207) :290–291, October 2014.
- [39] D Coling and B Kachar. Principles and application of fluorescence microscopy. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]*, Chapter 14 :Unit–Un10, April 2001.

Bibliographie

- [40] G Cormode and S Muthukrishnan. Combinatorial Algorithms for Compressed Sensing. In *Information Sciences and Systems, 2006 40th Annual Conference on*, pages 198–201, 2006.
- [41] C Cremer and T Cremer. Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field. *Microscopica acta*, 81(1) :31–44, August 1978.
- [42] John C Crocker and David G Grier. Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179(1) :298–310, December 1995.
- [43] Wei Dai and Olgica Milenkovic. Subspace Pursuit for Compressive Sensing Signal Reconstruction. *arXiv.org*, March 2008.
- [44] Ingrid Daubechies, Michel Defrise, and Christine De Mol. An iterative thresholding algorithm for linear inverse problems with a sparsity constraint. *Communications on Pure and Applied Mathematics*, 57(11) :1413–1457, 2004.
- [45] Ronald A DeVore. Nonlinear approximation. *Acta Numerica*, 7 :51, November 2008.
- [46] R M Dickson, A B Cubitt, R Y Tsien, and W E Moerner. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature*, 388(6640) :355–358, July 1997.
- [47] D Donoho. Compressed sensing. *Information Theory*, 2006.
- [48] D L Donoho, M Vetterli, R A DeVore, and I Daubechies. Data compression and harmonic analysis. *Information Theory, IEEE Transactions on*, 44(6) :2435–2476, 1998.
- [49] David L Donoho. Compressed Sensing. pages 1–34, September 2004.
- [50] David L Donoho and Philip B Stark. Uncertainty Principles and Signal Recovery. *SIAM Journal on Applied Mathematics*, 49(3) :906–931, June 1989.
- [51] David L Donoho, Yaakov Tsaig, Iddo Drori, and Jean-Luc Starck. Sparse Solution of Underdetermined Systems of Linear Equations by Stagewise Orthogonal Matching Pursuit. *IEEE Transactions on Information Theory*, 58(2) :1094–1121.
- [52] M Duarte, M Davenport, and D Takhar. Single-pixel imaging via compressive sampling. *Signal Processing*, 2008.
- [53] A Einstein. Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt. *Annalen der Physik*, 322(6) :132–148, 1905.
- [54] Julius Elster and Hans Geitel. Ueber die Entladung negativ electrischer Körper durch das Sonnen- und Tageslicht. *Annalen der Physik*, 274(12) :497–514, 1889.

- [55] Yaniv Erlich, Noam Shental, Amnon Amir, and Or Zuk. Compressed sensing approach for high throughput carrier screen. pages 539–544, 2009.
- [56] Mário A T Figueiredo, Robert D Nowak, and Stephen J Wright. Gradient Projection for Sparse Reconstruction : Application to Compressed Sensing and Other Inverse Problems. *IEEE Journal of Selected Topics in Signal Processing*, 1(4) :586–597.
- [57] Alyson K Fletcher, Sundeep Rangan, Lav R Varshney, and Aniruddha Bhargava. Neural reconstruction with approximate message passing (NeuRAMP). pages 2555–2563, 2011.
- [58] Liang Gao, Lin Shao, Bi-Chang Chen, and Eric Betzig. 3D live fluorescence imaging of cellular dynamics using Bessel beam plane illumination microscopy. *Nature Protocols*, 9(5) :1083–1101, April 2014.
- [59] A C Gilbert, S Guha, P Indyk, S Muthukrishnan, and M Strauss. Near-optimal sparse fourier representations via sampling. In *STOC '02 : Proceedings of the thirty-fourth annual ACM symposium on Theory of computing*. ACM Request Permissions, May 2002.
- [60] A C Gilbert, M J Strauss, J A Tropp, and R Vershynin. One sketch for all : fast algorithms for compressed sensing. In *STOC '07 : Proceedings of the thirty-ninth annual ACM symposium on Theory of computing*. ACM Request Permissions, June 2007.
- [61] R C Gonzalez and R E Woods. Digital image processing. 2002.
- [62] M. Grant and S. Boyd. CVX : Matlab software for disciplined convex programming, version 2.0 beta. <http://cvxr.com/cvx>. September 2013.
- [63] Michael C Grant and Stephen P Boyd. Graph implementations for nonsmooth convex programs. pages 95–110, 2008.
- [64] M G Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of microscopy*, 198(Pt 2) :82–87, May 2000.
- [65] Max Haitinger. Fluoreszenzmikroskopie. Akademie Verlag, Leipzig, 1959.
- [66] Elke Haustein and Petra Schwille. Trends in fluorescence imaging and related techniques to unravel biological information. *HFSP Journal*, 1(3) :169–180, September 2007.
- [67] Dennis Healy. Analog-to-information : BAA#05-35. Technical report, July 2005.
- [68] Mike Heilemann, Dirk P Herten, Rainer Heintzmann, Christoph Cremer, Christian Müller, Philip Tinnefeld, Kenneth D Weston, Jürgen Wolfrum, and Markus Sauer. High-Resolution Colocalization of Single Dye Molecules by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Analytical Chemistry*, 74(14) :3511–3517, July 2002.

Bibliographie

- [69] Mike Heilemann, Sebastian van de Linde, Mark Schüttpelz, Robert Kasper, Britta Seefeldt, Anindita Mukherjee, Philip Tinnefeld, and Markus Sauer. Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(33) :6172–6176, August 2008.
- [70] Rainer Heintzmann and Christoph G Cremer. Laterally modulated excitation microscopy : improvement of resolution by using a diffraction grating. pages 185–196, 1999.
- [71] S W Hell and M Kroug. Ground-state-depletion fluorescence microscopy : A concept for breaking the diffraction resolution limit. *Applied Physics B Lasers and Optics*, 60(5) :495–497, May 1995.
- [72] S W Hell and J Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters*, 19(11) :780–782, May 1994.
- [73] Stefan Hell and Ernst HK Stelzer. Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation. *Optics Communications*, 93(5) :277–282, December 1991.
- [74] Ricardo Henriques, Mickael Lelek, Eugenio F Fornasiero, Flavia Valtorta, Christophe Zimmer, and Musa M Mhlanga. QuickPALM : 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ. *Nature Methods*, 7(5) :339–340, May 2010.
- [75] H Hertz. Ueber einen Einfluss des ultravioletten Lichtes auf die elektrische Entladung. *Annalen der Physik*, 267(8) :983–1000, 1887.
- [76] Samuel T Hess, Thanu P K Girirajan, and Michael D Mason. Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophysical journal*, 91(11) :4258–4272, December 2006.
- [77] AJG Hey and A E Trefethen. The Data Deluge : An e-Science Perspective. *Grid Computing - Making the Global Infrastructure a Reality*, Wiley and Sons, pages 809–824, 2003.
- [78] Yasushi Hiraoka, Takeshi Shimi, and Tokuko Haraguchi. Multispectral imaging fluorescence microscopy for living cells. *Cell Structure and Function*, 27(5) :367–374, October 2002.
- [79] Seamus J Holden, Stephan Uphoff, and Achillefs N Kapanidis. DAOSTORM : an algorithm for high- density super-resolution microscopy. *Nature Methods*, 8(4) :279–280, April 2011.
- [80] Larry J Hornbeck. Multi-level digital micromirror device. 1996.

- [81] Larry J Hornbeck. The DMDTM projection display chip : a MEMS-based technology. *Mrs Bulletin*, 26(04) :325–327, 2001.
- [82] B Huang, W Wang, M Bates, and X Zhuang. Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. *Science*, 319(5864) :810–813, February 2008.
- [83] J Hyneczek and T Nishiwaki. Excess noise and other important characteristics of low light level imaging using charge multiplying CCDs. *IEEE Transactions on Electron Devices*, 50(1) :239–245, January 2003.
- [84] Digital Universe IDC. The digital universe of opportunities. *EMC Digital Universe*, pages 1–17, April 2014.
- [85] I Izeddin, J Boulanger, V Racine, C G Specht, A Kechkar, D Nair, A Triller, D Choquet, M Dahan, and J B Sibarita. Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. *Optics Express*, 20(3) :2081–2095, 2012.
- [86] Sara A Jones, Sang-Hee Shim, Jiang He, and Xiaowei Zhuang. Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells. *Nature Methods*, 8(6) :499–505, May 2011.
- [87] Rigaut JP and Vassy J. High-resolution three-dimensional images from confocal scanning laser microscopy. Quantitative study and mathematical correction of the effects from bleaching and fluorescence attenuation in depth. *Analytical and quantitative cytology and histology / the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology*, 13(4) :223–232, August 1991.
- [88] T A Klar, S Jakobs, M Dyba, A Egner, and S W Hell. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15) :8206–8210, July 2000.
- [89] D E Koppel, C Carlson, and H Smilowitz. Wiley Online Library : Not Found. *Journal of microscopy*, 1989.
- [90] V A Kotel’nikov. On the Transmission Capacity of the “Ether” and Wire in Electrocommunications. In *Modern Sampling Theory*, pages 27–45. Birkhäuser Boston, Boston, MA, 2001.
- [91] M Kozubek. Theoretical versus experimental resolution in optical microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 53(2) :157–166, April 2001.
- [92] Pavel Křížek, Ivan Raška, and Guy M Hagen. Minimizing detection errors in single molecule localization microscopy. *Optics Express*, 19(4) :3226–3235, February 2011.
- [93] K Lidke, B Rieger, T Jovin, and R. Heintzmann. Superresolution by localization of quantum dots using blinking statistics. *Optics Express*, 2005.

Bibliographie

- [94] Jennifer Lippincott-Schwartz, Nihal Altan-Bonnet, and George H Patterson. Photobleaching and photoactivation : following protein dynamics in living cells. *Nature cell biology*, pages S7–14, 2003.
- [95] Jennifer Lippincott-Schwartz and George H Patterson. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science*, 300(5616) :87–91, 2003.
- [96] Konstantin A Lukyanov, Dmitry M Chudakov, Sergey Lukyanov, and Vladislav V Verkhusha. Photoactivatable fluorescent proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(11) :885–890, 2005.
- [97] M Lustig, D L Donoho, J M Santos, and J M Pauly. Compressed Sensing MRI. *IEEE Signal Processing Magazine*, 25(2) :72–82, 2008.
- [98] Jianwei Ma. Compressed Sensing for Surface Characterization and Metrology. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 59(6) :1600–1615.
- [99] S Mallat. A Wavelet Tour of Signal Processing : The Sparse Way - Stephane Mallat - Google Books. 2008.
- [100] Xavier Michalet, Achillefs N Kapanidis, Ted Laurence, Fabien Pinaud, Soeren Doose, Malte Pflughoeft, and Shimon Weiss. THE POWER AND PROSPECTS OF FLUORESCENCE MICROSCOPIES AND SPECTROSCOPIES. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 32(1) :161–182, June 2003.
- [101] M Minsky. Microscopy apparatus. *US patent*, 1957.
- [102] Yuriy Mishchenko and Liam Paninski. A Bayesian compressed-sensing approach for reconstructing neural connectivity from subsampled anatomical data. *Journal of Computational Neuroscience*, 33(2) :371–388, March 2012.
- [103] Atsushi Miyawaki, Asako Sawano, and Takako Kogure. Lighting up cells : labeling proteins with fluorophores. *Nature cell biology*, pages S1–7, 2003.
- [104] Hossam MKasem and Maha El-Sabrouty. A Comparative Study of Audio Compression Based on Compressed Sensing and Sparse Fast Fourier Transform (SFFT) : Performance and Challenges. *Audio and Electroacoustics Newsletter, IEEE*, pages –, March 2014.
- [105] W E Moerner and L Kador. Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Physical Review Letters*, 62(2) :2535–2538, May 1989.
- [106] Michael J Nasse and Jörg C Woehl. Realistic modeling of the illumination point spread function in confocal scanning optical microscopy. *Journal of the Optical Society of America A*, 27(2) :295–302, January 2010.
- [107] D Needell and J A Tropp. CoSaMP : Iterative signal recovery from incomplete and inaccurate samples. *Applied and Computational Harmonic Analysis*, 26(3) :301–321, May 2009.

- [108] Deanna Needell and Roman Vershynin. Signal Recovery From Incomplete and Inaccurate Measurements Via Regularized Orthogonal Matching Pursuit. *IEEE Journal of Selected Topics in Signal Processing*, 4(2) :310–316.
- [109] Deanna Needell and Roman Vershynin. Uniform Uncertainty Principle and Signal Recovery via Regularized Orthogonal Matching Pursuit. *Foundations of Computational Mathematics*, 9(3) :317–334, June 2008.
- [110] Y Nesterov. Smooth minimization of non-smooth functions - Springer. *Mathematical programming*, 2005.
- [111] A J North. Seeing is believing? A beginners' guide to practical pitfalls in image acquisition. *The Journal of cell biology*, 172(1) :9–18, January 2006.
- [112] H Nyquist. Certain Topics in Telegraph Transmission Theory. *American Institute of Electrical Engineers, Transactions of the*, 47(2) :617–644, 1928.
- [113] Martin Ovesný, Pavel Křížek, Josef Borkovec, Zdeněk Švindrych, and Guy M Hagen. ThunderSTORM : a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. *Bioinformatics*, page btu202, 2014.
- [114] Erika Pastrana. special feature. *Nature Methods*, 8(1) :46–46, December 2010.
- [115] George Patterson, Michael Davidson, Suliana Manley, and Jennifer Lippincott-Schwartz. Superresolution Imaging using Single-Molecule Localization. *Annual Review of Physical Chemistry*, 61(1) :345–367, March 2010.
- [116] Anthony Guy Everson Pearse. Histochemistry : Theoretical and Applied. Churchill Livingstone Co, London, 1985.
- [117] Howard R Petty. Fluorescence microscopy : Established and emerging methods, experimental strategies, and applications in immunology. *Microscopy Research and Technique*, 70(8) :687–709, 2007.
- [118] Rayleigh. XV. On the theory of optical images, with special reference to the microscope. *Philosophical Magazine Series 5*, 42(255) :167–195, August 1896.
- [119] M S Robbins and B J Hadwen. The noise performance of electron multiplying charge-coupled devices. *IEEE Transactions on Electron Devices*, 50(5) :1227–1232, May 2003.
- [120] Michael J Rust, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) provides sub-diffraction-limit image resolution. *Nature Methods*, 3(10) :793–796, August 2006.
- [121] C Shannon. Communication in the presence of noise. *Proceedings of the IRE*, 37(1) :10–21, 1949.
- [122] C J Sheppard and T Wilson. The theory of the direct-view confocal microscope. *Journal of microscopy*, 124(Pt 2) :107–117, November 1981.

Bibliographie

- [123] Fergal P Shevlin. Speckle reduction for illumination with lasers and stationary, heat sinked, phosphors. *International Display Workshop, Kyoto*, pages 1–4, December 2012.
- [124] Fergal P Shevlin. Speckle reduction in laser-illuminated picoprojectors. *SPIE Photonic West, San Francisco*, pages 1–8, January 2012.
- [125] Fergal P Shevlin. A Compact, Low Cost, Phase Randomizing Device for Laser Illuminated Displays. *International Display Workshop, Niigata*, pages 1–2, December 2014.
- [126] O Shimomura. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of microscopy*, 217(Pt 1) :1–15, January 2005.
- [127] J SLEPIAN. Hot-cathode tube - Patent US1450265 . US Patent Office, April 1923.
- [128] S Stallinga and B Rieger. Optics InfoBase : Optics Express - Accuracy of the Gaussian Point Spread Function model in 2D localization microscopy. *Optics Express*, 2010.
- [129] Tim Stearns. Green fluorescent protein : the green revolution. *Current Biology*, 5(3) :262–264, 1995.
- [130] Peter B Stetson. DAOPHOT - A computer program for crowded-field stellar photometry. *Astronomical Society of the Pacific*, 99 :191–222, March 1987.
- [131] V Studer, J Bobin, M Chahid, H S Mousavi, E Candès, and M Dahan. Compressive fluorescence microscopy for biological and hyperspectral imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26) :E1679–E1687, June 2012.
- [132] Klaus Suhling, Paul M W French, and David Phillips. Time-resolved fluorescence microscopy. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 4(1) :13, 2005.
- [133] Dharmpal Takhar, Jason N Laska, Michael B Wakin, Marco F Duarte, Dror Baron, Shriram Sarvotham, Kevin F Kelly, and Richard G Baraniuk. A new Compressive Imaging Camera Architecture using Optical-Domain Compression. In Charles A Bouman, Eric L Miller, and Ilya Pollak, editors, *Electronic Imaging 2006*, pages 606509–606509–10. SPIE, February 2006.
- [134] Justin W Taraska and William N Zagotta. Fluorescence Applications in Molecular Neurobiology. *Neuron*, 66(2) :170–189, April 2010.
- [135] D S Taubman and M W Marcellin. *Jpeg2000 : Image Compression Fundamentals, Standards, and Practice*. The Springer International Series in Engineering and Computer Science Series. Springer-Verlag GmbH, 2002.
- [136] Joel A Tropp and Anna C Gilbert. Signal Recovery From Random Measurements Via Orthogonal Matching Pursuit. *IEEE Transactions on Information Theory*, 53(12) :4655–4666.

- [137] Sidney Udenfriend. Fluorescence assay in biology and medicine. Academic Press, New-York, 1971.
- [138] Sebastian van de Linde, Mike Heilemann, and Markus Sauer. Live-Cell Super-Resolution Imaging with Synthetic Fluorophores. *Annual Review of Physical Chemistry*, 63(1) :519–540, May 2012.
- [139] Richard Van Noorden. Insider view of cells scoops Nobel. *Nature*, 514(7522) :286–286, October 2014.
- [140] M Vetterli and J Kovačević. Wavelets and subband coding. 1995.
- [141] M Wakin, J Laska, and M Duarte. An architecture for compressive imaging. *Image Processing*, 2007.
- [142] M B Wakin, B M Sanandaji, and T L Vincent. On the observability of linear systems from random, compressive measurements. *IEEE Conference on Decision & Control. Proceedings*, pages 4447–4454, December 2010.
- [143] R H Walden. Analog-to-digital converter survey and analysis. *Selected Areas in Communications, IEEE Journal on*, 17(4) :539–550, 1999.
- [144] Yina Wang, Tingwei Quan, Shaoqun Zeng, and Zhen-Li Huang. PALMER : a method capable of parallel localization of multiple emitters for high-density localization microscopy. *Optics Express*, 20(14) :16039–16049, 2012.
- [145] Edmund Taylor Whittaker. On the Functions Which are Represented by the Expansions of the Interpolation Theory. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section A*, 35 :181–194, October 1915.
- [146] John Macnaghten Whittaker. Interpolatory function theory, 1935.
- [147] David E Wolf. Fundamentals of Fluorescence and Fluorescence Microscopy. pages 63–91. Elsevier, 2007.
- [148] Fred S Wouters. The physics and biology of fluorescence microscopy in the life sciences. *Contemporary Physics*, 47(5) :239–255, September 2006.
- [149] Andrew G York, Alireza Ghitani, Alipasha Vaziri, Michael W Davidson, and Hari Shroff. Confined activation and subdiffractive localization enables whole-cell PALM with genetically expressed probes. *Nature Methods*, 8(4) :327–333, February 2011.
- [150] Kaihua Zhang, Lei Zhang, and Ming-Hsuan Yang. Real-time compressive tracking. pages 864–877, 2012.
- [151] Lei Zhu, Wei Zhang, Daniel Elnatan, and Bo Huang. Faster STORM using compressed sensing. *Nature Methods*, 9(7) :721–723, April 2012.
- [152] Warren R Zipfel, Rebecca M Williams, and Watt W Webb. Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotechnology*, 21(11) :1369–1377, October 2003.

Bibliographie
