

## LA PROFONDEUR DE CHAMP (PdC) ET SON EXTENSION

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

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

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

### 1.1.1. VARIATION DE LA RÉPONSE IMPULSIONNELLE EN ÉCLAIREMENT AVEC LA DÉFOCALISATION

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

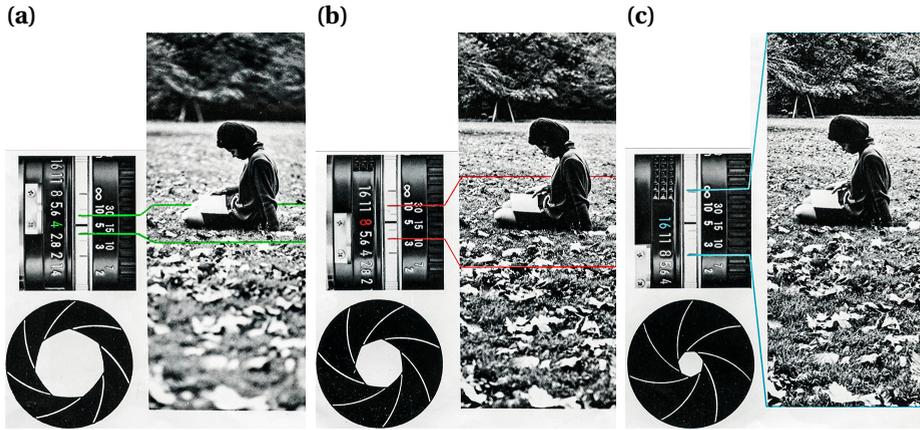


FIGURE 1.2 – Influence de l'ouverture sur la PdC d'un système d'imagerie. (a) Ouverture  $f/4$ . Faible PdC : seul le sujet principal est net. (b) Diaphragme fermé à  $f/8$ . La PdC est accrue. (c) Diaphragme fermé au maximum. On obtient une grande PdC avec le premier plan, le sujet et l'arrière plan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

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

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

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

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

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

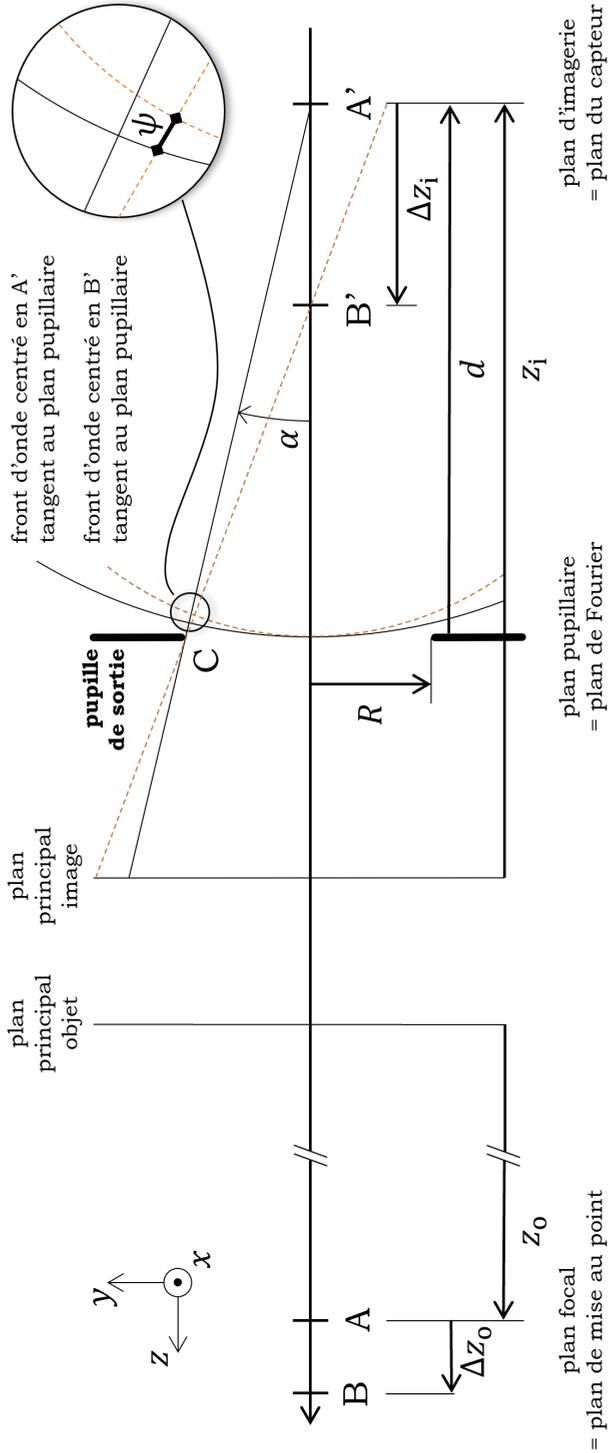
$$h_{\Delta z_i}(x, y) \propto \left| q \left( x \frac{NA_i}{\lambda}, y \frac{NA_i}{\lambda} \right) \right|^2 \quad (1.2)$$

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

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

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

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

FIGURE 1.3 – Construction associée à la définition du paramètre de défocalisation  $\psi$ .

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ainsi, en substituant l'expression approchée de  $\Delta z_i$  dans l'Équation (1.9), on obtient une autre expression du paramètre  $\psi$  :

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

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

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

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

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

Lorsque le système optique est parfaitement focalisé sur l'objet que l'on cherche à imager, la valeur du paramètre de défocalisation  $\psi$  est égale à 0. Si  $\psi \in [-\lambda/4, \lambda/4]$  alors l'image est considérée comme nette (critère de Rayleigh<sup>2</sup>). Cet intervalle correspond à la PdC naturelle du système optique que nous avons définie qualitativement à la Figure 1.1.

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

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

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

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

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

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

Cette approche de co-conception a d'abord été utilisée par [Diaz et al. \[2009\]](#) pour optimiser les paramètres d'un masque de phase cubique, puis généralisée à un grand nombre de fonctions de phase [[Diaz et al., 2010](#)], comme par exemple, les masques dont la phase est logarithmique [[Sherif et al., 2004](#)], exponentielle [[Yang et al., 2007](#)], ou s'exprime sous la forme de fonctions rationnelles [[Zhou et al., 2009](#)]. En particulier, elle a été utilisée pour optimiser des masques de phase binaires annulaires [[Diaz et al., 2010](#), [Falcón et al., 2017](#)], qui présentent l'intérêt d'être simples à fabriquer<sup>3</sup> tout en ayant une capacité d'extension de PdC équivalente à celle des masques dont la phase varie continûment<sup>4</sup>. Ces masques sont composés d'anneaux concentriques, comme l'illustre la Figure 1.4. Un masque à  $L$  anneaux, de rayon d'ouverture unitaire, est défini par l'ensemble de ses  $L - 1$  rayons, tel que  $\boldsymbol{\rho} = (\rho_1; \dots; \rho_{L-1})$ . Chaque anneau ajoute au front d'onde incident une phase de 0 ou  $\pi$  radians calculée à partir de la longueur d'onde nominale  $\lambda$  de lumière incidente.

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

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

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

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

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

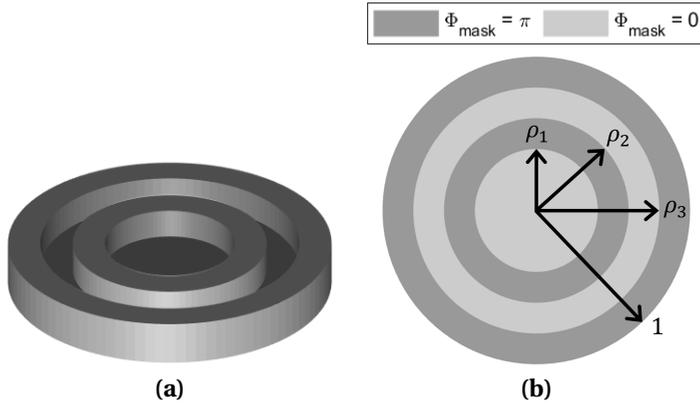


FIGURE 1.4 – Exemple d'un masque de phase binaire à  $L = 4$  anneaux représenté (a) en 3D et (b) en 2D.

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

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

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

## 1.2. PLAN DE LA THÈSE ET CONTRIBUTIONS

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

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

Plusieurs approches reposant sur l'utilisation d'un masque de phase ont été proposées dans la littérature pour généraliser le concept de super-localisation à la troisième dimension. Ces masques sont conçus pour modifier la forme la [PSF](#) et la faire varier avec la profondeur. Ainsi, l'estimation de cette forme permet d'estimer la profondeur à laquelle se situe le marqueur. Bien entendu, il faut aussi veiller à ce qu'à chaque profondeur, la forme de la [PSF](#) conduise également à une estimation précise de la position latérale du fluorophore. Par exemple, [Pavani et Piestun \[2008a\]](#) ont proposé un masque de phase dont la [PSF](#) — dite à « double hélice » — est de forme allongée et « tourne » d'un angle proportionnel à la profondeur. Le critère d'optimisation de ce masque est basé sur des considérations heuristiques. [Shechtman \*et al.\* \[2014\]](#) ont été les premiers à optimiser des masques de phase à l'aide d'un critère explicite et général issu de la théorie de l'information : la [borne de Cramér-Rao](#). Cette quantité permet de caractériser la précision de localisation théorique avec laquelle un marqueur fluorescent peut être localisé. Leur masque — appelé « tétrapode » en raison de sa forme — conduit à un allongement progressif de la [PSF](#) lorsque la défocalisation augmente. [Zhou et Carles \[2020\]](#) ont ensuite simplifié ce masque en décrivant sa fonction de phase par un nombre limité de polynômes de Zernike<sup>5</sup> et ont fourni une interprétation optique de ses propriétés. L'en-

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

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

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

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

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

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

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

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

