

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Ferhat Abbas- Sétif 1

Institut : Optique et Mécanique de Précision

Département : Optique et mécanique de précision

Domaine : Sciences et Technologies

Filière : Optique et Mécanique de Précision

Spécialité : Optique et photonique appliquée

Mémoire de Master

Étude de l'effet de la variation d'indice de réfraction par modélisation de la fonction d'étalement du point (PSF) en microscopie de fluorescence

Étudié par : BOUGUERRA Kamilia

Dirigé Par : Dr. TAALLAH Hossem

Dr. BOUZID Oussama

Devant le jury :

Dr. LAMACHE

Dr. NAAS

Dr. TAALLAH

Soutenue le : 03 / 07 /2021

Sommaire

Liste des tableaux.....	i
Liste des figures.....	ii
Résumé	iii
Abstract.....	iii
Introduction générale.....	1

Chapitre I: Résolution dans la microscopie optique

I.1 Introduction	4
I.2 Fondamentaux en microscopie optique et historique du domaine	4
I.2.1 Le principe de fonctionnement du microscope optique.....	5
I.3 Invention de microscope optique	6
I.4 La diffraction, limite majeure de résolution la microscopie optique	7
I.4.1 Définition de la résolution	7
I.4.2 La résolution et les objectifs microscopiques	8
I.4.3 La super-résolution	9
I.5 Microscopie à fluorescence	10
I.5.1 La fluorescence.....	10
I.5.2 Microscopie en champ large	12
I.5.3 Microscopie confocale.....	12
I.6 Microscope optique franchit la limite de diffraction.....	13
I.6.1 Le microscope PALM (Photoactivated Localization Microscopy)	14
I.7 Comparaison entre différents types de microscopes	15

Chapitre II: Modèles théoriques de la PSF en microscopie de fluorescence

II.1 Introduction.....	16
II.2 Fonction d'étalement de point (PSF)	16
II.3 La PSF et ses corollaires	17
II.3.1 Le Strehl ratio ou rapport de Strehl	17
II.3.2 La largeur à mi-hauteur	17
II.3.3 Le critère de résolution de Rayleigh.....	17
II.4 La PSF en microscopie de fluorescence	18
II.4.1 Modèle scalaire de Gibson-Lanni.....	18

II.4.2 Modèle de PSF pour un indice de réfraction variable	22
II.5 Conclusion	28

Chapitre III: Simulation de la PSF et restauration des images par déconvolution et filtrage

III.1 Introduction	28
III.2 Simulation de la PSF en utilisant le modèle scalaire de Gibson et Lanni	28
III.2.1 L'influence de déplacement du point source en profondeur.....	29
III.2.2 L'influence de déplacement du point source en profondeur et l'ouverture numérique sur la résolution axiale	32
III.3 La déconvolution	34
III.3.1 Les étapes de déconvolution :	34
III.4 Le bruit	35
III.5 Le filtrage de bruit	35
III.6 Application de la déconvolution et le filtrage pour la restauration des images.....	37
III.6.1 Application de la déconvolution sur les images des billes fluorescente	37
III.6.2 Application de déconvolution et filtrage sur des cellules biologique	39
III.7 Conclusion	41

Conclusion générale et perspectives

Référence bibliographique

Liste des tableaux

TABLEAU I.1 LES CRITERES DE RESOLUTION.	7
TABLEAU I-2 COMPARAISON ENTRE DIFFERENTS TYPES DE MICROSCOPES.	15
TABLEAU III-1 LES VALEURS DE LARGEUR A MI-HAUTEUR (FWHM) POUR LES PROFILS AXIAUX (NI=NS).	32
TABLEAU III-2 LES VALEURS DE LARGEUR A MI-HAUTEUR (FWHM) POUR LES PROFILS AXIAUX (NI≠NS).	32

Liste des figures

FIGURE I-1 LE MICROSCOPE OPTIQUE.	4
FIGURE I-2 SCHEMA SU PRINCIPE D'UN MICROSCOPE OPTIQUE.[8]	5
FIGURE I-3 L'INVENTION DU MICROSCOPE.[6]	6
FIGURE I-4 LES OUVERTURES NUMERIQUES.[9]	8
FIGURE I-5 EVOLUTION DE LA RESOLUTION OPTIQUE AU COURS DU TEMPS.[6]	9
FIGURE I-6 DIAGRAMME DE JABLONSKI DES ETATS ENERGETIQUES DE LA FLUORESCENCE. [1]	10
FIGURE I-7 DIAGRAMME DE DEPLACEMENT DES LONGUEURS D'ONDE ENTRE LUMIERE REÇUE ET EMISE.[1]	11
FIGURE I-8 FONCTIONNEMENT ET CARACTERISTIQUE DE MICROSCOPE CONVENTIONNELLE(A) ET CONFOCAL (B). [6]	13
FIGURE I-9 SCHEMA DE LA MICROSCOPIE DE LOCALISATION PAR PHOTO-ACTIVATION. (A) CONFIGURATION D'ACTIVATION DES FLUOROPHORES, (B) CONFIGURATION DE DESACTIVATION DES FLUOROPHORES. [6]	14
FIGURE II-1 LA PSF ET SES COROLLAIRES.[18]	18
FIGURE II-2 CHEMINS OPTIQUES DANS LE MODELE GIBSON-LANNI DANS LA CONDITION DE CONCEPTION (LIGNE POINTILLEE) ET DANS LA CONDITION EXPERIMENTALE (LIGNE CONTINUE). [19]	19
FIGURE II-3 REPRESENTATIONS SCHEMATIQUES D'UNE CONFIGURATION D'ECHANTILLON TYPIQUE. [1]	24
FIGURE II-4 MODELE GEOMETRIQUE DE LA DIFFERENCE DE CHEMIN ENTRE DEUX RAYONS DANS LE SYSTEME EXPERIMENTAL ET LE SYSTEME DE CONCEPTION. [23]	25
FIGURE II-5 VARIATION D'INDICE SELON SREYA ET AL.[25]	27
FIGURE III-1 SCHEMA DE LA POSITION DU POINT SOURCE.[1]	29
FIGURE III-2 COUPES TRANSVERSALES DE LA PSF POUR DIFFERENTES POSITIONS DE ZP (NI=NS).	30
FIGURE III-3 COUPES TRANSVERSALES DE LA PSF POUR DIFFERENTES POSITIONS DE ZP (NI≠NS).	30
FIGURE III-4 COUPES TRANSVERSALES DE LA PSF ET LEURS PROFILS AXILES D'INTENSITES POUR DIFFERENTES POSITIONS z_p POUR LES DEUX CAS (NI=NS) ET (NI≠NS).	31
FIGURE III-5 VARIATION DE LA LARGEUR A MI-HAUTEUR EN FONCTION D'OUVERTURE NUMERIQUE POUR DIFFERENTS POSITIONS ZP ET DANS LES CAS POUR $n_i = n_s$ (FIGURE A GAUCHE) ET $n_i \neq n_s$ (FIGURE A DROITE).	33
FIGURE III-6 DIFFERENCE ENTRE LA CONVOLUTION ET LA DECONVOLUTION.[28]	34
FIGURE III-7 APPLICATION DE FILTRAGE.	36
FIGURE III-8 LA DECONVOLUTION DES BILLES FLUORESCENTE.	38
FIGURE III-9 IMAGES DES NANO-BILLES FLUORESCENTES OBTENUS PAR MICROSCOPIE CONFOCALE ET STED [27], ET APPLICATION DE DE DECONVOLUTION SUR LES IMAGES CONFOCALE.	39
FIGURE III-10 COMPARAISON ENTRE LES METHODES DE TRAITEMENT D'IMAGE, LES IMAGE DANS LA COLONNE DECONVOLUTION ET DECONVOLUTION & FILTRAGE ONT ETE OBTENU DANS LE CADRE DE CE MEMOIRE.	40

Résumé

En microscopie de fluorescence, l'épaisseur de l'échantillon est élevée par rapport à la profondeur de champ d'un objectif à haute ouverture numérique (Na) du système d'imagerie. Une aberration est introduite lorsqu'il y a une variation de l'indice de réfraction dans le spécimen. Les aberrations diminuent la résolution et le contraste de l'image. La déconvolution est une méthode utilisée pour restaurer l'image par calcul et simulation numérique, et pour une déconvolution efficace, une connaissance précise de la fonction d'étalement du point (PSF) du système d'imagerie est indispensable. Cette PSF peut être mesurée expérimentalement ou modélisée théoriquement. Expérimentalement, les PSF peuvent être obtenus en capturant des images 3D d'une source ponctuelle de taille inférieure à la résolution de l'objectif du microscope. Mais il est souvent fastidieux de préparer une configuration expérimentale précise. Par conséquent, un modèle théorique qui prend en compte les paramètres optiques et les propriétés d'imagerie pour modéliser la PSF est une bonne alternative. En outre, ce modèle de PSF doit tenir compte des aberrations, afin de se conformer aux conditions expérimentales.

Mots clés : PSF, Résolution, Indice de réfraction, Déconvolution, Microscopie.

Abstract

In fluorescence microscopy, the thickness of the specimen is high relative to the depth of field of a high numerical aperture (Na) objective of the imaging system. An aberration is introduced when there is a variation in the refractive index in the specimen. Aberrations decrease the resolution and contrast of the image. Deconvolution is a method used to restore the image by computation and numerical simulation, and for an efficient deconvolution, an accurate knowledge of the point spread function (PSF) of the imaging system is essential. This PSF can be measured experimentally or modeled theoretically. Experimentally, the PSF can be obtained by capturing 3D images of a point source of size smaller than the resolution of the microscope objective. But it is often tedious to prepare an accurate experimental setup. Therefore, a theoretical model that takes into account the optical parameters and imaging properties to model the PSF is a good alternative. In addition, this PSF model must take into account the aberrations, in order to conform to the experimental conditions.

Keywords: PSF, Resolution, Refractive index, Deconvolution, Microscopy.

الملخص:

في الفحص المجهرى الفلورى، تكون سماكة العينة عالية مقارنة بعمق مجال هدف فتحة عددية عالية لنظام التصوير. يتم إدخال الانحراف عندما يكون هناك اختلاف في معامل الانكسار في العينة. تقلل الانحرافات دقة الصورة والتباين. عملية الفك هي طريقة تستخدم لاستعادة الصورة عن طريق الحساب والمحاكاة العددية، وللتفكيك الفعال، فإن المعرفة الدقيقة بوظيفة انتشار النقاط لنظام التصوير أمر ضروري. يمكن قياس وظيفة امتداد نقطة تجريبياً أو نمذجة نظرياً. تجريبياً، يمكن الحصول على وظيفة امتداد نقط عن طريق التقاط صور ثلاثية الأبعاد لمصدر نقطي بحجم أقل من دقة هدف المجهر. ولكن غالباً ما يكون إعداد تجريبي دقيق أمراً شاقاً. لذلك، فإن النموذج النظري الذي يأخذ في الاعتبار المعلومات البصرية وخصائص التصوير لنموذج وظيفة امتداد نقطة هو بديل جيد. علاوة على ذلك، يجب أن يأخذ نموذج وظيفة امتداد نقطة هذا في الاعتبار الانحرافات، من أجل التوافق مع الظروف التجريبية .

الكلمات المفتاحية: وظيفة امتداد نقطة، الدقة، معامل الانكسار، التفكيك، الفحص المجهرى.
