

# Introduction

**Corinne FOURNIER<sup>1</sup> et Olivier HAEBERLÉ<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Laboratoire Hubert Curien, CNRS, IOGS, Télécom Saint-Étienne,  
Université Jean Monnet, Saint-Étienne, France*

<sup>2</sup> *IRIMAS, Université de Haute-Alsace, Mulhouse, France*

## Contexte

L'imagerie optique des systèmes biologiques a connu ces dernières années des développements spectaculaires, délivrant une quantité et une qualité d'informations qui, il y a une vingtaine d'années encore, relevaient du rêve pour les physiciens, les biologistes ou les médecins.

Les extraordinaires progrès accomplis s'expliquent par une conjonction de contributions dans le domaine de la physique des phénomènes de formation des images, en instrumentation avec l'arrivée de nouveaux capteurs aux performances remarquables, et enfin par l'extraordinaire puissance de calcul et capacité mémoire des ordinateurs actuels. Pour illustrer ces propos, on peut se référer à deux exemples spectaculaires (et non traités dans cet ouvrage).

En microscopie de fluorescence, la barrière de la diffraction a été « brisée » de manière spectaculaire *via* les développements de la microscopie STED tout d'abord, puis l'invention des microscopies pointillistes. La microscopie STED exploite les propriétés temporelles du phénomène de fluorescence, qui n'est pas instantané, pour provoquer une émission stimulée, contrôlée par le système, et dissociable spatialement, temporellement, spectralement, et directionnellement de l'émission spontanée de fluorescence. Proposée dès 1994, cette technique ne s'est répandue que récemment, grâce

à l'apparition de lasers et de détecteurs peu chers et très performant. Les microscopies pointillistes utilisent les propriétés statistiques de l'émission de fluorescence, qui présente un caractère aléatoire. En traitant de grandes quantités d'images individuelles, présentant peu de points fluorescents, il est possible de les détecter et localiser individuellement, et donc de reconstruire une image de résolution améliorée. Ces techniques permettent même maintenant d'imager des spécimens vivants, grâce à la qualité des marquages de fluorescence, le bon rendement photonique des fluorophores, mais surtout la sensibilité extrême des caméras modernes, et la rapidité de traitement des images permises par les ordinateurs actuels.

Un autre domaine qui a connu des développements spectaculaires est l'imagerie à travers les milieux diffusants. De nombreuses techniques ont été développées ou améliorées ces dernières années. La plus spectaculaire est peut-être celle faisant appel aux matrices de diffusion. Elle se base sur le fait que, dans un système imageur, la matrice de Green (ensemble des fonctions de Green liant chaque source émettant de la lumière à chaque pixel du détecteur) contient l'information accessible en régime de diffusion linéaire. Les moyens expérimentaux modernes (capteurs de grandes dimensions et sensibilité, modulateurs spatiaux de lumière avec de nombreux degrés de liberté, et ordinateurs puissants) permettent maintenant de caractériser expérimentalement les milieux diffusants, en mesurant de manière précise la matrice de diffusion. On peut alors effectuer des opérations spectaculaires, et seulement imaginable il y a encore peu, comme la caractérisation de la diffusion de surface ou de volume, la séparation des contributions de la diffusion simple et de la diffusion multiple, et même la focalisation à travers un milieu diffusant, ce qui ouvre la voie à l'imagerie aussi bien en transmission qu'en réflexion.

Cet ouvrage couvre d'autres domaines de l'imagerie biologique qui ont aussi bénéficié, comme ces deux exemples, des progrès observés en instrumentation et en informatique, et qui ont permis de rendre possibles des concepts jusqu'à récemment purement théoriques.

### **Imagerie non conventionnelle**

L'imagerie non conventionnelle, contrairement à l'imagerie conventionnelle, permet d'accéder à des grandeurs physiques (opacité, indice optique, propriété de polarisation d'une onde, composition chimique d'un objet, etc.) non directement accessibles par les systèmes optiques, dont les capteurs ne peuvent mesurer qu'une information en intensité.

C'est grâce à l'utilisation de systèmes d'imagerie particuliers et de traitements numériques des images/signaux capturés que la reconstruction des grandeurs physiques recherchées est possible. On parle également d'imagerie computationnelle

(anglicisme pour *computational imaging*). Les modalités d'imagerie non conventionnelle typiques sont par exemple : la polarimétrie, l'interférométrie, l'holographie et l'imagerie de phase, l'imagerie hyperspectrale. L'imagerie non conventionnelle peut également avoir pour but de miniaturiser, de réduire le coût ou d'améliorer la quantitativité des systèmes d'imagerie classique. Ce type d'imagerie nécessite la conception étroitement liée du système optique, des capteurs, et des algorithmes de traitement du signal et des images. La richesse d'information obtenue par imagerie non conventionnelle permet d'améliorer la détection, la caractérisation quantitative ainsi que la classification des objets imagés. Ces systèmes sont utilisés dans de nombreux domaines de l'imagerie biologique : endoscopie, microscopie, imagerie de la peau ou à travers la peau, imagerie de phénomènes rapides.

## Contenu de l'ouvrage

Dans cet ouvrage nous nous intéressons à diverses modalités d'imagerie non conventionnelle développées pour le domaine biomédical : imagerie par analyse de front d'onde, holographie numérique, nanoscopie optique, endoscopie et imagerie monodétecteur. Les six premiers chapitres sont complémentaires et traitent de l'imagerie de phase.

Le [chapitre 1](#) présente la microscopie quantitative de phase par analyseur de front d'onde. Les analyseurs de front d'onde sont des dispositifs particuliers, permettant la mesure d'une onde sans faire appel à l'holographie (détaillée dans les chapitres suivants). Dans ce chapitre est donc d'abord rappelée la notion de phase d'une onde, puis la notion d'objet de phase dans le domaine de la biologie est introduite. La modalité particulière d'interférométrie à décalage quadrilatéral est décrite en détail et appliquée pour résoudre des problématiques majeures de l'imagerie biologique comme la mesure de masse sèche, l'étude de phénomènes biologiques rapides et la mesure de biréfringence.

Le [chapitre 2](#) présente l'holographie numérique en détaillant tout d'abord le principe de l'interférométrie utilisée en holographie, basé sur la superposition d'une onde de référence à l'onde diffractée par l'objet. Introduite par Gabor en microscopie électronique, l'holographie est en fait surtout connue pour ses applications en optique. Les montages holographiques les plus couramment utilisés sont décrits. Enfin, le traitement numérique des données obtenues, afin d'extraire les caractéristiques du front d'onde mesuré, en amplitude et en phase, est détaillé. Ce chapitre constitue une introduction au [chapitre 4](#) qui traite d'holographie numérique, dans la configuration dite d'holographie en ligne, ainsi qu'au [chapitre 5](#) qui présente la microscopie tomographique diffractive.

Le **chapitre 3** présente une méthodologie générale de reconstruction numérique par approche « problèmes inverses ». Cette approche permet d'estimer les paramètres d'intérêt des objets imagés à partir d'images non conventionnelles. Elle est présentée de manière très générale et donc applicable à différentes modalités d'imagerie non conventionnelle. Ce chapitre présente le cas simple de maximisation de la vraisemblance entre données et modèle linéaire de formation d'image, puis traite le problème non linéaire de reconstruction de la phase (*phase retrieval*) avec ou sans prise en compte d'*a priori* sur les objets reconstruits. Ce chapitre est illustré en holographie numérique en ligne en lien avec le chapitre suivant.

Le **chapitre 4** est consacré à la microscopie holographique en ligne. Il présente les configurations expérimentales de microscopie holographique utilisées dans le domaine biomédical et leurs spécificités. La problématique de la reconstruction numérique est abordée en comparant différentes approches historiques et de l'état de l'art sur des images expérimentales. Dans la continuité du chapitre 3, les approches « problèmes inverses » sont utilisées et leur potentiel en microscopie holographique discuté.

Dans le **chapitre 5**, une extension de l'holographie est présentée, avec application à la microscopie en transmission. La microscopie tomographique diffractive est une technique couplant l'holographie avec un balayage de l'illumination sur le spécimen, ou avec une rotation de celui-ci. Cette technique permet d'acquérir beaucoup plus d'informations, ce qui permet une reconstruction en 3D de la distribution des indices optiques dans le spécimen observé. L'indice optique (en réfraction et en absorption) est devenu un contraste permettant de nombreuses applications sur des spécimens sans préparation (pas de coloration, pas de marquage de fluorescence), qui trouve maintenant des applications dans de nombreux domaines (étude des cellules souches, de levures, de la croissance bactérienne, etc.).

Le **chapitre 6** décrit une autre technique de microscopie de phase, la microscopie interférométrique en lumière blanche. Basée sur un montage particulier (interféromètre de Linnick), elle se différencie des techniques décrites dans les chapitres précédents en ce sens qu'il s'agit d'une technique en réflexion. La démodulation du signal réfléchi permet une précision de mesure inégalée, dans la gamme nanométrique. La résolution latérale reste cependant celle d'un microscope optique classique. Une extension récente consiste à combiner la microscopie assistée par microsphères avec l'interférométrie, ouvrant la porte à une nanométrie des surfaces. Ces techniques sont aussi maintenant utilisées pour l'imagerie biologique, en particulier l'imagerie cellulaire ou tissulaire.

Le **chapitre 7** traite de l'imagerie endoscopique, en lumière blanche et en fluorescence. Après un exposé sur les principes de l'endoscopie, un accent particulier est mis sur la problématique de la reconstruction 3D des organes creux observés par cette

technique. Les images en endoscopie présentent en effet des caractéristiques spécifiques, nécessitant des approches dédiées : faible contraste des structures à observer, marquage en fluorescence délicat, fortes distorsions des images obtenues, induites par les caractéristiques du système optique utilisé et la géométrie en creux des organes. Ceci se traduit par des difficultés spécifiques pour effectuer le recalage des images en 3D.

Enfin, le [chapitre 8](#) est dédié à l'imagerie computationnelle monodétecteur. Grâce à la modulation optique de la scène par des motifs connus et grâce à des algorithmes de reconstruction numériques avancés, il est possible de reconstruire une image à partir d'une série de mesures ponctuelles (sur un pixel unique). Ce type d'imagerie s'est fortement développé ces quinze dernières années et permet de concevoir des systèmes performants et bas coûts pour différentes modalités telles que l'imagerie infrarouge, térahertz ou encore de fluorescence. Ce chapitre expose les aspects instrumentaux et les fondements mathématiques de l'imagerie computationnelle monodétecteur. Les techniques de reconstruction numériques classiques mais aussi les dernières approches utilisant l'apprentissage profond sont présentées.

Cet ouvrage a donc pour ambition d'initier le lecteur à ces nouvelles techniques d'imagerie non conventionnelle, en détaillant leurs principes et implémentations, illustrés par des exemples d'application tirés principalement des travaux des différents groupes de recherche impliqués dans leur développement.