

Modélisation de la réponse impulsionnelle pour la détection de particules en microscopie par fluorescence

Thèse de doctorat

soumise le 10 janvier 2008 par

Elodie Dusch

en vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Paris Descartes

Composition du jury

<i>Rapporteurs :</i>	Pr. Alain Faure	Université du Havre
	Pr. Isabelle Magnin	INSA
<i>Examineurs :</i>	Pr. Nicole Vincent	Université Paris Descartes
	Pr. Georges Stamon	Université Paris Descartes
	Pr. Patrick Bouthemy	IRISA
	Dr. Jean-Christophe Olivo-Marin	Institut Pasteur
	Dr. Auguste Genovesio	Institut Pasteur Korea
	Dr. Thierry Dorval	Institut Pasteur Korea
	Dr. Nicolas Loménie	Université Paris Descartes

Résumé

La réponse impulsionnelle d'un microscope, appelée *Point Spread Function*, provoque un flou et une déformation des objets sur les images de fluorescence. Une connaissance précise de cette fonction peut permettre de corriger ce phénomène, ou encore de donner un *a priori* sur la taille des objets recherchés dans l'image. En effet, sous la supposition que les particules biologiques fluorescentes peuvent être assimilées à une impulsion lumineuse, l'image de ces particules sera alors donnée par cette PSF.

Dans un premier temps, nous nous intéressons à la modélisation de la réponse impulsionnelle en microscopie par fluorescence. Afin d'obtenir un modèle analytique, nous étudions la diffraction des ondes dans un système optique parfait. Nous proposons un modèle analytique 3D de la PSF d'un microscope confocal à balayage par ligne en nous basant sur la théorie scalaire de Debye. Ce microscope, dont le fonctionnement peut être comparé à un microscope à champ large suivant la direction de la ligne et un microscope confocal classique suivant la direction perpendiculaire, possède une PSF asymétrique dans le plan focal. La modélisation proposée comprend un modèle asymétrique ainsi qu'une approximation gaussienne de ce modèle. Une comparaison de ces deux représentations est réalisée sur une vérité terrain.

Dans un deuxième temps, nous utilisons ces modèles pour la détection 3D de particules fluorescentes. Nous proposons une méthode de détection basée sur la courbure locale, combinée à une modélisation statistique de la formation de l'image afin d'estimer les positions sous-voxellique des particules détectées. Cette modélisation prend en compte les perturbations affectant l'image et l'approximation analytique de la réponse impulsionnelle. De plus, nous étudions l'influence de la modélisation analytique et de son approximation gaussienne sur la détection de particules sous la résolution optique.

Enfin, nous présentons des applications concrètes de la méthode à des problématiques biologiques, réalisées en collaboration avec d'autres équipes de l'Institut Pasteur de Corée.

Abstract

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Introduction générale	1
Partie I Modélisation de la réponse impulsionnelle (PSF)	5
Introduction	7
Chapitre 1 Optique ondulatoire	11
1.1 Généralités sur les ondes	12
1.2 Théorie scalaire de la diffraction	13
1.2.1 Principe de Huygens-Fresnels	13
1.2.2 Théorie de la diffraction de Kirchhoff	14
1.2.3 Approximation de Fraunhofer : modélisation 2D paraxiale	16
1.2.4 Approximation de Debye : modélisation 3D non-paraxiale/paraxiale	17
1.2.5 Approche vectorielle	18
1.3 Aberrations optiques	19
1.4 Conclusion	20
Chapitre 2 Réponse impulsionnelle d'un microscope optique à fluorescence	21
2.1 Description des microscopes optiques à fluorescence	21
2.1.1 Microscope à champ large	22
2.1.2 Microscope confocal	22
2.1.3 Caméra CCD	23
2.1.4 L'objectif	24
2.2 Modélisation de la PSF	25
2.2.1 Microscope optique à champ large	25
2.2.2 Microscope confocal à balayage par point	26

2.2.3	Approximation par une gaussienne	27
2.3	Conclusion	28
Chapitre 3 Réponse impulsionnelle d'un microscope confocal à balayage par ligne		29
3.1	Description du microscope	30
3.2	Modélisation par la théorie scalaire de Debye	31
3.2.1	PSF d'excitation	31
3.2.2	PSF d'émission	32
3.2.3	Modèle non-paraxial de la PSF d'un microscope MCL	33
3.2.4	Approximation paraxiale	33
3.3	Validation du modèle analytique	33
3.3.1	Mesure de la PSF expérimentale	34
3.3.2	Résultats et discussion	38
3.4	Approximation par une gaussienne	40
3.4.1	Méthodologie	41
3.4.2	Résultats et validation	41
3.5	Conclusion	44
Conclusion		45
Partie II Détection de particules fluorescentes		47
Introduction		49
Chapitre 1 Perturbations et limites		51
1.1	Nature des bruits dans l'image	51
1.1.1	Bruit intrinsèque : bruit de photons	51
1.1.2	Bruits extrinsèques	52
1.1.3	Perturbations liées à la préparation fluorescente	52
1.1.4	Description de la formation de l'image	53
1.2	Échantillonnage : critère de Nyquist	53
1.3	Résolution	54
1.3.1	Le critère de Rayleigh	55
1.3.2	Limite pratique : analyse de la formation de l'image	57
1.3.3	Amélioration de la résolution	58
1.4	Conclusion	59

Chapitre 2 Détection de particules fluorescentes : état de l'art	61
2.1 Détection de points d'intérêt	61
2.1.1 Approche par corrélation	61
2.1.2 Approche par ondelettes	62
2.1.3 Test du rapport de vraisemblance généralisé	63
2.1.4 Courbure locale	64
2.2 Localisation des particules	64
2.2.1 Calcul du centre de gravité	65
2.2.2 Ajustement d'une approximation de la PSF	66
2.3 Détection en dessous de la résolution	66
2.3.1 Déconvolution	67
2.3.2 Ajustement de modèles gaussiens	68
2.4 Conclusion	71
Chapitre 3 Détection de particules fluorescentes imagées par un microscope confocal à balayage par ligne	73
3.1 Détection de particules fluorescentes	73
3.1.1 Détection de particules par courbure locale	74
3.1.2 Estimation sous-voxellique des centres	76
3.1.3 Estimation du nombre de particules dans un amas	78
3.2 Validation	79
3.2.1 Algorithme de détection par courbure locale	79
3.2.2 Estimation sous-voxelique des centres	80
3.2.3 Estimation du nombre de particules fluorescentes dans un amas	83
3.3 conclusion	87
Chapitre 4 Applications biologiques	91
4.1 La leishmania	91
4.1.1 Problématique biologique	91
4.1.2 Analyse automatique	93
4.2 La malaria	95
4.2.1 Problématique biologique	96
4.2.2 Analyse préliminaire	96
4.3 Conclusion	96
Conclusion	97
Conclusion générale	99

Annexe	103
Annexe A Série de Maclaurin	103
Table des figures	105
Liste des tableaux	107
Bibliographie	109

Introduction générale

Les avancées en biologie ainsi qu'en optique permettent d'observer et d'étudier des phénomènes de plus en plus complexes, tels que la transcription de l'ARN au sein du noyau, l'interaction entre protéines, la propagation d'un virus ou encore les changements morphologiques des cellules sous l'effet d'une molécule. Ces phénomènes peuvent en effet être visualisés sur des images 3D et dans le temps grâce à la mise en place de systèmes optiques de plus en plus précis et de protocoles biologiques adaptés. Afin de transformer ces observations en études rigoureuses, il est cependant nécessaire de répéter les expériences et de quantifier ces phénomènes. La complexité des phénomènes observés et la masse de données à analyser rend alors la quantification manuelle inappropriée. L'étude de ces phénomènes nécessite des algorithmes de traitement et d'analyse des images biologiques automatiques, précis et robustes. Malgré les avancées en optique, l'observation de ces expériences biologiques reste perturbée par une variabilité et une déformation intrinsèque au système optique, celles-ci compliquant la mise en place d'une bonne quantification.

Nous cherchons ici à étudier et à modéliser cette déformation afin d'incorporer des *a priori* lors de la restauration ou l'analyse des images et ainsi obtenir une quantification plus pertinente.

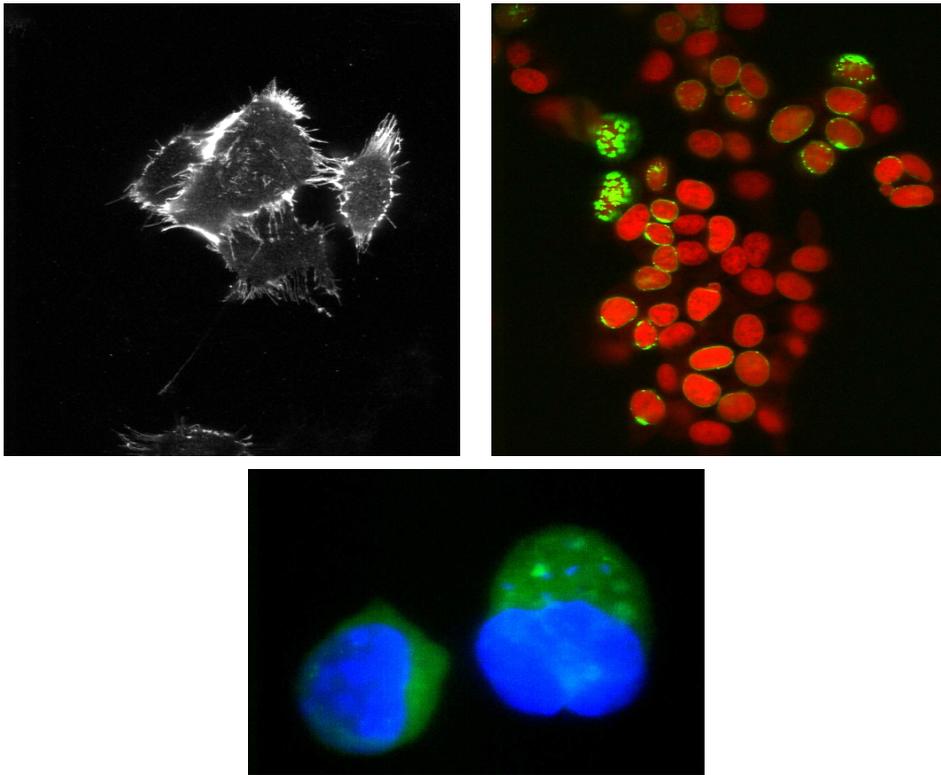
Microscopie par fluorescence

La microscopie par fluorescence exploite la capacité de certaines molécules d'absorber et d'émettre de la lumière. Georges Stokes, en 1852, a été le premier à observer un minéral fluorine émettant de la lumière rouge lorsqu'il est illuminé par des ultra-violets.

La microscopie par fluorescence est une méthode permettant d'étudier les matériaux possédant une propriété de fluorescence propre les structures marquées par des molécules fluorescentes, comme c'est le cas en biologie. Afin de visualiser les différentes structures d'une cellule, des sondes fluorescentes sont liées aux structures d'intérêt. Lors du marquage d'un noyau par exemple, on peut utiliser une protéine fluorescente (le DAPI) se fixant spécifiquement sur l'ADN. L'ADN se situant sur l'ensemble du noyau, il est alors possible de visualiser une zone fluorescente représentant le noyau. Depuis l'apparition de ces méthodes de marquage dans les années 70, la microscopie par fluorescence est devenue la technique la plus utilisée pour observer les structures cellulaires. La figure 1 présente quelques exemples d'images obtenue avec des microscopes par fluorescence.

Il existe plusieurs types de microscopes par fluorescence. Le microscope à champ large, où la lumière est focalisée vers un plan de la préparation, a été le premier microscope proposé. Ce microscope, largement utilisé à l'heure actuelle, a l'avantage de permettre des acquisitions rapides des expériences étudiées. Cependant, la microscopie à champ large pose un problème pour l'observation des objets ayant une certaine épaisseur. Les images du plan focalisé sont, en effet, perturbées par la lumière provenant des plans non-focalisés de la préparation et possèdent un flou lié à l'épaisseur de l'objet imagé.

Le principe de la microscopie confocale a été inventé par Minsky en 1955. Ce microscope permet de palier le problème du microscope à champ large en illuminant un point de la préparation par un laser et en utilisant un diaphragme placé devant le détecteur, ce dernier permettant de filtrer l'information hors



Sources : Dynamic Imaging Platform, Systems Biology of Pathogens, Institut Pasteur Korea

FIG. 1 – Exemples d’images en microscopie par fluorescence.

focale. La préparation est alors illuminée en balayant le laser point par point, ce principe donnant lieu au nom de microscope confocal à balayage par point. Le temps d’acquisition étant long comparativement au microscope à champ large, des améliorations de ce principe ont été proposées en modifiant le type de balayage. Le microscope à balayage par disque [Egger et Petran, 1967] permet d’illuminer la préparation à différentes positions de la préparation simultanément, imitant plusieurs microscopes confocaux à balayage par point utilisé en parallèle. Le microscope à balayage par ligne [Koester, 1980] focalise un laser sur une ligne de la préparation et balaye cette ligne sur l’ensemble de la préparation, une fente placée devant le détecteur permet de bloquer l’information hors focale.

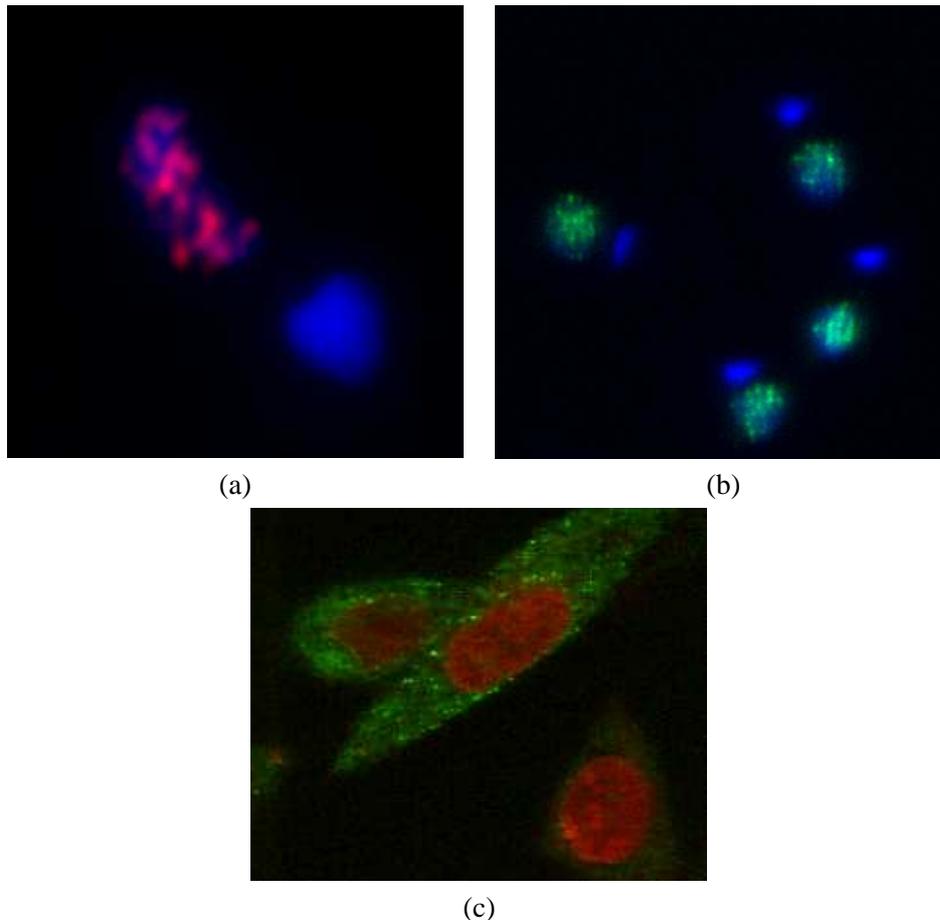
Problématique

En microscopie optique, l’image d’un point source lumineux est une tache créée entre autres par la diffraction des ondes lumineuses provenant de ce point. Ce phénomène, modélisé par la réponse impulsionnelle, engendre une déformation des objets étudiés plus ou moins importante suivant la taille de l’objet et le type de microscope considéré. De plus, il limite l’observation des détails des structures biologiques ou la discrimination spatiale de deux points sources. La capacité d’un système optique à discriminer ces détails est définie par un critère, appelé critère de résolution optique. À l’aide d’un modèle précis de la réponse impulsionnelle, il est possible de mettre en place des algorithmes de traitement d’image permettant de restaurer les images, d’améliorer la résolution optique et ainsi obtenir une analyse plus précise des phénomènes biologiques étudiés.

Le but de cette thèse est de proposer une modélisation de la réponse impulsionnelle par l’étude de la diffraction des ondes lumineuses à la sortie de microscope par fluorescence. Dans ce cadre, nos contri-

butions concernent la mise en place d'un modèle analytique de la réponse impulsionnelle du microscope confocal à balayage par ligne.

Dans un deuxième temps, nous utilisons cette modélisation afin de détecter des taches fluorescentes pouvant être modélisées par la réponse impulsionnelle. Nous supposons alors que les petites structures biologiques marquées par les molécules fluorescentes sont assez petites pour être considérées comme des points sources. L'image de ces particules fluorescentes peut alors être définie par la réponse impulsionnelle du microscope. La figure 2 présente des images de particules fluorescentes. Les premières images présentent des télomères en rouge (a) et en vert (b) à l'intérieur du noyau (en bleu) d'un parasite. La dernière image (c) montre des protéines fluorescentes (en vert) et le noyau (en rouge).



Sources : Dynamic Imaging Platform, Systems Biology of Pathogens, Institut Pasteur Korea

FIG. 2 – Exemples d'images de particules fluorescentes. Les premières images présentent la localisation des télomères en rouge (a) et en vert (b) dans le noyau d'un parasite. La dernière image (c) présente des protéines fluorescentes (en vert) et le noyau (en rouge).

Dans ce contexte, nous mettons en place des algorithmes de détection basés sur une modélisation analytique de la réponse impulsionnelle robustes aux diverses perturbations telles que le bruit pouvant affecter l'image. De plus, nous cherchons à discriminer des particules fluorescentes en dessous de la résolution optique. Dans ce cadre, nous étudions les erreurs induites par une mauvaise approximation de la réponse impulsionnelle.

Plan

Ce manuscrit propose une étude en deux parties. La première partie est consacrée à la modélisation de la réponse impulsionnelle d'un microscope par fluorescence. Après une introduction, nous présentons dans le chapitre 1 quelques rappels en optique ondulatoire et la théorie de la diffraction des ondes ainsi que ses approximations. Dans le chapitre 2, nous décrivons les microscopes à champ large et les microscopes confocaux à balayage par point, ainsi que les modélisations analytiques (basées sur la diffraction des ondes) et les approximations gaussiennes de leurs réponses impulsionnelles. Nous présentons dans le chapitre 3 nos contributions, concernant la modélisation de la réponse impulsionnelle du microscope confocal à balayage par ligne. Nous proposons alors un modèle analytique basé sur la théorie de la diffraction et son approximation gaussienne. Une validation et une comparaison de ces modèles sont réalisées par rapport à une vérité terrain.

La deuxième partie de ce manuscrit concerne la détection de particules fluorescentes. Après une introduction, nous exposons dans le chapitre 1 les perturbations pouvant affecter les images en microscopie par fluorescence. Nous présentons ensuite les critères permettant de définir la résolution optique. Dans le chapitre 2, nous présentons un état de l'art sur les méthodes de détection au dessus et en dessous de la résolution optique. Dans le chapitre 3, nous proposons une méthode de détection de particules fluorescentes basée sur la modélisation de la réponse impulsionnelle du microscope à balayage par ligne. Dans ce cadre, nous comparons alors notre modélisation analytique et son approximation gaussienne. Le chapitre 4 est finalement dédié aux problématiques biologiques pour lesquelles nous avons utilisés notre modélisation analytique et notre méthode de détection.

Cadre de travail

Ce travail a été effectué au sein de deux laboratoires : le groupe Image Mining de l'Institut Pasteur Korea (IPK) et l'équipe des Systèmes Intelligents de Perception du Centre de Recherche en Informatique de l'Université Paris Descartes.

L'Institut Pasteur Korea (<http://www.pasteur.or.kr>) est une fondation indépendante financée par le ministère des sciences et technologies de la Corée du Sud, et la province de Gyeonggido. En collaboration avec l'Institut Pasteur (Paris) et le KIST (Séoul), l'IPK combine la recherche en biologie et les nouvelles technologies pour la recherche de nouveaux médicaments contre des maladies infectieuses ou chroniques. Le groupe Image Mining, au sein de l'IPK, a pour objectif la mise au point de méthodes de traitement d'images permettant de quantifier automatiquement des phénomènes biologiques variés.

L'équipe Systèmes Intelligents de Perception (SIP), située à l'UFR Mathématiques et Informatique de l'Université Paris Descartes, a pour objectif de développer des méthodes issues de la reconnaissance des formes, de l'analyse d'images et de l'intelligence artificielle afin d'apporter des solutions fonctionnelles et originales à différentes problématiques, telles que la bio-imagerie, la géo-imagerie ou encore la reconnaissance de caractère.

Première partie

Modélisation de la réponse impulsionnelle (PSF)

Introduction

La réponse impulsionnelle d'un microscope optique appelée généralement PSF, de l'anglais Point Spread Function, ou fonction d'étalement du point, constitue un phénomène majeur de la formation d'une image. Elle correspond à la sortie d'un système optique soumis à une impulsion d'entrée. Nous utiliserons le terme PSF pour désigner cette fonction dans le reste du document.

La figure 1 montre un système optique simple constitué d'une unique lentille mince convergente. Un point source, mathématiquement formulé par une impulsion de Dirac $\delta(\xi, \nu, \omega)$, est situé sur le plan focal de la lentille et produit une tache $T(x, y, z)$ sur le plan image. Cette réponse correspond à la PSF de ce système optique. Le rapport entre la distance d_f , distance focale de la lentille, et d_i , la distance entre la lentille et le plan image, définit le coefficient de grossissement transversal $M = \frac{d_i}{d_f}$ de la lentille. Du

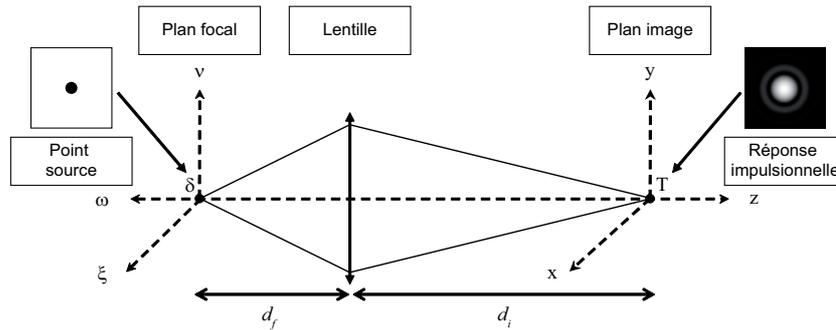


FIG. 1 – Système optique simple constitué d'une lentille mince. La lentille transforme l'impulsion $\delta(\xi, \nu, \omega)$ située sur le plan focal, en une tache $T(x, y, z)$ sur le plan image. La tache ainsi formée représente la PSF de ce système. Les distances d_f et d_i sont respectivement la distance focale et la distance entre la lentille et le plan image.

point de vue de l'optique géométrique, ce système peut être vu comme un grossissement et une projection de l'impulsion d'entrée vers l'image de sortie. L'optique géométrique ne suffit pas alors à expliquer la tache formée sur le plan image.

À l'aide des notations de la figure 1, la PSF h de ce système, définie en tout point de l'espace, s'écrit [Castleman, 1996, Tao et Nicholson, 1995, Gu, 1996] :

$$h(x, y, z) = \iiint_{\mathbb{R}^3} h\left(\frac{x}{M} - \xi, \frac{y}{M} - \nu, \frac{z}{M^2} - \omega\right) \delta(\xi, \nu, \omega) d\xi d\nu d\omega.$$

On remarque que le grossissement axial (le long de l'axe optique z) est égal au carré du coefficient de grossissement transversal M . Le grossissement axial équivaut à la distance entre deux plans successifs dans l'espace objet divisée par la distance entre les deux plans correspondants dans l'espace image. Ce rapport peut être approché par le carré de M pour de grands coefficients transversaux.

Dans un système optique linéaire et invariant par translation, la formation d'une image est définie par la PSF, il est alors possible d'exprimer l'image comme la convolution entre l'objet étudié et la PSF. Un système est dit invariant par translation s'il transforme de façon identique deux points sources situés à deux endroits différents du plan focal. Le système optique présenté sur la figure 1 ne peut être considéré invariant par translation du fait du coefficient de grossissement de la lentille. En effet, un déplacement de l'impulsion d'une distance δx provoquerait un déplacement sur l'image de $M\delta x$. Néanmoins, ce coefficient n'intervenant pas directement dans la modélisation de la fonction h , nous utilisons le changement de variable $u = M\xi$, $v = M\nu$ et $w = M^2\omega$ et nous supposons un grossissement de 1, afin de rendre le système invariant par translation. Sous ces simplifications, les coordonnées des pixels seront exprimées dans l'espace de l'objet, c'est à dire en micromètres (μm).

Un système est dit linéaire si l'image d'un objet correspond à la somme des PSFs le composant. Un microscope à fluorescence est un système linéaire en intensité. La distribution d'intensité des PSFs arrivant sur le détecteur est sommée pour former l'image. On parle alors de PSF d'intensité.

L'image d'un objet o dans un système optique linéaire et invariant par translation, est alors obtenue par la convolution de celui-ci par la PSF :

$$\begin{aligned} g(x, y, z) &= \iiint_{\mathbb{R}^3} h(x - u, y - v, z - w) o(u, v, w) du dv dw, \\ g(x, y, z) &= (h * o)(x, y, z), \end{aligned} \quad (1)$$

où l'opérateur $*$ indique la convolution. Ces notations formalisent la création des images mais ne nous permettent pas de définir la fonction h .

En microscopie optique, la PSF exacte h ne peut être connue *a priori*. Elle varie d'une expérience biologique à une autre suivant les objets étudiés et les aberrations introduites par les composants optiques du microscope. Néanmoins une approximation de la PSF peut être obtenue expérimentalement ou calculée de façon analytique grâce à une modélisation mathématique de la propagation de la lumière à travers les composants du système optique.

Dans le cadre d'une approche expérimentale, la PSF est directement déduite d'objets assimilables à des impulsions lumineuses. En pratique, imager un point source s'avérant difficile, une préparation contenant des billes de petites tailles (inférieures à la longueur d'onde) fixées dans un gel est généralement utilisées à cet effet [Hiraoka *et al.*, 1990, Shaw et Rawlins, 1991, Yoo *et al.*, 2006]. Pour chaque bille, un masque est extrait de l'image, et l'ensemble de ces masques est ensuite moyenné pour créer une image correspondant à la PSF. Afin de prendre aussi en compte les conditions d'imageries *in situ*, de Monvel *et al.* [de Monvel *et al.*, 2001] ainsi que Tiedemann *et al.* [Tiedemann *et al.*, 2006] proposent d'extraire de petites structures modélisant la PSF dans l'image biologique.

Cette approche ayant l'avantage de bien refléter les conditions d'imagerie, elles sont souvent utilisées dans les algorithmes de déconvolution [McNally *et al.*, 1997, Voort et Strasters, 1995, Verveer, 1998, Sarder et Nehorai, 2006]. Pour obtenir une restauration précise des images biologiques, les algorithmes de déconvolution nécessitent en effet une modélisation précise de la PSF. De plus, la résolution du problème de déconvolution étant réalisée de façon numérique, l'utilisation d'un masque ne pose pas de problèmes algorithmiques.

Dans notre cadre de détection de particules fluorescentes, l'utilisation d'un masque limiterait cependant les possibilités algorithmiques. Pour cette raison, nous nous intéresserons par la suite essentiellement à une modélisation analytique de la PSF.

Afin de proposer une définition de h , il est nécessaire de modéliser la distribution de la lumière à la sortie du système optique. Nous nous plaçons dès lors dans le cadre de l'optique ondulatoire, celle-ci

permettant la description des phénomènes de diffraction. La lumière sera décrite en tant qu'onde par opposition à la description en tant que particule fournie par la théorie corpusculaire.

Dans le premier chapitre, suite à un rappel sur les ondes électromagnétiques, nous présenterons les théories scalaires et vectorielles sur la diffraction ainsi que les différentes aberrations induites par les composants optiques.

Dans le deuxième chapitre, nous décrirons les microscopes optiques à fluorescence et plus particulièrement les microscopes confocaux. Nous présenterons, ensuite, les modèles de PSF existants pour ces microscopes.

Finalement, nous proposerons dans le dernier chapitre un modèle de PSF pour un microscope confocal par fluorescence à balayage par ligne.

Chapitre 1

Optique ondulatoire

Dans l'introduction, nous avons présenté la théorie de la formation de l'image d'un point de vue de l'optique géométrique. Développée dès l'Antiquité, cette approche décrit la propagation de la lumière en terme de rayons, et repose sur deux lois : (i) la loi de propagation rectiligne de la lumière dans un milieu homogène et (ii) la loi de Snell-Descartes (début du XVII^e siècle) exprimant la réflexion et la réfraction de la lumière. Cette dernière est illustrée dans la figure 1.1.

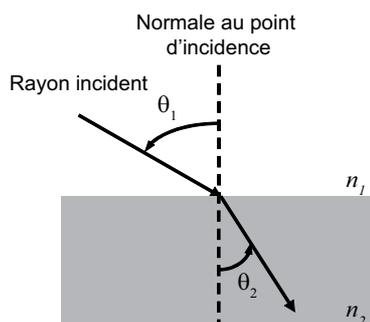


FIG. 1.1 – Illustration de la loi de Snell-Descartes exprimant la réfraction de la lumière. Un rayon lumineux se propageant avec un angle θ_1 dans un milieu d'indice de réfraction n_1 sera dévié de sa direction originale à la rencontre d'un milieu d'indice de réfraction $n_2 \neq n_1$. L'angle de réfraction θ_2 est donné par la relation $n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$, appelée relation de Snell-Descartes.

Au milieu du XVII^e siècle, Robert Boyle et Robert Hooke mettent en évidence les premiers phénomènes d'interférence que l'optique géométrique ne peut expliquer. Christiaan Huygens, à la fin du XVII^e siècle, proposera la théorie ondulatoire de la lumière pour expliquer ces phénomènes. La lumière est alors décrite par des mouvements ondulatoires se transmettant de proche en proche.

En parallèle de la théorie ondulatoire de la lumière, Isaac Newton développe la théorie corpusculaire dans laquelle la lumière se propage sous forme de particules. Cette opposition sera à l'origine d'une série d'expériences mettant en évidence le principe de dualité onde-corpuscule selon lequel tous les objets de notre univers présentent simultanément des propriétés d'ondes et de particules.

Il faudra attendre le début du XVIII^e siècle avec la série d'expériences sur les interférences réalisées par Thomas Young pour que la théorie ondulatoire soit pleinement acceptée. Dans la même période, Augustin Fresnel reprend les travaux de Huygens et développe la théorie sur les phénomènes de diffraction, donnant lieu au principe de Huygens-Fresnel. Ce principe sera mise sous forme mathématique à la fin du XVIII^e siècle par Gustav Kirchhoff.

Le lecteur pourra se référer à [Born et Wolf, 1999] pour une description complète du phénomène de diffraction.

La première section de ce chapitre est consacrée à un rappel sur la lumière définie par des ondes électromagnétiques. Dans la deuxième section, nous présenterons le principe de Huygens-Fresnel et la formulation de Kirchhoff. Nous présenterons, ensuite, l'approximation de Debye (début du XX^e siècle) sur les phénomènes de diffraction au voisinage du plan focal. Enfin, nous nous attacherons à décrire les phénomènes d'aberrations optiques pouvant intervenir dans la modélisation de la PSF.

1.1 Généralités sur les ondes

Une onde électromagnétique (cf. figure 1.2), régie par les équations de Maxwell [Maxwell, 1873], est définie par son champ électrique \mathbf{E} et son champ magnétique \mathbf{B} tous deux perpendiculaires à sa direction de propagation \mathbf{k} , appelée aussi vecteur d'onde. Le champ magnétique pouvant se déduire du champ électrique, une onde est généralement uniquement représentée par ce dernier.

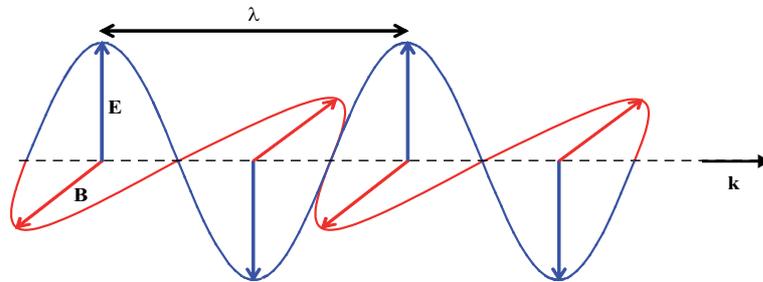


FIG. 1.2 – Onde électromagnétique monochromatique de longueur d'onde λ . Elle est caractérisée par un champ électrique \mathbf{E} et un champ magnétique \mathbf{B} tous deux perpendiculaires à la direction de propagation \mathbf{k} .

Deux types d'ondes interviennent principalement dans la théorie de la diffraction : les ondes planes et les ondes sphériques. L'expression complexe d'une onde plane est donnée par :

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}_0 \exp(-i(\mathbf{k}\mathbf{r} - \omega t)).$$

Cette équation donne la valeur du champ électrique en un point \mathbf{r} , en un temps t exprimé en secondes (s) et avec ω sa pulsation exprimée en radians par seconde (rad/s). Dans les microscopes à fluorescence les ondes étant filtrées afin de sélectionner une seule longueur d'onde, les ondes intervenant dans la modélisation de la PSF peuvent être considérées monochromatiques. La norme k du vecteur d'onde, notée $\|\mathbf{k}\|$ et appelée nombre d'onde, est alors égale à $\frac{n2\pi}{\lambda}$ avec n l'indice de réfraction du milieu dans lequel l'onde se propage.

Une onde électromagnétique est caractérisée par sa polarisation. Celle-ci définit l'orientation du champ électrique \mathbf{E} . Suivant le type de polarisation, la forme décrite par le champ électrique sera une ligne, un cercle ou une ellipse. Si elle ne suit aucune de ces formes, la lumière est alors non polarisée.

Si l'on ne s'intéresse pas à la polarisation de l'onde, il est possible de décrire une onde par son amplitude complexe scalaire U :

$$U(\mathbf{r}, t) = U_0 \exp(-i(\mathbf{k}\mathbf{r} - \omega t)). \quad (1.1)$$

On parle alors d'onde plane scalaire par opposition à une onde plane vectorielle. Cette approximation est présentée sur la figure 1.3. Nous conserverons cette approximation dans le reste de cette section. De

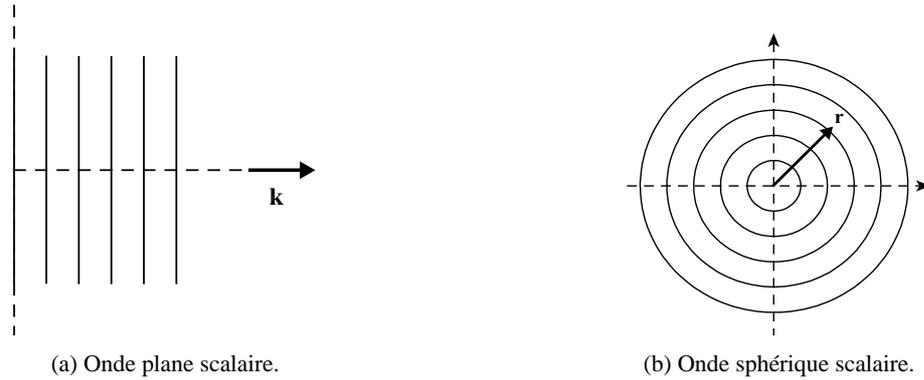


FIG. 1.3 – Exemple d'ondes scalaires stationnaires. L'onde plane (a) est caractérisée par sa direction \mathbf{k} de propagation et son amplitude initiale U_0 . En un point de vecteur associé \mathbf{r} , l'amplitude d'une onde sphérique (b) est définie par son amplitude initiale et sa distance de propagation.

plus, nous supposons que l'onde est stationnaire, c'est à dire que son amplitude est indépendante du temps ($t = 0$ dans l'équation (1.1)).

Une onde sphérique monochromatique stationnaire est présentée sur la figure 1.3(b). Son amplitude complexe est donnée par :

$$U(\mathbf{r}, t = 0) = U_0 \frac{\exp(-ikr)}{r} \quad (1.2)$$

où $r = \|\mathbf{r}\|$ est la longueur du rayon entre l'origine de l'onde et le point extrémité du vecteur \mathbf{r} .

Les détecteurs utilisés en microscopie par fluorescence n'enregistrent que l'intensité lumineuse, notée $I(\mathbf{r})$, il est intéressant de remarquer que celle-ci est donnée par le carré du module de l'amplitude complexe $|U(\mathbf{r})|^2$.

1.2 Théorie scalaire de la diffraction

A la rencontre d'un obstacle, les ondes interfèrent les unes avec les autres et forment une figure de diffraction. Dans cette section, nous présentons la théorie scalaire de la diffraction quantifiant ce phénomène dans le cas particulier d'ondes scalaires, monochromatiques et stationnaires. La figure 1.4 présente deux phénomènes de diffraction : le disque d'Airy et la diffraction d'onde plane par une fente. Le disque d'Airy représente la distribution d'intensité des ondes dans le plan focal d'une lentille circulaire.

1.2.1 Principe de Huygens-Fresnels

Le principe de Huygens-Fresnels permet d'expliquer de façon qualitative la diffraction de la lumière. Chaque élément d'une surface d'onde peut être regardé comme le centre d'une perturbation secondaire qui donne naissance à des ondelettes sphériques de même fréquence et vitesse que les ondes primaires. La position de la surface d'onde à un instant postérieur est l'enveloppe de toutes ces ondelettes et son amplitude est égale à la superposition de ces ondelettes.

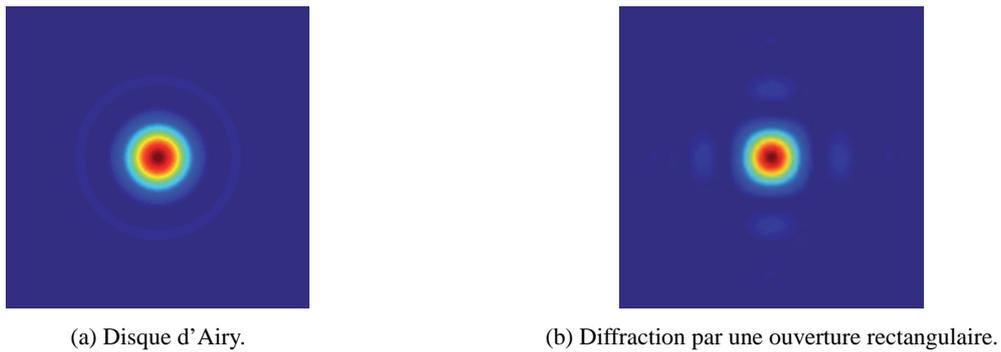


FIG. 1.4 – Exemples de phénomènes de diffraction. Le disque d'Airy (a) représente la diffraction des ondes par une ouverture circulaire. La figure (b) présente la diffraction des ondes par une ouverture rectangulaire.

1.2.2 Théorie de la diffraction de Kirchhoff

La théorie de la diffraction de Kirchhoff formalise mathématiquement le principe de Huygens-Fresnel. Elle fournit une expression générale pour calculer la diffraction de la lumière par une ouverture. Cette théorie est basée sur le théorème de Kirchhoff. Ce théorème, basé sur le théorème de Green, exprime la solution à l'équation d'onde (équation différentielle exprimant la propagation des ondes) pour un point arbitraire situé dans une surface fermée. Une présentation ainsi qu'une démonstration de ce théorème peuvent être trouvées dans [Born et Wolf, 1999].

Afin de présenter la formule qui régit la diffraction de Kirchhoff, appelée formule de diffraction de Fresnel-Kirchhoff, nous allons nous placer dans les conditions suivantes (aussi présentées sur la figure 1.5) : une source à une distance s d'une ouverture O émet une onde monochromatique sphérique. L'amplitude complexe de cette onde au point P_1 situé sur l'ouverture est donnée par :

$$U(P_1) = U_0 \frac{\exp(-iks)}{s}$$

où U_0 est l'amplitude à l'origine.

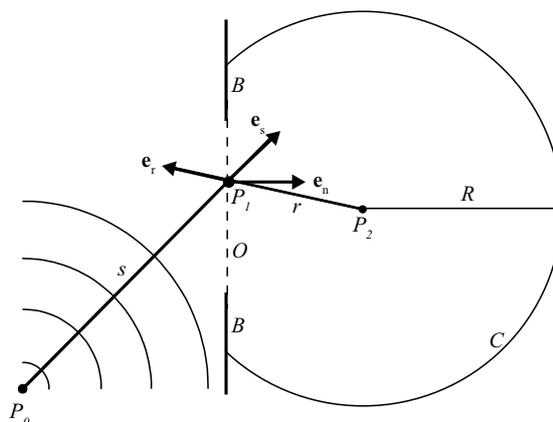


FIG. 1.5 – Schéma de la diffraction de Kirchhoff par une ouverture O . Une source P_0 à une distance s , de vecteur unitaire \mathbf{e}_s , de l'ouverture émet une onde sphérique. Cette onde traverse O suivant un facteur d'inclinaison égal à $\cos(\mathbf{e}_n, \mathbf{e}_r) - \cos(\mathbf{e}_n, \mathbf{e}_s)$ avec \mathbf{e}_n la normale à l'ouverture et \mathbf{e}_r un vecteur unitaire du support de (P_2, P_1) . L'amplitude complexe au point P_2 est donnée par la théorie de la diffraction de Kirchhoff.

La théorie de la diffraction de Kirchhoff établit l'amplitude d'un point P_2 situé à l'intérieur d'une surface fermée S formée par : (1) l'ouverture O , (2) les bords B de l'ouverture et (3) une portion C d'une sphère centrée en P_2 et de rayon R . Dans ce cadre, le théorème de Kirchhoff exprime l'amplitude du point P_2 par :

$$U(P_2) = \frac{1}{4\pi} \left[\iint_O + \iint_B + \iint_C \right] \left[U(P_1) \frac{\partial}{\partial \mathbf{e}_n} \left(\frac{\exp(-ikr)}{r} \right) - \frac{\exp(-ikr)}{r} \frac{\partial}{\partial \mathbf{e}_n} U(P_1) \right] dS, \quad (1.3)$$

où \mathbf{e}_n est un vecteur unitaire de la normale à l'ouverture et r la distance entre l'ouverture O et le point P_2 . Les conditions de bord de Kirchhoff établissent que la contribution des bords B peut être négligée et que l'ouverture ne modifie pas l'amplitude des ondes incidentes. De plus, il est possible de montrer que l'intégration sur la portion sphérique devient nulle lorsque le rayon R est large. Les dérivées le long de la normale pouvant être approchées par [Born et Wolf, 1999] :

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial \mathbf{e}_n} U(P_1) &\approx -U_0 \frac{ik}{s} \exp(-iks) \cos(\mathbf{e}_n, \mathbf{e}_s), \\ \frac{\partial}{\partial \mathbf{e}_n} \left(\frac{\exp(-ikr)}{r} \right) &\approx -\frac{ik}{r} \exp(-ikr) \cos(\mathbf{e}_n, \mathbf{e}_r), \end{aligned}$$

l'équation (1.3) devient :

$$U_{FK}(P_2) = \frac{ikU_0}{4\pi} \iint_O \frac{\exp(-ik(r+s))}{rs} [\cos(\mathbf{e}_n, \mathbf{e}_s) - \cos(\mathbf{e}_n, \mathbf{e}_r)] dS. \quad (1.4)$$

où \mathbf{e}_r et \mathbf{e}_s sont respectivement les vecteurs unitaires entre les points P_2 et P_1 , et entre les points P_0 et P_1 . L'onde produite au point P_2 est alors le résultat de la superposition d'ondes sphériques issues de chaque point de l'ouverture.

La théorie de Kirchhoff quantifie la diffraction à travers une ouverture quelconque et à une distance quelconque de l'ouverture. Sous diverses approximations, les équations résultant de cette théorie ont été adaptées à la modélisation de la diffraction à travers une lentille mince. La validité de ces approximations dépend principalement de la distance focale et de l'angle de convergence de la lentille.

Si la distance focale est faible, on parle alors d'approximation à champ proche, donnée par la théorie de Fresnel. Dans les microscopes optiques, la distance focale est généralement considérée large. On parle alors de diffraction à l'infini. Lorsque la distance focale augmente, le rayon de courbure des ondes devient très grand. Ces ondes peuvent alors être approximées par des ondes planes. Cette approximation constitue le cadre de l'approximation de Fraunhofer et de l'approximation de Debye. En pratique, ces approximations sont valides pour une distance focale supérieure à $\frac{a^2}{\lambda}$ avec a la taille de lentille.

L'approximation de Fraunhofer permet de définir l'amplitude en un point situé sur le plan focal de la lentille. Cette approximation est valable pour de petits angles de convergence, on parle alors d'approximation paraxiale.

L'approximation de Debye définit, quant à elle, l'amplitude d'un point situé proche du plan focal. Elle permet de modéliser la distribution 3D de l'amplitude des ondes proches du point focal dans le cas non-paraxial (grand angle de convergence) et dans le cas paraxial. Pour ces raisons, la modélisation de la PSF 3D d'un microscope optique par fluorescence est fréquemment obtenue à l'aide de cette approximation.

Dans les paragraphes suivants, nous présentons l'approximation de Fraunhofer souvent utilisée dans les modélisations 2D de la PSF, et l'approximation de Debye.

1.2.3 Approximation de Fraunhofer : modélisation 2D paraxiale

Comme nous l'avons vu précédemment, l'approximation de Fraunhofer permet de modéliser l'amplitude d'un point P_2 situé sur le plan focal de la lentille avec une distance focale d_f importante. Dans un microscope optique, le point P_0 est loin de la lentille comparativement à la longueur d'onde [Gu, 2000]. Dans ces conditions, la distance entre les points P_0 et P_2 est assez grande pour négliger le facteur d'inclinaison $\cos(\mathbf{e}_n, \mathbf{e}_s) - \cos(\mathbf{e}_n, \mathbf{e}_r)$.

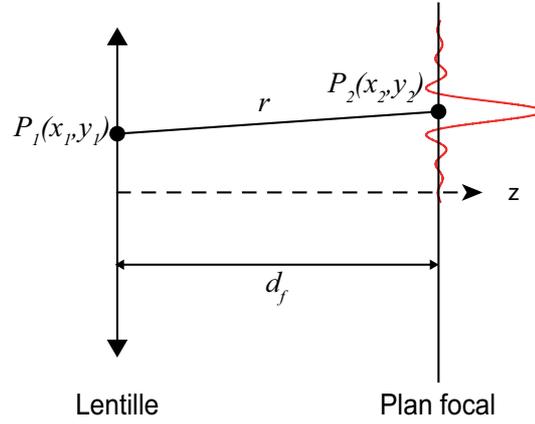


FIG. 1.6 – Diffraction de Fraunhofer par une lentille. Le point d'observation P_2 est situé sur le plan focal de la lentille.

En appliquant ces conditions et les notations présentées sur la figure 1.6, l'équation (1.4) devient :

$$U(x_2, y_2) = \frac{ikU_0}{4\pi} \iint_O U(x_1, y_1) \frac{\exp(-ikr)}{r} dx_1 dy_1.$$

Suivant le système de coordonnées défini sur la figure 1.6, la distance r intervenant dans l'exponentiel peut être exprimée par :

$$r^2 = d_f^2 + (x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 = d_f^2 \left(1 + \frac{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}{d_f^2} \right).$$

Sous une approximation paraxiale, l'onde se propage le long d'une direction proche de l'axe optique z , nous pouvons alors supposer que $(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2$ est très petit devant d_f^2 . En utilisant le développement en série de Maclaurin de $\sqrt{1+x}$, dont nous retenons que $1 + x/2$, cette distance peut être approchée par :

$$r \approx d_f \left(1 + \frac{x_2^2 + y_2^2}{2d_f^2} - \frac{x_1x_2 + y_1y_2}{d_f^2} + \frac{x_1^2 + y_1^2}{2d_f^2} \right).$$

La distance focale d_f étant importante, le rapport contenant les termes x_1^2 et y_1^2 peut aussi être négligé. Sous une approximation paraxiale, le point P_2 étant supposé proche de l'axe optique z , la distance r au dénominateur peut être approchée par d_f .

Sous ces approximations, l'amplitude complexe au point P_2 est définie par :

$$U(x_2, y_2) = \frac{ikU_0 \exp(-ikd_f)}{4\pi d_f} \exp\left(-ik \frac{x_2^2 + y_2^2}{2d_f}\right) \iint_{-\infty}^{+\infty} G(x_1, y_1) \exp\left(\frac{ik}{d_f}(x_1x_2 + y_1y_2)\right) dx_1 dy_1 \quad (1.5)$$

où U_0 est l'amplitude de l'onde avant la lentille et $G(x_1, y_1)$ est la distribution des ondes sur la lentille, aussi appelée fonction pupille. Dans le cas paraxial, la fonction pupille est simplement définie par le

coefficient de transmission $T(x_1, y_1)$ de la lentille. La transmission étant définie pour tout point de la lentille, l'intégration est maintenant réalisée sur \mathbb{R}^2 . On constate que cette équation peut être vue comme la transformée de Fourier de la fonction pupille.

Dans le cas d'une lentille circulaire, il est possible d'utiliser un système de coordonnées polaires pour simplifier l'équation (1.5). En introduisant le rayon a de la lentille, l'équation (1.5) est alors remplacée par :

$$U_{P_2}(r_2) = C \left(\frac{2J_1(kar_2/d_f)}{kar_2/d_f} \right), \text{ avec } \begin{cases} r_2 = \sqrt{x_2^2 + y_2^2} \\ C = \frac{ikU_0 \exp(-ikd_f)}{4\pi d_f} \exp\left(-ik\frac{r_2^2}{2d_f}\right) \end{cases} \quad (1.6)$$

où J_n est la fonction Bessel d'ordre n . Le coefficient de transmission est dans ce cadre égal à :

$$T(r_1) = \begin{cases} 1 & \text{si } r_1 \leq a, \\ 0 & \text{sinon,} \end{cases}$$

avec $r_1 = \sqrt{x_1^2 + y_1^2}$.

La distribution d'intensité dans le plan focal, donnée par le carré de l'équation (1.6), correspond au disque d'Airy illustré sur la figure 1.4(a).

1.2.4 Approximation de Debye : modélisation 3D non-paraxiale/paraxiale

L'approximation de Debye définit la distribution de lumière en un point proche du point focal. Dans ce cadre, la distance focale d_f est large et le facteur d'inclinaison peut être négligé.

La figure 1.7 décrit le système optique pour l'approximation de Debye. Contrairement au système de Kirchhoff, le point source P_0 est positionné au point focal de la lentille. L'amplitude complexe au point P_1 s'écrit alors :

$$U(P_1) = G(P_1) \frac{\exp(ikd_f)}{d_f},$$

où $G(P_1)$ représente la fonction pupille de la lentille.

Dans ces conditions, l'équation (1.4) devient :

$$U(P_2) = \frac{i}{\lambda} \iint_O G(P_1) \frac{\exp(-ik(r - d_f))}{d_f r} dS.$$

Si le point P_2 est proche de P_0 , la distance $r - d_f$ peut être approchée par le produit scalaire $\mathbf{e}_k \cdot \mathbf{R}$ où \mathbf{e}_k est un vecteur unitaire dans la direction P_0P_1 et \mathbf{R} le vecteur $\overrightarrow{P_0P_2}$. De plus, la surface élémentaire dS est donnée par $d_f^2 d\Omega$ où Ω représente l'angle solide défini par le cône centré au point focal et de rayon d_f .

Ces approximations donnent lieu à l'approximation de Debye définissant l'amplitude complexe d'un point près du point focal comme la superposition d'ondes planes de différentes directions de propagation, spécifiées par \mathbf{e}_k , intégrées sur l'angle solide Ω [Born et Wolf, 1999] :

$$U(P_2) = \frac{i}{\lambda} \iint_{\Omega} G(P_1) \exp(-ik\mathbf{e}_k \cdot \mathbf{R}) d\Omega. \quad (1.7)$$

Dans le cas d'une lentille circulaire, de façon similaire à l'approximation de Fraunhofer, il est possible d'utiliser un système de coordonnées sphériques pour simplifier l'équation (1.7). En introduisant le demi-angle de convergence maximal α de la lentille, l'équation (1.7) est alors remplacée par :

$$U(P_2) = \frac{2\pi i}{\lambda} \int_0^\alpha G(\theta) J_0(kr \sin \theta) \exp(-ikz \cos \theta) \sin \theta d\theta, \quad (1.8)$$

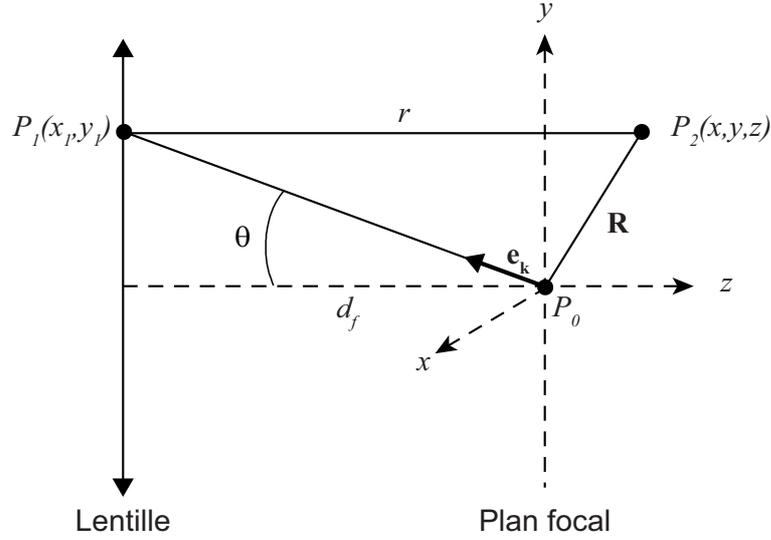


FIG. 1.7 – Système optique pour l’approximation de Debye. Une onde sphérique est émise d’un point P_0 situé sur le point focal de la lentille. \mathbf{e}_k est un vecteur unitaire dans la direction P_0P_1 , et \mathbf{R} le vecteur d’extrémité P_0 et le point d’observation P_2 . θ est la mesure de l’angle de convergence de la lentille.

où J_0 est la fonction Bessel d’ordre 0 et $r = \sqrt{x^2 + y^2}$. La fonction pupille dépend maintenant de l’angle de convergence θ . La fonction $G(\theta)$, aussi appelée fonction d’apodisation dans le cas non-paraxial, inclut les coefficients de transmission et de réflexion de la lentille et les aberrations (cf. paragraphe 1.3).

Cette équation est valable pour tout angle de convergence. Néanmoins, si l’angle θ tend vers zéro, il est possible de simplifier l’équation précédente en utilisant les approximations suivantes :

$$\begin{cases} \sin \theta & \approx \theta, \\ \cos \theta & \approx 1 - \frac{1}{2}\theta^2, \\ \theta & = \alpha t. \end{cases} \quad (1.9)$$

L’équation de Debye pour une lentille circulaire devient alors :

$$U(r, z) = \frac{2\pi i \alpha^2}{\lambda} \exp(-ikz) \int_0^1 J_0(kr\alpha t) \exp\left(\frac{i}{2}kz\alpha^2 t^2\right) t dt. \quad (1.10)$$

Les angles de convergence étant considérés petits, cette formulation correspond à une approximation paraxiale. On remarquera que la fonction pupille n’intervient plus dans cette approximation. De façon similaire à l’approximation de Fraunhofer, les angles de transmission des ondes à travers la lentille étant faibles, cette fonction peut être supposée constante.

1.2.5 Approche vectorielle

Au cours des paragraphes précédents, nous avons supposé que les ondes étaient totalement définies par leurs amplitudes complexes ne tenant pas compte de la nature vectorielle d’une onde électromagnétique. Néanmoins, lors du passage au travers d’une lentille à grand angle de convergence α , une lumière polarisée linéairement peut devenir dépolarisée au point focal de lentille. La distribution des ondes proches du point focal sera alors différente de celle modélisée par la théorie scalaire. La distribution du champ électrique d’un point proche du point focal a été largement étudiée [Richards et Wolf, 1959, Sheppard et Matthews, 1987, Hell *et al.*, 1993, Török et Varga, 1997], la théorie vectorielle de Debye, [Wolf, 1959, Gu, 2000] étant la plus utilisée pour modéliser ce changement de

polarisation. Le lecteur pourra se référer à [Gu, 2000] pour une présentation de cette théorie. La théorie scalaire permettant cependant d'obtenir une modélisation simple de la PSF, proche de la PSF vectorielle [Born et Wolf, 1999], nous négligeons les effets de dépolarisation des ondes dans les modèles présentés.

1.3 Aberrations optiques

Nous avons présenté la propagation de la lumière dans le cas d'une lentille mince supposée parfaite. Dans ce cadre, la distribution de la lumière est alors totalement définie par la théorie de la diffraction. En pratique, un système optique n'est jamais parfait et la formation de l'image est alors altérée par des aberrations optiques. On distingue généralement deux types d'aberrations : les aberrations chromatiques et les aberrations géométriques [Keller, 1995].

Aberrations chromatiques

Les aberrations chromatiques (cf. figure 1.8) sont dues à la variation de l'indice de réfraction du matériau composant les lentilles en fonction de la longueur d'onde. Un rayon d'une certaine longueur d'onde ne sera pas réfracté de la même façon qu'un rayon possédant une longueur d'onde différente. Il en résulte une distance focale différente pour chaque longueur d'onde. Ces aberrations provoquent un décalage radial (sur le plan focal) et axial (le long de l'axe optique) entre les différents canaux d'une image. Différentes méthodes de corrections ont été proposées [Kozubek et Matula, 2000, Manders, 1997]. Elles sont entre autres basées sur le recalage entre images de billes fluorescentes émettant à différentes longueurs d'ondes. Les coefficients de recalage sont calculés suivant les trois axes, de façon globale ou locale.

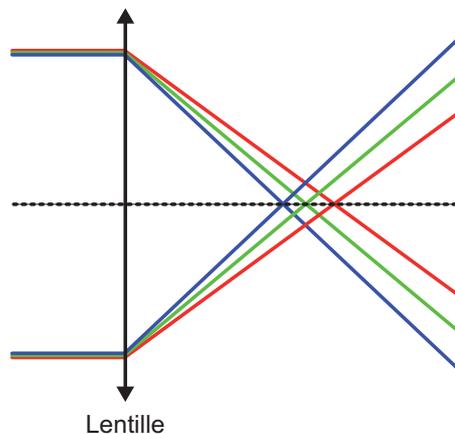


FIG. 1.8 – Illustration des aberrations chromatiques. La distance focale d'une lentille étant différente par chaque longueur d'onde, la longueur d'onde bleue est focalisée à une distance focale plus faible que la longueur d'onde rouge. Ce phénomène crée donc un décalage entre les canaux d'une image.

Aberrations géométriques

Il existe cinq types d'aberrations géométriques : le coma, l'astigmatisme, la courbure de champ, la distorsion et les aberrations sphériques. Le coma, l'astigmatisme, la courbure de champ et la distorsion vont affecter les points sources se situant sur le plan focal loin de l'axe optique. Elles sont généralement négligeables si le système optique est correctement calibré [Gibson et Lanni, 1991].

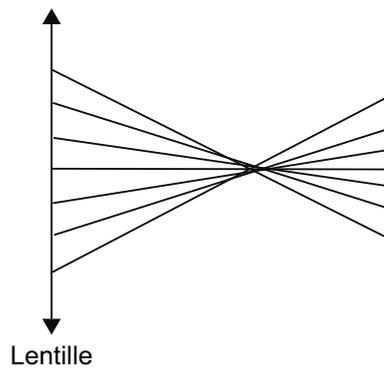


FIG. 1.9 – Illustration des aberrations sphériques. Les ondes traversant la lentille ne se focalisent pas sur le même point.

Les aberrations sphériques, présentées sur la figure 1.9, sont les plus importantes en microscopie par fluorescence. Elles sont principalement dues à une différence d'indices de réfraction dans le chemin optique de la lumière. Dans un système optique parfait, le front d'onde passant par la lentille se focalise sur un point. Quand une interface d'indice de réfraction différent de celui de la lentille est introduit devant celle-ci, les ondes éloignées de l'axe optique et les ondes paraxiales ne vont plus se focaliser sur le même point [Sheppard et Török, 1997]. Ces aberrations sont de ce fait plus prononcées dans les systèmes optiques non-paraxiaux (composés de lentilles à grande angle de convergence). Plusieurs auteurs se sont attachés à l'étude de ces aberrations sphériques dans la formation de l'image en microscopie optique. Sheppard et Wilson en 1979 [Sheppard et Wilson, 1979] ont montré en utilisant une théorie de diffraction paraxiale que les aberrations sphériques dégradent la formation de l'image dans un microscope confocal. Dans le cas de système optique non-paraxial, Visser et Wiersma [Visser et Wiersma, 1991] ont montré, en utilisant la théorie vectorielle de Kirchhoff, que la distribution d'intensité le long de l'axe optique est asymétrique.

Plusieurs techniques [Sheppard et Cosgwell, 1991] sont proposées pour atténuer ces aberrations telles que par exemple l'utilisation de lentille correctrice. Néanmoins, elles ne permettent pas de compenser complètement ces aberrations et sont rarement utilisées dans les microscopes commerciaux. La modélisation de ces aberrations dans la formation de l'image reste donc un vaste domaine de recherche [Wolf, 1951, Sheppard et Cosgwell, 1991, Gibson et Lanni, 1991, Hell *et al.*, 1993, Török et Varga, 1997, Haeberlé *et al.*, 2003].

1.4 Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre la propagation et la diffraction de la lumière par une ouverture décrite par la théorie scalaire de Kirchhoff. Nous avons ensuite introduit les approximations de Fraunhofer et de Debye couramment utilisées dans le cadre des microscopes par fluorescence. De plus, nous avons présenté les aberrations chromatiques et optiques pouvant intervenir dans la modélisation de la PSF. Cependant, la modélisation de ces aberrations constitue un vaste domaine que nous n'aborderons pas dans ce manuscrit. Dans le chapitre suivant, nous présenterons la PSF 3D d'un microscope par fluorescence à champ large et d'un microscope par fluorescence confocal, modélisée grâce à l'approximation scalaire de Debye.

Chapitre 2

Réponse impulsionnelle d'un microscope optique à fluorescence

Le microscope optique est un système optique composé de lentilles, de miroirs, d'un diaphragme et d'un système d'éclairage permettant d'obtenir une image agrandie de l'objet visualisé. Il existe plusieurs techniques de microscopie optique, toutes basées sur le même principe. Une source de lumière blanche est dirigée et focalisée vers la préparation. L'onde résultant de l'interaction entre la lumière et les molécules de la préparation, est captée par un objectif. Celui-ci projette, sur le plan image intermédiaire, une image inversée et agrandie de la préparation. Elle est ensuite inversée par une lentille et captée par un détecteur ou envoyée vers la rétine.

La façon dont interagissent les molécules et la lumière définit les caractéristiques de la méthode. Les différentes techniques de microscopie optique comme la microscopie en lumière directe ou la microscopie à contraste de phase, ne rentrant pas dans le cadre de notre étude, ne seront pas décrites dans ce document.

Dans la première section, nous présentons les principes de la microscopie à fluorescence. Nous décrivons les caractéristiques des objectifs, premiers responsables de la PSF, ainsi que les détecteurs utilisés. Ensuite, dans la seconde section, nous définirons la PSF pour deux types de microscope par fluorescence : le microscope à champ large et le microscope confocal à balayage par point.

2.1 Description des microscopes optiques à fluorescence

La microscopie à fluorescence exploite la capacité de certaines molécules (les fluorophores ou fluorochromes) d'émettre de la lumière lorsqu'elles sont éclairées sous une certaine longueur d'onde. Une présentation complète du phénomène de fluorescence est donnée dans [Valeur, 2004]. Un photon de longueur d'onde λ_{ex} est émis par un laser ou par une lampe de longueur d'onde filtrée vers le fluorophore. Ce photon excite cette molécule et la fait passer à un état d'énergie supérieure. La molécule se trouvant dans un état instable, elle produit un photon de longueur d'onde λ_{em} supérieure à λ_{ex} (perte d'énergie due au déplacement de l'électron). En réalité, comme on le voit sur la figure 2.1, le fluorophore peut être excité par une gamme de longueur d'onde appelée spectre d'excitation et émettre sur une gamme supérieure appelée spectre d'émission. Les photons émis par le fluorophore sont alors captés par un objectif et envoyés vers le détecteur.

Plusieurs objets biologiques émettent de la lumière fluorescente par eux-mêmes, on parle alors de fluorescence primaire ou autofluorescence, les autres doivent être marqués à l'aide de fluorophores. Il est possible d'utiliser plusieurs fluorophores afin de visualiser simultanément différents objets biologiques.

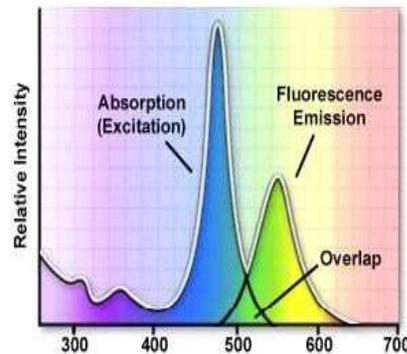


FIG. 2.1 – Exemple de spectres d'excitation et d'émission. Afin d'éviter la superposition de ces spectres dans l'image, il est nécessaire d'utiliser des composants optiques supprimant la lumière d'excitation dans le chemin optique de la lumière d'émission².

Les microscopes produisent alors des images possédant plusieurs canaux de couleur. Dans cette section nous présentons le fonctionnement et les composants de deux principaux microscopes à fluorescence : les microscopes à champ large (widefield en anglais) et les microscopes confocaux.

2.1.1 Microscope à champ large

En microscopie à champ large, la préparation est entièrement illuminée par une source de lumière blanche, généralement une lampe à mercure ou à xénon. La figure 2.2 présente le parcours de la lumière dans un microscope optique à champ large possédant une épi-illumination. L'illumination de la préparation et la détection de la lumière d'émission sont réalisées par le même objectif. Le microscope est aussi équipé d'un jeu de filtres et d'un miroir dichroïque. Les filtres d'excitation et d'émission permettent de sélectionner les longueurs d'ondes et peuvent être soit des filtres passe-bande soit des filtres passe-bas. Le miroir dichroïque joue un rôle de filtre passe-bande : la lumière d'excitation est réfléchiée et dirigée vers l'objectif, et la lumière d'émission passe au travers. La caméra CCD enregistre une image 2D basée sur l'intensité de la lumière émise par la préparation.

L'un des problèmes majeurs en microscopie par fluorescence est la présence d'un flou important sur l'image. Bien que l'image enregistrée par le détecteur corresponde à un plan focal de la préparation, elle est perturbée par l'information hors plan focal. Ce phénomène est présenté sur la figure 2.3. Afin de créer une image 3D, différents plans focaux de la préparation sont enregistrés. L'ensemble de ces plans, séparés par une distance fixée par l'utilisateur, fournit un volume de la préparation. Néanmoins, ce volume contient une redondance d'information correspondant à l'information hors plan focal.

2.1.2 Microscope confocal

Décrite pour la première fois par Marvin Minsky en 1957, le microscope confocal est un microscope à balayage optique fonctionnant en lumière réfléchiée ou en fluorescence. Il permet de focaliser sur de fines coupes à différents niveaux de la préparation et d'éliminer les signaux fluorescents provenant des régions situées en dehors du plan focal. Plusieurs articles [Webb, 1996, Conchello et Lichtman, 2005] et sites internet [Olympus] décrivent de façon précise le fonctionnement du microscope confocal. Les livres de Pawley [Pawley, 1995, Pawley, 2006a] présentent une description complète des microscopes confocaux avec leurs avantages et inconvénients. La figure 2.4 schématise ce type de microscope. Il existe plusieurs types de microscopes confocaux caractérisés soit par le type de balayage (point ou ligne), soit par le type

²Cette figure provient du site internet Molecular expressions (<http://micro.magnet.fsu.edu>).

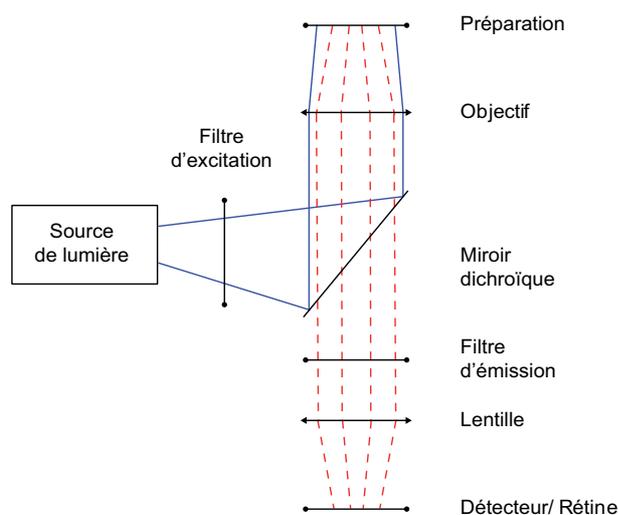


FIG. 2.2 – Schéma d'un microscope optique à champ large sur lequel est dessiné le parcours de la lumière d'excitation (en bleu) et de la lumière d'émission (en rouge pointillée).

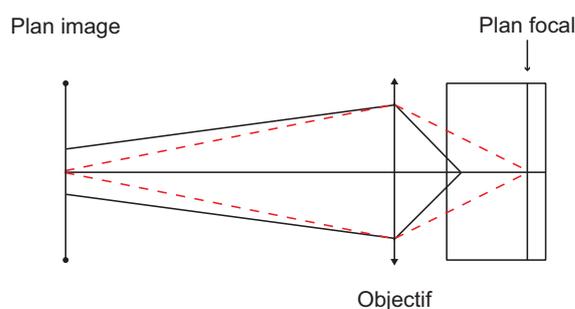


FIG. 2.3 – Schéma d'un microscope optique à champ large sur lequel est dessiné l'information hors plan focal (en noir) et l'information focalisée (en rouge pointillée). Le détecteur enregistre sur le même plan image l'information focalisée et non-focalisée.

de diaphragme (circulaire, disque de Nipkow, fente). Dans le cadre d'un microscope confocal à balayage par point, désigné par MCP, un laser est dirigé grâce au miroir dichroïque et focalisé sur un seul point du plan. Le plan focal est alors balayé point par point. Un diaphragme circulaire est positionné devant le détecteur dans le plan conjugué au plan focal de l'objectif (plans confocaux). Ainsi, seuls les signaux lumineux émis par ce point seront détectés soit par une caméra CCD, soit par un photon multiplicateur. Le microscope confocal permet alors d'acquérir une image 3D où chaque plan de l'image correspond à une fine coupe de la préparation.

2.1.3 Caméra CCD

Une description complète des détecteurs utilisés en microscopie à fluorescence peut être trouvée dans [Art, 2006, Pawley, 2006b]. La plupart des microscopes à fluorescence sont équipés d'une caméra CCD (de l'anglais Charge Coupled Device) pour l'acquisition des images de la préparation. Cette technique introduite dans les années 60 par les chercheurs des laboratoires Bell permet de convertir, grâce à une matrice de photodiodes, l'énergie lumineuse en énergie électrique sous forme de charge. La matrice de photodiodes est constituée d'un réseau de cellules électriquement indépendantes. Chaque cellule intègre sur un certain temps d'exposition les photons provenant de l'échantillon et les convertit en une valeur de

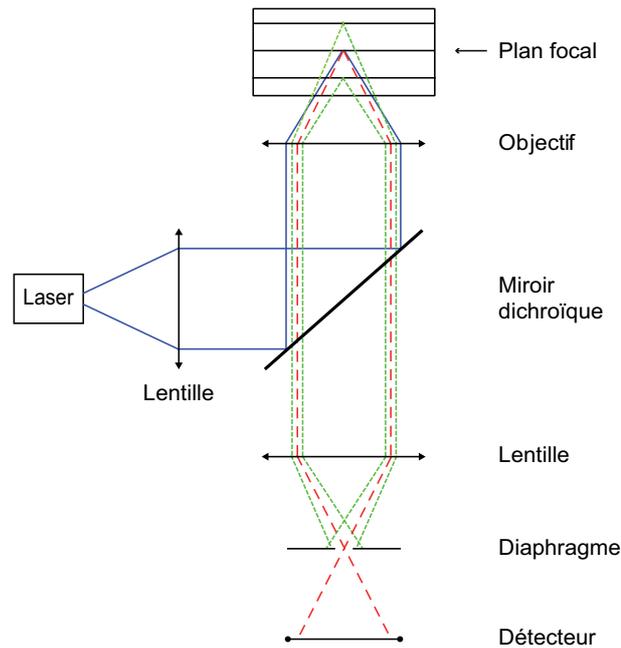


FIG. 2.4 – Schéma d'un microscope confocal à fluorescence sur lequel est dessiné le parcours de la lumière d'excitation (en bleu), de la lumière d'émission focalisée (en rouge pointillée) et non focalisée (en vert striée). Le diaphragme positionné devant le détecteur dans un plan conjugué au plan focal bloque la lumière non focalisée. Ce microscope permet ainsi de réaliser des coupes optiques de la préparation.

niveau de gris. La taille de ces cellules va ainsi définir l'échantillonnage de l'image.

2.1.4 L'objectif

L'objectif est l'élément essentiel du microscope [Keller, 1995]. La figure 2.5 montre un objectif de microscope observant un point A d'un objet situé dans un milieu d'indice de réfraction n_0 recouvert d'une lamelle d'indice n_v , séparée de l'objectif par un liquide d'immersion d'indice n . L'inclinaison du rayon le plus incliné par rapport à l'axe optique définit l'ouverture numérique ON de l'objectif (NA : numerical aperture, en anglais). Elle est égale à :

$$ON = n \sin \alpha \quad (2.1)$$

où α est le demi-angle maximal de convergence. Trois milieux d'immersion sont utilisés en microscopie par fluorescence : l'air ($n = 1$), l'eau ($n = 1,333$) et l'huile ($n = 1,515$).

L'ouverture numérique est la caractéristique principale de l'objectif. Elle est de ce fait très importante dans la modélisation de la PSF. Pour les objectifs possédant une ouverture numérique inférieure à 0,8 (l'ON peut varier de 0,1 à 1,4), une approximation paraxiale peut alors être utilisée pour modéliser la PSF.

La différence d'indice de réfraction entraîne une différence de chemin optique entre les ondes proches de l'axe optique et les ondes plus éloignées, exprimée par la loi de Snell-Descartes (cf. figure 1.1). Cette aberration sphérique devient négligeable pour les objectifs possédant une petite ouverture numérique.

En considérant $n = n_0 = n_v$, les aberrations sphériques n'interviennent plus dans la fonction d'apodisation $G(\theta)$ de l'objectif, présentée dans le chapitre précédent. Cette fonction décrit alors la densité des rayons à la sortie de la lentille. Ces rayons peuvent obéir à plusieurs conditions, la condition des sinus d'Abbe étant généralement mise en place dans les objectifs commerciaux [Gu, 2000]. Basée sur

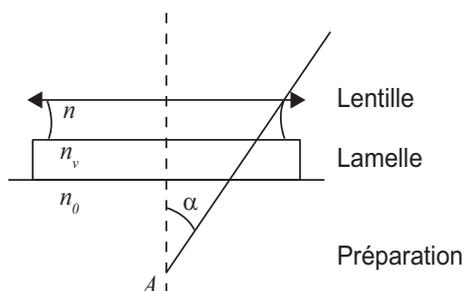


FIG. 2.5 – Description de l'ouverture numérique d'un objectif. Une onde traverse le liquide d'immersion de l'objectif, d'indice de réfraction n , et focalise à un point A. L'inclinaison de ce rayon par rapport à l'axe optique définit l'ouverture numérique $ON = n \sin \alpha$.

l'optique géométrique, cette condition s'exprime par la relation :

$$n_1 Y_1 \sin \theta_1 = n_0 Y_0 \sin \theta_0, \quad (2.2)$$

où $n_{0/1}$, $\theta_{0/1}$ et $Y_{0/1}$ correspondent respectivement aux indices de réfraction, aux angles de convergence de l'objectif, et aux distances entre l'axe optique et les points d'incidence des rayons. Cette condition permet de produire des images nettes d'objets proches de l'axe optique quels que soient les angles de convergence. La fonction d'apodisation sous cette condition est alors égale à :

$$G(\theta) = \sqrt{\cos \theta}.$$

2.2 Modélisation de la PSF

Dans le chapitre précédent nous avons introduit les notions d'optique ondulatoire nécessaires à la modélisation de la PSF. Les microscopes à fluorescence sont caractérisés par deux types de phénomènes de diffraction : la diffraction par la lumière d'excitation et celle d'émission. La PSF d'intensité arrivant sur le détecteur s'écrit :

$$h(x, y, z) = |h_{ex}(x, y, z)|^2 |h_{em}(x, y, z)|^2,$$

où h_{ex} appelée PSF d'excitation, correspond à l'amplitude des ondes focalisées sur le plan focal et h_{em} , appelée PSF d'émission, est l'amplitude des ondes émises par la fluorescence sur le plan image conjugué au plan focal. Afin d'obtenir la PSF complète du système, il nous faut aussi considérer l'effet du détecteur CCD. Comme nous l'avons dit, le détecteur capte l'intensité des ondes provenant de l'objectif et non leurs amplitudes [Wilson, 1995]. La PSF h est alors définie par l'intégration sur un élément du détecteur de la distribution d'intensité d'émission multipliée par la distribution d'excitation, c'est à dire :

$$h(x, y, z) = |h_{ex}(x, y, z)|^2 (|h_{em}(x, y, z)|^2 * D(x, y)), \quad (2.3)$$

où $D(x, y)$ caractérise un élément du détecteur.

2.2.1 Microscope optique à champ large

Dans les microscopes à champ large, l'illumination est réalisée par une lampe sur l'ensemble du plan focal. La zone illuminée est alors assez large pour permettre de négliger la diffraction de la lumière d'excitation. L'amplitude de l'onde d'excitation est alors considérée constante, égale à C . De plus, Young

[Young, 1989] a montré que les éléments du CCD sont assez petits pour négliger leurs effets sur la PSF. La PSF d'un microscope à champ large peut alors s'écrire :

$$PSF_{large}(x, y, z) = C |h_{em}(x, y, z)|^2 .$$

Le principe de réciprocité [Born et Wolf, 1999] établit que tout point situé sur le plan image subit les mêmes transformations que les points situés sur le plan focal. Dû à ce principe, la distribution de l'amplitude sur le plan image peut être obtenue grâce aux théories de diffraction établissant l'amplitude au plan focal. Afin de définir la PSF d'un microscope à champ large, nous nous plaçons dans le cadre d'un objectif circulaire à grande ouverture numérique et à grande distance focale. Nous pouvons alors, en utilisant le principe de réciprocité et la théorie de Debye, établir la PSF d'un microscope à champ large à partir de l'équation (1.8). En négligeant les aberrations optiques et la polarisation de la lumière émise par les fluorophores, la PSF d'un microscope respectant la condition des sinus, est donnée par :

$$PSF_{large}(x, y, z) = C \left| \frac{2\pi i}{\lambda_{em}} \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta} J_0(k_{em} \sqrt{x^2 + y^2} \sin \theta) \exp(-ik_{em}z \cos \theta) \sin \theta d\theta \right|^2 . \quad (2.4)$$

La figure 2.6 représente la PSF analytique d'un microscope à champ large. Cette PSF possède une symétrie transversale et axiale.

2.2.2 Microscope confocal à balayage par point

Contrairement au microscope à champ large, la diffraction due à la lumière d'excitation dans les microscopes confocaux à balayage par point, ne peut être négligée [Webb, 1996]. L'expression de la PSF d'intensité de ce microscope est déduite de l'expression générale 2.3 en remplaçant le détecteur par le diaphragme. En utilisant la théorie de Debye, la PSF est alors donnée par :

$$PSF_{point}(x, y, z) = \left| \frac{2\pi i}{\lambda_{ex}} \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta} J_0(k_{ex} \sqrt{x^2 + y^2} \sin \theta) \exp(-ik_{ex}z \cos \theta) \sin \theta d\theta \right|^2 \int_{x_0^2 + y_0^2 \leq a^2} \left| \frac{2\pi i}{\lambda_{em}} \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta} J_0(k_{em} \sqrt{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2} \sin \theta) \exp(-ik_{em}z \cos \theta) \sin \theta d\theta \right|^2 dx_0 dy_0, \quad (2.5)$$

où a est le rayon du diaphragme en unité d'Airy (UA), un Airy étant égal à $1.22 * \frac{\lambda_{em}}{ON}$.

En supposant que le diaphragme est infiniment petit [van Kempen, 1999, Webb, 1996], l'équation (2.5) peut être simplifiée en :

$$PSF_{point}(x, y, z) = C \left| \frac{2\pi i}{\lambda_{ex}} \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta} J_0(k_{ex} \sqrt{x^2 + y^2} \sin \theta) \exp(-ik_{ex}z \cos \theta) \sin \theta d\theta \right|^2 \left| \frac{2\pi i}{\lambda_{em}} \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta} J_0(k_{em} \sqrt{x^2 + y^2} \sin \theta) \exp(-ik_{em}z \cos \theta) \sin \theta d\theta \right|^2 . \quad (2.6)$$

En pratique le diaphragme étant de taille finie, le choix de cette taille représente un compromis entre le rapport signal sur bruit et la résolution optique de l'image [Wilson, 1995]. La figure 2.6 (b) présente une vue xy , xz , yz de la PSF analytique donnée par l'équation (2.6). On remarque que cette PSF possède une symétrie axiale et transversale. En comparaison à la PSF d'un microscope à champ large, la PSF du MCP est moins étendue, dû au système d'illumination point par point.

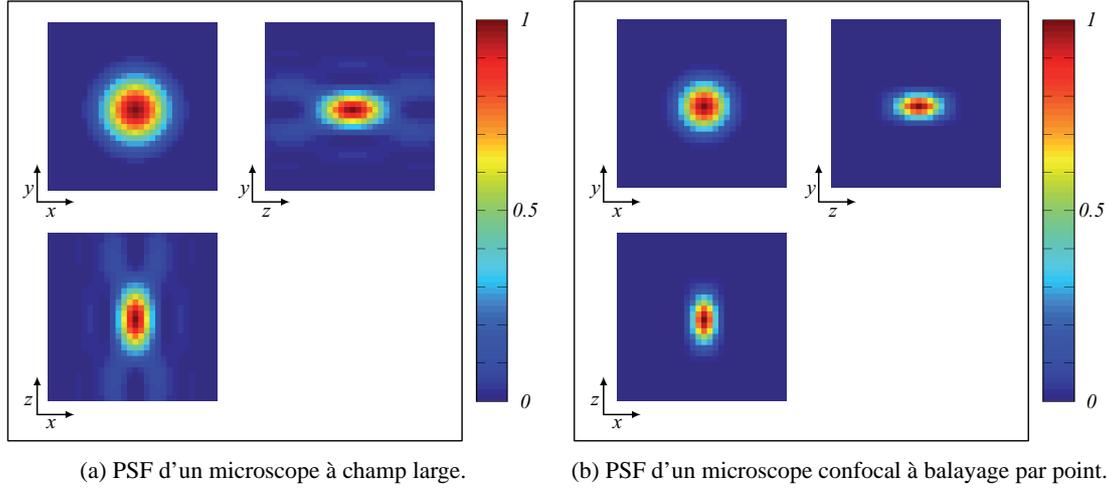


FIG. 2.6 – Représentation 3D de la PSF analytique d'un microscope à champ large (a) et d'un microscope confocal à balayage par point (b). L'intensité est sur cette représentation normalisée à 1.

2.2.3 Approximation par une gaussienne

Dans les sections précédentes, nous avons présenté des modèles de la PSF basés sur la théorie de la diffraction. Néanmoins, une approximation gaussienne de la PSF est très souvent utilisée dans les algorithmes de traitement d'image car elle permet de réduire la complexité algorithmique [Anderson *et al.*, 1992, van Vliet, 1993, den Dekker, 1997, Patwardhan, 1997, Santos et Young, 2000, Cheezum *et al.*, 2001, Thomann *et al.*, 2002, Thompson *et al.*, 2002, Qu *et al.*, 2004, Bonneau *et al.*, 2005, Andersson, 2007, Zhang *et al.*, 2007]. En supposant que le lobe principal de la PSF puisse être approché par une fonction gaussienne séparable, on obtient alors une approximation simple de la réponse impulsionnelle de tous systèmes optiques.

Afin d'estimer les écart-types de la fonction gaussienne 3D, l'estimation aux moindres-carrés est couramment utilisée. En définissant $g_{\sigma_x, \sigma_y, \sigma_z}$ une fonction gaussienne séparable exprimée par :

$$g_{\sigma_x, \sigma_y, \sigma_z}(x, y, z) = \exp\left(-\frac{x^2}{2\sigma_x^2} - \frac{y^2}{2\sigma_y^2} - \frac{z^2}{2\sigma_z^2}\right).$$

L'estimation de l'ensemble des écart-types $\sigma^* = \{\sigma_x^*, \sigma_y^*, \sigma_z^*\}$ est réalisée par la minimisation du critère des moindres-carrés :

$$\sigma^* = \operatorname{argmin}_{\sigma > 0} \|\text{PSF} - g_\sigma\|_2^2.$$

Deux approches sont généralement utilisées pour minimiser ce critère :

- une approche numérique utilisant un algorithme d'optimisation,
- une approche analytique basée sur la mise en correspondance de points particuliers des deux fonctions.

Dans le cadre d'une approche analytique, Vliet *et al.* [van Vliet, 1993] proposent d'estimer ces paramètres en faisant correspondre la courbure des lobes principaux des deux fonctions, c'est à dire :

$$\frac{1}{\sigma_r^2} \equiv \left. \frac{\partial^2 \text{PSF}(r)}{\partial r^2} \right|_{r=0}, \quad (2.7)$$

avec $r = \sqrt{x^2 + y^2}$. Ils montrent que leur approche analytique est similaire aux approches numériques. De plus, ils montrent que, dans de nombreuses circonstances, il est possible d'obtenir une approximation gaussienne convenable de la PSF d'un microscope à champ large [van Vliet et Verbeek, 1994].

L'approximation de la PSF 3D paraxiale d'un microscope à champ large a été étudiée par Thomann *et al.* [Thomann *et al.*, 2002]. En minimisant l'équation des moindres-carrés, ils ajustent un modèle de PSF paraxial prenant en compte des aberrations sphériques [Gibson et Lanni, 1991], à une image de protéine fluorescente représentant la PSF. De façon similaire, ils ajustent une fonction gaussienne dont les paramètres ont été estimés précédemment à partir du modèle analytique de la PSF. En comparant les erreurs résiduelles des deux ajustements, ils mettent en évidence une erreur systématique proche du mode de la gaussienne.

Zhang *et al.* [Zhang *et al.*, 2007b] proposent une approximation par développement limité afin de déterminer les paramètres de la fonction gaussienne et étudient la précision de cette approximation dans les cas 2D/3D, paraxial/non-paraxial pour les microscopes à champ large, et les microscopes confocaux à balayage par point et par disque. L'énergie de la PSF étant principalement concentrée dans une zone proche de l'origine, ils égalisent la série de Maclaurin d'ordre 2 de la PSF analytique, donnée par la théorie de Debye, à la série de Maclaurin (d'ordre 2) de la fonction gaussienne. Les dérivées premières en 0 de la PSF analytique et de la gaussienne étant nulles, on peut remarquer une équivalence entre cette approche et celle de Vliet *et al.*. Dans le cas 2D, ils obtiennent des erreurs d'approximation faible pour les trois types de microscopes. Il en est de même dans le cadre de l'approximation 3D de la PSF de microscopes confocaux possédant un diaphragme de rayon a tendant vers 0. L'erreur réalisée lors de l'approximation de la PSF 3D des microscopes à champ large et des microscopes confocaux à large diaphragme est cependant élevée. Cette étude montre que la PSF 3D de ces microscopes ne peut être modélisée de façon précise par une fonction gaussienne.

2.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit le fonctionnement des microscopes à champ large et des microscopes confocaux. De plus, nous avons présenté un modèle de réponse impulsionnelle pour ces microscopes basé sur la théorie de Debye, ainsi que l'approximation de ces PSF par une fonction gaussienne séparable. Nous proposons, dans le chapitre suivant, un modèle de PSF pour un microscope confocal à balayage par ligne. L'illumination de la préparation étant réalisée par une fine ligne de lumière, la PSF de ce microscope est asymétrique dans le plan transversal, contrairement aux microscopes présentés précédemment.

Chapitre 3

Réponse impulsionnelle d'un microscope confocal à balayage par ligne

Le microscope confocal à balayage par point permet d'acquérir des images peu dégradées par l'information hors plan focal. Cependant le balayage point par point de l'espace à imager est coûteux en temps, cela pouvant compliquer l'acquisition d'objets se déplaçant rapidement. De plus, une molécule pouvant être excitée plusieurs fois pendant l'acquisition, le phénomène de photoblanchiment des molécules fluorescentes est plus prononcé dans ce type de microscope. Le photoblanchiment, correspondant à la destruction photochimique du fluorophore, est un problème critique pour la visualisation d'un phénomène biologique au cours du temps. D'autres méthodes de microscopie confocale, telles que le microscope à balayage par disque [Egger et Petran, 1967] et le microscope à balayage par ligne [Koester, 1980] ont été proposées afin de pallier ces difficultés.

Nous nous intéressons dans ce chapitre aux caractéristiques du microscope confocal à balayage par ligne, désigné par MCL dans la suite de ce document. Contrairement aux microscopes MCP caractérisés par une illumination point par point et un diaphragme circulaire, une illumination ligne par ligne est utilisée dans les microscopes MCL ainsi qu'un détecteur en forme de fente. Ces particularités provoquent une asymétrie dans l'excitation et la détection des molécules fluorescentes, ne pouvant être caractérisée par les modèles de PSF analytiques proposés pour les microscopes MCP. De plus, le microscope MCL n'étant pas très répandu, peu de modèles de sa réponse impulsionnelle ont été proposés. Sheppard & Mao [Sheppard et Mao, 1988] ont donné un modèle analytique paraxial de la PSF 2D basé sur la théorie de Fraunhofer (voir section 1.2.3). Plus récemment, Wolleschensky *et al.* [Wolleschensky *et al.*, 2005] ont proposé un modèle 3D paraxial utilisant des unités optiques non-paraxiales. Dans un cadre général, cette approche permet d'obtenir une première approximation d'un modèle non-paraxial [Amos, 1995].

Après une description du parcours de la lumière dans un microscope MCL par fluorescence, nous proposons un modèle analytique non-paraxial de la PSF en 3D [Dusch *et al.*, 2007a] et nous montrons que ce modèle tend asymptotiquement vers le modèle paraxial proposé par Wolleschensky *et al.*. De plus, nous calculons un modèle expérimental utilisant des images de billes fluorescentes afin de valider notre modèle. La PSF du MCP, donnée par l'équation (2.6), et le modèle analytique paraxial de Wolleschensky *et al.* sont aussi comparés au modèle expérimental.

Une approximation gaussienne de la PSF ayant l'avantage de réduire la complexité algorithmique, nous proposons dans la dernière section une approximation gaussienne de la PSF analytique du microscope MCL et nous étudions l'erreur réalisée dans ce cadre.

3.1 Description du microscope

Contrairement au microscope MCP, l'illumination dans le microscope MCL est réalisée par le balayage d'une fine ligne sur la préparation. La figure 3.1 présente le parcours de la lumière dans ce type de microscope. Une fine ligne de lumière, créée par une lentille cylindrique, est dirigée vers un miroir reflétant la lumière d'excitation. Un jeu de lentilles sphériques permet de focaliser cette ligne parallèlement à l'axe x de la préparation. La fluorescence générée le long de cette ligne est ensuite enregistrée par un détecteur CCD. Une fente orientée parallèlement à l'axe y , est placée devant le détecteur pour bloquer les ondes émises suivant l'axe y , non focalisées. Le fonctionnement de ce microscope peut donc être comparé au fonctionnement du microscope à champ large suivant l'axe x et au microscope MCP suivant l'axe y . Cette particularité produit, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, une PSF asymétrique.

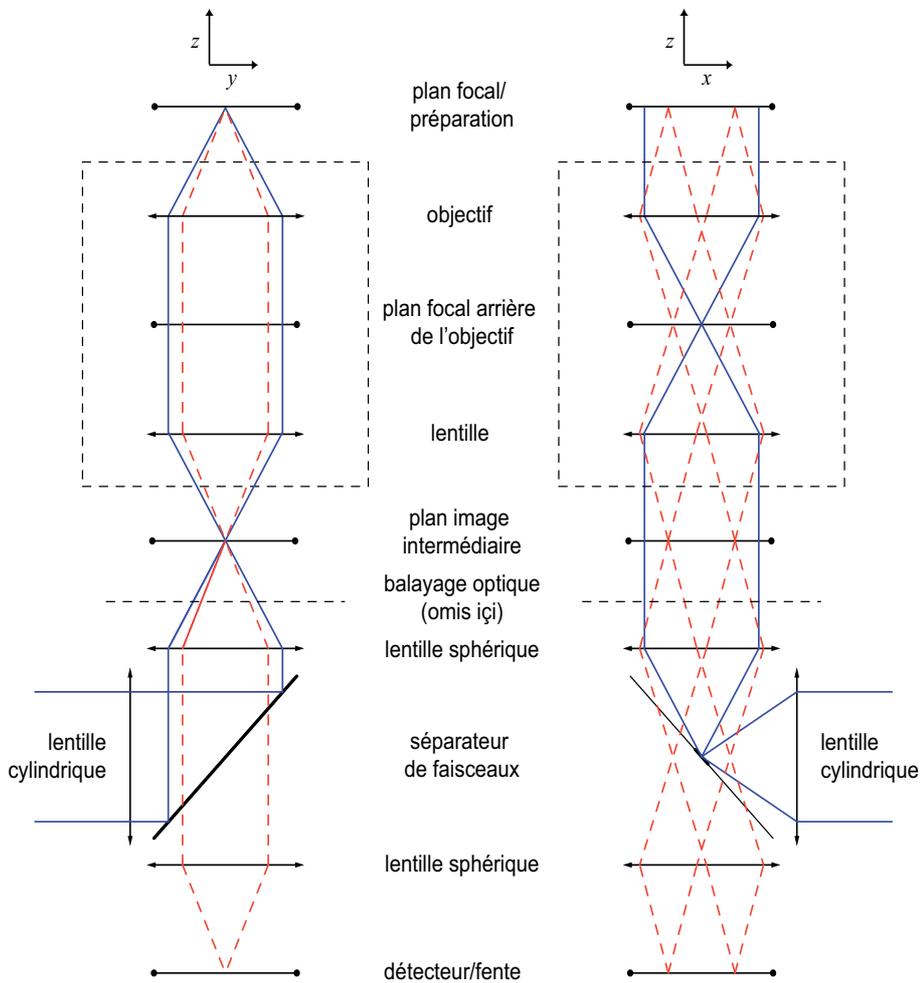


FIG. 3.1 — Schéma d'un microscope confocal à fluorescence à balayage par ligne sur lequel est représenté le parcours de la lumière d'excitation (en bleu), ainsi que celui de la lumière d'émission focalisée (en rouge pointillée). Une lentille cylindrique et un jeu de lentilles sphériques sont utilisés pour focaliser un laser en une ligne fine parallèle à l'axe x . Le chemin de la lumière suivant l'axe x (à droite) et suivant l'axe y (à gauche) est représenté.

3.2 Modélisation par la théorie scalaire de Debye

Dans cette section, nous proposons un modèle analytique basé sur la théorie de Debye de la PSF d'un microscope confocal à balayage par ligne. En premier lieu, nous présentons un modèle non-paraxial et nous montrons ensuite que ce modèle tend asymptotiquement vers le modèle paraxial proposé par Wolleschensky *et al.* [Wolleschensky *et al.*, 2005].

Les effets, tels que les aberrations (cf. section 1.3), la dépolarisation (cf. section 1.2.5) et l'apodisation (cf. section 2.1.4) des ondes, deviennent plus importants lorsque l'ouverture numérique de l'objectif augmente. En considérant les propriétés électromagnétiques des ondes, la théorie vectorielle de Debye permet de modéliser la dépolarisation des ondes, proche du point focal. Néanmoins, Born & Wolf [Born et Wolf, 1999] ont montré qu'une approximation correcte de la PSF d'intensité peut être obtenue à partir de la théorie scalaire. Nous considérons dans notre modélisation de la PSF du MCL que le système optique ne possède aucune aberration et nous négligeons la dépolarisation des ondes.

Reprenons le modèle de la PSF d'intensité d'un microscope par fluorescence présenté dans la section 2.2 :

$$PSF(x, y, z) = |h_{ex}(x, y, z)|^2 (|h_{em}(x, y, z)|^2 * D(x, y)), \quad (3.1)$$

avec $D(x, y)$ représentant un élément du détecteur. Dans un microscope MCL, le détecteur est caractérisé par une fente le long de l'axe y et un CDD le long de l'axe x . Nous présentons dans un premier temps la PSF d'excitation h_{ex} et dans un second temps la PSF d'émission h_{em} .

3.2.1 PSF d'excitation

De façon similaire au microscope à champ large, la diffraction de la lumière d'excitation peut être négligée le long de l'axe x . En effet, une fine ligne de lumière étant focalisée sur l'ensemble de la préparation parallèlement à l'axe x , la zone illuminée est assez longue pour permettre d'assimiler à une constante C_x , l'amplitude d'excitation le long de cet axe. En utilisant l'approximation scalaire de Debye représentée par l'équation (1.7), l'amplitude d'excitation d'un point proche du point focal est exprimée par la superposition d'ondes planes de direction de propagation \mathbf{k} , caractérisé par (k_y, k_z) , intégrée sur le domaine de l'objectif O (cf. figure 3.2) :

$$h_{ex}(x, y, z) = C_x \iint_O G(k_y, k_z) \exp(-i(k_y \cdot y + k_z \cdot z)) dS,$$

avec $G(k_y, k_z)$ la fonction pupille. Nous pouvons remarquer que cette formulation est équivalente à la théorie du spectre angulaire d'onde plane [Goodman, 1968]. Cette théorie basée sur l'optique de Fourier définit l'amplitude des ondes à la sortie d'une lentille par la transformée de Fourier de la fonction pupille.

En coordonnées polaires, les vecteurs d'ondes k_y et k_z peuvent être décrits par l'angle de convergence de la pupille θ et le nombre d'onde k_{ex} égal à $n \frac{2\pi}{\lambda_{ex}}$:

$$\begin{cases} k_y = k_{ex} \sin \theta, \\ k_z = k_{ex} \cos \theta. \end{cases}$$

Sous ces transformations, l'élément d'intégration dS et la fonction pupille sont donnés par :

$$\begin{aligned} dS &= k_{ex} \cos \theta d\theta, \\ G(k_x, k_z) &= G(\theta). \end{aligned}$$

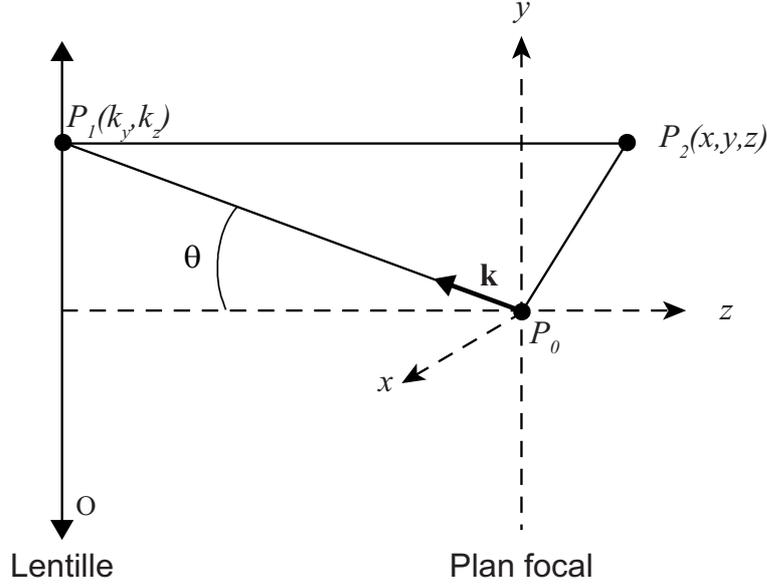


FIG. 3.2 – Système optique dans le cadre de la modélisation de la distribution de l'amplitude d'excitation du microscope MCL. Une onde plane, de direction de propagation \mathbf{k} égale à $\mathbf{k}_y + \mathbf{k}_z$, émise d'un point P_0 situé sur le point focal de la lentille, traverse l'objectif O au point $P_1(k_y, k_z)$. L'amplitude d'excitation au point d'observation P_2 est donnée alors par la théorie scalaire de Debye.

Finalement, l'intégration est réalisée dans la limite du demi-angle de convergence maximal α de l'objectif. La PSF d'excitation s'écrit alors :

$$h_{ex}(x, y, z) = C_x \int_{-\alpha}^{\alpha} G(\theta) \exp(-ik_{ex}y \sin \theta) \exp(-ik_{ex}z \cos \theta) k_{ex} \cos \theta d\theta. \quad (3.2)$$

De plus, nous supposons, comme présenté dans la section 2.1.4, que l'objectif respecte la condition des sinus d'Abbe. La fonction d'apodisation $G(\theta)$ est alors égale à $\sqrt{\cos \theta}$.

3.2.2 PSF d'émission

Nous modélisons la PSF d'émission, de façon similaire aux microscopes à champ large et aux microscopes MCP, grâce à l'approximation scalaire de Debye dans le cadre d'une lentille circulaire. La distribution de l'amplitude d'émission arrivant sur la fente est alors donnée par :

$$h_{em}(x, y, z) = \int_0^{\alpha} G(\theta) J_0(k_{em} \sin \theta \sqrt{x^2 + y^2}) \exp(-ik_{em}z \cos \theta) k_{em} \sin \theta d\theta, \quad (3.3)$$

où le nombre d'onde d'émission k_{em} est égal à $n \frac{2\pi}{\lambda_{em}}$.

3.2.3 Modèle non-paraxial de la PSF d'un microscope MCL

Basé sur le modèle de l'équation (3.1), la PSF d'un microscope MCL à grande ouverture numérique est approchée par :

$$PSF_{NP}(x, y, z) = \left| \int_{-\alpha}^{\alpha} \sqrt{\cos \theta} \exp(-ik_{ex}y \sin \theta) \exp(-ik_{ex}z \cos \theta) k_{ex} \cos \theta d\theta \right|^2 \int_{-d}^d \int_{-s}^s \left| \int_0^{\alpha} \sqrt{\cos \theta} J_0 \left(k_{em} \sin \theta \sqrt{(x-x_d)^2 + (y-y_s)^2} \right) \exp(-ik_{em}z \cos \theta) k_{em} \sin \theta d\theta \right|^2 dx_d dy_s, \quad (3.4)$$

où s représente la demi-largeur de la fente et d la demi-largeur d'un élément du CDD, toutes deux en unité d'Airy. En supposant que les éléments du CDD sont assez petits pour négliger leurs effets sur la PSF, le modèle défini par l'équation (3.4) devient alors :

$$PSF_{NP}(x, y, z) = \left| \int_{-\alpha}^{\alpha} \sqrt{\cos \theta} \exp(-ik_{ex}y \sin \theta) \exp(-ik_{ex}z \cos \theta) k_{ex} \cos \theta d\theta \right|^2 \int_{-s}^s \left| \int_0^{\alpha} \sqrt{\cos \theta} J_0 \left(k_{em} \sin \theta \sqrt{x^2 + (y-y_s)^2} \right) \exp(-ik_{em}z \cos \theta) k_{em} \sin \theta d\theta \right|^2 dy_s, \quad (3.5)$$

Les figures 3.3 et 3.4 présentent la PSF d'intensité, le long de l'axe x , du microscope MCL défini par l'équation (3.4) (ligne pointillée) et par l'équation (3.5) (ligne pleine). Dans la figure 3.3, les échantillonnages considérés ($d = 0, 04$ (a), $d = 0, 1$ (b), $d = 0, 2$ (c)) correspondent aux tailles de pixels usuels pour l'ouverture numérique choisie ($ON=1,4$) et la taille de la fente est fixée à $1UA$. Dans la figure 3.4, la taille des pixels est fixée à 50 nm et la taille des fentes à $s \rightarrow \infty$ (a), $s = 1$ (b) et $s \rightarrow 0$ (c). Le peu de différence entre les deux modèles sur les deux figures nous permet de négliger l'effet du détecteur et de conserver l'approximation définie par l'équation (3.5).

3.2.4 Approximation paraxiale

Pour les objectifs à faible ouverture numérique (inférieure à 0,7), l'équation (3.5) peut être simplifiée en utilisant les approximations 1.9. Dans ce cadre, on suppose que l'angle θ tend vers zéro et l'équation (3.5) est approximée par :

$$PSF_P(x, y, z) = \left| \int_{-1}^1 \exp(-ik_{ex}y\alpha t) \exp\left(\frac{i}{2}k_{ex}z\alpha^2 t^2\right) k_{ex} dt \right|^2 \int_{-s}^s \left| \int_0^1 J_0 \left(k_{em}\alpha t \sqrt{x^2 + (y-y_s)^2} \right) \exp\left(\frac{i}{2}k_{em}z\alpha^2 t^2\right) k_{em} t dt \right|^2 dy_s, \quad (3.6)$$

équivalent au modèle paraxial proposé par Wollenschensky *et al.* [Wollenschensky *et al.*, 2005]. La figure 3.5 montre la distribution d'intensité de la PSF du microscope MCL suivant les trois axes dans le cas non-paraxial et dans le cas paraxial.

3.3 Validation du modèle analytique

Afin de valider notre modèle, nous mesurons la PSF expérimentale d'un microscope MCL à l'aide de billes fluorescentes. Plusieurs billes sont extraites des images et moyennées pour augmenter le rapport

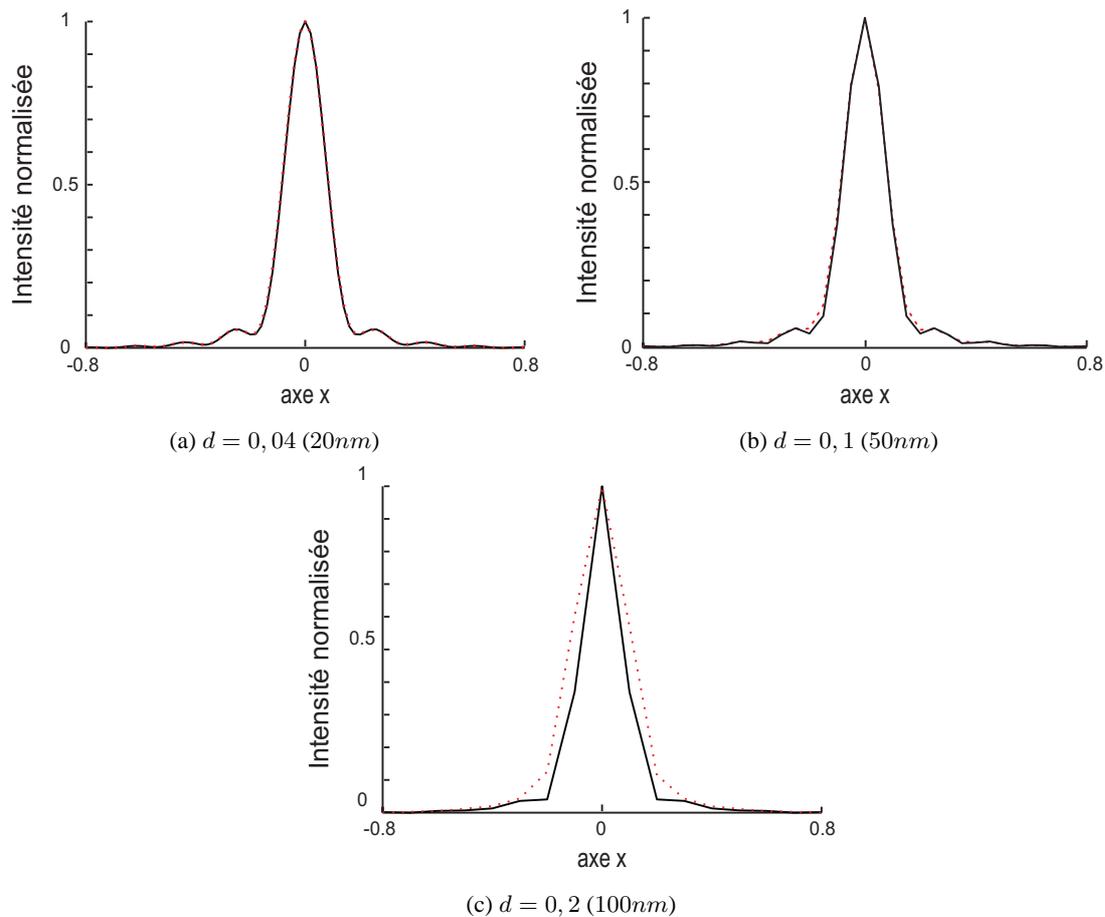


FIG. 3.3 – Effet du détecteur sur la PSF d'intensité en fonction de l'échantillonnage. Le modèle de PSF défini par l'équation (3.4) prenant en compte l'effet du CCD (ligne pointillée) et le modèle de PSF défini par l'équation (3.5) négligeant l'effet du CCD (ligne pleine) sont comparés pour différentes tailles de pixels : $d = 0,04 \mu A$ (20nm) (a), $d = 0,1 \mu A$ (50nm) (b) et $d = 0,2 \mu A$ (100nm) (c). Les unités de l'axe x sont en μm .

signal sur bruit de la PSF ainsi mesurée. Nous comparons alors la PSF expérimentale considérée comme notre vérité terrain à notre modèle analytique de PSF non-paraxial et au modèle analytique de Wollenshensky *et al.*. Nous comparons aussi le modèle analytique non-paraxial de la PSF du microscope MCP, ce dernier étant le modèle le plus connu en microscopie confocale.

3.3.1 Mesure de la PSF expérimentale

Matériels

Les billes fluorescentes utilisées afin de créer notre vérité terrain proviennent du kit PS-Speck proposé par Invitrogen (Etats-Unis). Ce kit contient des billes fluorescentes de différentes longueurs d'ondes d'un diamètre de $0,175 \pm 0,005 \mu m$. Nous avons choisi d'utiliser les billes possédant une longueur d'onde d'excitation de 505 nm et d'émission de 515 nm afin d'approcher les longueurs d'ondes généralement rencontrées dans les expériences biologiques sur lesquelles nous travaillons.

Les billes ainsi choisies ont été imagées sur le microscope à balayage par ligne *LSM 5 Live* commercialisé par Zeiss (Allemagne) avec une résolution spatiale de $0,05 \times 0,05 \times 0,1 \mu m$ par voxel. Cet échantillonnage a été choisi afin de respecter le critère de Nyquist, critère qui sera détaillé dans la deuxième partie de cette thèse. Finalement, nous avons utilisé un laser de longueur d'onde de 488 nm , un filtre

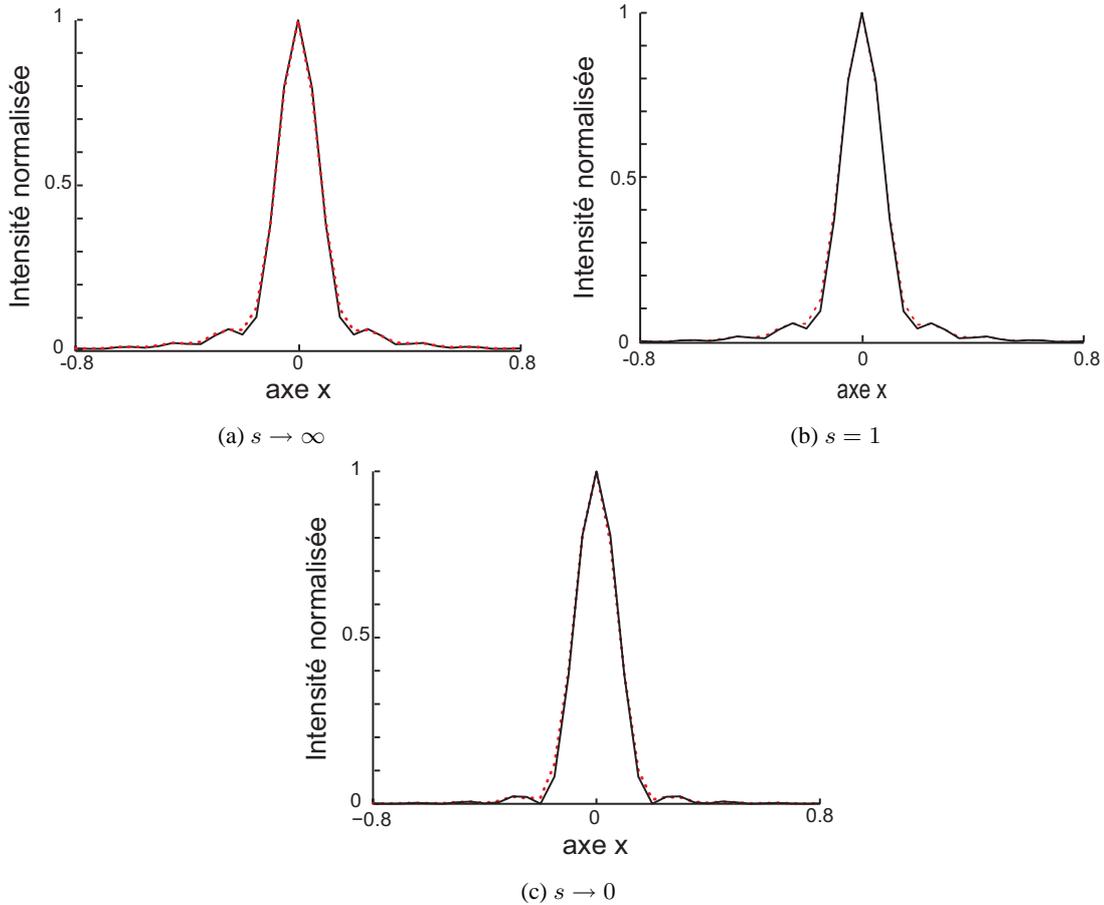


FIG. 3.4 – Effet du détecteur sur la PSF d’intensité en fonction de la fente. Le modèle de PSF défini par l’équation (3.4) prenant en compte l’effet du CCD (ligne pointillée) et le modèle de PSF défini par l’équation (3.5) négligeant l’effet du CCD (ligne pleine) sont comparés pour différentes tailles de fentes : $s \rightarrow \infty$ (a), $s = 1$ (b) et $s \rightarrow 0$ (c). Les unités de l’axe x sont en μm .

d’émission passe-haut de 505 nm , et un objectif à immersion par huile d’ouverture numérique égale à 1,4 et de coefficient de grossissement égal à 63.

Détection des billes fluorescentes imagées

Les billes fluorescentes étant distribuées de façon aléatoire dans la préparation, elles peuvent apparaître superposées sur l’image et former un amas composé de plusieurs PSFs. Afin d’obtenir une estimation correcte de la PSF, ces amas doivent être exclus de la mesure de la PSF expérimentale. Suite à la détection des billes fluorescentes, réalisée par le calcul de la courbure d’intensité locale (cf. partie 2), des masques d’images de billes isolées sont créés et moyennés afin d’obtenir la PSF mesurée.

Recalage des billes fluorescentes imagées

Afin de limiter les biais introduits par la moyenne des billes fluorescentes dans l’estimation de la PSF, nous réalisons un recalage sous-voxellique de chaque masque par rapport à un masque fixé. Le recalage est la mise en correspondance entre les points dans un espace, dans notre cas les masques M_{rec} , avec d’autres points dans un autre espace, appelé référentiel, correspondant dans notre cas à un masque choisi comme référence M_{ref} .

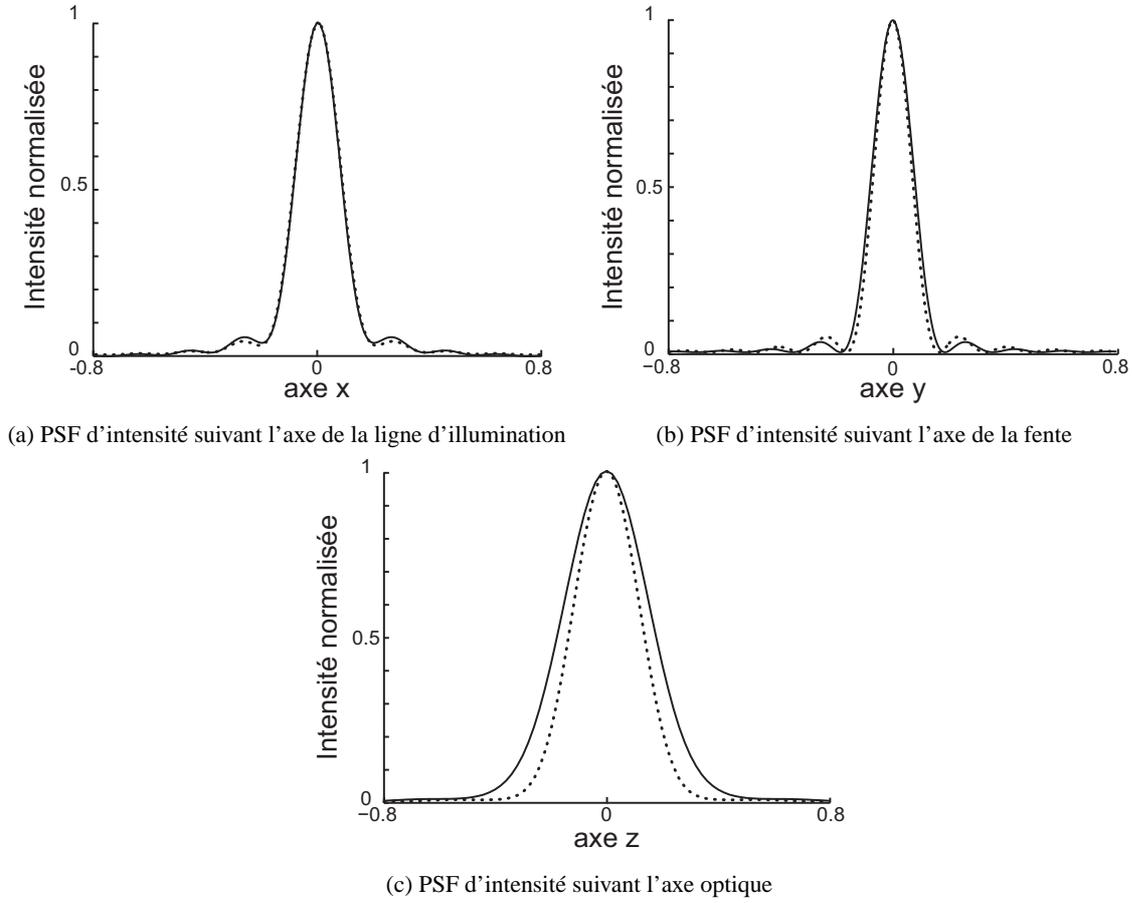


FIG. 3.5 – Présentation de la PSF d'intensité suivant les trois axes : le modèle non-paraxial étant représenté par la ligne pleine et le modèle paraxial par la ligne pointillée. Les unités sont en μm .

Nous utilisons une méthode de recalage linéaire rigide consistant à trouver la transformation géométrique $\Phi_{\mathbf{t}}$ composée d'une translation $\mathbf{t} = \{t_x, t_y, t_z\}$ permettant de passer du masque à recaler M_{rec} au masque de référence M_{ref} . Plus précisément, tout voxel \mathbf{x} de M_{rec} est transformé, par Φ , en un point \mathbf{x}^* de telle sorte que :

$$\mathbf{x}^* = \Phi(\mathbf{x}) = \mathbf{x} + \mathbf{t}.$$

À l'aide de la méthode d'optimisation des gradients conjugués de Polak-Ribiere [Polak, 1971], la transformation $\Phi_{\mathbf{t}}$ est calculée grâce à l'expression suivante :

$$\operatorname{argmin}_{\mathbf{t} \in \mathbb{R}} \Delta (M_{rec}(\Phi_{\mathbf{t}}(\mathbf{x})), M_{ref}(\mathbf{x})),$$

où Δ est la fonction de similarité ou encore appelée fonction de coût quantifiant la qualité du recalage entre les deux masques.

Nous utilisons l'information mutuelle [Viola et Wells, 1997] comme critère de similarité. L'information mutuelle a l'avantage d'être indépendante des différences d'intensités entre les images. Elle est définie par :

$$I(X, Y) = \sum_{x \in X, y \in Y} p_{XY}(x, y) \log \left(\frac{p_{XY}(x, y)}{p_X(x)p_Y(y)} \right),$$

où $I(X, Y)$ mesure la dépendance entre deux variables aléatoires X et Y , dans notre cas les masques M_{rec} et M_{ref} .

La distribution jointe $p_{XY}(x, y)$ est calculée à partir de l'histogramme joint $hist(x, y)$ représentant le nombre d'occurrences où l'intensité $X(x)$ correspond à l'intensité $Y(y)$. La figure 3.6 présente l'histogramme joint entre le masque de référence et le masque à recaler (a), puis l'histogramme joint entre le masque de référence et le masque recalé (b). Les différentes distributions présentes dans l'information mutuelle s'obtiennent par :

$$\begin{aligned} p_{XY}(x, y) &= \frac{hist(x, y)}{\sum_{x \in X, y \in Y} hist(x, y)}, \\ p_X(x) &= \sum_{y \in Y} p_{XY}(x, y), \\ p_Y(y) &= \sum_{x \in X} p_{XY}(x, y). \end{aligned}$$

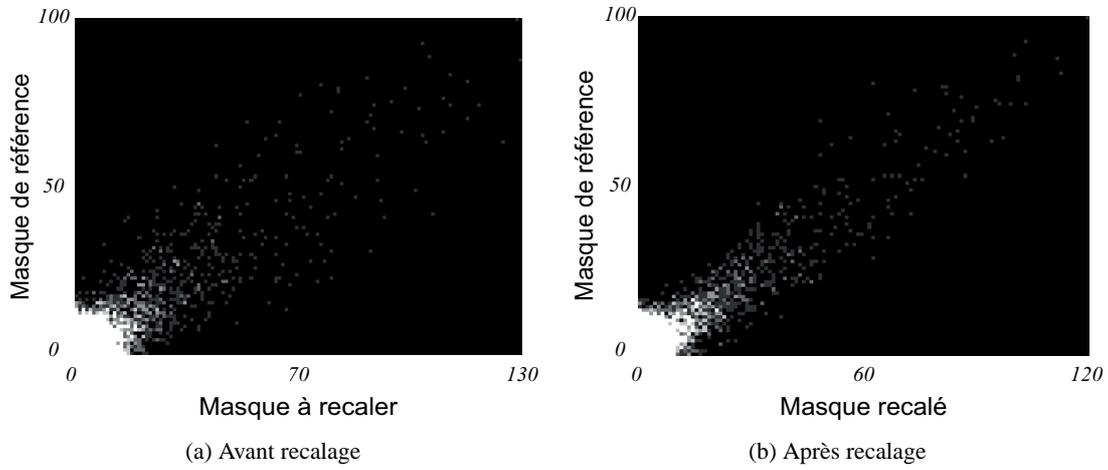


FIG. 3.6 – Histogramme joint du masque de référence vis à vis du masque à recaler (a), et vis à vis du masque recalé (b). Chaque coordonnée $[i, j]$ indique le nombre d'occurrences de paire de points ayant les intensités i et j .

La figure 3.7 présente les résultats du recalage sur deux billes fluorescentes, la bille de référence étant présentée en vert et la bille recalée en rouge. Les paramètres de translation estimés $\hat{\mathbf{t}} = \{\hat{t}_x, \hat{t}_y, \hat{t}_z\}$ pour ce recalage sont égales à $\{0, 52, -0, 48, 0, 33\}$. Une fois les masques recalés, la PSF expérimentale est obtenue à partir de la moyenne d'environ 150 billes.

Déconvolution de billes fluorescentes

Les billes fluorescentes utilisées dans ce protocole ne peuvent être assimilables à une impulsion lumineuse. En effet, la PSF expérimentale mesurée à l'aide de ce protocole est plus large que la PSF analytique du fait de la taille des billes.

Il serait possible d'utiliser des billes plus petites mais au risque d'obtenir une PSF expérimentale possédant un faible rapport signal sur bruit. Van der Voort & Strasters [Voort et Strasters, 1995] ont proposé de réduire l'effet de la taille de la bille en appliquant une déconvolution de la PSF par l'objet étudié.

En nous basant sur ces travaux, nous supposons que la PSF expérimentale est dégradée par la convolution avec une bille de diamètre $0.175 \mu m$ et nous utilisons l'algorithme de déconvolution itératif de Richardson-Lucy [Richardson, 1972, Lucy, 1974] pour restaurer la PSF expérimentale. Le noyau de déconvolution est dans ce cadre une bille de diamètre $0.175 \mu m$. La figure 3.8 présente le résultat de la déconvolution sur la PSF expérimentale.

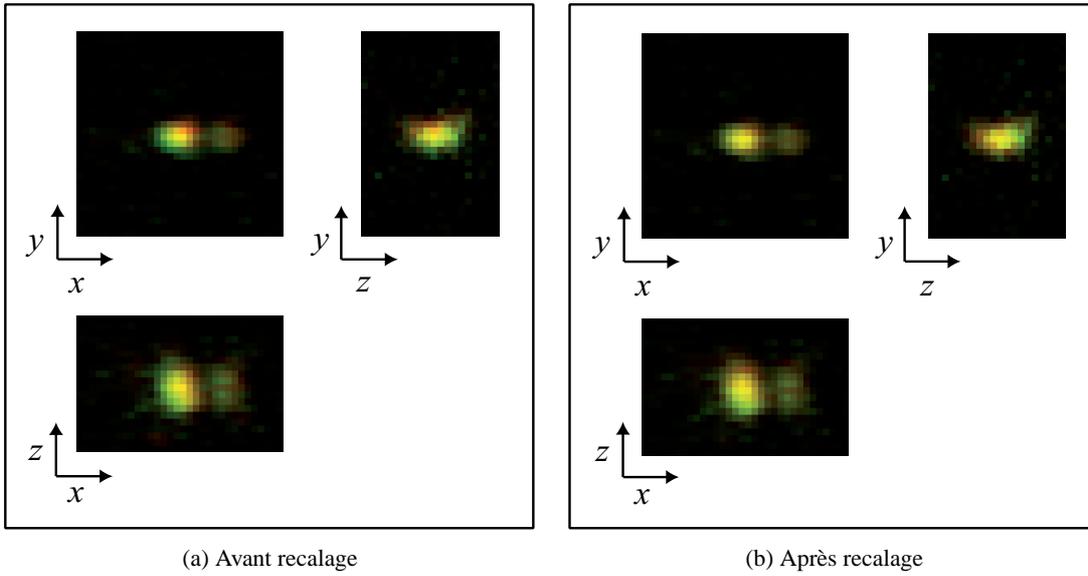


FIG. 3.7 – Résultat du recalage entre deux masques de billes fluorescentes imagées. Le masque de référence (en vert) et le masque à recalier (en rouge) sont superposés et présentés avant (a) et après recalage (b).

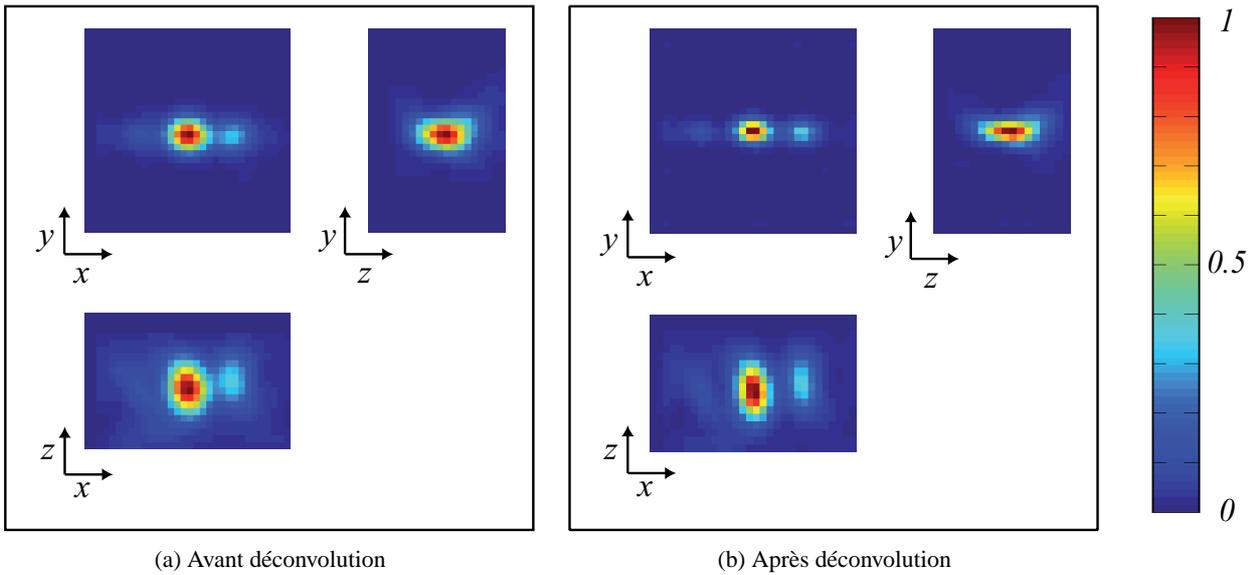


FIG. 3.8 – xy , xz et yz vues de la PSF expérimentale avant (a) et après déconvolution (b), le noyau de déconvolution étant une bille de diamètre $0,175 \mu m$.

3.3.2 Résultats et discussion

Afin de comparer les différentes modélisations analytiques, nous quantifions l'erreur d'approximation de la PSF expérimentale par l'erreur relative au carré (ER), celle-ci étant exprimée par :

$$ER = \frac{\sum_{i=1}^n (PSFE_i - PSFA_i)^2}{\sum_{i=1}^n PSFE_i^2}, \quad (3.7)$$

où PSFE et PSFA sont, respectivement, la PSF expérimentale et analytique. n est le nombre de pixels (ou voxels) pris en considération dans le calcul de l'erreur. Nous calculons dans un premier temps l'erreur

relative globale, n étant dans ce cas le nombre de voxels de l'image. Dans un deuxième temps, afin de comparer les PSFs analytiques le long de l'axe optique, nous calculons l'erreur relative locale à chaque plan 2D de l'image, n étant alors le nombre de pixels par plan.

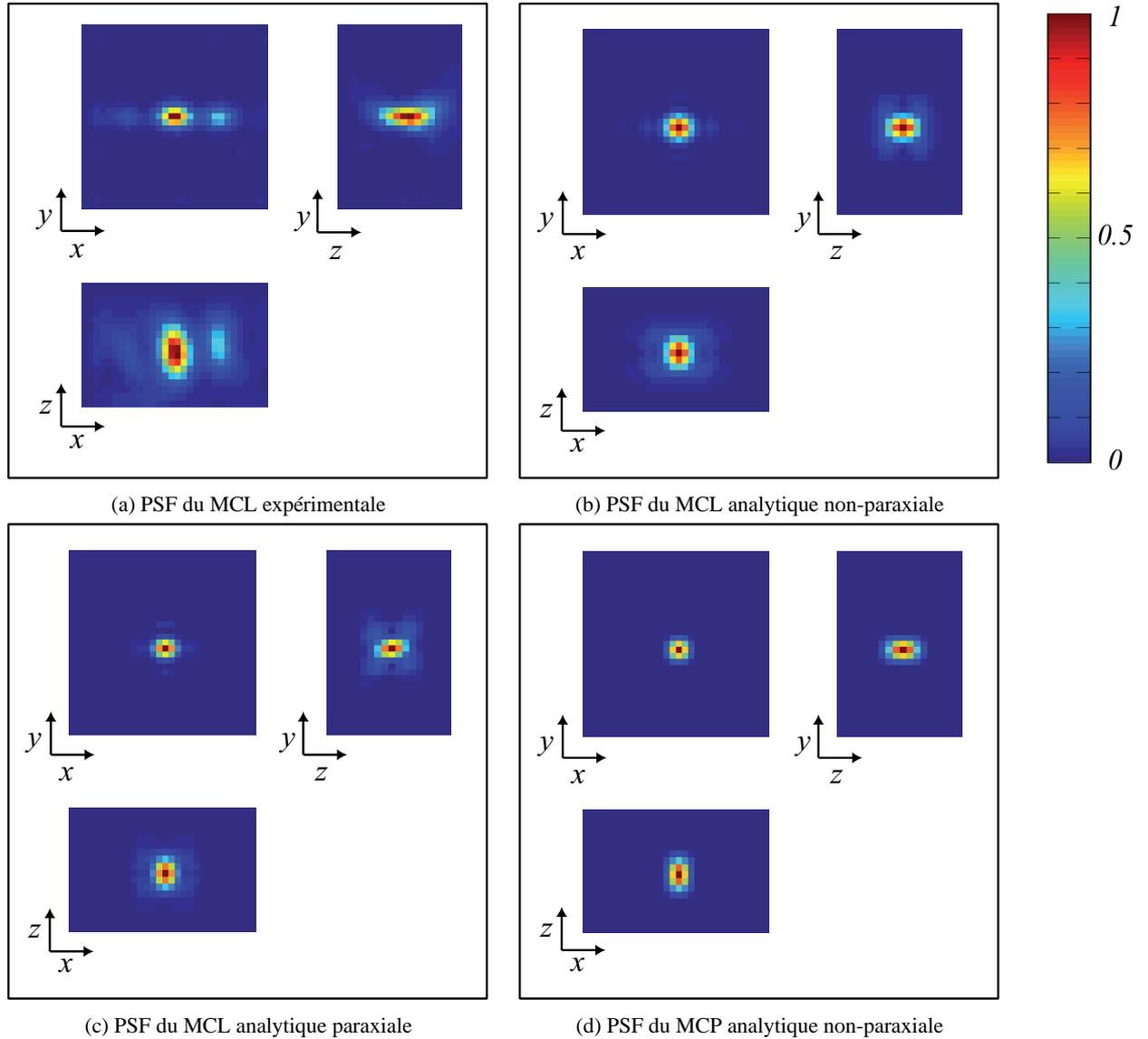


FIG. 3.9 – xy , xz et yz vues de la PSF expérimentale (a), de notre modèle analytique non-paraxial (b), du modèle paraxial (c) et du modèle non-paraxial du microscope MCP (d). Sur ces représentations, la taille de la fente est égale à 0,12 UA. Les erreurs relatives globales entre la PSF expérimentale et les PSFs analytiques sont égales à 0,30 pour notre modèle, 0,43 pour le modèle paraxial et 0,45 pour le modèle du MCP.

s	PSF non-paraxiale MCL	PSF paraxiale MCL	PSF non-paraxiale MCP
0,5	0,42	0,51	0,60
0,12	0,30	0,43	0,45

TAB. 3.1 – Erreur relative globale entre notre vérité terrain et les PSFs analytiques pour deux tailles de fente ($s = 0,5$ UA, $s = 0,12$ UA).

La figure 3.9 présente la PSF expérimentale ainsi que les PSFs analytiques centrées sur leurs maxima, suivant les vues xy , xz et yz . Sur ces représentations, la taille de la fente est égale à 0,12 UA. Le tableau 3.1 présente les erreurs relatives entre notre vérité terrain et les modèles analytiques. Nous pouvons remarquer que l'erreur relative globale entre notre modèle analytique et la PSF expérimentale est plus faible pour les deux tailles de fentes.

La quantité d'informations hors plan-focal enregistrée dans chaque plan focal étant liée à la taille de la fente, l'image acquise avec une taille de fente $s = 0.5$ UA peut être entachée d'un flou important. Ce phénomène n'étant pas modélisé par la PSF analytique, l'approximation de notre vérité terrain est plus pertinente pour de petites tailles de fentes, comme le montre nos résultats.

Malgré la déconvolution, notre vérité terrain reste plus étalée que notre modèle analytique. Afin d'éviter de rehausser le bruit présent dans l'image, l'algorithme de déconvolution doit être stoppé avant convergence et ne permet pas de ce fait de corriger complètement l'effet de la bille sur la PSF mesurée.

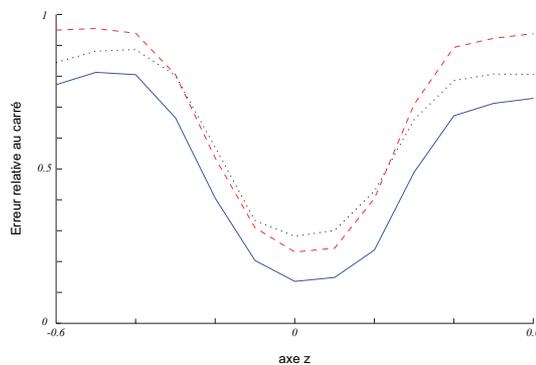


FIG. 3.10 – Erreur relative suivant l'axe z entre la PSF expérimentale et les PSFs analytiques : notre modèle (ligne pleine bleu), le modèle paraxial (ligne striée rouge) et le modèle non-paraxial du microscope MCP (ligne pointillée noire). Les unités de l'axe optique sont en mm .

La figure 3.10 montre l'erreur relative locale le long de l'axe z entre la PSF expérimentale et les PSFs analytiques. Notre modèle fournit une meilleure approximation de la PSF expérimentale pour tous les plans comparativement au modèle paraxial et au modèle du MCP. Pour tous les modèles, l'erreur relative est faible dans les zones proches du plan focal. On peut remarquer dans la PSF expérimentale un cône divergent sur la vue xz (cf figure 3.9a) non modélisé dans le modèle analytique, expliquant l'augmentation de l'erreur avec la profondeur. Ce phénomène est dû aux aberrations sphériques présentées dans la section 1.3.

De plus, une aberration coma est présente sur le plan xy . Cette aberration donnant un effet de défo-calisation sur l'axe x , est due à un mauvais alignement de l'axe optique.

De façon similaire aux travaux réalisés sur le microscope à champ large et sur le microscope MCP, nous proposons dans la section suivante une approximation gaussienne de la PSF analytique et comparons cette approximation à la PSF expérimentale.

3.4 Approximation par une gaussienne

Une modélisation gaussienne de la PSF peut permettre, comme nous l'avons dit dans le paragraphe 2.2.3, de simplifier et d'accélérer l'analyse des images en microscopie par fluorescence. Dans cette section, nous proposons une approximation gaussienne de la PSF analytique du microscope MCL et nous étudions la validité de cette approche.

3.4.1 Méthodologie

Afin d'estimer l'approximation gaussienne de la PSF du microscope du MCL, nous supposons que la fonction gaussienne $g_{\sigma_x, \sigma_y, \sigma_z}$ est séparable et centrée à l'origine de la PSF. Dès lors, $g_{\sigma_x, \sigma_y, \sigma_z}$ est définie par :

$$g_{\sigma_x, \sigma_y, \sigma_z}(x, y, z) = \exp\left(-\frac{x^2}{2\sigma_x^2} - \frac{y^2}{2\sigma_y^2} - \frac{z^2}{2\sigma_z^2}\right),$$

avec $g(0, 0, 0) = PSF_{NP}(0, 0, 0) = 1$.

Nous cherchons alors à estimer l'ensemble des paramètres $\sigma^* = \{\sigma_x, \sigma_y, \sigma_z\}$ par la minimisation du critère des moindres-carrés :

$$\sigma^* = \operatorname{argmin}_{\sigma > 0} \|PSF_{NP} - g_{\sigma}\|_2^2,$$

où PSF_{NP} est le modèle analytique non-paraxial de la PSF du microscope MCL, défini par l'équation (3.5).

De façon similaire aux travaux de Vliet *et al.* [van Vliet, 1993] et Zhang *et al.* [Zhang *et al.*, 2007b] présentés dans le paragraphe 2.2.3, nous supposons que l'énergie de la PSF est principalement concentrée au voisinage de l'origine. Nous réalisons une approximation proche de l'origine, c'est à dire $g_{\sigma}(\mathbf{x}) \rightarrow PSF_{NP}(\mathbf{x})$ quand $\mathbf{x} \rightarrow 0$, en égalant les séries de Maclaurin à l'ordre 2 de PSF_{NP} et de g_{σ} . Due à la complexité de la fonction analytique de la PSF, il n'est pas possible d'obtenir une série de Maclaurin simple. Afin de simplifier la fonction, nous supposons que la PSF d'excitation h_{ex} , donnée par l'équation (3.2), et la PSF d'émission h_{em} , donnée par l'équation (3.3), peuvent être modélisées par des fonctions gaussiennes, respectivement, $g_{\sigma_{ex,y}, \sigma_{ex,z}}$ et $g_{\sigma_{em,x}, \sigma_{em,y}, \sigma_{em,z}}$, donnant alors :

$$PSF_{NP} \approx g_{\sigma_{ex,y}, \sigma_{ex,z}}(y, z) \int_{-s}^s g_{\sigma_{em,x}, \sigma_{em,y}, \sigma_{em,z}}(x, y - y_s, z) dy_s.$$

Les séries de Maclaurin de la PSF analytique et de la fonction gaussienne sont présentées dans l'annexe A. Les écart-types estimés de la PSF analytique sont donnés dans le tableau 3.2.

3.4.2 Résultats et validation

Afin de valider notre estimation par approche analytique, nous comparons les écart-types ainsi estimés avec les écart-types estimés par une approche numérique, pour laquelle le critère de moindre-carrés est minimisé par l'algorithme des gradients-conjugués. Ensuite, nous étudions la validité d'une approximation gaussienne en comparant notre modèle analytique et la PSF expérimentale à la fonction gaussienne pour différentes tailles de fente. Afin de réaliser ces comparaisons, nous nous plaçons dans les conditions d'acquisition présentées dans le paragraphe 3.3.1.0.

Approximation numérique

De façon similaire à [Zhang *et al.*, 2007b], nous supposons dans ce paragraphe que les paramètres estimés à l'aide de l'approche numérique sont les estimateurs optimaux σ^* . L'erreur relative évaluée pour ces paramètres est égale à $\frac{|\hat{\sigma} - \sigma^*|}{|\sigma^*|}$.

Les écart-types estimés et les erreurs associées suivant les trois directions x, y, z , calculés dans les conditions d'acquisition décrites dans la section 3.3.1.0, sont donnés dans le tableau 3.3. Les erreurs relatives sont très faibles pour les trois directions. Dès lors, nous pouvons considérer que les estimateurs obtenus par l'approche analytique sont corrects.

Écart-types estimés	
$\hat{\sigma}_{ex,y}^2$	$\frac{1}{2*k_{ex}^2 \left(1 - \frac{\int_{-\alpha}^{\alpha} \cos^{7/2} \theta d\theta}{\int_{-\alpha}^{\alpha} \cos^{3/2} \theta d\theta} \right)}$
$\hat{\sigma}_{ex,z}^2$	$\frac{1}{2*k_{ex}^2 \left(\frac{\int_{-\alpha}^{\alpha} \cos^{7/2} \theta d\theta}{\int_{-\alpha}^{\alpha} \cos^{3/2} \theta d\theta} - \left(\frac{\int_{-\alpha}^{\alpha} \cos^{5/2} \theta d\theta}{\int_{-\alpha}^{\alpha} \cos^{3/2} \theta d\theta} \right)^2 \right)}$
$\hat{\sigma}_{em,x/y}^2$	$\frac{7(1-\cos^3 \alpha)}{2*k_{em}^2 (4-7 \cos^3 \alpha + 3 \cos^7 \alpha)}$
$\hat{\sigma}_{em,z}^2$	$\frac{175(1-\cos^3 \alpha)^2}{6*k_{em}^2 (4+4 \cos^5 \alpha - 25 \cos^7 \alpha + 42 \cos^5 \alpha - 25 \cos^3 \alpha)}$
$\hat{\sigma}_x^2$	$\hat{\sigma}_{em,x}^2$
$\hat{\sigma}_y^2$	$\frac{\hat{\sigma}_{ex,y}^2 \hat{\sigma}_{em,y}^3 \sqrt{\pi} \operatorname{erf}\left(\frac{\sqrt{2}s}{2\hat{\sigma}_{em,y}}\right)}{\hat{\sigma}_{em,y}^3 \sqrt{\pi} \operatorname{erf}\left(\frac{\sqrt{2}s}{2\hat{\sigma}_{em,y}}\right) + \hat{\sigma}_{ex,y}^2 \sqrt{2}s \exp\left(-\frac{s^2}{2\hat{\sigma}_{em,y}^2}\right)}$
$\hat{\sigma}_z^2$	$\frac{\hat{\sigma}_{ex,z}^2 \hat{\sigma}_{em,z}^2}{\hat{\sigma}_{ex,z}^2 + \hat{\sigma}_{em,z}^2}$

TAB. 3.2 – Écart-types estimés de la fonction gaussienne approchant la PSF analytique du microscope MCL. L'estimation est réalisée par la mise en correspondance des séries de Maclaurin de la PSF analytique et la fonction gaussienne.

	Écart-types optimaux σ^*	écart-types estimés $\hat{\sigma}$	ER
x	0.0764	0.0759	0.0065
y	0.0700	0.0709	0.0127
z	0.1774	0.1830	0.0316

TAB. 3.3 – Écart-types optimaux et estimés de la fonction gaussienne approximant la PSF analytique pour de typiques conditions d'acquisition. L'erreur relative des écart-types estimés est présentée suivant les trois directions x, y, z .

Approximation gaussienne de la PSF non-paraxiale

Afin de regarder la validité de l'approximation gaussienne de la PSF analytique non-paraxiale, nous calculons l'erreur relative, ER égale à $\frac{\|PSF - g_{\hat{\sigma}}\|^2}{\|PSF\|^2}$, pour différentes tailles de fentes.

s (en UA)	$\hat{\sigma}_x$	$\hat{\sigma}_y$	$\hat{\sigma}_z$	ER
0.5	0.076	0.070	0.183	0.12
0.25	0.076	0.069	0.183	0.09
0.1	0.076	0.058	0.183	0.06
0	0.076	0.051	0.183	0.05

TAB. 3.4 – Erreur relative entre la PSF analytique et son approximation gaussienne.

Les erreurs relatives sont données dans le tableau 3.4 pour différentes tailles de fente. La PSF dans

la direction de la ligne étant assimilable à la PSF du microscope à champ large, l'erreur d'approximation suivant cette direction reste importante pour toutes tailles de fentes. De ce fait, la PSF analytique non-paraxiale du microscope MCL ne peut être approchée précisément par une fonction gaussienne.

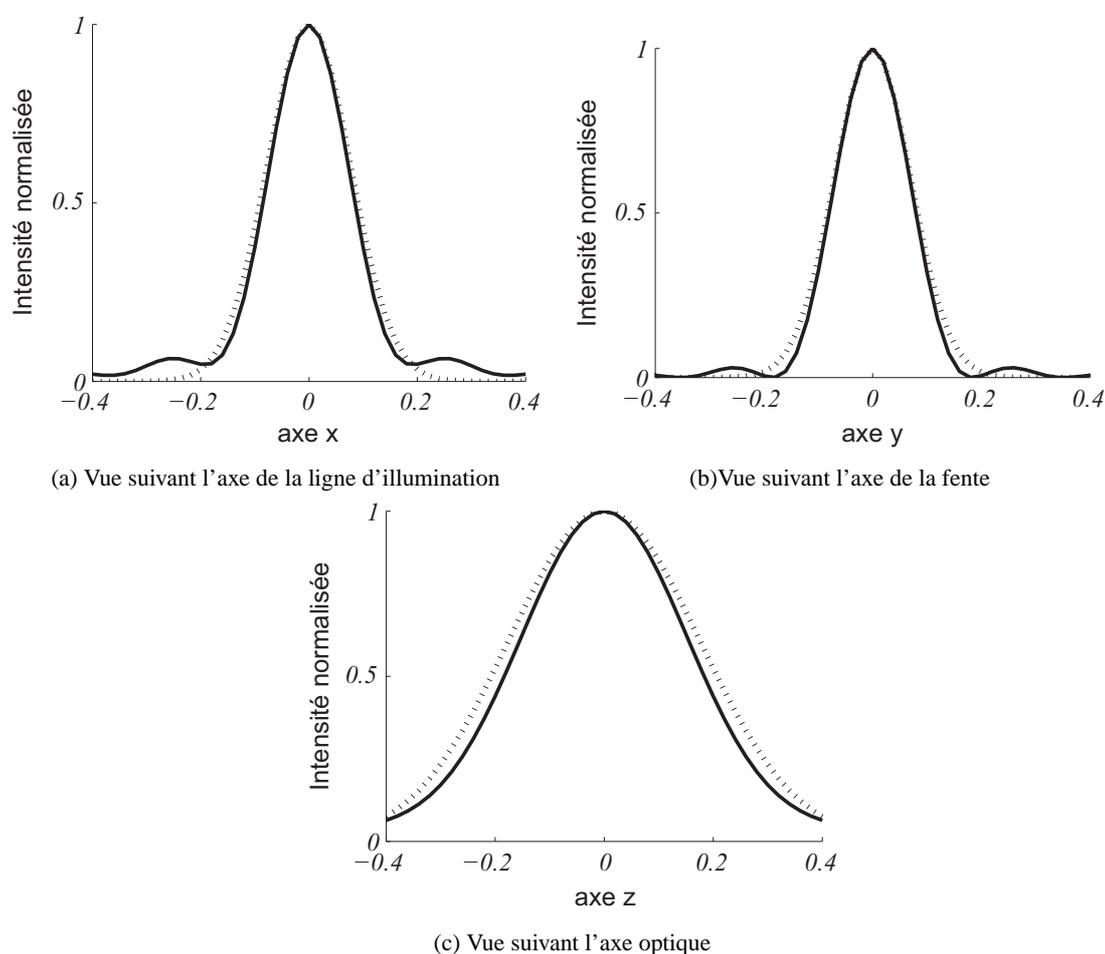


FIG. 3.11 – Vues x , y , z de la PSF analytique (ligne pleine) et de son approximation gaussienne (ligne pointillée).

La figure 3.11 présente la PSF analytique et son approximation gaussienne suivant les trois axes. Le lobe principal de la PSF analytique étant bien modélisé par la fonction gaussienne, l'approximation gaussienne peut être cependant suffisante pour certaines applications.

s (en UA)	Approximation analytique non-paraxiale	Approximation Gaussienne
0.5	0.42	0.52
0.1	0.30	0.37

TAB. 3.5 – Erreur relative pour deux tailles de fente, entre notre vérité terrain et les deux approximations : modèle non-paraxial et modèle gaussien.

De façon générale, en comparant les erreurs relatives présentées dans le tableau 3.5, notre modèle analytique fournit une meilleure estimation de la PSF expérimentale que l'approximation gaussienne.

3.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons proposé une modélisation analytique de la PSF d'un microscope confocal par fluorescence à balayage par ligne. Suite à une description du microscope MCL, nous avons présenté un modèle de PSF analytique non-paraxial basé sur la théorie scalaire de Debye. Nous avons ensuite comparé les modèles de PSF existants et notre modèle, à une PSF expérimentale extraite d'image de billes fluorescentes. Nos résultats montrent que notre modèle donne une meilleure modélisation comparativement au modèle paraxial et modèle non-paraxial du microscope MCP. Cependant, notre modèle pourrait être amélioré en considérant les effets provoqués par les aberrations optiques et la dépolarisation des ondes.

Finalement, nous avons proposé une modélisation gaussienne de notre modèle analytique. Nous avons montré dans un premier temps que l'estimation des écarts-types par approche analytique permettait d'obtenir des estimateurs précis, dans notre cadre d'approximation de la PSF analytique du MCL. Dans un deuxième temps, nous avons étudié la validité d'une approximation gaussienne pour ce type de microscope. Les résultats obtenus nous permettent de conclure que la PSF du microscope MCL ne peut être approchée précisément par une fonction gaussienne. Cependant, les erreurs réalisées avec ce type d'approximation peuvent devenir négligeables pour certaines applications. Nous reviendrons sur ce point dans le cadre de la détection de particules fluorescentes .

Conclusion

Dans cette partie, nous avons commencé par présenter la formation d'une image dans le cas d'un système optique simple composé d'une lentille unique. Dans ce cadre, la formation d'une image est pleinement caractérisée par la PSF du système. Nous avons ensuite présenté dans le premier chapitre la théorie de l'optique ondulatoire et plus précisément la théorie scalaire de la diffraction des ondes. Cette théorie caractérisant la distribution des ondes au point focal d'une lentille permet de définir la PSF analytique d'un système optique.

Après une description des microscopes par fluorescence à champ large puis confocaux, nous avons présenté, dans le deuxième chapitre, les modèles analytiques de PSF existant pour ces microscopes ainsi que les méthodes permettant d'approximer ces modèles par des fonctions gaussiennes séparables.

Dans le dernier chapitre, nous nous sommes intéressés à un microscope confocal particulier : le microscope à balayage par ligne, pour lequel nous avons proposé un modèle de PSF analytique non-paraxial basé sur la théorie scalaire de Debye. La validation de ce modèle a été réalisée à partir d'une PSF expérimentale, mesurée à l'aide de billes fluorescentes. En comparant les modèles de PSF existants et notre propre modèle, à la PSF expérimentale nous avons montré que notre modèle donne une meilleure approximation de notre vérité terrain. Il pourrait cependant être amélioré en tenant compte des distorsions introduites par les aberrations optiques ainsi que la dépolarisation des ondes.

Finalement, nous avons réalisé une approximation gaussienne de ce modèle analytique et nous avons constaté que la PSF d'un microscope MCL ne peut être approchée précisément par une fonction gaussienne.

Dans la deuxième partie, nous regarderons l'influence de l'approximation analytique et de l'approximation gaussienne sur la précision des algorithmes de détection de particules fluorescentes.

Deuxième partie

Détection de particules fluorescentes

Introduction

La détection de particules est un problème largement rencontré dans les applications biologiques [Tvarusko *et al.*, 1999, Galy *et al.*, 2000, Feuerbach *et al.*, 2002, Hediger *et al.*, 2002, Molenaar *et al.*, 2003]. Que ce soit dans l'étude de la propagation de virus ou de la répartition de gènes au sein du noyau, la première étape de l'analyse consiste, en générale, en la détection de ces particules. Dans ces études, le problème de la détection se scinde souvent en deux sous problèmes interdépendants : déterminer le nombre de particules et déterminer leurs positions avec précision.

Lors de l'étude de la propagation d'un virus [Arhel *et al.*, 2006], réalisée grâce à des algorithmes de suivi permettant de déterminer la trajectoire de chaque virus, la détection d'un nombre erroné de particules peut générer des erreurs lors de leur association au cours du temps, et ainsi créer de fausses trajectoires.

Dans les problèmes de suivi d'une seule particule consistant par exemple à déterminer le coefficient de diffusion des protéines à travers la membrane des cellules [Saxton et Jacobson, 1997], Martin *et al.* [Martin *et al.*, 2002] ont montré que des erreurs dans la localisation de la particule peuvent induire une interprétation erronée du comportement de diffusion. De façon similaire, des erreurs dans la détection des gènes ou des sites de transcription de l'ARN au sein du noyau pourraient conduire à une conclusion biologique erronée. Ces exemples montrent donc l'importance d'une détection correcte et précise des particules.

Les objets de notre étude, tels que les gènes, les télomères ou encore les protéines, sont considérés suffisamment de petites tailles (de quelques nanomètres) pour pouvoir être assimilés à des impulsions lumineuses, définies par une impulsion de Dirac dans la partie précédente. Ils apparaissent alors sur l'image comme des taches définies par la PSF du microscope.

Le système optique étudié étant linéaire en intensité, l'intensité de chaque particule est sommée lors de la formation de l'image. Dans ce cadre, l'équation décrivant la formation d'une image dans un système optique, adaptée à notre problématique est donnée par :

$$I(x, y, z) = \sum_{i=1}^n \iiint_{\mathbb{R}^3} h(x - \xi, y - \nu, z - \omega) a(x_i, y_i, z_i) \delta_{x_i, y_i, z_i}(\xi, \nu, \omega) d\xi d\nu d\omega,$$

où n désigne le nombre de particules sur l'image, $(x_{1..n}, y_{1..n}, z_{1..n})$ leurs positions et $a(x_{1..n}, y_{1..n}, z_{1..n})$ leurs intensités initiales produites par les fluorophores. L'impulsion de Dirac $\delta_{x_i, y_i, z_i}(\xi, \nu, \omega)$ vaut 0 si (ξ, ν, ω) sont différents de (x_i, y_i, z_i) pour chaque i . Cette notation correspondant à une translation de h

d'une valeur (x_i, y_i, z_i) , cette équation peut se simplifier en :

$$\begin{aligned} I(x, y, z) &= \sum_{i=1}^n a(x_i, y_i, z_i) h(x - x_i, y - y_i, z - z_i), \\ I(\mathbf{x}) &= \sum_{i=1}^n a_i h(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i). \end{aligned} \quad (1)$$

Cette équation décrit notre problème pour un système optique parfait. Afin de le modéliser de manière plus exacte, il est nécessaire cependant de considérer les perturbations inhérentes à tout système optique. Ces perturbations, désignées par \mathcal{P} , correspondent à l'ensemble des phénomènes pouvant affecter la formation de l'image, et seront décrites dans le premier chapitre. L'équation (1) est alors remplacée par :

$$I(\mathbf{x}) = \mathcal{P} \left(\sum_{i=1}^n a_i h(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i) \right). \quad (2)$$

Le problème de détection de ces particules se résume alors à l'estimation du nombre de particules n et de leurs positions. Afin de poser ces problématiques, nous considérons deux particules $\delta_{\mathbf{x}_1}$ et $\delta_{\mathbf{x}_2}$ séparées d'une distance $d_{\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2}$ et nous prenons en compte deux cas : $d_{\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2}$ est supérieure à une certaine valeur d^r et $d_{\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2}$ est inférieure à d^r . La limite d^r correspond à la résolution optique et sera définie dans le premier chapitre.

Dans le premier cas ($d_{\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2} > d^r$), l'estimation du nombre de particules peut être assimilée à un problème classique en traitement d'images de détection de points d'intérêt, où dans notre cas particulier les points d'intérêt sont définis par la PSF. Les algorithmes existants et leurs adaptations à notre problème seront présentés dans le deuxième chapitre. Le degré de précision pouvant être obtenu sur la localisation spatiale d'une particule unique est un problème largement étudié dans le cas de microscope par fluorescence [Bobroff, 1986, Thompson *et al.*, 2002, Ober *et al.*, 2004]. Nous présenterons dans le deuxième chapitre les différents travaux sur ce problème conduisant à des limites sur la précision pouvant être obtenue.

Dans le deuxième cas, la distance de séparation d^r est faible. Les taches apparaissent alors superposées sur l'image et forment un amas fluorescent. L'estimation du nombre de particules dans cet amas se révèle alors plus compliquée que dans le cas précédent. Nous présentons dans le deuxième chapitre des algorithmes, dits de détection sous-résolution, mieux adaptés à ce cadre.

À la suite de ces états de l'art, nous décrirons dans le troisième chapitre nos contributions. Nous proposons alors une méthode de détection de points d'intérêt adaptée à la détection de particules fluorescentes acquises avec un microscope confocal à balayage par ligne, ainsi qu'une méthode permettant d'estimer le nombre de particules superposées. Finalement, nous présentons une validation de nos méthodes réalisée sur des images simulées et sur des images de billes fluorescentes.

Chapitre 1

Perturbations et limites

Diverses limitations physiques vont interférer dans la détection de particules fluorescentes. Parmi celles-ci, la limite de la résolution optique de n'importe quel système, mise en évidence par Ernest Abbe à la fin du XIX^e siècle, et les perturbations sont les plus importantes. Nous présentons dans un premier temps les différentes perturbations affectant l'image, ainsi que le critère de Nyquist définissant l'échantillonnage idéal dans le cadre de microscope par fluorescence. Nous définissons ensuite la résolution optique dans un cadre théorique ou classique et dans un cadre plus large prenant en compte l'échantillonnage et les différentes perturbations.

1.1 Nature des bruits dans l'image

Le bruit, par opposition au signal, est l'ensemble des dégradations perturbant le signal. Cependant, il est possible de différencier les dégradations du signal induites par la PSF et les autres dégradations. Nous désignons alors par bruit l'ensemble des perturbations, excluant la PSF, affectant les images en microscopie par fluorescences. Dans ce contexte, plusieurs sources de bruits peuvent être différenciées : le bruit intrinsèque, les bruits extrinsèques et les perturbations liées à la préparation.

1.1.1 Bruit intrinsèque : bruit de photons

Le bruit de photons, de la famille des bruits quantiques (shot noise en anglais), est une caractéristique intrinsèque à la source observée. Il provient de la nature aléatoire de la production de photons d'une source lumineuse, ainsi que de la nature ponctuelle des particules, et entraîne des fluctuations dans le nombre de photons mesuré par un détecteur. En d'autres termes, le nombre de photons enregistré par un élément de détecteur sur un temps d'acquisition fixé varie d'une mesure à une autre. Le nombre de photons n_p reçu est décrit par une loi de Poisson P_{μ_p} de paramètre μ_p :

$$P_{\mu_p}(N = n_p) = \frac{\mu_p^{n_p} \exp(-\mu_p)}{n_p!}.$$

La variance $\text{Var}[N] = \mu_p$ de ce processus étant égale à sa moyenne $\mathbb{E}[N] = \mu_p$, le niveau de bruit de l'image augmente avec l'intensité de l'image. Pour une moyenne μ_p large ($\mu_p > 30$), la distribution du nombre de photons peut être approchée par une loi normale de moyenne μ_p et de variance μ_p ($n_p \sim \mathcal{N}(\mu_p, \mu_p)$).

1.1.2 Bruits extrinsèques

En plus du bruit intrinsèque à la production de la lumière, les images sont corrompues par d'autres sources de bruits liées au détecteur et à la conversion en numérique.

Bruits électroniques

Parmi l'ensemble des bruits électroniques induits par le détecteur, le bruit thermique est le plus important. Généré par l'agitation thermique des électrons dans le capteur en l'absence de photons, il induit un faible courant électrique produisant un bruit de fond sur l'image. Ce phénomène, aussi appelé courant d'obscurité, est généralement modélisé par un bruit blanc additif gaussien η (processus décrit par une loi normale dont les paramètres sont identiques sur l'ensemble de l'image). D'autres bruits auxiliaires sont générés par le capteur, tels que le bruit de lecture provenant de la conversion de la charge d'électrons en tensions et par l'amplification de celle-ci. Le bruit de lecture, de nature gaussienne, est négligeable devant le bruit thermique.

Bruit de quantification

Le bruit de quantification est l'erreur moyenne commise en arrondissant la tension issue du capteur en sa valeur discrète la plus proche. Plus le nombre de valeurs numériques est élevé (256 valeurs en 8 bit, 65536 valeurs en 16 bit), plus la valeur discrète sera proche du signal analogique et plus le bruit de quantification sera faible. L'erreur de quantification e_q est décrite par :

$$e_q = \frac{n}{q} - \left\lfloor \frac{n}{q} \right\rfloor, \quad (1.1)$$

où n est le nombre de photo-électrons mesuré avant l'étape de numérisation, q le pas de quantification et $\lfloor x \rfloor$ l'entier inférieur le plus proche de x . Ce bruit est généralement modélisé par une distribution uniforme entre $[-q/2, q/2]$ [Widrow *et al.*, 1995]. Alter et al. [Alter *et al.*, 2006] analyse la combinaison du bruit de photon et du bruit de quantification dans le cadre d'une comparaison de mesure d'intensité sur des images de faibles intensités.

1.1.3 Perturbations liées à la préparation fluorescente

En microscopie par fluorescence, plusieurs phénomènes liés aux types d'objets fluorescents imagés peuvent également dégrader les images. Ces phénomènes incluent l'autofluorescence, le photoblanchiment et l'atténuation de la fluorescence en fonction de la profondeur.

Autofluorescence

L'autofluorescence désigne la fluorescence des structures de la préparation ne correspondant pas à la molécule fluorescente d'intérêt. De nombreuses molécules possèdent une fluorescence naturelle et peuvent donc posséder un spectre d'émission similaire à celui de la molécule d'intérêt. Ces molécules peuvent alors créer un fond fluorescent important sur l'image et dégrader la visualisation de la molécule d'intérêt. L'autofluorescence est donc une source importante de perturbations dans le cadre de particules fluorescentes possédant une faible intensité comparativement à l'intensité des autres structures de la préparation. Le nombre de photons n_b provenant de l'autofluorescence est décrit lui aussi par une loi de Poisson P_b de paramètre b .

Photoblanchiment

Le photoblanchiment correspond à la destruction photochimique d'un fluorophore. Il est caractérisé par une décroissance de la proportion de fluorescence émise par les molécules. La proportion de fluorophore photoblanchi dépend de la puissance du laser et du temps d'exposition. Chaque fluorophore possède une cinétique de photoblanchiment propre.

Ce phénomène est surtout problématique pour la quantification de phénomène biologique au cours du temps. De ce fait, nous le négligerons dans notre étude.

Atténuation de la fluorescence

À cause de l'absorption ou de la réflexion de la lumière par la préparation, l'intensité du signal fluorescent va décroître en fonction de la profondeur de la molécule. Cette atténuation limite la profondeur à laquelle une molécule peut être excitée et la profondeur à laquelle elle peut être détectée. De nombreux travaux ont été réalisés sur la modélisation de cette décroissance d'intensité afin de rehausser l'image [Rigaut et Vassy, 1991, Markham et Conchello, 2001, Can *et al.*, 2003, Kervrann *et al.*, 2004, Zwier *et al.*, 2004, Bernas *et al.*, 2007]. L'approche la plus courante consiste en la modélisation de la baisse d'intensité par une décroissance exponentielle.

1.1.4 Description de la formation de l'image

En introduisant l'ensemble des perturbations pouvant intervenir dans la formation d'une image en microscopie par fluorescence, l'équation (2) devient :

$$I(x, y, z, t) = P \left(\left(\sum_{i=1}^n a_i h(x - x_i, y - y_i, z - z_i) + b(x, y, z) \right) e^{-c_z z - c_t t} \right) + \eta + e_q, \quad (1.2)$$

où η est un bruit Gaussien de moyenne μ_η et d'écart-type σ_η , décrivant les bruits électroniques et P un processus de Poisson de moyenne $\sum_{i=1}^n a_i h(x_i, y_i, z_i) + b$. L'autofluorescence est caractérisée par la fonction b . L'atténuation de la fluorescence en fonction de la profondeur et le photoblanchiment sont modélisés par une fonction exponentielle décroissante. Nous supposons dans notre modèle que c_z , respectivement c_t , est une constante caractérisant le taux de fluorescence perdu entre deux profondeurs, respectivement entre deux temps. Finalement e_q caractérise le bruit de quantification.

Le tableau 1.1 présente un récapitulatif des perturbations affectant la formation des images en microscopie par fluorescence. Pour chaque perturbation, nous indiquons la description de ces phénomènes et si ceux-ci sont pris en compte dans notre modèle.

Nous simplifions l'équation précédente en négligeant certaines perturbations affectant peu la détection de particules fluorescentes. L'équation 1.2 est alors remplacée par :

$$I(x, y, z) = P \left(\sum_{i=1}^n a_i h(x - x_i, y - y_i, z - z_i) + b \right) + \eta.$$

1.2 Échantillonnage : critère de Nyquist

Le théorème de Nyquist-Shannon établit que la fréquence d'échantillonnage doit être au moins égale au double de la fréquence maximale du signal analogique afin de pouvoir reconstruire parfaitement le signal original à partir du signal échantillonné. Le critère de Nyquist établit alors l'échantillonnage permettant d'enregistrer une image sans perte d'information ou sans création de phénomènes de recouvrement

Perturbation	Description	Prise en compte
Bruit de photons	$n_p \sim P(\mu_p)$	oui, cas $\mu_p > 30$ alors $n_p \sim \mathcal{N}(\mu_p, \mu_p)$
Bruit électronique	$\eta \sim \mathcal{N}(\mu_\eta, \sigma_\eta)$	oui
Bruit de quantification	écart entre la valeur analogique et la valeur discrète	négligé
Autofluorescence	$n_b \sim P(b)$	oui, lors de la la détection de points d'intérêt
Photoblanchiment	décroissance exponentielle en fonction du temps	négligé
Atténuation de la fluorescence	décroissance exponentielle en fonction de la profondeur	négligée

TAB. 1.1 – Récapitulatif des perturbations affectant la formation des images en microscopie par fluorescence. Pour chaque perturbation, une description ou modélisation du phénomène est présentée. De plus, nous précisons pour chaque perturbation si elle est prise en compte dans notre étude et si oui dans quel cadre.

spectral. En microscopie, la fréquence maximale f_m est déterminée à partir de la fonction de transfert du système, celle-ci étant définie comme la transformée de Fourier de la PSF. Pour un microscope par fluorescence à champ large, l'échantillonnage transversal Δ_{xy} et axial Δ_z respectant le critère de Nyquist sont données à :

$$\begin{cases} \Delta_{xy} &= \frac{\lambda_{em}}{4ON}, \\ \Delta_z &= \frac{\lambda_{em}}{2n(1-\cos \alpha)}. \end{cases}$$

Lors du calcul du critère de Nyquist dans le cadre de microscopes confocaux, la différence entre la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission affecte peu le résultat. De ce fait, sous l'approximation que les longueurs d'onde d'excitation et d'émission soient proches, l'échantillonnage d'un microscope confocal par fluorescence peut être approché par la moitié de celui d'un microscope à champ large, c'est à dire :

$$\begin{cases} \Delta_{xy} &= \frac{\lambda_{ex}}{8ON}, \\ \Delta_z &= \frac{\lambda_{ex}}{4n(1-\cos \alpha)}. \end{cases}$$

Dans nos travaux, les paramètres d'acquisition de chaque image sont choisis de sorte que l'échantillonnage respecte le critère de Nyquist.

1.3 Résolution

Mise en évidence par Ernest Abbe au XIX^e siècle, la résolution ou plus précisément le pouvoir de résolution d'un système optique est une notion variant suivant le type de définition utilisée pour la caractériser. On trouve deux grands types de définitions : (i) le plus petit détail d'une structure pouvant être distingué (ii) la plus petite distance entre deux points permettant de les discriminer. Dans cette section, nous utiliserons la deuxième définition.

Si l'on observe à travers un système optique deux particules proches l'une de l'autre, l'image résultante sera composée de deux taches se recouvrant. Dans ce cadre, la résolution est définie comme la distance minimum entre ces deux points permettant de les discriminer visuellement ou analytiquement avec le système optique considéré. Différents critères ont été mis en place afin de quantifier cette résolu-

tion [den Dekker et van den Bos, 1997]. Le critère de Rayleigh est un critère communément admis pour exprimer la résolution dans le cadre d'un système linéaire en intensité.

Nous présentons dans un premier temps le critère de Rayleigh défini à partir d'une modélisation analytique de la réponse impulsionnelle du système optique. Dans un deuxième temps, nous décrivons les critères, dits pratiques, prenant en compte le bruit et l'échantillonnage de l'image. Nous introduisons ensuite des approches biophysiques permettant d'améliorer la résolution, dans le cadre où celle-ci est définie par le critère de Rayleigh.

1.3.1 Le critère de Rayleigh

Le critère de Rayleigh (illustré sur la figure 1.1) définit la résolution optique entre deux particules de mêmes intensités à partir d'une approximation analytique de la PSF.

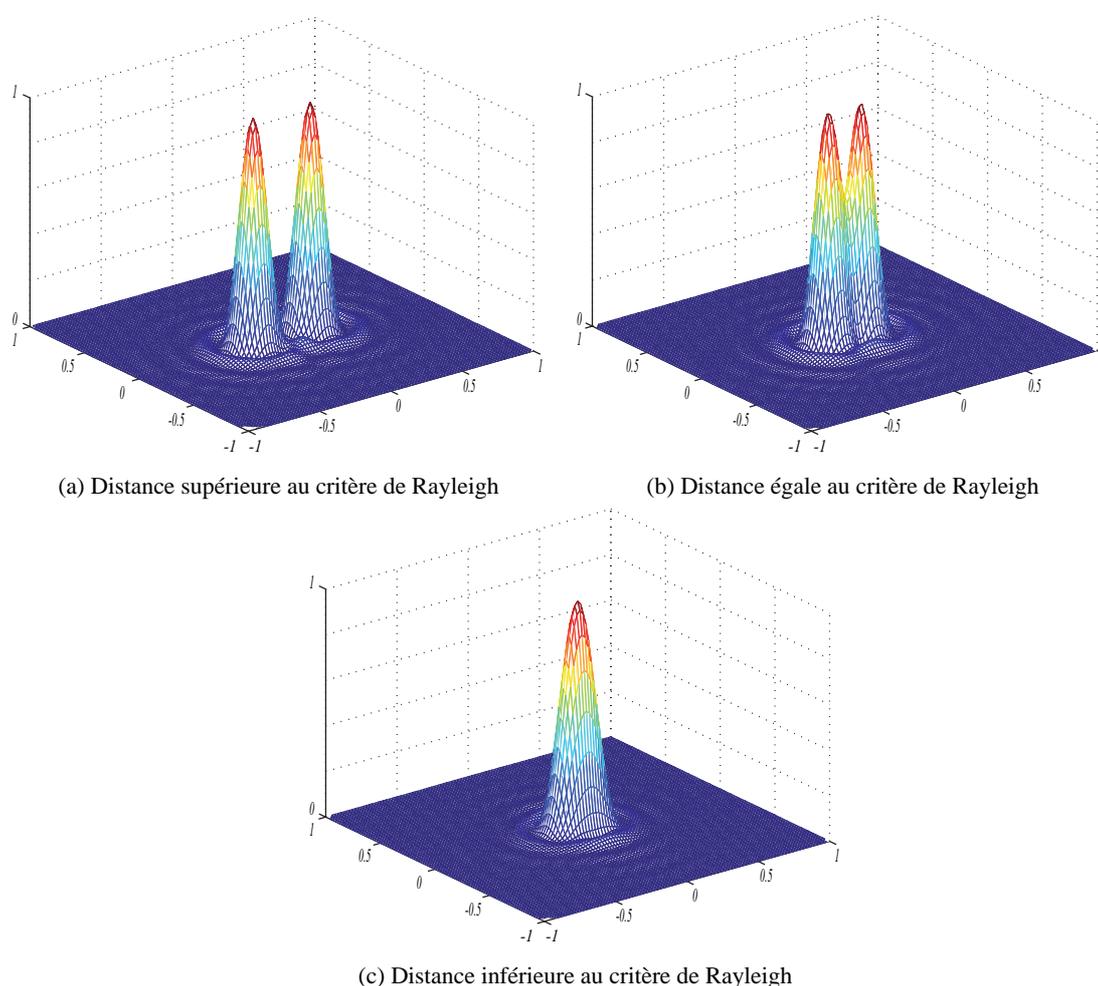


FIG. 1.1 – Illustration du critère de Rayleigh. Deux particules imagées en 2D par un microscope à champ large sont séparées d'une distance supérieure ($0,4\mu m$) (a), égale ($0,22\mu m$) (b) ou inférieure ($0,10\mu m$) (c), à la valeur obtenue par le critère de Rayleigh. Les paramètres de la PSF analytique sont égaux à 1,4 pour l'ouverture numérique et $0,5\mu m$ pour la longueur d'onde d'émission.

Ce critère établit que deux points sources peuvent être distingués si le maximum de la PSF produit par l'un des points correspond au passage par zéro de la PSF produit par le deuxième point. Dans le cadre

d'un microscope à champ large, le critère de Rayleigh définit la distance minimum par :

$$\begin{cases} d_{xy}^r &= \frac{0.61\lambda_{em}}{ON}, \\ d_z^r &= \frac{2n\lambda_{em}}{ON^2}. \end{cases}$$

De façon similaire aux hypothèses faites pour traduire le critère de Nyquist, on suppose que les longueurs d'onde d'excitation et d'émission soient assez proches pour permettre de définir le critère de Rayleigh d'un microscope confocal à balayage par point par :

$$\begin{cases} d_{xy}^r &= \frac{0.4\lambda_{em}}{ON}, \\ d_z^r &= \frac{1.4n\lambda_{em}}{ON^2}. \end{cases}$$

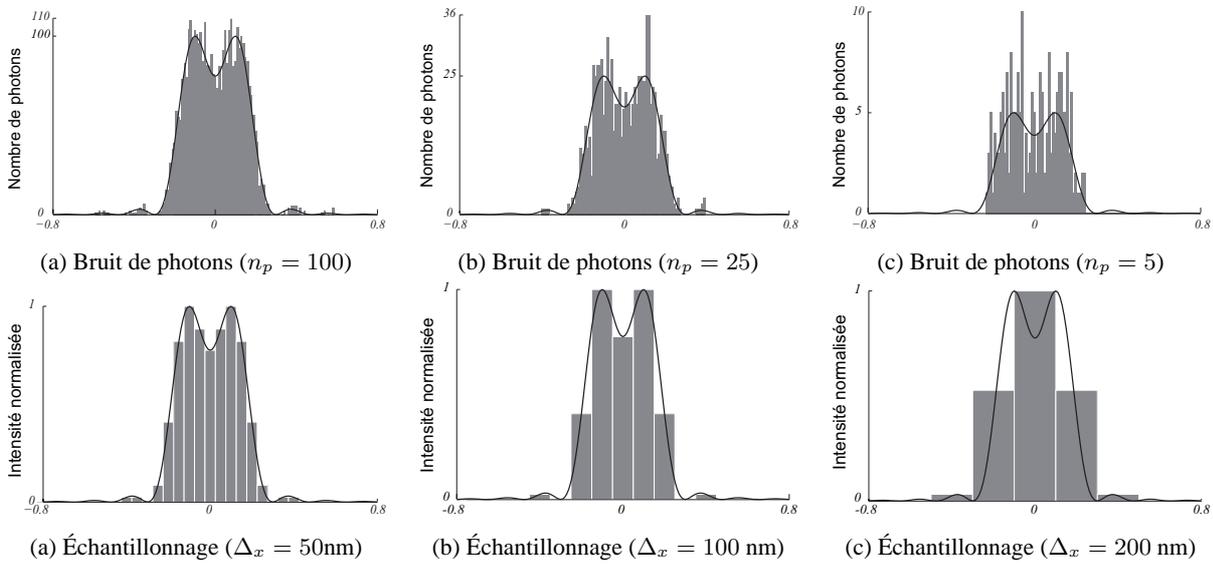


FIG. 1.2 – Illustration des effets du bruit de photons et de l'échantillonnage sur la résolution optique. Les schémas présentent deux taches séparées par une distance respectant le critère de Rayleigh dans un cas parfait (pleine ligne) et perturbées par le bruit de photon ou l'échantillonnage (barre grise). Sur les figures du haut, l'image est affectée par un bruit de photons proportionnelle le nombre de photons n_p enregistré (intensité des points sources) : $n_p = 100$ (a), $n_p = 25$ (b), $n_p = 5$ (c). Les figures du bas présentent l'image des points sources avec différents échantillonnages : $\Delta_x = 50\text{nm}$ (a), $\Delta_x = 100\text{nm}$ (b), $\Delta_x = 200\text{nm}$ (c) où (b) respecte le critère de Nyquist.

Parallèlement au critère de Rayleigh, de nombreux critères basés sur une approche visuelle, ont été établis pour définir la résolution [den Dekker et van den Bos, 1997]. Par exemple, le critère de Schuster établit que deux points sources sont résolus s'il n'y a aucun recouvrement des lobes principaux. La limite de résolution est alors le double de celle donnée par le critère de Rayleigh.

Établis dans le cadre d'image affectée par aucune perturbation et par une PSF parfaitement connue, ces critères se révèlent erronés dans un cas pratique [Ronchi, 1961, Goodman, 1985]. En effet, sous ces suppositions, la localisation des particules pourrait être parfaitement estimée et il n'existerait alors aucune limite à la résolution de deux points séparés par une distance quelconque.

La figure 1.2 illustre l'effet du bruit de photon et de l'échantillonnage sur la résolution optique. Deux taches de mêmes intensités séparées d'une distance égale au critère de Rayleigh sont présentées sur l'ensemble de ces schémas. Suivant le niveau de bruit de photons, l'échantillonnage, le contraste entre les deux taches et l'erreur commise lors de la modélisation de la PSF, alors la distance donnée par le critère de Rayleigh n'est pas représentative de la distance minimale permettant de discriminer deux taches superposées [Pawley, 2006a].

1.3.2 Limite pratique : analyse de la formation de l'image

Plusieurs études ont été réalisées pour déterminer une limite prenant en compte l'effet de l'échantillonnage et du bruit [Helstrom, 1964, van den Bos, 1987, den Dekker, 1997, Stelzer, 1998, Bettens *et al.*, 1999, Shahram et Milanfar, 2004, Aert et Dyck, 2006, Ram *et al.*, 2006]. Faites dans le cadre de deux points sources séparés par une distance d , ces études utilisent une modélisation de la formation d'une image dans laquelle les bruits et la réponse impulsionnelle sont connus. Reprenons le modèle de formation d'une image définie par l'équation 2 pour deux points sources :

$$I(\mathbf{x}) = \mathcal{P} \left(a_1 h \left(\mathbf{x} - \frac{d}{2} \right) + a_2 h \left(\mathbf{x} + \frac{d}{2} \right) \right), \quad (1.3)$$

Les différentes limites présentées dans ce paragraphe ont été établies dans les cas 1D et 2D.

Approche basée sur la théorie de l'estimation

Une première approche consiste en une analyse statistique basée sur la théorie de l'estimation [Helstrom, 1964, Bettens *et al.*, 1999, Ram *et al.*, 2006]. Dans ce cadre, la résolution est définie par une borne sur la précision pouvant être obtenue lors de l'estimation de la distance de séparation. Cette borne est déterminée par la borne de Cramer-Rao permettant de définir une limite à la précision de tout estimateur non biaisé [Kay, 1993b].

Soit $I = \{I_1, \dots, I_N\}$ le vecteur aléatoire représentant l'intensité des pixels $\{x_1, \dots, x_N\}$ de densité de probabilité p_{θ} avec θ le vecteur de paramètres $\{a_1, a_2, d\}$ et soit \hat{d} un estimateur non biaisé de la distance d . La variance de cet estimateur satisfait l'inégalité suivante :

$$\text{var}(\hat{d}) \geq \frac{1}{F_{3,3}(\theta)}, \quad (1.4)$$

où $F(\theta) = (F_{i,j}(\theta))_{1 \leq i,j \leq 3}$ correspond à la matrice d'information de Fisher dont les termes sont donnés par :

$$F_{i,j}(\theta) = E \left[\frac{\partial}{\partial \theta_i} \ln p(I; \theta) \frac{\partial}{\partial \theta_j} \ln p(I; \theta) \right].$$

L'évaluation de la matrice de Fisher est réalisée à l'aide des valeurs connues de θ . Si la densité de probabilité ayant produit les intensités I_1, \dots, I_N est connue, la borne de Cramer-Rao permet de déterminer une limite à la précision avec laquelle les positions des particules seront estimées pour une distance et des intensités initiales données.

Sous la supposition que le modèle de formation de l'image est parfaitement connu, Helstrom [Helstrom, 1964] définit la résolution comme la précision obtenue lors de l'estimation de la distance de séparation en supposant un bruit gaussien. Bettens *et al.* [Bettens *et al.*, 1999] définissent la borne de Cramer-Rao pour deux points sources de même intensité sous une PSF gaussienne. Les auteurs trouvent une relation entre la précision pouvant être obtenue, et la distance, la largeur et l'intensité des particules. La distribution de probabilité p_{θ} est définie à partir d'une distribution multinomiale, caractérisant le nombre d'évènements n_p (le nombre de photons, d'électrons, ...) enregistrés par le détecteur.

De façon similaire, Ram *et al.* [Ram *et al.*, 2006] quantifient pour une distance donnée l'erreur réalisée dans l'estimation des positions de chaque particule, dans le cadre d'une image perturbée par un bruit de photon. Ils définissent alors la résolution par l'écart-type de l'inverse de la matrice de Fisher et la calculent dans le cadre de point sources de même intensité acquis par un microscope à champ large. Ils proposent ensuite de mesurer l'effet de l'échantillonnage et du bruit Gaussien.

Ram *et al.* et Bettens *et al.* déduisent de leurs critères qu'une meilleure précision peut être obtenue en augmentant le nombre de photons enregistrés par le détecteur et que la variance de l'estimateur croît si la

distance entre les particules décroît. Dans ce cadre, l'estimation des localisations ne peut être considérée pertinente en dessous d'une certaine distance.

Approche basée sur la théorie des catastrophes

En raison d'un changement de structure de la fonction de vraisemblance, l'estimateur du maximum de vraisemblance de la distance devient nul lorsque la distance entre les particules est faible. Ce changement de structure est décrit par la théorie des catastrophes, définissant l'évolution d'une fonction paramétrique sous l'influence de ces paramètres.

En se basant sur cette théorie, van den Bos *et al.* [van den Bos, 1987, den Dekker, 1997, Bettens *et al.*, 1999] déterminent, à partir de la fonctionnelle de coût des moindres-carrés, une surface séparant deux cas : (i) la fonctionnelle possédant un point selle et deux minima locaux, (ii) la fonctionnelle possédant un seul minimum. Ces cas correspondent respectivement à la situation où deux taches sont présentes et à celle où une seule tache est présente. Cette surface définit alors la limite permettant de différencier ces cas et donc la limite de résolution optique. Ces auteurs définissent ensuite la probabilité de résolution comme étant la probabilité que les estimateurs du maximum de vraisemblance des positions des particules soient distincts (ou que l'estimateur de la distance soit non nul).

Van den Bos et den Dekker [van den Bos et den Dekker, 1996] mettent en évidence que des erreurs systématiques dus à une mauvaise approximation de la PSF peuvent induire une estimation nulle de la distance, et donc limiter la résolution calculée.

Approche basée sur la théorie de la détection

Shahram *et al.* [Shahram et Milanfar, 2004] réalisent une analyse statistique de la limite basée sur la théorie de la détection. Ils estiment alors la distance minimum dans le cas de particules d'intensités variables sous une supposition de bruit gaussien. Basé sur le test de vraisemblance généralisé que nous présentons dans le chapitre suivant, ils établissent une relation entre l'estimation de la localisation des particules et le rapport signal sur bruit. Ils montrent que la distance permettant de discriminer les deux particules décroît lorsque l'intensité des particules augmente. De plus, ils quantifient l'effet de l'échantillonnage et d'une mauvaise approximation de la PSF sur la résolution. En conclusion de leurs études, ils mettent en évidence que la résolution est indépendante de l'échantillonnage, si le pas d'échantillonnage est inférieur au critère de Nyquist. Ils montrent aussi que plus la distance entre les particules est faible, plus les erreurs d'approximation de la PSF vont perturber la détection.

Bilan

La limite de résolution de deux points sources dépend du bruit affectant l'image, de l'échantillonnage mais aussi des erreurs systématiques introduites par la modélisation de la PSF. Celle-ci ne pouvant être connue *a priori*, les limites de résolution présentées restent subjectives et de ce fait ne peuvent être considérées comme des limites exactes dans un cas pratique. Le critère de Rayleigh présentant l'avantage de donner une définition simple de la résolution optique, cette limite reste généralement utilisée. Dans le paragraphe suivant, nous présentons des méthodes basées sur une approche biophysique du problème permettant d'améliorer la résolution optique définie par le critère de Rayleigh.

1.3.3 Amélioration de la résolution

Diverses méthodes ont été proposées afin d'améliorer la résolution au sens du critère de Rayleigh. L'approche la plus courante consiste à modifier le système optique afin de réduire l'étalement de la PSF

tel que par exemple le microscope confocal par comparaison au microscope à champ large (voir [Garini *et al.*, 2005, Heintzmann et Ficz, 2006] pour une présentation de toutes les solutions optiques existantes).

Une autre approche utilise des molécules fluorescentes ayant les particularités d'émettre à différentes longueurs d'ondes [Churchman *et al.*, 2005], de s'activer à des instants différents [Lidke *et al.*, 2005, Bates *et al.*, 2007] ou de photoblanchir à des instants différents [Qu *et al.*, 2004, Betzig *et al.*, 2006]. Les particules fluorescentes marquées à l'aide de ces molécules apparaissent alors sur différentes images quelle que soit la distance les séparant. La distribution des particules est ensuite reconstruite à partir de l'ensemble de ces images.

Ces approches n'étant pas applicables à tous les problèmes biologiques, une autre approche utilise des algorithmes de traitement d'image afin d'estimer le nombre de particules dans un amas fluorescent. Les algorithmes existants seront présentés dans le chapitre suivant.

1.4 Conclusion

Nous avons présenté la nature des perturbations affectant une image acquise par un microscope par fluorescence, ainsi que le critère de Nyquist dans ce cadre. Nous avons ensuite défini la résolution optique et le critère de Rayleigh quantifiant la distance minimum permettant de distinguer deux points de même intensité sur une image soumise à aucune perturbation. Suite à cette définition, nous avons évoqué des méthodes permettant de déterminer des limites prenant en compte les perturbations et l'échantillonnage. Ces critères mettent en évidence que la résolution est dépendante de l'intensité des particules. Peu d'études ont été réalisées cependant sur l'effet des erreurs systématiques induites par une mauvaise approximation de la PSF. Dans le chapitre suivant, nous présentons des méthodes permettant d'estimer le nombre de particules séparées par des distances supérieures et inférieures au critère de Rayleigh.

Chapitre 2

Détection de particules fluorescentes : état de l'art

Nous proposons dans ce chapitre un état de l'art des méthodes permettant de détecter des particules fluorescentes selon que la distance entre les particules soit supérieure ou inférieure au critère de Rayleigh. Dans le premier cas, le problème de détection est assimilable à un problème de détection de points d'intérêt. Les points d'intérêt, ou singularités, sont des points au voisinage desquels l'intensité varie significativement dans plusieurs directions. Plusieurs types de singularité peuvent être extraits de l'image tels que les coins, les taches, les crêtes... Les méthodes de détection de ce type d'objets sont généralement basées sur la variation locale d'intensité obtenue à partir de la courbure. Cependant, d'autres approches telles que les approches par ondelettes et les approches par corrélation peuvent aussi être adaptées à la détection des points d'intérêt.

Les méthodes de détection de points d'intérêt adaptées aux taches fluorescentes sont décrites dans la première section. Nous présentons dans la deuxième section les méthodes permettant d'estimer la position sous-voxellique des particules et les études réalisées sur la limite de précision pouvant être obtenue en fonction du bruit, de l'échantillonnage et du système optique. Finalement, nous introduisons les méthodes permettant d'estimer le nombre de particules fluorescentes séparées par une distance inférieure au critère de Rayleigh.

2.1 Détection de points d'intérêt

Les particules fluorescentes assimilables à des impulsions lumineuses apparaissent sur l'image comme des taches de diffractions. Celles-ci sont de tailles fixées par la PSF et possèdent une variation spatiale d'intensité. Différentes méthodes ont été proposées pour détecter de telles taches fluorescentes. Ces méthodes sont combinées à une étape de réduction de bruit dans l'image par diffusion anisotrope [Tvarusko *et al.*, 1999], seuillage par ondelettes [Olivo-Marin, 2002], filtrage par estimation adaptative sur une fenêtre [Kervrann et Boulanger, 2006] ou filtrage adaptatif basé sur une modélisation de la PSF [Thomann *et al.*, 2002].

2.1.1 Approche par corrélation

L'approche par corrélation (template matching, en anglais) est basée sur une mesure de similarité entre l'image et un masque de l'objet recherché. Dans le cadre de la détection de taches fluorescentes, le masque est soit extrait de l'image [Ngoc *et al.*, 1997] soit obtenu grâce à une expression analytique de la

PSF [Bonneau *et al.*, 2005]. Le principe consiste à mettre en évidence les régions de l'image ressemblant le plus à l'objet recherché par le calcul d'une mesure de corrélation.

La corrélation normalisée ayant l'avantage d'être robuste aux variations locales d'intensité est calculée pour chaque voxel de l'image. Considérons le masque M représentant l'objet recherché, la corrélation normalisée γ est définie de la manière suivante :

$$\gamma = \frac{(I - I^m) * (M - M^m)}{I^\sigma M^\sigma},$$

où I^m et I^σ correspondent respectivement à la moyenne locale et à l'écart-type local de l'image I au voisinage du voxel considéré. M^m et M^σ correspondent à la moyenne et à l'écart-type du masque M . Les maxima locaux de γ constituent l'ensemble de positions potentielles des objets recherchés. L'ensemble de ces positions est ensuite seuillé afin de rejeter les fausses alarmes résultant du bruit. Bonneau *et al.* [Bonneau *et al.*, 2005] estiment un seuil à partir de la variance du bruit de l'image originale. Ils conservent alors les voxels possédant une forte corrélation et une intensité supérieure à ce seuil.

Afin d'obtenir une localisation sous-voxellique, les approches par corrélations peuvent être combinées à une méthode d'interpolation [Cheezum *et al.*, 2001]. Les méthodes par corrélations, relativement simples à mettre en œuvre, sont lourdes en temps de calcul. Elles peuvent cependant être accélérées en réalisant la convolution dans le domaine de Fourier.

2.1.2 Approche par ondelettes

L'idée centrale de la transformation en ondelettes est de réaliser une analyse des structures locales de l'image avec un grossissement dépendant de l'échelle considérée. En d'autres termes, la transformation en ondelettes consiste en une corrélation de l'image avec une ondelette successivement dilatée et translatée. Les corrélations avec les ondelettes dilatées à de larges échelles révèlent les larges structures tandis que les fines structures sont détectées aux petites échelles. La transformée en ondelettes W d'une fonction f s'écrit :

$$W_\psi f(u, s) = \frac{1}{\sqrt{s}} \int_{-\infty}^{+\infty} \psi^* \left(\frac{x - u}{s} \right) f(x) = \langle f, \psi_{s,u} \rangle,$$

où ψ^* est le complexe conjugué de l'ondelette ψ , u est le facteur de translation et $s > 0$ représente le facteur de dilatation. Deux types d'analyses en ondelettes sont utilisés : les ondelettes continues et les ondelettes discrètes. Les transformées discrètes produisant des décompositions échantillonnées sont bien adaptées à l'analyse d'image. La transformée en ondelettes discrète, introduite par [Mallat, 1989], permet de décomposer une image à travers un filtre passe-bas et un filtre passe-haut avant d'être décimée par deux et ainsi de suite. La décomposition par filtre passe-haut permet de mettre en évidence les détails de l'image (points d'intérêt, bruits) tandis que la décomposition par filtre passe-bas met en évidence les larges structures (zones homogènes, fond).

Olivo-Marin [Olivo-Marin, 2002] propose d'utiliser une transformée en ondelettes discrète invariante par translation pour discriminer le fond fluorescent des objets caractérisés par des hautes fréquences dans l'image telles que les taches fluorescentes. La transformée utilisée, l'algorithme à trous introduit par [Starck *et al.*, 2000] décompose l'image en coefficients d'approximation A (donnés par le filtrage passe-bas) et coefficients de détails W non-décimés. Sous cette transformation, l'image originale I peut être reconstruite à partir de la formule suivante :

$$I(\mathbf{x}) = A_J(\mathbf{x}) + \sum_{i=1}^J W_i(\mathbf{x}),$$

où $i = 1..J$ donne l'échelle considérée. Cette transformation crée une décomposition où les coefficients sont corrélés. Les informations concernant une tache seront alors contenues dans plusieurs échelles des coefficients de détail. Le bruit est, quant à lui, distribué sur tous les coefficients. Sous la supposition d'un bruit gaussien, une étape de débruitage est réalisée grâce à un seuillage des coefficients de détail. Le seuil établi, pour chaque niveau de résolution, est proportionnel à la variance du bruit de l'échelle considérée [Donoho, 1995].

Une image de corrélation, obtenue par le produit inter-échelles des coefficients débruités, est ensuite seuillée afin de discriminer les coefficients de détails correspondant aux taches. Le nombre d'échelles considéré dans le calcul de l'image de corrélation correspond à la dimension des objets d'intérêt. La mise en place d'un seuil automatique et efficace se révèle cependant difficile dans ce cadre [Genovesio, 2005].

En se basant sur la transformée d'Anscombe généralisée, Zhang *et al.* [Zhang *et al.*, 2007a] proposent d'étendre cette méthode de détection au cadre d'images perturbées par une combinaison d'un bruit de Poisson et d'un bruit gaussien.

2.1.3 Test du rapport de vraisemblance généralisé

En considérant une fenêtre g sur l'image, la détection de particules peut aussi être formulée comme un test binaire sur la présence d'une particule sur la fenêtre. Ce test est alors décrit par :

$$\begin{cases} H_0 : \mathbf{g} = \mathcal{P}(b), \\ H_1 : \mathbf{g} = \mathcal{P}(ah(\mathbf{x} - \mathbf{x}_c) + b), \end{cases}$$

où H_0 et H_1 correspondent respectivement à l'hypothèse nulle et alternative. \mathbf{g} désigne l'intensité des voxels dans la fenêtre considérée et a l'intensité initiale de la particule. En supposant connu l'ensemble des paramètres $\theta = \{b, \mathbf{x}_c, a\}$, le test de vraisemblance établit que l'hypothèse alternative est choisie si [Kay, 1993a] :

$$\mathcal{R}(\mathbf{g}) = \frac{p(\mathbf{g} | H_1)}{p(\mathbf{g} | H_0)} > \gamma$$

où $p(\mathbf{g}|H_1)$ (respectivement $p(\mathbf{g}|H_0)$) correspond à la probabilité de \mathbf{g} sous H_1 (respectivement H_0) et γ est un seuil défini par la probabilité de fausse alarme P_{FA} , donnée par :

$$P_{FA} = \int_{\gamma}^{\infty} p(\mathbf{g}|H_0)d\mathbf{g} = \alpha. \quad (2.1)$$

α caractérise l'erreur de première espèce du test, c'est à dire la probabilité de décider H_1 alors que H_0 est vraie.

Cependant, le vecteur de paramètres θ étant généralement inconnu, H_1 est décidée si :

$$\mathcal{R}(\mathbf{g}) = \frac{p(\mathbf{g}|H_1, \hat{\theta}_1)}{p(\mathbf{g}|H_0, \hat{\theta}_0)} > \gamma, \quad (2.2)$$

avec $\hat{\theta}_i$ donné par l'estimateur du maximum de vraisemblance sous l'hypothèse i . Ce test correspond alors au test de vraisemblance généralisé. De façon similaire au test de vraisemblance exacte, le seuil γ peut être déduit de la probabilité de fausse alarme si la probabilité de \mathbf{g} sous H_0 est connue (l'ensemble des paramètres θ_0 est connu). Samson *et al.* [Samson *et al.*, 2004] dérive ce test sur une fenêtre glissante sous la supposition d'un bruit gaussien et [Abu-Naser *et al.*, 2006] dans le cadre d'images perturbées par un bruit de photons.

Cette méthode a l'avantage d'inclure l'estimation de la position sous-voxele de la particule dans l'algorithme de détection. Elle est cependant très coûteuse en temps de calcul.

2.1.4 Courbure locale

Les détecteurs de points d'intérêt, type détecteur de Harris [Harris et Stephens, 1988], sont basés sur des expressions dérivatives de l'intensité de l'image. Ces expressions définissent alors la courbure d'intensité locale. Il existe deux types de courbures : (i) la courbure moyenne C_m définie par le Laplacien de l'image et (ii) la courbure gaussienne C_g définie par le déterminant de la matrice hessienne. Ces opérateurs simples ou une combinaison de ceux-ci permettent de différencier plusieurs types de points d'intérêt [Harris et Stephens, 1988, Wilson et Hancock, 1999, Schmidt *et al.*, 2000].

Les signes des courbures moyennes et gaussiennes permettent de classifier localement différents types de surfaces. Ces opérateurs calculés à un point de la surface, généralement le centre, représentant les niveaux de gris d'une image 2D permettent de distinguer :

- une surface elliptique, pour laquelle $C_g > 0$, le signe de C_m donnant l'orientation de la surface ;
- une surface hyperbolique (selle de cheval) pour laquelle $C_g < 0$;
- une surface parabolique pour laquelle $C_g = 0$ et $C_m \neq 0$, le signe de C_m déterminant l'orientation de la surface ;
- une surface plane pour laquelle $C_g = C_m = 0$.

La figure 2.1 présente ces différentes surfaces et le signe des courbures au centre associé. Ces critères déterminés dans le cadre d'image 2D ne permettent pas de classifier directement des hypersurfaces 4D (niveaux de gris d'une image 3D). Par exemple, contrairement au cas 2D, la courbure gaussienne n'est pas invariante par changement de l'orientation de l'hypersurface 4D.

Dans le cadre de détection de taches, la courbure locale est dérivée de l'image filtrée par un noyau gaussien de variance adaptée à la taille des taches recherchées. La réponse de l'opérateur de courbure est alors fortement dépendante de la relation entre la taille de la tache et la variance du noyau gaussien. En effet, la courbure locale sera élevée pour les objets dont la taille coïncide avec l'écart-type du filtre gaussien, et faible sur le reste de l'image. Afin de détecter des objets de différentes tailles sur l'image, une approche multi-échelles peut être envisagée [Lindeberg, 1998]. Cette approche est basée sur des filtrages successifs de l'image par un noyau gaussien.

Thomann *et al.* [Thomann *et al.*, 2002] proposent un opérateur basé sur la courbure gaussienne et l'intensité moyenne calculée localement, ceci afin de détecter des particules fluorescentes sur des images acquises avec un microscope à champ large. Leur opérateur est adapté à la détection de taches isotropes possédant une courbure et une intensité élevée. De plus, ils définissent la variance du noyau gaussien par une approximation gaussienne de la PSF.

Dans le cadre de suivi d'une particule fluorescente, Sage *et al.* [Sage *et al.*, 2005] calculent la courbure moyenne de l'image filtrée. Cet opérateur, aussi appelé filtrage LoG (Laplacian of Gaussian, en anglais) leur permet de rehausser la tache fluorescente et ainsi d'améliorer la performance de leur algorithme de suivi.

Zhang *et al.* [Zhang *et al.*, 2006] proposent une méthode pour détecter des bâtonnets fluorescents basée sur la courbure moyenne et l'intensité. Les auteurs s'intéressent aussi à la mise en place d'un seuil automatique de l'image des courbures sous la supposition d'un bruit gaussien.

2.2 Localisation des particules

Dans cette section, nous présentons les méthodes permettant d'estimer la localisation d'une particule unique ainsi que les limites sur la précision pouvant être obtenue. Bobroff [Bobroff, 1986] a établi que la précision de la localisation d'une particule dépend du nombre de photons imagés. De nombreuses études ont été réalisées ensuite sur la précision de la localisation pouvant être obtenue suivant l'approximation de la PSF, les aberrations optiques, les différentes perturbations et l'échantillonnage [Bobroff, 1986, Patwardhan, 1997, Cheezum *et al.*, 2001, Thompson *et al.*, 2002, Ober *et al.*, 2004, Samson *et al.*, 2004,

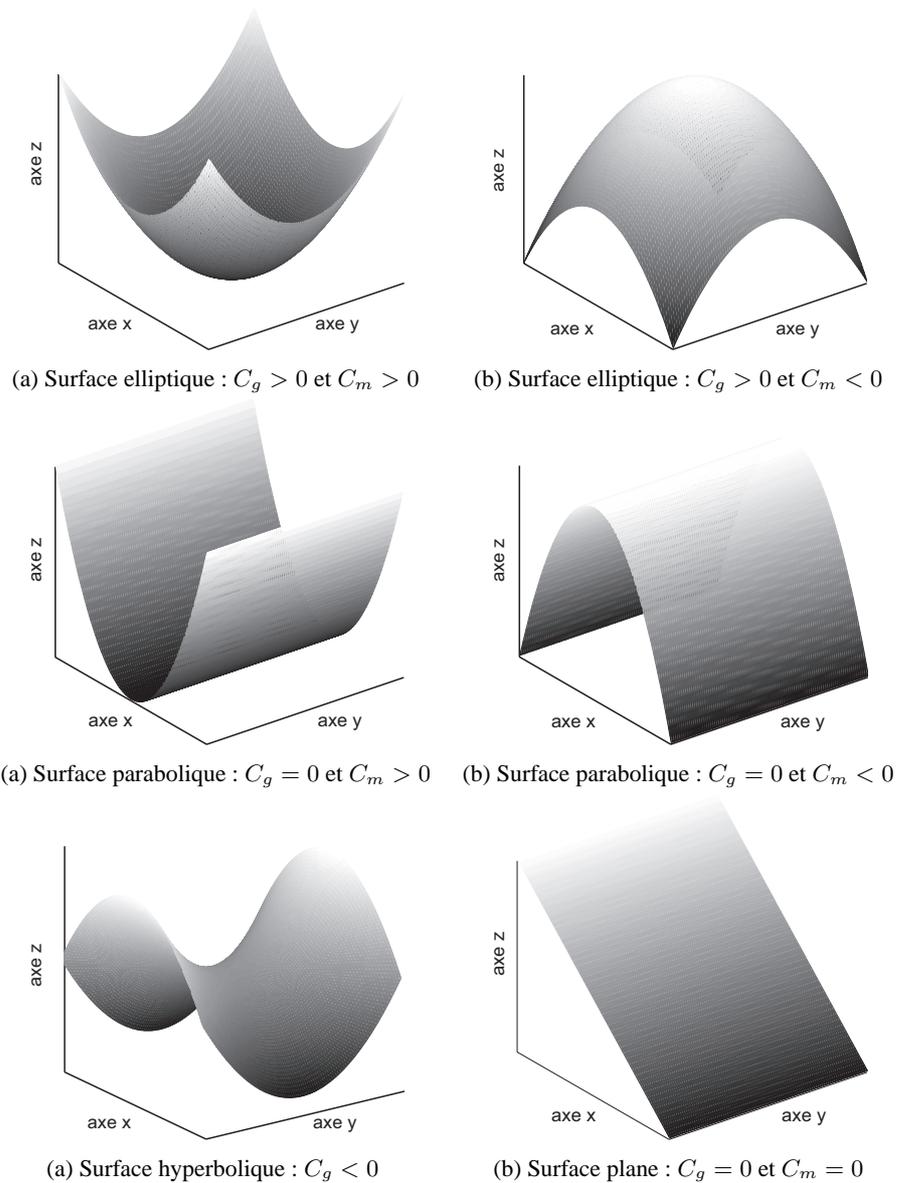


FIG. 2.1 – Illustration des surfaces classifiées grâce aux opérateurs de courbures. Les schémas du haut présentent deux surfaces elliptiques orientées positivement (a) ou négativement (b) par rapport à l'origine. Deux surfaces paraboliques, orientation positive (a) et négative (b), sont présentées sur les schémas du milieu. Les schémas du bas présentent une surface hyperbolique (a) et une surface plane (b).

Aguet *et al.*, 2005, Andersson, 2007]. Les méthodes permettant d'estimer la localisation d'une particule se regroupent en deux principales approches : (i) le calcul du centre de gravité d'une surface représentant la tache et (ii) l'ajustement d'une fonction analytique représentant la tache, dans notre cadre la PSF.

2.2.1 Calcul du centre de gravité

Dans cette approche, aucune supposition sur le bruit n'est effectuée : la position est déduite du centre de gravité de la particule imagée [Ghosh et Webb, 1994, Patwardhan, 1997, Cheezum *et al.*, 2001]. Un volume caractérisant la particule est extrait de l'image à l'aide d'une méthode de segmentation et la

position \mathbf{x}_c de la particule est alors définie par :

$$\mathbf{x}_c = \frac{\sum_{\mathbf{x}=1}^N \mathbf{x}I(\mathbf{x})}{\sum_{\mathbf{x}=1}^N I(\mathbf{x})},$$

où N correspond au nombre de voxels du volume segmenté. En plus des perturbations et de l'échantillonnage, l'erreur de localisation est liée au volume considéré [Cheezum *et al.*, 2001, Patwardhan, 1997]. Les auteurs montrent en effet que l'erreur de localisation augmente quand le volume considéré décroît. Le calcul du centre de gravité est, de plus, biaisé dans le cas d'une tache asymétrique.

2.2.2 Ajustement d'une approximation de la PSF

L'estimation de la position d'une particule unique est réalisée dans ce cadre par la minimisation d'un critère de similarité Δ entre une modélisation analytique de la PSF et la particule imagée. Soit \mathbf{g} l'image de la particule unique perturbée par différents bruits, les positions estimées $\hat{\boldsymbol{\theta}}(x_c, y_c, z_c)$ sont obtenues par :

$$\hat{\boldsymbol{\theta}} = \underset{\boldsymbol{\theta}}{\operatorname{argmin}} \Delta(\operatorname{PSF}_{\boldsymbol{\theta}} - \mathbf{g}),$$

où le critère de similarité est défini soit par le critère des moindres-carrés, soit par l'estimateur du maximum de vraisemblance.

En se basant sur le critère des moindres-carrés, Thompson *et al.* [Thompson *et al.*, 2002] estiment l'erreur de localisation d'une particule en ajustant une fonction gaussienne approchant la PSF. Ils définissent plusieurs limites suivant le type de bruits pris en compte et l'échantillonnage. À l'aide de données simulées, ils comparent ensuite à ces limites des résultats expérimentaux obtenus sous deux suppositions : (i) l'image de la particule est perturbée par le bruit de photons et un bruit de fond, (ii) l'image de la particule est simplement affectée par le bruit de fond. Leurs résultats indiquent alors que le bruit de photons ne peut être négligé.

Ober *et al.* [Ober *et al.*, 2004] définissent une limite théorique à la précision de la localisation basée sur la borne de Cramer-Rao. Cette borne est calculée pour différentes densités de probabilité suivant le type de bruits et d'approximation de la PSF pris en considération.

Aguet *et al.* [Aguet *et al.*, 2005] étudient la faisabilité d'une localisation axiale précise. Ils montrent que la position axiale d'une particule est d'autant plus précise si l'estimation est réalisée sur des images possédant d'importantes aberrations sphériques. Ils utilisent alors une approximation de la PSF d'un microscope à champ large prenant en compte ces aberrations. La localisation transversale est cependant moins précise comparée au cas où la particule est située sur le plan focal [Aguet *et al.*, 2007].

2.3 Détection en dessous de la résolution

Les méthodes de détection de points d'intérêt sont généralement combinées à une étape de seuillage, ou de recherche de maxima locaux, empêchant la discrimination de particules en dessous de la résolution définie par le critère de Rayleigh. Même si la distance entre les particules est assez élevée pour que les critères basés sur la courbure ou la corrélation révèlent un écart entre les particules, la taille de la fenêtre de recherche des maxima locaux est un compromis entre des fausses détections dues au bruit et la détection de ces particules. La figure 2.2 illustre ce phénomène en montrant le résultat d'un algorithme de détection par courbure suivant deux différentes tailles de fenêtres de recherche. Sur l'image de résultat à gauche (a), la distance minimum entre les maxima locaux est fixée à 30 pixels tandis que sur l'image

à droite (b) cette distance est fixée à 5 pixels. On remarque que, lorsque la distance entre les maxima décroît, le nombre de particules superposées augmente mais aussi le nombre de fausses détections.

De façon générale, la distance entre les maxima locaux choisie induit qu'un seul maximum sur un amas de particules est conservé. Ces algorithmes ne sont alors pas adaptés à l'estimation du nombre de particules dans un amas. Ils peuvent cependant être combinés à une méthode permettant d'améliorer la résolution optique.

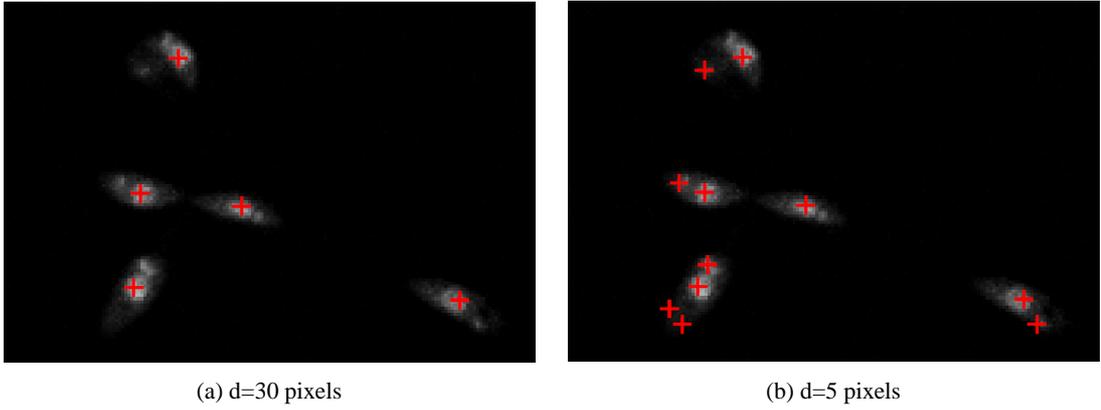


FIG. 2.2 – Effet de la taille de la fenêtre de recherche des maxima locaux sur la détection de taches fluorescentes. Les images présentées montrent le résultat d'un algorithme de détection par courbure suivant deux tailles de fenêtres de recherche : (a) la distance d entre les maxima locaux est fixée à 30 pixels et (b) la distance d entre les maxima locaux est fixée à 5 pixels. Lorsque la distance entre les maxima décroît, il est possible de détecter des taches superposées mais on remarque aussi l'apparition de fausses détections.

Contrairement au chapitre précédent, nous nous plaçons ici dans le cas où le nombre de particules dans un amas est inconnu. Nous présentons dans un premier temps une approche par déconvolution permettant de corriger l'effet de la PSF sur la particule. Dans un second temps, nous décrirons les méthodes basées sur un ajustement de mélange de fonctions gaussiennes, chacune approximant la PSF.

2.3.1 Déconvolution

La formation d'une image en microscopie est définie comme la convolution d'une réponse impulsionnelle et de l'objet étudié (cf. section I). La déconvolution, processus permettant d'inverser ce phénomène, fait partie des problèmes mal-posés. De ce fait, la déconvolution ne peut être envisagée que par l'utilisation de contraintes sur la solution.

De nombreuses méthodes de déconvolution ont été proposées afin de restaurer l'objet original et d'améliorer la résolution. Sarder *et al.* [Sarder et Nehorai, 2006] proposent un récapitulatif de ces méthodes.

L'algorithme le plus utilisé est l'algorithme de Richardson [Richardson, 1972] et Lucy [Lucy, 1974] basé sur l'estimation de l'image originale par maximisation de la vraisemblance. Nous présentons ici cet algorithme dans le cadre d'un bruit de photons. Il peut cependant être dérivé sous la supposition d'un bruit gaussien.

Si un objet o est observé comme une image I dégradée par un bruit de photons, alors la distribution de probabilité de l'intensité peut être modélisée par un processus de Poisson. En supposant les intensités I_1, \dots, I_N indépendantes, avec N le nombre de voxels de l'image, la vraisemblance s'écrit :

$$L(o; I) = \prod_{\mathbf{x}=1}^N \left(\frac{[(h * o)(\mathbf{x})]^{I(\mathbf{x})} e^{-(h * o)(\mathbf{x})}}{I(\mathbf{x})!} \right).$$

L'algorithme de Richardson et Lucy minimise la fonctionnelle $\mathcal{L}(o; I)$, égale à $-\log L(o; I)$, de façon itérative. Si o_k est une estimation à l'itération k , alors le processus itératif de l'algorithme de Richardson-Lucy est donné par :

$$o_{k+1}(\mathbf{x}) = \left\{ \left[\frac{I(\mathbf{x})}{(o_k * h)(\mathbf{x})} \right] * h(-\mathbf{x}) \right\} o_k(\mathbf{x}).$$

Cet algorithme ayant tendance à amplifier le bruit, il ne converge pas nécessairement vers une solution correcte. Plusieurs méthodes ont été proposées pour régulariser la solution de cet algorithme. Nous pouvons par exemple citer la régularisation par variation totale proposée par [Dey *et al.*, 2004], ou encore la régularisation par ondelettes proposée par [Vonesch et Unser, 2007].

D'autres méthodes basées sur une estimation du maximum *a posteriori* permettent aussi de régulariser la solution et ainsi de réduire l'amplification du bruit. Verveer *al.* [Verveer *et al.*, 1999] proposent une comparaison des *a priori* utilisés.

Dans notre cadre d'amélioration de la résolution, les méthodes de régularisation ne permettent pas de discriminer les particules tout en réduisant le bruit. Le choix sur le nombre d'itérations est un compromis entre le niveau de régularisation et de résolution souhaités.

2.3.2 Ajustement de modèles gaussiens

L'idée principale de cette méthode consiste, suivant une modélisation analytique de la PSF et un modèle de perturbations affectant l'image, à décider parmi les hypothèses suivantes celles caractérisant le mieux les données :

$$\begin{cases} H_0 : \mathbf{g} = \mathbf{g}_n, \\ H_1 : \mathbf{g} \neq \mathbf{g}_n, \end{cases}$$

où n correspond à un nombre initial de particules et \mathbf{g}_n désigne le modèle utilisé pour représenter les données \mathbf{g} . Dans notre cas, il peut s'écrire :

$$g_n(\mathbf{x}) = \mathcal{P} \left(\sum_{i=1}^n a_i h(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i) \right).$$

Nous séparons en deux principales approches les méthodes permettant de définir un critère de décision : l'approche basée sur le test de vraisemblance généralisé et les approches par maximum de vraisemblance pénalisée.

Test de vraisemblance généralisé

De façon similaire à la méthode de détection de points d'intérêt présentée dans la section 2.1.3, le nombre de particules au sein d'un amas peut être estimé par la résolution d'un test de vraisemblance généralisé à l'aide d'une modélisation de la densité de probabilité d'une perturbation de l'image. Thomann *et al.* [Thomann *et al.*, 2002] et Shahram *et al.* [Shahram et Milanfar, 2006] dérivent ce test sous l'hypothèse d'un bruit blanc gaussien. Le test est alors formalisé par :

$$\begin{cases} H_0 : \mathbf{g} = \sum_{i=1}^n a_i h(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i) + \eta_\sigma, \\ H_1 : \mathbf{g} = \sum_{i=1}^{n+1} a_i h(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i) + \eta_\sigma, \end{cases}$$

où η définit un bruit blanc gaussien de variance σ . Reprenons le test de vraisemblance généralisé défini par l'équation 2.2 adaptée au test précédent où $p(\mathbf{g}|H_1; \boldsymbol{\theta}_1)$ suit une loi gaussienne de variance σ :

$$\begin{aligned} \mathcal{R}(\mathbf{g}) &= \frac{\frac{1}{(2\pi\sigma^2)} \exp\left(-\frac{1}{2\sigma^2} \|\mathbf{g} - \hat{\mathbf{g}}_{n+1}\|^2\right)}{\frac{1}{(2\pi\sigma^2)} \exp\left(-\frac{1}{2\sigma^2} \|\mathbf{g} - \hat{\mathbf{g}}_n\|^2\right)} \\ &= \exp\left(-\frac{1}{2\sigma^2} \left(\|\hat{\mathbf{g}}_{n+1}\|^2 - \|\hat{\mathbf{g}}_n\|^2 - 2\mathbf{g}^t(\hat{\mathbf{g}}_{n+1} - \hat{\mathbf{g}}_n)\right)\right) \end{aligned}$$

où \mathbf{g}^t correspond à la transposée de \mathbf{g} . $\hat{\mathbf{g}}_{n+1}$, respectivement $\hat{\mathbf{g}}_n$, correspond aux données décrites par l'ensemble des paramètres $\boldsymbol{\theta}_{n+1}$, respectivement $\boldsymbol{\theta}_n$, estimés par le maximum de vraisemblance sous l'hypothèse alternative H_1 , respectivement l'hypothèse nulle H_0 . Les estimateurs des paramètres $\boldsymbol{\theta}_n$, correspondant aux intensités initiales des particules $a_{1..n}$ et leurs positions $\mathbf{x}_{1..n}$, sont alors obtenus par la maximisation de la fonction de log-vraisemblance, c'est à dire :

$$\hat{\boldsymbol{\theta}}_n = \operatorname{argmax}_{\boldsymbol{\theta}_n} \sum_{j=1}^N \left(g(\mathbf{x}_j) - \sum_i^n a_i h(\mathbf{x}_j - \mathbf{x}_i) \right)^2. \quad (2.3)$$

Sous l'hypothèse nulle H_0 , respectivement sous l'hypothèse alternative H_1 , la vraisemblance peut être définie comme une statistique χ_n^2 , respectivement χ_{n+1}^2 :

$$\chi_n^2 = \frac{\sum_{j=1}^N \left(g(\mathbf{x}_j) - \sum_i^n a_i h(\mathbf{x}_j - \mathbf{x}_i) \right)^2}{\sigma^2}. \quad (2.4)$$

Cette statistique correspondant à la somme des carrés de variables aléatoires indépendantes, chacune suivant une loi normale centrée réduite, suit une loi du χ^2 à $N - 4n$ degrés de liberté. On pose r_0 , égal à $N - 4n$, le degré de liberté sous l'hypothèse nulle et r_1 , égal à $N - 4(n + 1)$, le degré de liberté sous l'hypothèse alternative. La statistique f définie par le rapport entre les fonctions de log-vraisemblance sous chaque hypothèse, divisé par le rapport entre les degrés de liberté sous chaque test, est égale à :

$$f = \frac{\sum_{j=1}^N \left(g(\mathbf{x}_j) - \sum_i^n a_i h(\mathbf{x}_j - \mathbf{x}_i) \right)^2 r_1}{\sum_{j=1}^N \left(g(\mathbf{x}_j) - \sum_i^{n+1} a_i h(\mathbf{x}_j - \mathbf{x}_i) \right)^2 r_0}.$$

f suit alors une loi de Fisher $F(r_0, r_1)$ à r_0 et r_1 degrés de liberté. La décision sur ces hypothèses est alors basée sur une erreur de première espèce α , généralement fixée à 5%. L'hypothèse nulle est choisie si :

$$\operatorname{prob}(F > f) < \alpha.$$

La performance du test de vraisemblance est gérée par l'erreur de première espèce. Ce test est de ce fait sensible aux fausses détections.

Sous une supposition de bruit de photons, ou une combinaison de plusieurs bruits, le test de vraisemblance généralisé est difficile à mettre en place analytiquement.

Maximum de vraisemblance pénalisé

Largement utilisée dans les domaines de la classification et de la segmentation, cette approche rassemble les méthodes permettant d'estimer le nombre de composants dans un mélange de densités. On peut remarquer qu'elle est cependant peu utilisée dans le cadre de la détection de particules fluorescentes.

Dans cette approche, le nombre de composants du mélange (ou le nombre de particules) est sélectionné suivant :

$$\hat{n} = \underset{n}{\operatorname{argmin}} \left\{ \Delta(\hat{\boldsymbol{\theta}}_n, n), n = n_{\min}, \dots, n_{\max} \right\}, \quad (2.5)$$

où Δ désigne un critère de sélection du nombre de composants dans le mélange et $\hat{\boldsymbol{\theta}}_n$ correspond à l'ensemble des paramètres estimés par le maximum de vraisemblance.

Le critère de sélection est basé sur la fonction de vraisemblance si la densité de probabilité de \mathbf{g} ($p_{\boldsymbol{\theta}}(\mathbf{g})$) est connue. Si aucune information statistique sur \mathbf{g} n'est disponible, on suppose que \mathbf{g} est une mesure bruitée de $\sum_{i=1}^n a_i h(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i)$ et on utilise le critère des moindres-carrés.

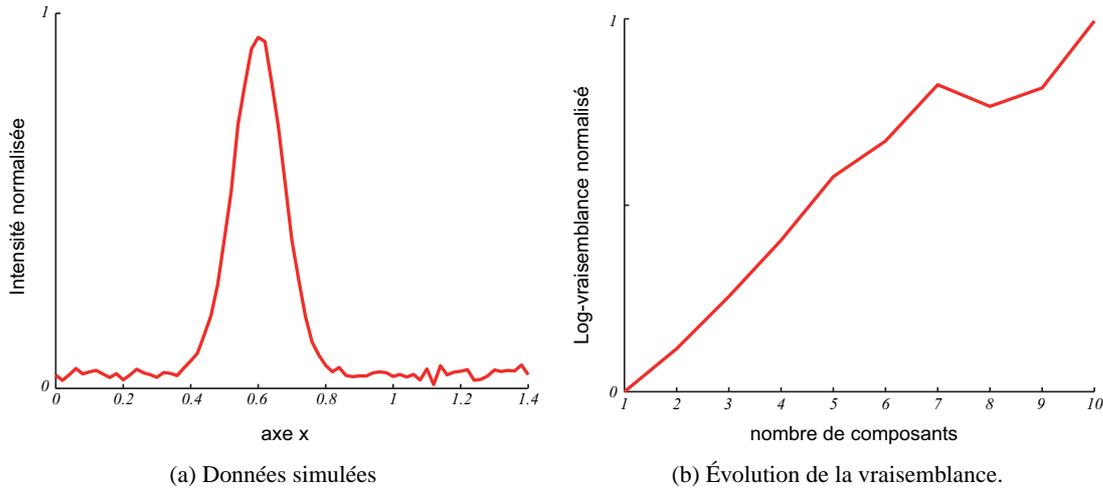


FIG. 2.3 – Évolution de la vraisemblance en fonction du nombre de composants dans le modèle. Nous présentons sur le schéma (a) une fonction gaussienne bruitée sur laquelle a été réalisée l'ajustement des modèles. Nous présentons ensuite sur le schéma (b), la log-vraisemblance normalisée en fonction du nombre de composants du modèle ajusté aux données simulées. On remarque que la log-vraisemblance augmente avec l'ajout d'un composant dans le modèle.

La figure 2.3 présente l'évolution de la vraisemblance en fonction du nombre de composants dans le modèle ajusté. Nous calculons les vraisemblances des modèles g_1 à g_{10} par rapport à des données simulées. Nous avons réalisé ces calculs sur des données simulées correspondant à une fonction gaussienne bruitée. Cette fonction est présentée sur le schéma 2.3 (a) et l'évolution de la vraisemblance avec un nombre variable de composant dans le modèle est présentée sur le schéma 2.3 (b). La vraisemblance augmentant avec l'ajout d'un composant, cette fonctionnelle ne peut être utilisée seule comme critère de sélection.

La fonction de vraisemblance est généralement complétée par la soustraction d'un terme pénalisant les hautes valeurs de n , c'est à dire :

$$\Delta(\hat{\boldsymbol{\theta}}_n, n) = -\log p(\mathbf{g}; \hat{\boldsymbol{\theta}}_n) + \mathcal{F}(n), \quad (2.6)$$

où $\mathcal{F}(n)$ est une fonction pénalisante.

Diverses approches, basées sur la théorie de l'information ou sur la théorie bayésienne, ont été proposées afin de déterminer la fonction $\mathcal{F}(n)$ [Figueiredo et Jain, 2002, Stoica et Selén, 2004]. Une présentation et comparaison de ces critères est réalisée dans [McLachlan et Peel, 2000].

Les approches basées sur la théorie bayésienne nécessitent de définir une densité de probabilité *a priori* caractérisant le nombre de composants dans le modèle. Cette densité étant généralement inconnue, plusieurs auteurs ont proposé des approximations aboutissant à des critères relativement simples, le plus utilisé étant le critère d'information bayésienne (BIC). Parmi les approches utilisant la théorie

de l'information, le critère d'information d'Akaike (AIC) et le critère de message de longueur minimale (MML) sont les plus utilisés, la formulation de ce dernier coïncidant avec la formation du critère BIC. Dans le cadre d'ajustement de densité de probabilité, plusieurs auteurs ont montré que le critère AIC a tendance à surestimer le nombre de composants.

Une autre approche est basée sur les méthodes des chaînes de Markov à sauts réversible dans lesquelles le nombre de composants est un paramètre à estimer. Cependant, cette approche est trop lourde en temps de calcul pour être utilisée dans notre cadre.

Santos et Young [Santos et Young, 2000] proposent un algorithme de détection sous-résolution par seuillage d'un rapport de maximum de vraisemblance pénalisée sous l'hypothèse d'un bruit gaussien. Une décision sur un nombre n de particules est définie par un seuillage du rapport :

$$R(\mathbf{g}) = \frac{p(\mathbf{g}; \hat{\boldsymbol{\theta}}_n + 1) - p(\mathbf{g}; \hat{\boldsymbol{\theta}}_n)}{p(\mathbf{g}; \hat{\boldsymbol{\theta}}_n + 1)}.$$

Si $R(\mathbf{g})$ est en dessous d'un seuil fixé empiriquement, alors un nombre n de particules est conservé.

2.4 Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre un état de l'art sur les méthodes de détection de particules en microscopie par fluorescence. Cet état de l'art se divise en deux parties : les méthodes basées sur la détection de points d'intérêt, et les méthodes permettant une détection des particules en-dessous de la résolution optique définie par le critère de Rayleigh. De plus, nous avons présenté des méthodes permettant de déterminer la position sous-pixellique dans le cadre de particules uniques.

L'approche par courbure a l'avantage d'être rapide et bien adaptée à la détection de tache décrite par la PSF. De ce fait, nous utiliserons cette approche afin de mettre en place un algorithme de détection de particules décrites par une PSF asymétrique.

Afin de détecter les taches en dessous de la résolution optique, nous nous intéresserons à une approche par maximum de vraisemblance pénalisée. Contrairement à l'approche par tests statistiques dont la performance est gérée par l'erreur de première espèce, l'approche par vraisemblance pénalisée permet une décision simple et déterministe.

Les méthodes existantes d'ajustement d'un modèle de PSF utilisent une approximation gaussienne de la PSF. Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, les erreurs systématiques induites par une mauvaise approximation de la PSF peuvent dégrader la résolution et donc biaiser la décision sur le nombre de particules. De ce fait, nous utiliserons notre modèle analytique de PSF lors de la mise en place de notre algorithme de détection sous-résolution. Nous comparons ensuite les erreurs induites par notre modèle analytique et celles induites par son approximation gaussienne.

Chapitre 3

Détection de particules fluorescentes imagées par un microscope confocal à balayage par ligne

La PSF du microscope confocal à balayage par ligne possédant une asymétrie entre chaque direction (cf. chapitre 3), les particules fluorescentes acquises par ce microscope possèdent la même asymétrie. Nous proposons dans la première section une méthode de détection de points d'intérêt adaptée à ce cadre [Dusch *et al.*, 2007b]. Afin de mettre en place un score, grâce à un calcul de la courbure locale, permettant de discriminer les taches fluorescentes asymétriques du fond provenant de l'autofluorescence, nous utilisons l'approximation gaussienne de la PSF du MCL présentée dans la première partie (cf. section 3.4). Par la suite, nous utiliserons une modélisation statistique prenant en compte le bruit de photons et les bruits électroniques afin d'estimer par maximum de vraisemblance les positions sous-voxelliques des particules fluorescentes. Dans ce cadre, nous comparons la précision d'estimation obtenue à l'aide de notre modèle analytique à celle obtenue par l'approximation gaussienne.

La méthode de détection n'étant pas adaptée à l'estimation du nombre de particules fluorescentes dans des amas de taches fluorescentes, nous présentons ensuite nos travaux sur la détection de particules séparées par une distance inférieure au critère de Rayleigh, basée sur la vraisemblance pénalisée.

La validation de ces travaux réalisée sur des images simulées est présentée dans la deuxième section. Nous utilisons alors la PSF expérimentale présentée dans la section 3.3.1.

3.1 Détection de particules fluorescentes

Dans cette section, nous décrivons notre algorithme de détection de particules fluorescentes, dans le cadre de l'utilisation d'un microscope à balayage par ligne. Nous avons vu dans la première partie que la réponse impulsionnelle de ce microscope peut être caractérisée par une fonction asymétrique. Les taches fluorescentes produites par cette PSF peuvent alors être aussi considérées asymétriques. Nous proposons une méthode de détection basée sur la courbure locale adaptée à ce cadre. Nous introduisons ensuite, à l'aide d'une modélisation statistique de la formation de l'image, l'estimation des positions de particules par le maximum de vraisemblance. Finalement, nous introduisons les critères de vraisemblance pénalisée utilisés afin d'estimer le nombre de particules dans un amas.

3.1.1 Détection de particules par courbure locale

Cet algorithme est composé de quatre principales étapes successives que nous détaillerons par la suite. Ces étapes sont :

1. un filtrage gaussien permettant de discriminer les taches fluorescentes,
2. un calcul de courbure sur l'image filtrée,
3. un seuillage sur la courbure afin de discriminer les taches du fond,
4. et une recherche des maxima locaux pour extraire les centres des taches.

Filtrage gaussien

La réponse d'un détecteur de points d'intérêt basé sur la courbure est liée au masque gaussien utilisé pour filtrer l'image. En plus de réduire le bruit, le filtrage permet une première discrimination entre le fond et les taches. Dans notre cadre, les taches fluorescentes étant décrites par la PSF du microscope, l'approximation analytique de la PSF nous permet de mettre en place un filtrage adaptatif. Nous utilisons pour cela l'approximation gaussienne de la PSF analytique du microscope MCL, présentée dans la section 3.4.

Après un filtrage gaussien d'écart-type fixé par l'approximation de la PSF analytique, nous calculons en chaque voxel de l'image la courbure locale.

Courbure locale

Dans le cas d'un calcul de courbure en un point de l'image, on peut calculer directement les courbures gaussiennes et moyennes à partir de la matrice hessienne déterminée en chaque voxel de l'image filtrée. Soit $I_\sigma(x, y, z)$ la fonction de niveaux de gris de l'image filtrée par le masque gaussien d'écart-type σ . Soit H la matrice hessienne en point de coordonnées x, y, z de cette image :

$$\mathbf{H} = \begin{pmatrix} \frac{\partial I_\sigma^2(x,y,z)}{\partial x \partial x} & \frac{\partial I_\sigma^2(x,y,z)}{\partial x \partial y} & \frac{\partial I_\sigma^2(x,y,z)}{\partial x \partial z} \\ \frac{\partial I_\sigma^2(x,y,z)}{\partial x \partial y} & \frac{\partial I_\sigma^2(x,y,z)}{\partial y \partial y} & \frac{\partial I_\sigma^2(x,y,z)}{\partial y \partial z} \\ \frac{\partial I_\sigma^2(x,y,z)}{\partial x \partial z} & \frac{\partial I_\sigma^2(x,y,z)}{\partial y \partial z} & \frac{\partial I_\sigma^2(x,y,z)}{\partial z \partial z} \end{pmatrix}.$$

On appelle courbure moyenne C_m la moyenne des valeurs propres γ de la matrice hessienne, soit

$$C_m = \frac{\gamma_1 + \gamma_2 + \gamma_3}{3}.$$

La courbure gaussienne C_g est obtenue par le produit des valeurs propres, soit :

$$C_g = \gamma_1 \gamma_2 \gamma_3$$

Les valeurs propres permettent de classer les surfaces locales. La courbure gaussienne est bien adaptée pour discriminer les taches isotropes. En effet, dans ce cadre, les valeurs propres sont importantes dans chaque direction. La réponse de ce détecteur sera donc élevée pour ce type de taches et faible sur le reste de l'image.

Les taches fluorescentes acquises par un microscope MCL étant anisotropes, la valeur propre suivant la direction de la fente sera élevée comparativement aux valeurs propres suivant les autres directions. La multiplication de ces valeurs propres, donnée par la courbure gaussienne, a tendance à baisser le score de courbure et donc ne permet pas une bonne discrimination des particules et du fond. Nous utilisons alors la courbure moyenne afin de mettre en place un score de détection de ces particules. Les taches

fluorescentes seront caractérisées par un score négatif élevé tandis que le bruit et le fond fluorescent posséderont un score proche de zéro.

En pratique, les dérivées de l'image se calculent de manière discrète, soit par différence finie, soit par convolution avec les dérivées du filtre gaussien. Pour sa simplicité et son temps de calcul faible, nous avons choisi de déterminer les gradients de l'image filtrée par différence finie, c'est à dire :

$$\frac{\partial I_{\sigma}}{\partial x}(x, y, z) = \frac{I(x+1, y, z) - I(x-1, y, z)}{2h},$$

h permettant de compenser la différence d'échantillonnage entre les dimensions. L'échantillonnage étant similaire dans les dimensions x et y , le paramètre h est unitaire lors du calcul des gradients dans ces directions. Suivant la direction z , h est égal au rapport :

$$h = \frac{\Delta_x}{\Delta_z}, \quad (3.1)$$

où Δ_x , et respectivement Δ_z , désigne la largeur d'un pixel suivant la direction x , et respectivement z . Les dérivées secondes sont ensuite obtenues par :

$$\frac{\partial^2 I_{\sigma}}{\partial x^2}(x, y, z) = \frac{\partial I}{\partial x}(x+1, y, z) - \frac{\partial I}{\partial x}(x-1, y, z).$$

Algorithme d'Otsu

La méthode de classification d'Otsu permet de déterminer un seuil entre deux classes en minimisant la variance intra-classe pondérée, équivalent à maximiser la variance interclasse. Cette méthode est opérée directement sur l'histogramme des courbures. Cet histogramme est composé deux classes séparées : une première classe proche de zéro correspondant aux perturbations et une deuxième classe correspondant aux taches fluorescentes. Dans ce cadre, il est alors possible de trouver un seuil minimisant la variance intraclasse pondérée. Cette variance est donnée par :

$$\sigma_w^2(s) = q_1(s)\sigma_1^2(s) + q_2(s)\sigma_2^2(s)$$

où s détermine le niveau de gris correspondant au seuil, q_1 et q_2 le poids des classes 1 et 2, et σ_1 et σ_2 la variance de ces classes. Soit $N(i)$ un niveau de gris de l'histogramme, les poids q_1 et q_2 sont :

$$\begin{cases} q_1(s) &= \sum_{i=1}^s N(i), \\ q_2(s) &= \sum_{i=s+1}^N N(i), \end{cases}$$

où N est le nombre de niveaux de gris de l'histogramme. Il est possible d'accélérer le calcul du seuil en discrétisant l'histogramme à 256 pas. Les variances et moyennes de chaque classe sont :

$$\begin{cases} \mu_1(s) &= \frac{\sum_{i=1}^s iN(i)}{q_1(s)}, \\ \mu_2(s) &= \frac{\sum_{i=s+1}^N iN(i)}{q_2(s)}, \\ \sigma_1(s) &= \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^s [i - \mu_1(s)]^2 N(i)}{q_1(s)}}, \\ \sigma_2(s) &= \sqrt{\frac{\sum_{i=s+1}^N [i - \mu_2(s)]^2 N(i)}{q_2(s)}}. \end{cases}$$

Maxima locaux

La dernière étape de l'algorithme de détection réalise une recherche des maxima locaux sur l'image de courbure seuillée. Les lobes secondaires de la PSF du microscope MCL étant importants suivant la direction de la ligne, la distance minimale entre les maxima doit être choisie assez grande afin d'éviter la détection de ces maxima locaux, ainsi que les fausses détections dues au bruit. Nous avons donc fixé empiriquement la taille de la fenêtre à 3σ suivant chaque direction.

La figure 3.1 présente une image 3D de billes fluorescentes projetée en 2D selon l'axe z . La projection utilisée est une projection de type maximum. À chaque pixel de l'image projetée, on affecte l'intensité maximale suivant la direction z . Cette projection donne des résultats visuelles satisfaisantes. De ce fait, nous l'utilisons dans le reste du document afin de visualiser des images 3D. On montre dans cette figure, le résultat de la détection projeté avec une fenêtre de recherche égale à 2σ et à 3σ . On remarque que lorsque la distance entre les maxima décroît, l'algorithme permet de détecter des taches superposées mais détecte aussi un lobe secondaire d'une des taches.

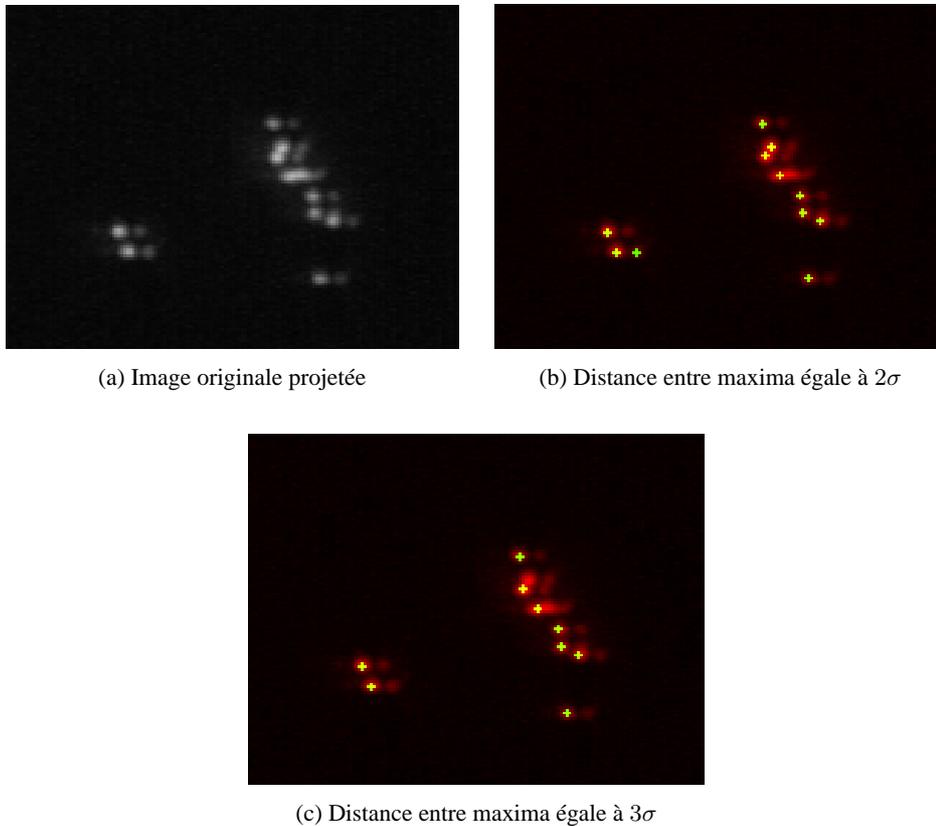


FIG. 3.1 – Effet de la taille de la fenêtre de recherche des maxima locaux. La figure montre le résultat de notre algorithme de détection sur image de billes fluorescentes (a) avec une taille de fenêtre de recherche des maxima locaux fixée à 2σ (b) et à 3σ dans chaque direction. On remarque que lorsque la distance entre les maxima décroît, l'algorithme détecte un lobe secondaire d'une des taches.

3.1.2 Estimation sous-voxellique des centres

Pour chaque maximum local détecté par la méthode précédemment décrite, nous extrayons une fenêtre g de taille constante dont les dimensions permettent d'englober la tache fluorescente. Ces dimensions sont fixées empiriquement et sont typiquement de l'ordre de 4σ . Nous appliquons sur chacune de

ces fenêtres un ajustement de la modélisation analytique de la PSF. Pour cela, nous supposons que la formation de l'image contenue en g peut être décrite comme un processus stochastique discret. Nous estimons la position d'une particule, donnée par $\{x_c, y_c, z_c\}$, en maximisant la vraisemblance que le modèle considéré est produit g .

Reprenons l'équation (cf. section 1.1.4) décrivant la formation de l'image avec une seule particule :

$$g(\mathbf{x}) = P (ah(\mathbf{x} - \mathbf{x}_c) + b(\mathbf{x})) + \eta_\sigma(\mathbf{x}). \quad (3.2)$$

Nous considérons alors les intensités g_1, \dots, g_N de la fenêtre comme les réalisations d'un processus stochastique \mathcal{G} . Une réalisation de ce processus est décrit par :

$$g_{\theta,k} = s_{\theta,k} + b_k + w,$$

où $k = 1..N$ et $s_{\theta,k}$, b_k et w sont des variables aléatoires mutuellement indépendantes. La variable aléatoire $s_{\theta,k}$ suit une loi de Poisson de moyenne $\mu_{\theta,k}$ égale à $ah(\mathbf{x}_k - \mathbf{x}_c)$, et décrit le nombre de photons enregistré au voxel k provenant de la particule fluorescente. La variable aléatoire b_k décrit le nombre de photons enregistré au voxel k provenant du fond fluorescent et suit une loi de Poisson de moyenne b . La somme des variables aléatoires $s_{\theta,k}$ et b_k suit donc une loi de Poisson de moyenne $\mu_{\theta,k} + b_k$. Finalement, la variable w désigne un bruit blanc gaussien de moyenne μ et d'écart-type σ , caractérisant le bruit électronique. L'ensemble θ des paramètres à estimer comprend $\{a, \mathbf{x}\}$, avec a l'intensité d'une particule et \mathbf{x} sa position.

Basé sur le théorème (3.1.1), la distribution de la variable aléatoire $g_{\theta,k}$ est donnée par :

$$p_{\theta}(g_k) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \sum_{l=0}^{\infty} \frac{(\mu_{\theta,k} + b_k)^l e^{-\mu_{\theta,k} - b_k}}{l!} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{g_k - l - \mu}{\sigma} \right)^2}.$$

Théorème 3.1.1 Si X et Y sont deux variables aléatoires discrètes, la densité de probabilité $T=U+V$ est :

$$p(T = t) = \sum_{x \in \mathbb{Z}} p(U = x) p(V = t - x).$$

Afin de simplifier cette densité de probabilité, nous supposons dans notre méthode que l'intensité des taches est suffisamment élevée pour modéliser le bruit de photons par une distribution gaussienne de moyenne $\mu_{\theta,k}$ et de variance $\mu_{\theta,k}$. Comparativement à un microscope à balayage par point, l'intensité lumineuse enregistrée par le détecteur du microscope MCL, est relativement élevée du fait de l'illumination en ligne. De ce fait, cette simplification est acceptable dans notre cadre. De plus, nous supposons que la contribution du fond fluorescent sur la fenêtre g est négligeable devant les autres perturbations.

La distribution de la variable aléatoire $g_{\theta,k}$ devient alors :

$$p_{\theta}(g_k) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sqrt{\mu_{\theta,k} + \sigma^2}} e^{-\frac{1}{2} \frac{(g_k - \mu_{\theta,k})^2}{\mu_{\theta,k} + \sigma^2}}.$$

Soit $L(\theta; \mathcal{G})$ une mesure de la vraisemblance que l'ensemble des paramètres θ ait produit \mathcal{G} . En supposant que les réalisations $\{g_1, \dots, g_N\}$ soient indépendamment distribuées de loi p_{θ} , la fonction de log-vraisemblance $\mathcal{L}(\theta; \mathcal{G})$ est définie par :

$$\begin{aligned} \mathcal{L}(\theta, \mathcal{G}) &= \log p(g_1, \dots, g_N; \theta), \\ &= \log \prod_{k=1}^N p(g_k, \theta), \\ &= \sum_{k=1}^N -\log \left(\sqrt{2\pi} \sqrt{\mu_{\theta,k} + \sigma^2} \right) - \frac{1}{2} \frac{(g_k - \mu_{\theta,k})^2}{\mu_{\theta,k} + \sigma^2}. \end{aligned}$$

La position θ de chaque particule unique est alors estimée en maximisant le logarithme de cette vraisemblance, c'est à dire :

$$\hat{\theta} = \operatorname{argmax}_{\theta} \sum_{k=1}^N -\log \left(\sqrt{2\pi} \sqrt{\mu_{\theta,k} + \sigma^2} \right) - \frac{1}{2} \frac{(g_k - \mu_{\theta,k})^2}{\mu_{\theta,k} + \sigma^2}.$$

Cette maximisation est réalisée numériquement par l'algorithme des gradients-conjugués de Polak-Ribiere [Polak, 1971].

Nous supposons dans ce contexte que les paramètres du bruit gaussien sont connus. Afin de les estimer, nous réalisons des acquisitions d'images noires sur le microscope MCL. Ces acquisitions nous permettent d'obtenir une estimation de la moyenne et de la variance du courant d'obscurité.

Lors de la validation de cet algorithme, nous discuterons sur le modèle analytique de la PSF à utiliser dans ce cadre. Nous comparons alors notre modèle analytique et son approximation gaussienne.

3.1.3 Estimation du nombre de particules dans un amas

Afin d'estimer le nombre de particules fluorescentes dans un amas, nous utilisons la modélisation statistique présentée dans le paragraphe 3.1.2 et nous mettons en place un algorithme de détection sous-résolution basé sur un critère de vraisemblance pénalisée.

Dans cet algorithme, nous cherchons à sélectionner parmi un ensemble de modèles celui décrivant le mieux les données sur la fenêtre g . L'ensemble des modèles \mathcal{M} pouvant décrire les données sur g , est égal à :

$$\mathcal{M} = \left\{ \sum_{i=1}^n a_i h(x - x_i, y - y_i, z - z_i), n = n_{min}, \dots, n_{max} \right\},$$

où n est le nombre de particules intervenant dans la formation de g . h correspond au modèle analytique de la PSF du microscope MCL. Les paramètres $\{a_{1..n}, x_{1..n}, y_{1..n}, z_{1..n}\}$, correspondant aux intensités et positions des particules, sont inconnus mais déterministes : aucune connaissance *a priori* n'étant disponible sur ces paramètres, nous supposons qu'ils ne sont pas décrit par une densité de probabilité. Ces paramètres seront désignés, par la suite, par θ_n .

La distribution de la variable aléatoire $g_{\theta_n,k}$ devient alors :

$$p_{\theta_n}(g_k) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sqrt{\mu_{\theta_n,k} + \sigma^2}} e^{-\frac{1}{2} \frac{(g_k - \mu_{\theta_n,k})^2}{\mu_{\theta_n,k} + \sigma^2}}.$$

Nous sélectionnons le modèle parmi M représentant les intensités g_1, \dots, g_N en utilisant un critère de vraisemblance pénalisée. Le nombre de particules estimé \hat{n} sur la fenêtre est obtenu par :

$$\hat{n} = \operatorname{argmin}_n \left\{ -\mathcal{L}(\hat{\theta}_n, \mathcal{G}) + \mathcal{F}(n), n = n_{min}, \dots, n_{max} \right\},$$

où $\hat{\theta}_n$ correspond à l'ensemble des paramètres estimés par le maximum de vraisemblance pour le modèle à n particules.

Plusieurs critères ont été proposés afin de définir la fonction $\mathcal{F}(n)$, pénalisant la vraisemblance pour les hautes valeurs de n . Dans nos travaux, nous avons sélectionné quelques uns de ces critères afin de comparer leurs performances. L'information de Kublack-Lieber quantifie l'information perdue lorsqu'un modèle est utilisé pour approcher les données. Akaike [Akaike, 1974] a montré qu'un critère de sélection de modèle pouvait être obtenue en estimant l'espérance de l'information de Kublack-Lieber. En utilisant une approximation asymptotique, le critère d'information d'Akaike (AIC) est égal à :

$$\mathcal{F}(n)_{AIC} = r_n.$$

où r_n , égal à $4 * n$, est le nombre de paramètre à estimer avec le modèle à n réponse impulsionnelle. Plusieurs modifications de ce critère ont été proposés par la suite (voir [Gheissari et Bab-Hadiashar, 2003, Stoica et Selén, 2004] pour une présentation de ces modifications). Afin de compenser la tendance du critère AIC à sélectionner le modèle le plus complexe parmi M , le critère CAIC a été introduit par [Bozdogan, 1987]. Un facteur de compensation basé sur la taille N des données est introduit, c'est à dire :

$$\mathcal{F}(n)_{\text{CAIC}} = r_n(\log N + 1).$$

Nous avons choisi d'utiliser ce critère dans notre comparaison afin de mieux prendre en compte la taille de la fenêtre d'ajustement.

Le critère BIC se place dans un cadre bayésien et cherche à sélectionner le modèle M_i qui maximise la probabilité *a posteriori* $P(M_i|\mathcal{G})$, égale à :

$$P(M_i|\mathcal{G}) = \frac{P(\mathcal{G}|M_i)P(M_i)}{P(\mathcal{G})}.$$

En utilisant une distribution *a priori* $P(M_i)$ non informative et plusieurs approximations asymptotiques (voir [Lebarbier et Mary-Huard, 2004]), le modèle sélectionné par ce critère est donné par :

$$\mathcal{F}(n)_{\text{BIC}} = n \log N$$

Le critère de longueur minimale (MDL) sélectionne le modèle donnant la plus petite description des données. Ce critère est donné sous une forme équivalente au critère BIC. Dans ce cadre, le critère SSD sélectionne le modèle minimisant la représentation en bit des données [Gheissari et Bab-Hadiashar, 2003]. Ce critère est donné par :

$$\mathcal{F}(n)_{\text{SSD}} = r_n \log((N + 2)/24) + 2 \log(r_n + 1).$$

De façon similaire à l'estimation des centres, nous comparons dans ce cadre notre modèle analytique et son approximation gaussienne lors de la validation.

3.2 Validation

La validation de ces algorithmes est réalisée sur des images simulées. Nous utilisons alors la PSF expérimentale afin de modéliser la PSF du MCL.

3.2.1 Algorithme de détection par courbure locale

Afin de valider l'étape de détection par courbure locale, nous réalisons une simulation de plusieurs images contenant un fond fluorescent d'intensité inhomogène et plusieurs points sources séparés par une distance supérieure au critère de Rayleigh. La simulation de ces images est réalisée en plusieurs étapes :

1. création de points sources d'intensité a . La distance entre chaque point source est supérieure au critère de Rayleigh,
2. convolution de ces points sources par notre modèle expérimental de la PSF du microscope MCL,
3. création d'un fond fluorescent d'intensité maximum b et ajout de ce fond à l'image précédente,
4. dégradation de l'image par un bruit de Poisson,
5. ajout d'un bruit gaussien de moyenne nulle et d'écart-type σ fixé à 2.5.

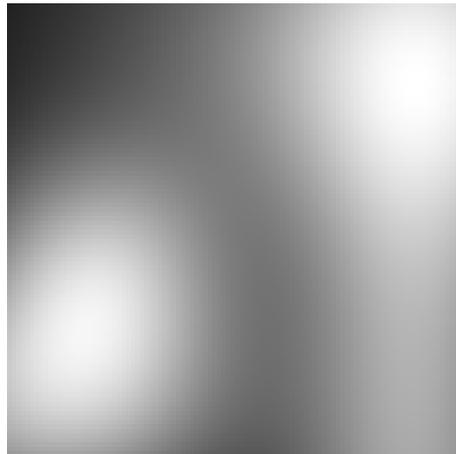


FIG. 3.2 – Exemple de fond fluorescent 2D.

Nous faisons varier l'intensité a des points sources et l'intensité maximum b du fond fluorescent. Afin d'obtenir une modélisation aléatoire et lisse du fond fluorescent, nous le créons par la superposition de plusieurs gaussiennes d'écart-types variables et de positions variables. La figure 3.2 montre un exemple de fond fluorescent en 2D. L'intensité du fond fluorescent est proportionnelle à l'intensité des points sources, le maximum b d'intensité du fond varie alors de $0.2a$ à $0.8a$. Nous supposons que le bruit gaussien dû à l'agitation des électrons dans le détecteur varie peu entre les expériences biologiques. De ce fait, nous fixons l'écart-type de ce bruit à une valeur typique rencontrée dans les images fluorescentes.

La validation est réalisée sur 20 images simulées pour chaque niveau d'intensité et fond fluorescent, contenant 10 points sources séparés. Nous définissons le rapport signal sur bruit (SNR) par $\frac{\sqrt{a}}{\sigma}$. Nous calculons alors le ratio de vrais positifs et le nombre moyen de faux positifs, pour différentes valeurs de SNR et de fond fluorescent b , présentés sur le tableau 3.1. Les résultats obtenus sur nos simulations montrent que notre algorithme réalise une détection satisfaisante jusqu'à un SNR égal 5 et une intensité de fond égale à 60% de l'intensité des taches.

La figure 3.3 montre le résultat de notre algorithme suivant différentes intensités de taches et de fond. Nous montrons un plan 2D (a, d, g), le résultat sur ce plan (b, e, h) et la projection maximum de tous les plans de l'image résultat (c, f, i).

Image naturelle

La figure 3.4 montre le résultat sur une image 3D de télomères au sein d'un noyau de parasite. Cette image a été acquise sur le microscope LSM 5 *live* de Zeiss par le groupe System Biology of Pathogens (Institut Pasteur Korea). Les conditions d'acquisitions sont : 1,4 pour l'ouverture numérique, 1 UA pour la taille de la fente. La taille des voxels est fixée à $0.05\mu m$ sur le plan x et y et $0.1\mu m$ en z , ces dimensions respectant le critère de Nyquist.

La figure présente un plan 2D (a) de l'image biologique, le résultat sur ce plan (b), la projection maximum tous les plans (c) et (d) la projection avec le résultat de la détection.

3.2.2 Estimation sous-voxelique des centres

Nous réalisons dans cette section l'estimation des centres sur des images de particules fluorescentes simulées à l'aide de la PSF expérimentale. De façon similaire à la validation de l'algorithme de détection par courbure locale, nous perturbons le point source convolué à la PSF expérimentale par un bruit de

SNR \ b	0.2a	0.4a	0.6a	0.8a
20	1	1	1	0.92
15	1	1	1	0.90
10	1	1	1	0.88
7	1	1	1	0.80
5	1	1	0.91	0.66
3	1	0.56	0.28	0.26

(a) Ratio de vrais positifs.

SNR \ b	0.2a	0.4a	0.6a	0.8a
20	0	0	0	0
15	0	0	0	0
10	0	0	0	0.85
7	0	0	0	5.38
5	0	0	4	9.58
3	0.1	12	13.68	14.43

(b) Nombre moyen de faux positifs.

TAB. 3.1 – Résultats de la détection par courbure locale. Le tableau (a) présente le ratio de vrai positifs et le tableau (b) le nombre moyen de faux positifs, pour différentes valeurs a d'intensité et de fond.

Poisson, puis nous ajoutons un bruit gaussien de moyenne nulle et d'écart-type fixé à 2, 5. Nous faisons varier le SNR en modifiant l'intensité a du point source. Nous supposons cependant dans ce cadre que l'image du point source ne possède aucun fond fluorescent.

Nous étudions alors les erreurs d'estimation induites par notre approximation analytique de la PSF et celles induites par son approximation gaussienne. Pour cela, nous calculons l'erreur absolue entre la localisation estimée et la localisation réelle suivant chaque direction et l'erreur totale, donnée par $\|\hat{\mathbf{x}}_c - \mathbf{x}_c\|_2$. Ces erreurs sont calculées sur 50 images simulées. L'initialisation du centre de la tache dans l'algorithme d'optimisation est donnée par le résultat de notre algorithme de détection. L'intensité est donnée par le niveau de gris enregistré au voxel détecté.

La figure 3.5 présente l'évolution de l'erreur (en nanomètre) en fonction du rapport signal sur bruit avec notre approximation analytique (en ligne bleu pleine) et son approximation gaussienne (en ligne rouge pointillée). Nous présentons l'erreur de localisation suivant l'axe de la ligne d'illumination (a), suivant l'axe de la fente (b), suivant l'axe optique (c) et l'erreur totale (d).

Nous remarquons sur ce dernier schéma que notre approximation analytique permet une meilleure estimation que son approximation gaussienne, et cela jusqu'à un SNR égale à 5. Cependant, les résultats obtenus grâce à l'approximation gaussienne varient peu suivant le SNR, tandis que l'erreur réalisée avec l'approximation analytique augmente avec la baisse du SNR. La stabilité de l'erreur avec l'approximation gaussienne peut être expliquée par le fait que lorsque le SNR décroît, les lobes secondaires de la PSF ne sont plus distinguables du bruit. L'approximation gaussienne peut permettre alors une meilleure modélisation que l'approximation analytique à de faibles SNR.

Pour les deux approximations, l'erreur de localisation est plus faible suivant l'axe de la fente. Dans ce cadre, l'approximation gaussienne réalise une estimation de la position en y proche de zéro. Ce résultat rejoint les résultats obtenus dans la section 3.4. Les lobes secondaires étant très faibles dans la direction de la fente, l'approximation gaussienne permet alors une modélisation satisfaisante.

Suivant l'axe de la ligne, l'erreur de localisation réalisée par l'approximation analytique est proche de 5 nm jusqu'à un SNR égale à 3 tandis que l'erreur avec l'approximation gaussienne est proche de 10

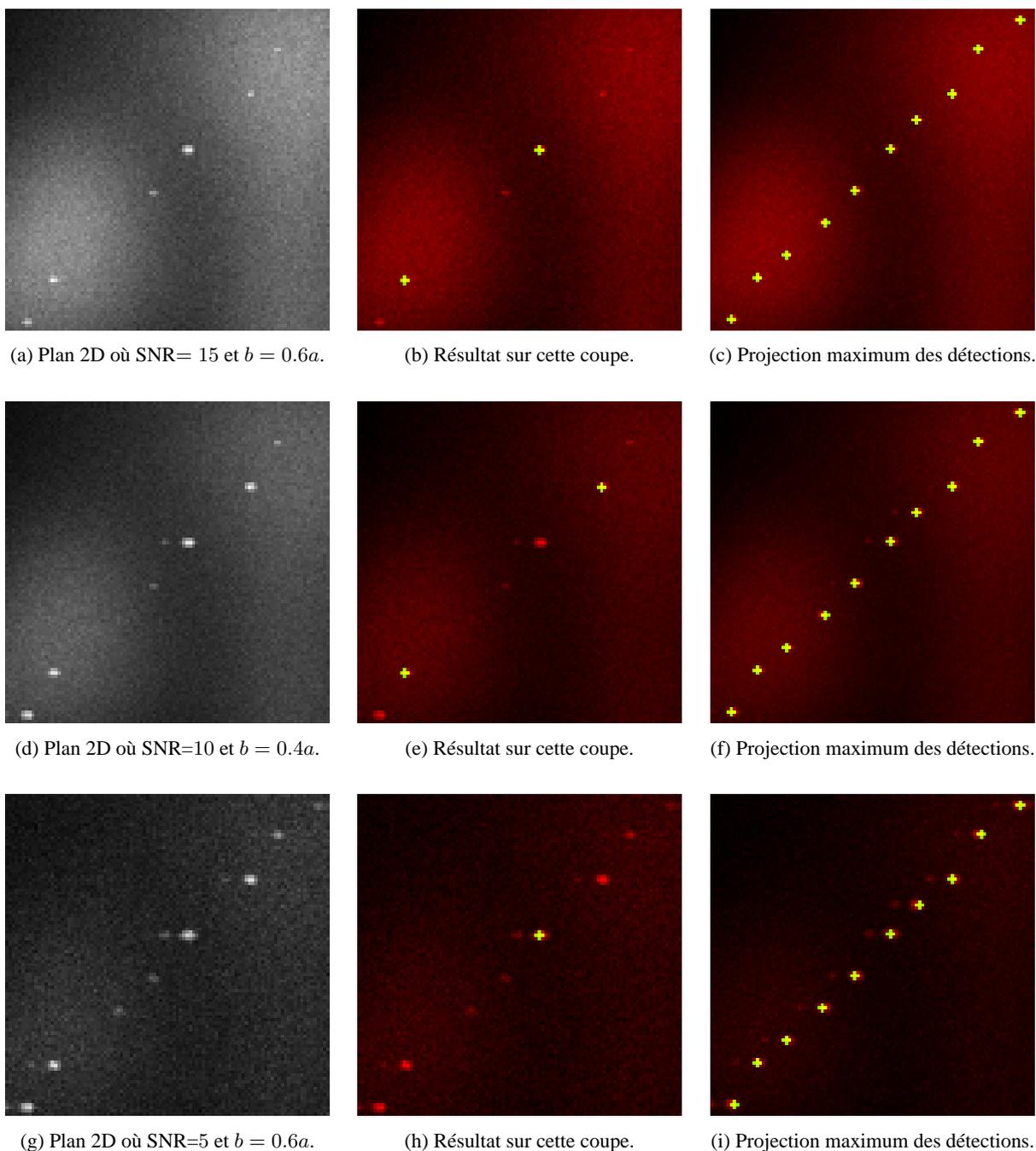


FIG. 3.3 – Résultats de la détection par courbure locale sur une image 3D simulée. Pour différentes valeurs de SNR et de fond, la figure présente un plan 2D (a, d, g) de l'image, le résultat de la détection sur ce plan (b, e, h) et une projection maximum de tous les plans du résultat de la détection en 3D (c, f, i).

nm.

Finalement, l'erreur de localisation suivant l'axe z avec notre modèle analytique est proche de 7 nm jusqu'à un SNR égal à 5. L'erreur de localisation avec l'approximation gaussienne est relativement élevée (autour de 25 nm).

Ces résultats rejoignent les résultats obtenus lors d'études similaires sur d'autres microscopes (cf. section 2.2). En effet, on remarque qu'une meilleure localisation peut être réalisée en augmentant le

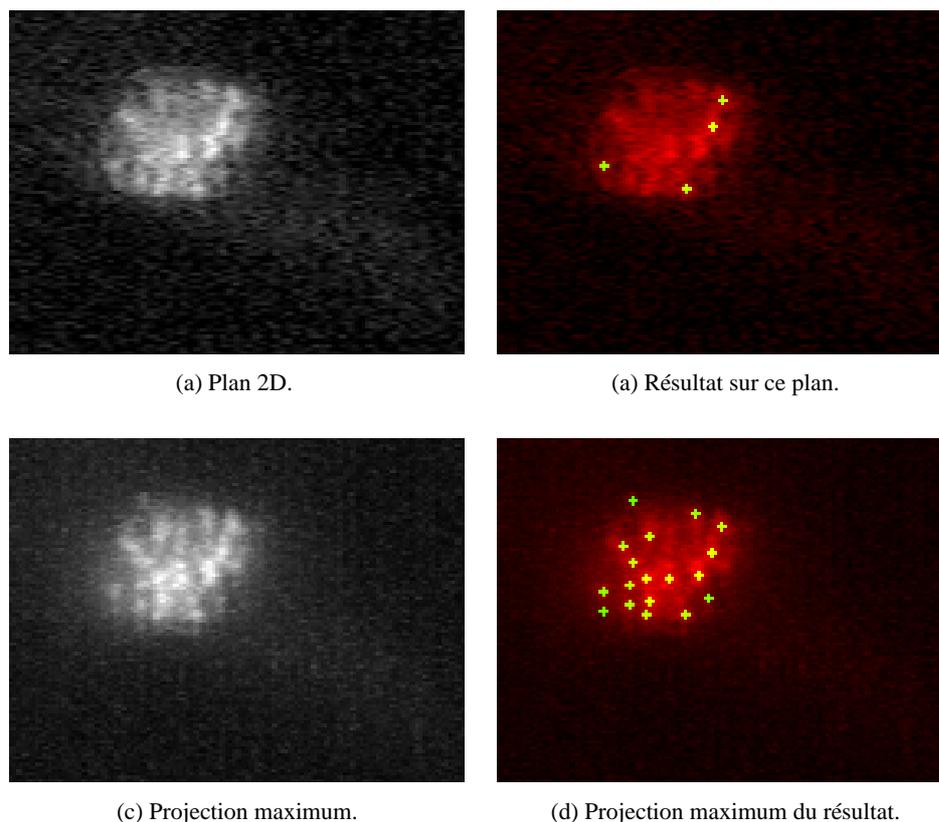


FIG. 3.4 – Résultats de la détection par courbure locale sur image 3D de télomères. La figure présente un plan 2D (a) de l’image biologique, le résultat sur ce plan (b), la projection maximum de l’image (c) et la projection maximum avec le résultat de la détection (d).

nombre de photons enregistré. De plus, l’erreur de localisation suivant l’axe optique est plus importante que dans les autres directions.

Lors de l’estimation avec notre modèle analytique, l’erreur de localisation suivant l’axe x et suivant l’axe z peut être expliquée par les aberrations présentes dans le modèle expérimentale.

3.2.3 Estimation du nombre de particules fluorescentes dans un amas

Dans cette section, nous étudions la faisabilité d’estimer le nombre de particules dans un amas en utilisant un critère de vraisemblance pénalisée ainsi que les erreurs induites par les approximations de la PSF.

Dans le premier paragraphe de cette validation, nous comparons les critères de vraisemblance pénalisée dans le cadre où la PSF est parfaitement connue. Dans le deuxième paragraphe, nous utilisons notre vérité terrain de la PSF du MCL, donné par le modèle expérimentale, afin de simuler un amas de taches fluorescentes. Nous ajustons alors notre modèle analytique et son approximation gaussienne à ces données.

Comparaison des critères de vraisemblance pénalisée

En plus de comparer les critères de vraisemblance pénalisée que nous avons sélectionné, nous réalisons le test de Fisher présenté dans la section 2.3.2.0 pour chacun des ajustements. Nous avons alors fixé l’erreur de première espèce à 5%. Nous réalisons notre validation pour différents SNR suivant deux

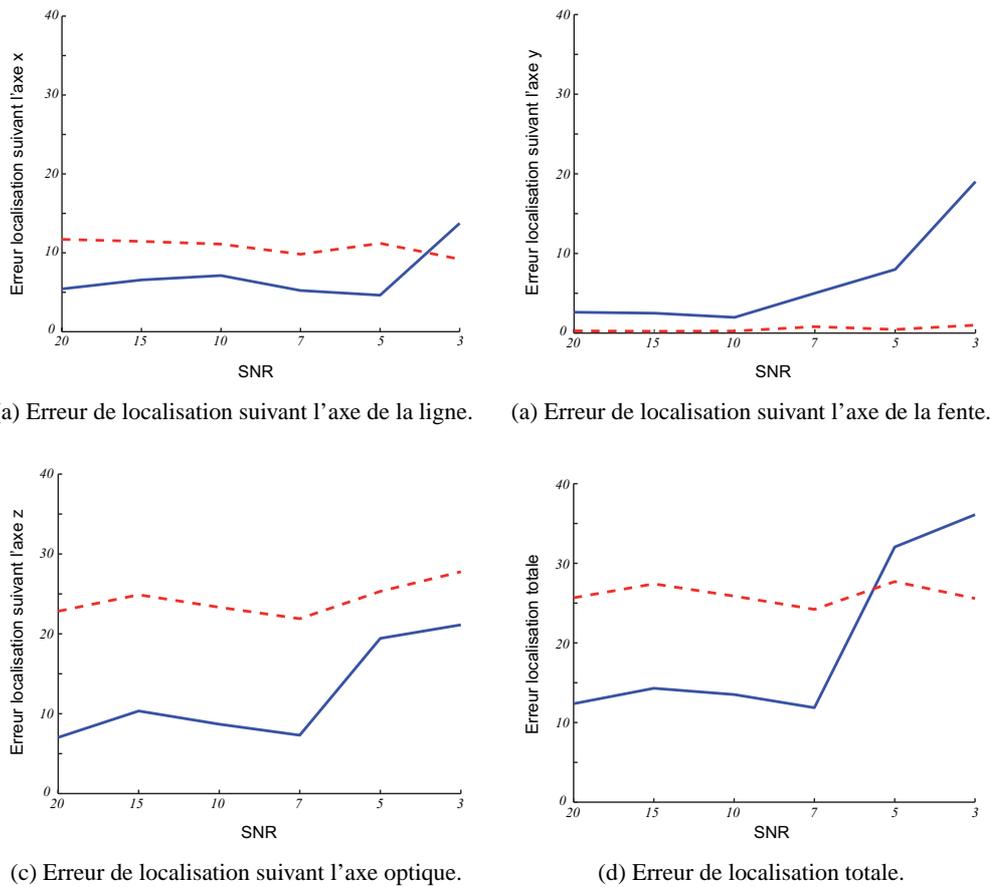


FIG. 3.5 – Erreur d'estimation des centres en fonction du rapport signal sur bruit. La courbe pleine bleu présente l'erreur de localisation réalisée par notre modèle analytique et la courbe rouge pointillée l'erreur réalisée par son approximation gaussienne. Nous présentons l'erreur de localisation suivant l'axe x (a), suivant l'axe y (b), suivant l'axe z (c) et l'erreur totale (d).

cas : (i) une image contenant une tache produite par une PSF gaussienne et (ii) une autre contenant deux taches de mêmes intensités. Pour le deuxième cas, nous faisons varier la distance entre les points sources suivant l'axe x . Les distances, inférieures au critère de Rayleigh, varient de $0.2\mu m$ à $0.05\mu m$. Pour ces deux cas, nous ajustons trois modèles composés d'une, deux ou trois taches et nous sélectionnons le modèle minimisant le critère de vraisemblance pénalisée. Pour le test de Fisher, nous réalisons un test entre un modèle contenant une tache et un modèle en contenant deux, et ensuite un test entre le modèle à deux taches et trois taches. Les valeurs initiales des centres et des intensités de chaque PSF sont données par le résultat de notre algorithme de détection par courbure locale. Les fonctions analytiques de la PSF sont alors positionnées sur le même voxel et possèdent la même intensité.

Le tableau 3.2 présente les résultats de l'estimation lorsqu'une seule tache est présente. Nous testons dans ce cadre des modèles à une seule PSF contre les modèles avec deux PSF et trois PSF. Nous calculons pour différent SNR le ratio entre le nombre de fois où les critères de vraisemblance pénalisée ont estimé correctement le nombre de particules, et le nombre d'images testées. Nous trouvons des résultats similaires pour chacun des critères. Ces méthodes permettent d'estimer correctement le nombre de particules jusqu'à un SNR égale à 3.

Nous présentons sur le tableau 3.3 les résultats de l'estimation lorsque deux taches sont présentes.

SNR\Critères	Test	BIC	CAIC	SSD
20	0.97	1	1	1
15	0.99	1	1	1
10	0.97	1	1	1
7	1	1	1	1
5	0.96	0.96	0.99	0.96
3	0	0	0	0

TAB. 3.2 – Résultats de l'estimation du nombre de particules lorsqu'une seule tache est présente. Dans ce cadre, la PSF ayant produit la tache simulée est parfaitement connue. Le tableau présente le ratio moyen de bonne estimation suivant différents critères et différents SNR. L'erreur de première espèce pour le test est fixée à 0.05.

Distance (en μm)	SNR	Test	BIC	CAIC	SSD
0.2	20	0.78	0.78	0.78	0.78
	15	0.81	0.81	0.81	0.81
	10	0.83	0.83	0.83	0.83
	7	0.73	0.75	0.75	0.73
	5	0.65	0.68	0.65	0.675
	3	0.05	0.05	0.05	0.05
0.15	20	0.76	0.76	0.76	0.76
	15	0.66	0.72	0.72	0.72
	10	0.71	0.71	0.71	0.71
	7	0.76	0.76	0.79	0.76
	5	0.61	0.61	0.68	0.68
	3	0.24	0.24	0.24	0.24
0.1	20	0.61	0.61	0.61	0.61
	15	0.42	0.42	0.39	0.42
	10	0.54	0.54	0.54	0.54
	7	0.68	0.65	0.65	0.65
	5	0.60	0.57	0.57	0.60
	3	0.11	0.11	0.11	0.11
0.05	20	0	0	0	0
	15	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	7	0.05	0.05	0.03	0.05
	5	0.03	0.03	0.03	0.03
	3	0.21	0.21	0.21	0.22

TAB. 3.3 – Résultats de l'estimation du nombre de particules dans un amas composé de deux taches, pour une PSF connue. Le tableau présente le ratio moyen de bonne estimation suivant différents critères, différents SNR et différentes distances. La distance entre les taches est donnée en μm et l'erreur de première espèce pour le test est fixé à 0.05.

Nous pouvons remarquer que tous les critères ainsi que le test de Fisher obtiennent des résultats équivalents pour l'ensemble des distances et SNR. Ces critères obtiennent un taux de détection proche de 80% pour les images possédant un SNR supérieur à 5 et pour une distance supérieure à $0.10\mu m$.

En dessous de cette distance, les taux de bonne estimation tombent en dessous de 50%. La superposition des lobes principaux des PSF devenant importante à partir de cette distance, l'initialisation de l'algorithme ne correspond plus à la réalité. L'initialisation est alors trop éloignée de la véritable valeur

pour permettre une bonne estimation. En effet, l'intensité de chaque tache sur nos simulations n'est plus égale au niveau de gris enregistré au voxel détecté. Ces intensités sont alors proches de la moitié de ce niveau de gris. Nous avons alors testé notre algorithme en initialisant les intensités à la moitié de l'intensité détectée. Notre algorithme réalise une meilleure estimation lorsque la distance est inférieure à $10\mu m$ mais ne permet plus d'estimer le nombre de particules correctement lorsque la distance est plus élevée.

Comparaison entre notre modélisation analytique et son approximation gaussienne

Dans ce paragraphe, nous comparons notre modèle analytique et son approximation gaussienne afin de quantifier les erreurs induites par une mauvaise approximation de la PSF. Nous simulons des amas composés d'une ou deux taches à l'aide de la PSF expérimentale du microscope MCL.

SNR\Critères	Test	BIC	CAIC	SSD
20	1	1	1	1
15	1	1	1	1
10	1	1	1	1
7	0.62	0.62	0.69	0.69
5	0.24	0.24	0.24	0.24
3	0	0	0	0

(a) Ratio de bonne estimation avec notre approximation analytique.

SNR\Critères	Test	BIC	CAIC	SSD
20	0.59	0.61	0.63	0.61
15	0.41	0.39	0.45	0.41
10	0.11	0.11	0.11	0.11
7	0.06	0.06	0.06	0.06
5	0.02	0.02	0.02	0.02
3	0	0	0	0

(b) Ratio de bonne estimation avec l'approximation gaussienne.

TAB. 3.4 – Résultats de l'estimation du nombre de particules lorsqu'une seule tache est présente, avec l'approximation analytique (a) et l'approximation gaussienne (b).

Le tableau 3.4 présente les résultats de l'estimation lorsqu'une seule tache est présente. Les deux tableaux présentent le nombre moyen de bonne estimation obtenu avec (a) notre approximation analytique et avec (b) son approximation gaussienne. De façon similaire au résultat obtenu avec une PSF connue, les résultats sont équivalents pour le test de Fisher et tous les critères. L'estimation réalisée avec notre approximation analytique permet une bonne détection sur les images possédant un SNR supérieur à 7. Dans le cadre de l'approximation gaussienne, on remarque cependant que le résultat de l'estimation est faible.

Les résultats de l'estimation de deux taches avec l'approximation gaussienne, présentés dans le tableau 3.5, sont aussi faible pour chaque SNR. On remarque néanmoins que lorsque la distance entre les particules décroît, le ratio de bonne estimation augmente pour chacun des critères. Nous présentons sur le tableau 3.6 les résultats de l'estimation sur deux taches avec notre approximation analytique. On remarque que notre modèle donne des résultats proches de ceux obtenus dans le cadre où la PSF est parfaitement connue.

Distance	SNR	Test	BIC	CAIC	SSD
0.2	20	0.06	0.06	0.06	0.06
	15	0.13	0.13	0.13	0.13
	10	0.13	0.13	0.13	0.13
	7	0.25	0.25	0.25	0.25
	5	0.06	0.06	0.06	0.06
	3	0.13	0.13	0.13	0.13
0.15	20	0.06	0.06	0.06	0.06
	15	0.06	0.06	0.06	0.06
	10	0	0.06	0.06	0
	7	0.2	0.2	0.2	0.2
	5	0.06	0.06	0.06	0.06
	3	0.2	0.2	0.2	0.2
0.1	20	0.2	0.26	0.26	0.26
	15	0.07	0.14	0.14	0.14
	10	0.36	0.36	0.36	0.36
	7	0.14	0.21	0.21	0.21
	5	0.14	0.14	0.14	0.14
	3	0.14	0.14	0.14	0.14
0.05	20	0.57	0.57	0.57	0.57
	15	0.71	0.71	0.71	0.71
	10	0.43	0.43	0.43	0.43
	7	0.57	0.57	0.57	0.57
	5	0.14	0.14	0.14	0.14
	3	0.07	0.07	0.07	0.07

TAB. 3.5 – Résultats de l'estimation du nombre de particules dans un amas composé de deux taches avec l'approximation gaussienne.

3.3 conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre un algorithme de détection de taches fluorescentes acquises avec un microscope MCL composé de trois étapes : détection des taches séparés par une distance supérieure au critère de Rayleigh, estimation du centre des taches et estimation du nombre de particules dans un amas. Ces trois algorithmes pouvant être utilisés séparément suivant l'application, nous avons réalisé pour chacun une validation propre sur des images simulées.

La méthode de détection de taches séparées par une distance supérieure au critère de Rayleigh, est basée sur un calcul de la courbure locale. Nous réalisons dans ce cadre un filtrage par l'approximation gaussienne de la PSF du microscope MCL et un seuil de l'image des courbures, afin de discriminer les taches du fond fluorescent. Nous avons alors montré que cet algorithme de détection permet une bonne détection sur des images possédant un fond fluorescent d'intensité élevé et un faible rapport signal sur bruit.

Dans le cadre de l'estimation du centre, nous utilisons l'estimateur du maximum de vraisemblance sous la supposition d'un mélange de bruit gaussien. Nous avons alors comparé notre approximation analytique et son approximation gaussienne. Nous avons alors montré que notre approximation analy-

Distance (en μm)	SNR	Test	BIC	CAIC	SSD
0.2	20	0.72	0.72	0.72	0.72
	15	0.68	0.68	0.68	0.72
	10	0.64	0.64	0.66	0.63
	7	0.63	0.65	0.65	0.63
	5	0.55	0.58	0.58	0.58
	3	0.02	0.02	0.02	0.02
0.15	20	0.74	0.74	0.76	0.75
	15	0.68	0.68	0.68	0.68
	10	0.71	0.71	0.71	0.70
	7	0.69	0.69	0.69	0.69
	5	0.68	0.71	0.71	0.71
	3	0.22	0.22	0.25	0.25
0.1	20	0.51	0.51	0.51	0.61
	15	0.38	0.40	0.40	0.38
	10	0.50	0.50	0.50	0.50
	7	0.56	0.55	0.55	0.56
	5	0.45	0.45	0.48	0.45
	3	0.08	0.08	0.08	0.08
0.05	20	0.1	0.1	0.1	0.1
	15	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	7	0.03	0.03	0.05	0.03
	5	0.04	0.04	0.04	0.04
	3	0.1	0.1	0.1	0.1

TAB. 3.6 – Résultats de l'estimation du nombre de particules dans un amas composé de deux taches avec notre approximation analytique.

tique permet une meilleur estimation sur des images possédant un rapport signal sur bruit élevé. En revanche, l'estimation réalisée avec l'approximation gaussienne donne des résultats plus stables pour tous les SNRs. Le rapport signal sur bruit sur la fenêtre pouvant être relativement faible sur des images réelles, il semble préférable d'utiliser dans ce cadre l'approximation gaussienne.

Nous avons proposé d'estimer le nombre de particules dans un amas en pénalisant la vraisemblance. Nous avons alors sélectionné dans la littérature trois critères : BIC, CAIC, SSD. Nous avons réalisé une première validation sur des images simulées avec une modélisation gaussienne de la PSF. Nous avons ensuite ajusté ce modèle sur nos simulations afin de nous placer dans le cas où la PSF est parfaitement connue. Lorsqu'une seule tache est présente, les critères permettent d'estimer correctement le nombre de particules jusqu'à un faible SNR. En revanche, sur deux taches de même intensité, ces critères ne permettent plus d'estimer correctement lorsque la distance entre les taches est inférieure à $0.10\mu m$. Sur nos simulations, cette méthode d'estimation du nombre de particules donne des résultats encourageants. Il serait cependant intéressant de comparer d'autres critères et d'étudier leurs comportements sur un plus grand nombre de tache ainsi que l'effet d'une variation d'intensité entre les taches. Afin d'étudier l'effet d'une mauvaise approximation de la PSF, nous avons ensuite comparé notre approximation analytique et son approximation gaussienne sur des simulations réalisées à l'aide de notre PSF expérimentale. Nos résultats indiquent que l'erreur induite par l'approximation gaussienne est trop importante pour estimer

de façon satisfaisante le nombre de particule dans un amas.

Chapitre 4

Applications biologiques

Les travaux présentés dans ce chapitre sont réalisés en collaboration avec le groupe Systems Biology of Pathogens à l'Institut Pasteur Korea. Ces travaux concernent l'étude de deux parasites : la leishmania, responsable de la leishmaniose et le plasmodium falciparum, responsable de la malaria. À la suite d'une présentation de la problématique biologique, nous présentons notre méthodologie pour analyser et quantifier le phénomène étudié.

4.1 La leishmania

La leishmaniose est une maladie négligée. Le nombre de personnes atteintes par la leishmaniose est estimé à 12 millions, certaines avec des manifestations cliniques et d'autres sans symptômes, dans plus de 80 pays. Il existe plusieurs types de leishmaniose chez l'homme : la leishmaniose viscérale, la leishmaniose mucocutanée et la leishmaniose cutanée. Aucun vaccin contre cette maladie n'existe à l'heure actuelle et les traitements disponibles sont très toxiques. La leishmania est un parasite responsable de la leishmaniose. Il en existe de nombreuses espèces telles que la leishmania donovani, provoquant une leishmaniose viscérale, et la leishmania tropica, provoquant une leishmaniose cutanée. Les travaux présentés ici portent sur l'étude du parasite de la leishmania major, provoquant aussi une leishmaniose cutanée.

La figure 4.1 présente le cycle parasitaire de la leishmaniose. La leishmaniose est transmise à l'homme par la piqûre d'un certain type de moustique, le phlébotome. La forme du parasite est différente suivant l'hôte, appelée forme promastigote (possédant un flagelle externe) dans les moustiques et forme amastigote chez l'homme. Les parasites promastigotes sont ingérées par les macrophages où ils prennent la forme amastigote. Le parasite se multiplie jusqu'à explosion du macrophage et infecte ainsi d'autres cellules. Le cycle se termine lorsqu'un phlébotome sain ingère des macrophages infectés. Dans l'intestin de l'insecte, le parasite reprend sa forme promastigote, se multiplie et migre vers la trompe.

4.1.1 Problématique biologique

Afin de survivre et se répliquer dans ces différents environnements, une stratégie courante des parasites est de réaliser régulièrement une modification du code ADN situé dans les télomères afin de tromper le système immunitaire de l'hôte. L'étude de ce phénomène permettrait d'en comprendre le mécanisme et ainsi de mettre en place un processus bloquant cette modification. Il a été montré, pour les parasites responsables de la malaria, que les télomères sont, au moment de cette modification, situés à la périphérie du noyau.

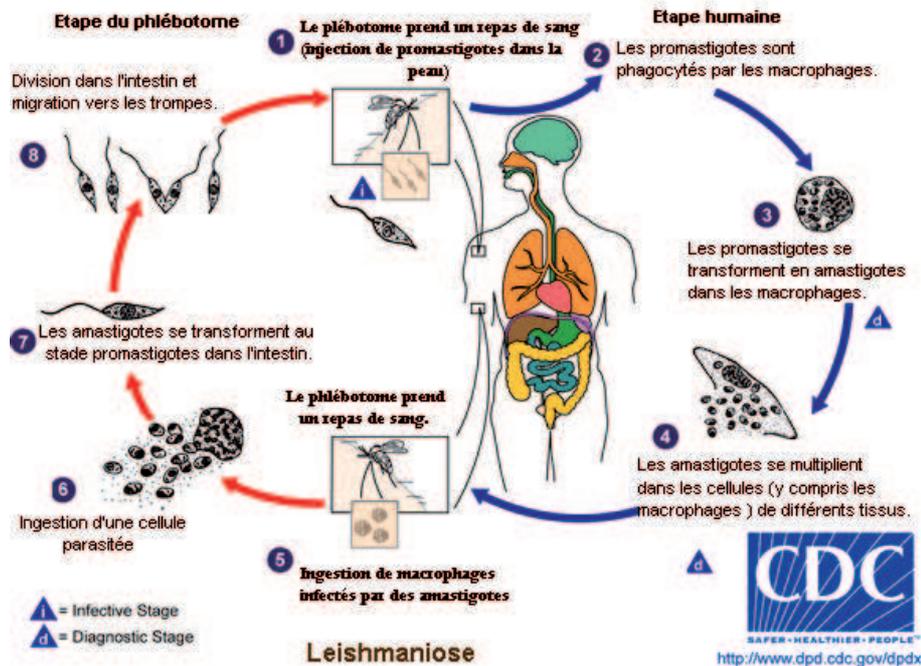


FIG. 4.1 – Cycle de vie de la leishmania, parasite responsable de la leishmaniose⁴. Après infection par la piqûre d'un insecte (étape 1), les promastigotes sont ingérés par un macrophage, transformés en amastigotes et multipliés (étapes 2, 3 et 4). Les insectes sont affectés lorsqu'ils ingèrent des macrophages contenant des amastigotes (étape 5). Dans l'intestin de l'insecte, les parasites changent à nouveau de formes, se multiplient et migrent vers la trompe (étape 6, 7 et 8). Les travaux présentés concernent l'étude de l'organisation des télomères dans le noyau du parasite sous la forme promastigote (8) et sous la forme amastigote (4).

Dans le cas de la leishmania, l'organisation spatiale des chromosomes à l'intérieur du noyau du parasite est très peu connue. Le travail présenté ici constitue une première étape de cette étude, dans laquelle nous comparons la distribution spatiale des télomères du parasite sous la forme promastigote à la distribution sous la forme amastigote.

La leishmania contient deux structures sous-cellulaires : le noyau et le kinétoplaste, ce dernier constituant une partie importante du mécanisme de déplacement du parasite. A l'aide d'un marqueur fluorescent spécifique de l'ADN (la protéine DAPI), le noyau et le kinétoplaste apparaissent tous les deux sur une image. Nous travaillons alors sur des images 3D composées de deux canaux sur lesquelles les deux structures sous-cellulaires apparaissent sur le canal bleu et les télomères marqués avec la protéine *Alexa 488* apparaissent sur le canal rouge. La figure 4.1.1 présente une projection d'une image 3D du noyau et du kinétoplaste (a), et des télomères (b).

Conditions d'acquisition

Les images ont été acquises sur deux microscopes suivant la forme du parasite. Un microscope confocal à balayage par ligne, le microscope *LSM 5 live* de Zeiss a été utilisé pour la forme promastigote et un microscope à champ large, le microscope *Eclipse 90i* de Nikon, pour la forme amastigote. Sur le microscope MCL, nous avons utilisé un objectif à immersion par huile d'ouverture numérique égale à 1,4 et de coefficient de grossissement égal à 63. Nous avons fixé la taille de la fente à $1\mu A$ ainsi que l'échantillonnage à $0.05\mu m$ sur le plan xy et $0.01\mu m$ suivant l'axe z . Les noyaux sous la forme amastigote étant

⁴Source : <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>.

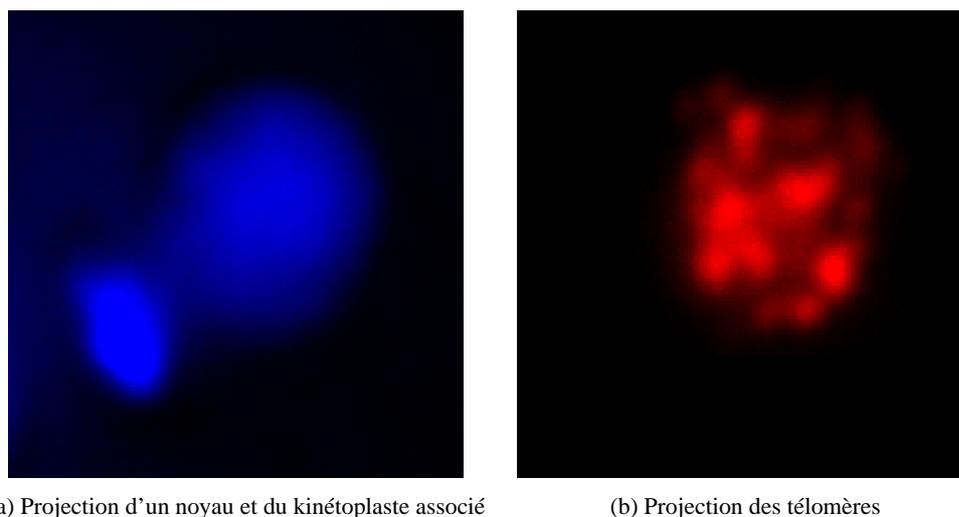


FIG. 4.2 – Projection d’une image 3D d’un noyau et des télomères associés, d’un parasite amastigote.

beaucoup plus petits que sous la forme promastigote, il n’était possible d’obtenir des images convenables sous ces conditions d’acquisition. Nous alors choisi d’utiliser un microscope à champ large possédant un objectif à immersion par huile d’ouverture numérique égale à 1,4 et de coefficient de grossissement égal à 100. L’échantillonnage est égal à $0.03\mu m$ sur le plan xy et $0.1\mu m$ en z .

4.1.2 Analyse automatique

Afin de mesurer la distance des télomères à la membrane nucléaire du parasite promastigote et amastigote, nous utilisons deux algorithmes présentés dans les paragraphes suivants.

Segmentation des noyaux

La segmentation des noyaux et des kinétoplastes a été réalisée à l’aide maillage actif 3D [Dufour, 2007]. Cette méthode nous permet d’obtenir une segmentation sous-voxellique, ainsi qu’une visualisation 3D du noyau, du kinétoplaste et des télomères.

Cependant, la forme des noyaux et des kinétoplastes segmentés est fortement modifiée par la PSF du microscope à balayage par ligne. A l’aide notre modèle analytique de la PSF du microscope à balayage par ligne, nous avons réalisé une déconvolution basée sur l’algorithme de Richardson-Lucy. Cette méthode nous permet de réduire la déformation provoquée par la PSF et ainsi réaliser une segmentation visuellement meilleure. La figure 4.1.2.0 montre un noyau et un kinétoplaste avant (a) et après (b) déconvolution, ainsi que la segmentation correspondante (c) et (d).

Détection des paquets de télomères

Les télomères étant de très petites tailles, les microscopes à fluorescence ne permettent pas de visualiser un unique télomère. Chaque tache fluorescente apparaissant sur une image représente alors un paquet de télomères. Dans ce travail, nous ne cherchons pas alors à détecter un unique télomère mais un paquet de télomères pour lequel nous déterminons sa position sous-voxellique et son intensité.

Ces taches fluorescentes pouvant être décrit par la PSF du système optique considéré, nous utilisons les algorithmes présentés dans le chapitre précédent, de détection de particules fluorescentes par courbure locale combinés à l’estimation des centres. Les taches étant proches les unes des autres, notre algorithme

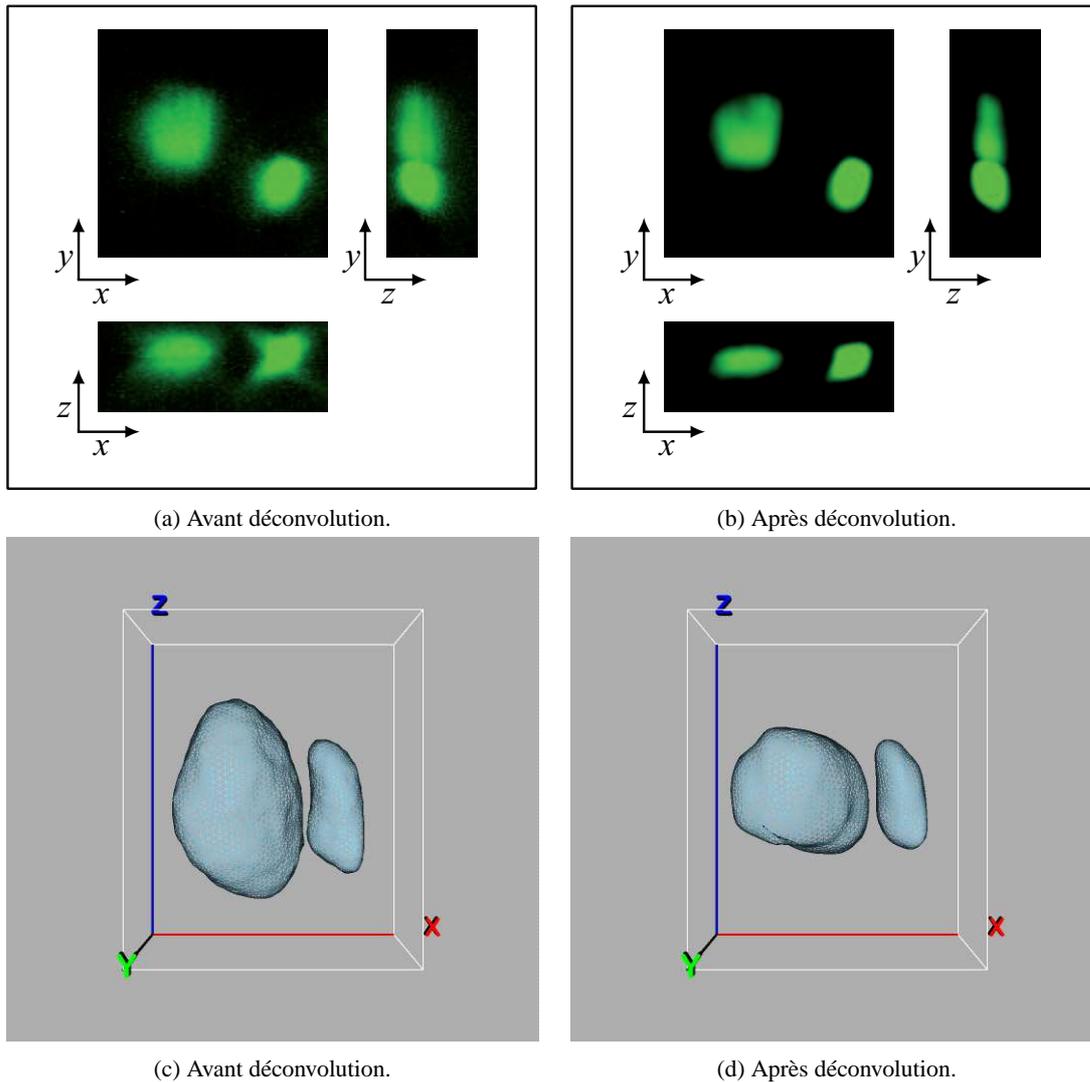


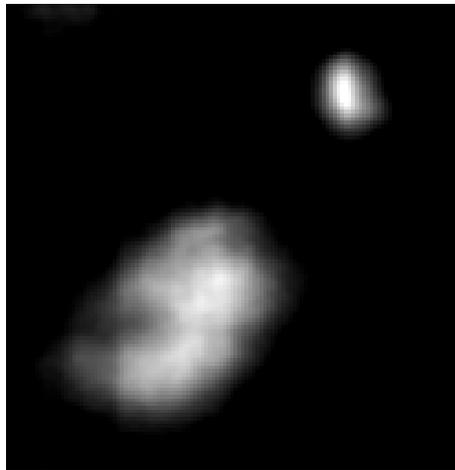
FIG. 4.3 – Résultat de la déconvolution sur un noyau du parasite promastigote. Nous présentons des vues xy , yz et xz d'un noyau et du kinétoplaste associé avant (a) et après (b) déconvolution, ainsi que le résultat de la segmentation avant (c) et après déconvolution (d).

ne permet pas de toutes les détecter. Cependant, le nombre de taches superposées pouvant être élevée, nous ne réalisons pas de détection en dessous de la résolution. Nous avons choisi d'analyser les variations d'intensité entre les taches afin d'obtenir une estimation du nombre de télomères par tache et par amas. Nous supposons alors que les taches possédant une forte intensité représentent un grand nombre de télomères. Ces mesures nous fournissent alors une information supplémentaire sur la répartition des télomères dans le noyau.

Nous avons montré dans le chapitre 3.1.2 que l'approximation gaussienne de la PSF permet d'estimer de façon stable la position de chaque particule pour tous les SNR. Le rapport signal sur bruit pouvant être faibles dans cette application, nous estimons ici les positions de chaque particule en maximisant la vraisemblance présentée dans le chapitre 3.1.2, où la PSF h est donnée par l'approximation gaussienne du modèle analytique.

La figure 4.1.2.0 montre le résultat de la détection des paquets de télomères sur une image de parasite promastigote. Nous présentons une projection maximum (a) et (b) de l'image et une projection

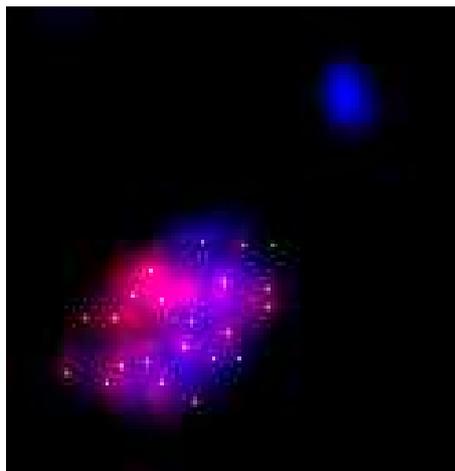
maximum du résultat de la détection (c). De plus, nous présentons la reconstruction 3D (d) des structures sous-cellulaires et de petites sphères correspondant aux taches fluorescentes détectées. La différence d'intensité entre les taches est représentée par une variation dans la taille des sphères.



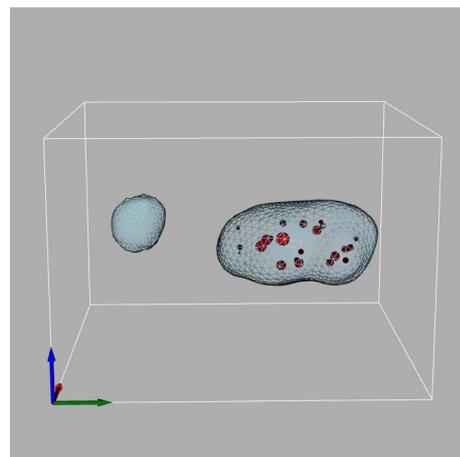
(a) Projection du noyau et du kinétoplaste déconvolués



(b) Projection des télomères



(c) Projection du résultat de la détection



(d) Reconstruction 3D

FIG. 4.4 – Résultat de la détection des paquets de télomères pour un parasite promastigote. Nous présentons une projection du noyau (a), des télomères (b) et du résultat de la détection (c), ainsi qu'une reconstruction 3D (d) de l'image segmentée. La variation dans la taille des sphères représente la différence d'intensité entre les taches.

4.2 La malaria

La malaria est la plus fréquente des infections parasitaires observées dans le monde. Plusieurs espèces de *Plasmodium*, genre du parasite responsable de la malaria, peuvent infecter l'homme. Les travaux de recherche présentés ici portent sur le *Plasmodium falciparum*, présentant l'espèce la plus fréquente et la seule mortelle chez l'homme.

4.2.1 Problématique biologique

L'expression des gènes chez le *Plasmodium falciparum*, est très peu connu. Dans ces travaux, nous étudions l'organisation des sites de transcription de l'ARN afin de comprendre son rôle dans la régulation des gènes [Moraes *et al.*, 2007]. A l'aide d'un marqueur spécifique, l'ARN transcrit apparaît sur un canal de l'image et l'ADN du noyau apparaît sur un autre canal. En réalisant des acquisitions à différent temps d'incubation du parasite, nous souhaitons étudier le lieu et le moment de la transcription de l'ARN. Ces travaux en sont encore au stade préliminaire. Nous avons réalisé à l'heure actuelle une première estimation du nombre de sites de transcription dans le noyau. La méthodologie est présentée dans le paragraphe suivant.

4.2.2 Analyse préliminaire

Les images des sites de transcription de l'ARN sont très similaires aux images de la leishmania. Une tache, définie par la PSF du microscope utilisée, pouvant correspondre aussi à un ou plusieurs sites de transcription, nous avons utilisé notre algorithme de détection par courbure locale pour estimer le nombre de paquets de sites dans le noyau. Contrairement à la leishmania, il n'est pas possible ici d'utiliser l'intensité des taches pour estimer le nombre de sites par paquet. En effet, l'intensité émise par le fluorophore utilisé dans ce cadre peut varier d'un site de transcription à l'autre, contrairement au marquage utilisé pour les télomères.

La figure 4.2.2 montre le résultat de la détection par courbure locale sur deux projections d'images de sites de transcription.

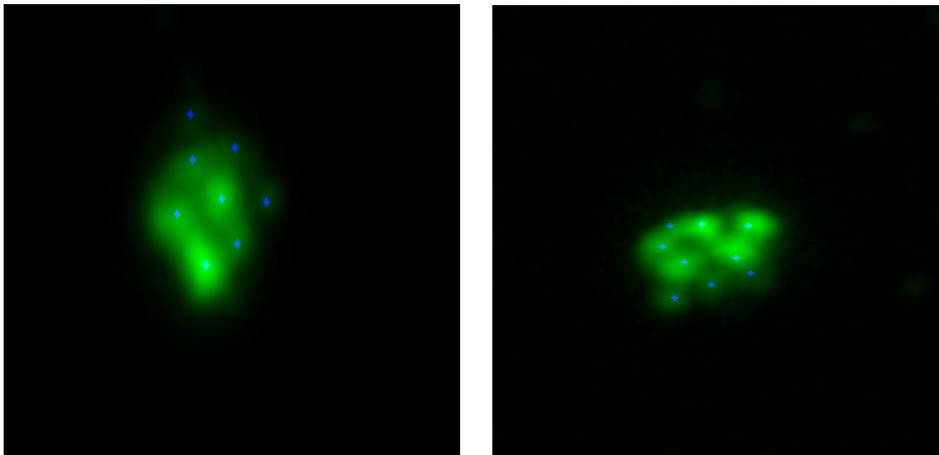


FIG. 4.5 – Résultat de la détection des sites de transcription de l'ARN.

4.3 Conclusion

Nous avons présentés les études biologiques sur lesquels nous travaillons en collaboration avec le groupe Systems Biology of Pathogens. Dans le cadre de la leishmania, nous avons utilisé notre méthode de détection de particules fluorescentes par courbure locale, combinée à notre méthode d'estimation de leurs positions et de leurs intensités, afin d'analyser l'organisation spatiale des télomères au sein du noyau. Les travaux réalisés dans le cadre de la malaria en sont au stade préliminaire et nécessite des recherches supplémentaires afin d'estimer de façon convenable le nombre de sites de transcription de l'ARN et leur répartition spatiale au sein du noyau.

Conclusion

Cette partie concerne la détection de taches fluorescentes définies par la PSF du système optique utilisé. Après une introduction, nous avons introduit dans le premier chapitre l'ensemble des perturbations affectant les images en microscopie par fluorescence ainsi que la résolution optique, définie comme la plus petite distance entre deux taches de même intensité permettant de les discriminer. Nous avons ensuite présenté des critères tels que le critère de Rayleigh permettant de quantifier cette distance.

Dans le deuxième chapitre, nous avons réalisé un état de l'art sur les méthodes de détection de particules fluorescentes. Nous avons alors présenté les méthodes dites de détection de points d'intérêt permettant de détecter les taches fluorescentes séparées par une distance supérieure au critère de Rayleigh. Par la suite, nous avons présenté les travaux réalisés sur l'estimation des positions sous-voxelliques des taches fluorescentes. Finalement, nous avons introduit les méthodes, dites sous-résolution permettant d'estimer le nombre de particules dans un amas.

Le troisième chapitre concerne nos contributions. Nous avons alors proposé une méthode de détection de particules fluorescentes, définies par la PSF du microscope confocal à balayage par ligne. Cette méthode est composée de trois étapes pouvant être utilisées séparément suivant l'application biologique.

La première étape concerne la détection de taches séparées par une distance supérieure au critère de Rayleigh. Nous avons alors proposé une méthode de détection basée sur la courbure locale permettant de discriminer les taches du fond fluorescent.

Dans la deuxième étape, nous avons présenté un estimateur par maximum de vraisemblance des positions sous-voxellique des taches, sous la supposition d'un mélange de bruit gaussien. Nous avons étudié les erreurs induites par une mauvaise approximation de la PSF et nous avons montré que notre approximation analytique permet une meilleure estimation sur des images possédant un rapport signal sur bruit élevé. En revanche, l'estimation réalisée avec l'approximation gaussienne donnent de meilleurs résultats lorsque le SNR est faible.

Finalement, la troisième étape concerne la détection de particules séparées par une distance inférieure au critère de Rayleigh. Nous avons alors proposé d'estimer le nombre de particules dans un amas en pénalisant la vraisemblance et nous avons comparé sur des images simulées trois critères de pénalisation : BIC, CAIC, SSD. Premièrement, nous avons pu remarquer que les trois critères donnent des résultats équivalents. Dans le cas où la PSF est parfaitement connue, les résultats de notre algorithme sont encourageants. Il serait cependant intéressant d'étudier le comportement de notre algorithme sur un grand nombre de tache ainsi que l'effet d'une variation d'intensité entre les taches.

Nous avons ensuite comparé dans ce cadre notre approximation analytique et son approximation gaussienne sur des simulations réalisées à l'aide de notre PSF expérimentale. Nos résultats indiquent que l'erreur induite par l'approximation gaussienne est trop importante pour estimer de façon satisfaisante le nombre de particules dans un amas acquise avec le microscope MCL.

Finalement, nous avons présenté dans le quatrième chapitre des applications concrètes de la méthode

Conclusion

à des problématiques biologiques réelles, réalisées en collaboration avec d'autres équipes de l'Institut Pasteur de Corée. Ces travaux concernent l'analyse de la répartition spatiale de télomères et de sites de transcription de l'ARN au sein du noyau d'un parasite.

Conclusion générale

Dans ce document, nous avons décrit nos travaux sur la modélisation de la réponse impulsionnelle en microscopie par fluorescence ainsi que la détection de particules fluorescentes pouvant être décrite par cette réponse. Pour conclure ce document, nous passons en revue l'ensemble de nos apports dans ces domaines. Nous présentons par la suite les perspectives nous semblant intéressantes.

Contributions

Modélisation de la réponse impulsionnelle La réponse impulsionnelle d'un microscope par fluorescence produit une déformation de l'image ne pouvant être négligée lors de la quantification de phénomènes biologiques. Lors de la mise en place d'algorithmes de correction de cette déformation tels que la déconvolution, un modèle précis de cette réponse est alors nécessaire. Cependant, la PSF exacte ne pouvant être connue *a priori*, plusieurs approches existent pour modéliser cette réponse : l'approche expérimentale basée sur l'acquisition d'objet biologique pouvant représenter la PSF et l'approche analytique basée sur l'analyse du chemin de la lumière dans le microscope. Une connaissance des deux modèles permettant de mieux caractériser le système, nous nous sommes basée sur la théorie de la diffraction des ondes afin d'obtenir un modèle analytique de la réponse impulsionnelle d'un nouveau type de microscope : le microscope à balayage par ligne.

Nous avons alors proposé pour ce microscope un modèle analytique 3D de la PSF basé sur la théorie scalaire de la diffraction de Debye. Lors de la comparaison avec un modèle expérimentale considéré comme notre vérité terrain, nous avons montré que notre modèle permet une modélisation satisfaisante de la réponse impulsionnelle de ce microscope. Nous avons ensuite complété cette analyse en proposant une approximation gaussienne de cette PSF. Lors de la comparaison entre ces deux modèles analytiques et le modèle expérimentale, nous avons constaté que l'approximation gaussienne ne permet pas de modéliser précisément la PSF du microscope à balayage par ligne. Cependant, cette approximation permettant de réduire de façon significative le temps de calcul par rapport au modèle analytique, nous pensons que le modèle gaussien peut être utilisé dans certaines applications ne nécessitant pas une grande précision.

Détection de particules fluorescentes De nombreuses applications biologiques nécessitent la détection de particules fluorescentes acquises avec un microscope optique. Ces particules étant de petites tailles devant la longueur d'onde, l'image de ces particules peut alors être modélisée par la réponse impulsionnelle du microscope considéré. Les algorithmes de détection de ce type d'objet peuvent être scindés en deux suivant la distance entre les particules. Cette distance, appelée résolution optique, et pouvant être définie par le critère de Rayleigh, caractérise la limite à partir de laquelle deux particules de même intensité peuvent être discriminées.

Dans le cadre de la détection de taches fluorescentes au dessous de la résolution, nous avons proposé un algorithme adapté aux particules acquises avec un microscope à balayage par ligne. Cet algorithme,

basé sur un filtrage par l'approximation gaussienne de la PSF et un calcul de la courbure locale, permet de discriminer les taches fluorescentes du fond fluorescent provenant de l'autofluorescence.

Combinés à cet algorithme, nous avons réalisé l'estimation des positions sous-voxelique en utilisant une modélisation statistique de la formation de l'image, comprenant les perturbations affectant l'image et la réponse impulsionnelle. Ce modèle définit alors l'image d'une particule par la réponse impulsionnelle perturbée par le bruit de photons et les bruits électroniques. Une estimation des positions est ensuite obtenue en maximisant la vraisemblance de ce modèle sous un mélange de bruit gaussien. La comparaison de notre modèle analytique et de son approximation gaussienne sur des images simulées grâce à notre modèle expérimentale, nous a permis de mettre en évidence le fait que notre modélisation analytique permet une bonne estimation des centres. Dans ce même contexte, nous avons aussi constaté que l'utilisation de l'approximation gaussienne dans notre algorithme permet une estimation stable pour tous les rapports signal sur bruit.

Ces deux méthodes ont pu être appliquées à des problèmes biologiques réels tels que l'analyse de la répartition spatiale des télomères au sein du noyau du parasite responsable de la leishmaniose.

Finalement, nous avons abordé les algorithmes de détection sous-résolution portant sur l'estimation du nombre de particules dans un amas fluorescent. Dans ce type de problèmes inverses, l'estimation peut être obtenue en sélectionnant parmi un ensemble de modèles celui caractérisant le mieux l'amas fluorescent. La sélection est alors réalisée soit par la mise en place d'un test statistique entre deux modèles consécutifs, soit par la maximisation d'un critère de vraisemblance pénalisée, cette dernière étant peu utilisée en microscopie par fluorescence. Nous avons alors proposé d'estimer le nombre de particules dans un amas grâce à la modélisation statistique de la formation de l'image utilisée dans l'estimation des positions combiné à des critères pénalisant la vraisemblance : les critères BIC, CAIC et SSD. Les modèles ajustés à l'amas sont alors caractérisés par une superposition d'approximation analytique de la PSF dont chaque position et intensité doivent être estimées. Nous avons aussi comparé dans ce contexte notre modèle analytique et son approximation gaussienne sur des images simulées à l'aide de notre véritable terrain de la PSF. Dans ce cadre, l'utilisation de notre modèle analytique dans l'ajustement permet une estimation proche du cas où la PSF est parfaitement connue. En revanche, le biais de modélisation induit par l'approximation gaussienne est trop important pour estimer correctement le nombre de particules.

Perspectives

De nombreuses perspectives peuvent être envisagées pour ces travaux, que ce soit à travers des améliorations algorithmiques ou des applications biologiques.

Modélisation de la réponse impulsionnelle Le modèle de la réponse impulsionnelle a été établi dans le cadre d'un système optique considéré parfait. Cependant, la distribution de la lumière dans le microscope MCL est altérée par des aberrations sphériques et comas. La prise en compte de ces aberrations permettrait alors d'augmenter la précision du modèle proposé. D'autre part, nous avons supposé que la diffraction des ondes est totalement définie par la théorie scalaire ne tenant pas compte de la nature vectorielle d'une onde électromagnétique. La modélisation pourrait alors être réalisée à l'aide de la théorie vectorielle de Debye.

Lors des applications biologiques, notre modèle combiné à l'algorithme de déconvolution de Richardson-Lucy nous a permis d'améliorer la quantification du phénomène étudié. Nous aurions souhaité approfondir ce point afin de mettre en place un critère d'arrêt robuste et ainsi mettre en place une routine automatique pour les biologistes.

Détection de particules fluorescentes Notre méthode de détection basée sur la courbure locale est adaptée à la discrimination de taches dans un fond fluorescent provenant de l'autofluorescence. Certaines applications nécessitent cependant la localisation de particules sur des images possédant des structures complexes telles que des filaments. Il serait intéressant de modifier notre méthode par une analyse plus fine du comportement des valeurs propres de la matrice hessienne en chaque point de l'image.

Dans le cadre de la détection sous-résolution, il serait intéressant de comparer plus de critères de sélection ainsi que leurs comportements sur un grand nombre de taches. D'autre part, afin de réduire l'influence de l'initialisation de l'intensité, nous aurions aimé tester une estimation en deux étapes : une première étape consistant à l'estimation d'une distance moyenne entre les taches, et la deuxième étape reposant sur le calcul de la vraisemblance pénalisée avec une intensité donnée par cette distance.

Finalement, l'approximation gaussienne ne modélisant pas correctement les lobes secondaires de la PSF, cette approximation ne peut pas être utilisée de façon satisfaisante. Il serait alors intéressant d'étudier les estimateurs robustes afin de réduire l'influence de ces lobes lors de l'ajustement.

Annexe A

Série de Maclaurin

Dans cette annexe, nous donnons les séries de Maclaurin à l'ordre 2, utilisées dans la section 3.4 afin d'estimer les paramètres de la fonction gaussienne approximant la PSF d'intensité non-paraxiale du microscope MCL. La série de Maclaurin d'une fonction f à 3 variables $\{x, y, z\}$ étant donnée par :

$$f(x, y, z) = \sum_{j=0}^{\infty} \left(\frac{1}{j!} \left[x \frac{\partial}{\partial x} + y \frac{\partial}{\partial y} + z \frac{\partial}{\partial z} \right]^j f(0, 0, 0) \right).$$

les développements de la fonction gaussienne g_{σ} , de la PSF d'excitation h_{ex} et de la PSF d'émission h_{em} sont alors égale à :

$$g_{\sigma_x, \sigma_y, \sigma_z}(x, y, z) = 1 - \frac{1}{2\sigma_x^2}x^2 - \frac{1}{2\sigma_y^2}y^2 - \frac{1}{2\sigma_z^2}z^2 + o(|\mathbf{x}|^2),$$

$$\left| \frac{1}{k_{ex} \int_{-\alpha}^{\alpha} \cos^{3/2} \theta d\theta} h_{ex} \right|^2 = 1 - \frac{1}{2}y^2 k_{ex}^2 \left(2 - \frac{2 \int_{-\alpha}^{\alpha} \cos^{7/2} \theta d\theta}{\int_{-\alpha}^{\alpha} \cos^{3/2} \theta d\theta} \right) - \frac{1}{2}z^2 k_{ex}^2 \left(\frac{2 \int_{-\alpha}^{\alpha} \cos^{7/2} \theta d\theta}{\int_{-\alpha}^{\alpha} \cos^{3/2} \theta d\theta} - \left(\frac{2 \int_{-\alpha}^{\alpha} \cos^{5/2} \theta d\theta}{\int_{-\alpha}^{\alpha} \cos^{3/2} \theta d\theta} \right)^2 \right) + o(|\mathbf{x}|^2),$$

$$\left| \frac{3}{2k_{em}(1-\cos^{3/2} \alpha)} h_{em} \right|^2 = 1 - k_{em}^2 \frac{4-7\cos^{3/2} \alpha + 3\cos^{3/2} \alpha}{14(1-\cos^{3/2} \alpha)} (x^2 + y^2) - \frac{3k_{em}^2}{175(1-\cos^{3/2} \alpha)} (4 + 4\cos^5 \alpha - 25\cos^{7/2} \alpha + 42\cos^{5/2} \alpha - 25\cos^{3/2} \alpha) z^2 + o(|\mathbf{x}|^2),$$

où \mathbf{x} est donné par (x, y, z) .

L'approximation de la PSF analytique non-paraxiale du microscope MCL étant réalisée à l'aide d'une première approximation de la partie excitation et de la partie émission, le développement de la PSF analytique est alors donnée par :

$$\frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_{em,y}\text{erf}\left(\frac{s}{\sqrt{2}\sigma_{em,y}}\right)} g_{\sigma_{ex,y}, \sigma_{em,z}}(y, z) \int_{-s}^s g_{\sigma_{em,x}, \sigma_{em,y}, \sigma_{em,z}}(x, y - y_s, z) dy_s = 1 - \frac{1}{2\sigma_{em,x}^2}x^2 - \frac{1}{2} \left(\frac{1}{\sigma_{ex,y}^2} + \frac{\sqrt{2}s \exp\left(-\frac{s^2}{2\sigma_{em,y}^2}\right)}{\sigma_{em,y}^3 \sqrt{\pi} \text{erf}\left(\frac{\sqrt{2}s}{2\sigma_{em,y}}\right)} \right) y^2 - \frac{1}{2} \left(\frac{\sigma_{ex,z}^2 + \sigma_{em,z}^2}{\sigma_{ex,z}^2 \sigma_{em,z}^2} \right) z^2 + o(|\mathbf{x}|^2),$$

où erf est la fonction erreur donnée par $\text{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x \exp(-t^2) dt$.

Table des figures

1	Exemples d'images en microscopie par fluorescence.	2
2	Exemples d'images de particules fluorescentes.	3
1	Système optique simple constitué d'une lentille mince.	7
1.1	Illustration de la loi de Snell-Descartes	11
1.2	Onde électromagnétique monochromatique	12
1.3	Exemple d'ondes scalaires stationnaires.	13
1.4	Exemples de phénomènes de diffraction.	14
1.5	Schéma de la diffraction de Kirchhoff	14
1.6	Diffraction de Fraunhofer.	16
1.7	Système optique pour l'approximation de Debye.	18
1.8	Illustration des aberrations chromatiques.	19
1.9	Illustration des aberrations sphériques.	20
2.1	Exemple de spectres d'excitation et d'émission.	22
2.2	Schéma d'un microscope optique à champ large	23
2.3	Information hors plan focal dans un microscope à champ large	23
2.4	Schéma d'un microscope confocal à fluorescence	24
2.5	Description de l'ouverture numérique d'un objectif	25
2.6	PSF d'intensité d'un microscope à champ large et d'un microscope confocal à balayage par point	27
3.1	Schéma d'un microscope confocal à fluorescence à balayage par ligne	30
3.2	Système optique dans le cadre de la modélisation de la distribution de l'amplitude d'excitation du microscope MCL	32
3.3	Effet du détecteur sur la PSF d'intensité en fonction de l'échantillonnage	34
3.4	Effet du détecteur sur la PSF d'intensité en fonction de la fente	35
3.5	Présentation de la PSF d'intensité du microscope à balayage par ligne suivant les trois axes	36
3.6	Histogramme joint entre deux masques de billes fluorescentes imagées.	37
3.7	Résultat du recalage entre deux masques de billes fluorescentes imagées	38
3.8	xy , xz et yz vues de la PSF expérimentale avant et après déconvolution.	38
3.9	xy , xz et yz vues de la PSF expérimentale et des PSFs analytiques	39
3.10	Erreur relative au carré suivant l'axe z	40
3.11	Vues x , y , z de la PSF analytique non-paraxiale et de son approximation gaussienne	43
1.1	Illustration du critère de Rayleigh	55
1.2	Illustration des effets du bruit de photons et de l'échantillonnage sur la résolution optique	56

Table des figures

2.1	Illustration des surfaces classifiées grâce aux opérateurs de courbures	65
2.2	Effet de la taille de la fenêtre de recherche des maxima locaux sur la détection de taches fluorescentes	67
2.3	Évolution de la vraisemblance en fonction du nombre de composants dans le modèle. . .	70
3.1	Effet de la taille de la fenêtre de recherche des maxima locaux.	76
3.2	Exemple de fond fluorescent 2D	80
3.3	Résultats de la détection par courbure locale sur une image 3D simulée.	82
3.4	Résultats de la détection par courbure locale sur image 3D de télomères.	83
3.5	Résultats de l'estimation des centres suivant le rapport signal sur bruit.	84
4.1	Cycle de vie de la leishmania, parasite responsable de la leishmaniose.	92
4.2	Projection d'une image 3D d'un noyau et des télomères associés.	93
4.3	Résultat de la déconvolution sur un noyau du parasite promastigote	94
4.4	Résultat de la détection des paquets de télomères pour un parasite promastigote	95
4.5	Résultat de la détection des sites de transcription de l'ARN.	96

Liste des tableaux

3.1	Erreur relative au carré entre notre vérité terrain et les PSFs analytiques	39
3.2	Écart-types estimés de la fonction gaussienne approchant la PSF analytique du microscope MCL	42
3.3	Ecart-types optimaux et estimés de la fonction gaussienne approximant la PSF analytique	42
3.4	Erreur relative entre la PSF analytique non-paraxiale et son approximation gaussienne. .	42
3.5	Erreur relative entre notre vérité terrain et ses approximations.	43
1.1	Récapitulatif des perturbations	54
3.1	Résultats de la détection par courbure locale.	81
3.2	Résultats de l'estimation du nombre de particules lorsqu'une seule tache est présente, pour une PSF connue.	85
3.3	Résultats de l'estimation du nombre de particules dans un amas composé de deux taches, pour une PSF connue	85
3.4	Résultats de l'estimation du nombre de particules lorsqu'une seule tache est présente, suivant l'approximation utilisée.	86
3.5	Résultats de l'estimation du nombre de particules dans un amas composé de deux taches avec l'approximation gaussienne.	87
3.6	Résultats de l'estimation du nombre de particules dans un amas composé de deux taches avec notre approximation analytique.	88

Bibliographie

- [Abu-Naser *et al.*, 2006] ABU-NASER, A., GALATSANOS, N. et WERNICK, M. (2006). Methods to detect objects in photon-limited images. *Journal of the Optical Society of America A.*, 23:272–278.
- [Aert et Dyck, 2006] AERT, S. V. et DYCK, D. V. (2006). Resolution of coherent and incoherent imaging systems reconsidered - Classical criteria and a statistical alternative. *Optics Express*, 14:3830–3839.
- [Aguet *et al.*, 2005] AGUET, F., de VILLE, D. V. et UNSER, M. (2005). A maximum-likelihood formalism for sub-resolution axial localization of fluorescent nanoparticles. *Optics Express*, 13:10503–10522.
- [Aguet *et al.*, 2007] AGUET, F., VILLE, D. V. D. et UNSER, M. (2007). Sub-resolution maximum-likelihood based localization of fluorescent nanoparticles in three dimensions. In *IEEE International Symposium on Biomedical Imaging : From Nano to Macro*.
- [Akaike, 1974] AKAIKE, H. (1974). A new look at statistical model identification. *IEEE Transaction on Automatic Control*, 19:716–723.
- [Alter *et al.*, 2006] ALTER, F., MATSUSHITA, Y. et TANG, X. (2006). An intensity similarity measure in low-light conditions. In *Proceedings of 9th European Conference on Computer Vision*, volume 4, pages 267–280, Graz, Autriche.
- [Amos, 1995] AMOS, W. (1995). Optical units. In PAWLEY, J., éditeur : *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, pages 579–580. Plenum Press, New York, 2nd édition.
- [Anderson *et al.*, 1992] ANDERSON, C., GEORGIU, G., MORRISON, I., STEVENSON, G. et CHERRY, R. (1992). Tracking of cell surface receptors by fluorescence digital imaging using a charge-coupled device camera. *Journal of Cell Science*, 101:415–425.
- [Andersson, 2007] ANDERSSON, S. B. (2007). Precise localization of fluorescent probes without numerical fitting. In *IEEE International Symposium on Biomedical Imaging : From Nano to Macro*.
- [Arhel *et al.*, 2006] ARHEL, N., GENOVESIO, A., KIM, K., MIKO, S., PERRET, E., OLIVO-MARIN, J.-C., SHORTE, S. et CHARNEAU, P. (2006). Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. *Nature Methods*, 3:817–24.
- [Art, 2006] ART, J. (2006). Photon detectors for confocal microscopy. In PAWLEY, J., éditeur : *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, chapitre 12, pages 251–264. 3rd. édition.
- [Bates *et al.*, 2007] BATES, M., HUANG, B., DEMPSEY, G. et ZHUANG., X. (2007). Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science*, 317:1749–1753.
- [Bernas *et al.*, 2007] BERNAS, T., BARNES, D., ASEM, E., ROBINSON, J. et RAJWA, B. (2007). Precision of light intensity measurement in biological optical microscopy. *Journal of microscopy*, 226:163–174.
- [Bettens *et al.*, 1999] BETTENS, E., DYCK, D. V., den DEKKER, A., J.SIJBERS et van den BOS, A. (1999). Model-based two object resolution from observations having counting statistics. *Ultramicroscopy*, 77:37–48.

- [Betzig *et al.*, 2006] BETZIG, E., PATTERSON, G., SOUGRAT, R., LINDWASSER, O., OLENYCH, S., BONIFACINO, J., DAVIDSON, M., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. et HESS, H. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313:1642–1645.
- [Bobroff, 1986] BOBROFF, N. (1986). Position measurement with a resolution and noise-limited instrument. *Review of Scientific Instruments*, 57:1152–1157.
- [Bonneau *et al.*, 2005] BONNEAU, S., DAHAN, M. et COHEN, L. D. (2005). Single Quantum Dot Tracking Based on Perceptual Grouping Using Minimal Paths in a Spatiotemporal Volume. *IEEE Transactions on Image Processing*, 14(9):1384–1395.
- [Born et Wolf, 1999] BORN, M. et WOLF, E. (1999). *Principles of Optics*. Pergamon, New York, 7th (expanded) édition.
- [Bozdogan, 1987] BOZDOGAN, H. (1987). Model selection and akaike's information criterion : the general theory and its analytical extensions. *Psychometrica*, 52:345–370.
- [Can *et al.*, 2003] CAN, A., AL-KOFAHI, O., LASEK, S., SZAROWSKI, D. H., TURNER, J. N. et ROYSAM, B. (2003). Attenuation correction in confocal laser microscopes : a novel two-view approach. *Journal of microscopy*, 211:67–79.
- [Castleman, 1996] CASTLEMAN, K. (1996). *Digital Image Processing*. Prentice Hall.
- [Cheezum *et al.*, 2001] CHEEZUM, M. K., WALKER, W. F. et GUILFORD, W. H. (2001). Quantitative Comparison of Algorithms for Tracking Single Fluorescent Particles. *Biophysical Journal*, 81:2378–2388.
- [Churchman *et al.*, 2005] CHURCHMAN, L., ÖKTEN, Z., ROCK, R., DAWSON, J. et SPUDICH, J. (2005). Single molecule high-resolution colocalization of cy3 and cy5 attached to macromolecules measures intramolecular distances through time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102:1419–1423.
- [Conchello et Lichtman, 2005] CONCHELLO, J. et LICHTMAN, J. (2005). Optical sectioning microscopy. *Nature Methods*, 2:920–931.
- [de Monvel *et al.*, 2001] de MONVEL, J. B., CALVEZ, S. L. et ULFENDAHL, M. (2001). Image Restoration for Confocal Microscopy : Improving the Limits of Deconvolution, with Application to the Visualization of the Mammalian Hearing Organ. *Biophysical Journal*, 80:2455–2470.
- [den Dekker, 1997] den DEKKER, A. J. (1997). Model-Based Optical Resolution. *IEEE Transactions on instrumentation and measurement*, 46(4):798–802.
- [den Dekker et van den Bos, 1997] den DEKKER, A. J. et van den BOS, A. (1997). Resolution : a survey. *Journal of Optical Society of America*, 14(3):547–557.
- [Dey *et al.*, 2004] DEY, N., BLANC-FERAUD, L., ZIMMER, C., ROUX, P., KAM, Z., OLIVO-MARIN, J.-C. et ZERUBIA, J. (2004). 3d microscopy deconvolution using richardson-lucy algorithm with total variation regularization. Rapport technique, Institut National de Recherche en Informatique et en Automatique.
- [Donoho, 1995] DONOHO, D. L. (1995). Denoising via soft thresholding. *IEEE Transactions on Information Theory*, 41:613–627.
- [Dufour, 2007] DUFOUR, A. (2007). *Segmentation, suivi et visualisation d'objets biologiques en microscopie 3D par fluorescence : approches par modèles déformables*. Thèse de doctorat, Université Paris Descartes.
- [Dusch *et al.*, 2007a] DUSCH, E., DORVAL, T., VINCENT, N., WACHSMUTH, M. et GENOVESIO, A. (2007a). Three-dimensional point spread function model for line-scanning confocal microscope with high-aperture objective. *Journal of Microscopy*, 228:132–138.

-
- [Dusch *et al.*, 2007b] DUSCH, E., VINCENT, N. et GENOVESIO, A. (2007b). 3D fluorescent spot detection in line-scanning confocal microscopy. *In IEEE International Conference on Image Processing*, San Antonio, Texas, USA.
- [Egger et Petran, 1967] EGGER, M. et PETRAN, M. (1967). New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells. *Science*, 157:305–307.
- [Feuerbach *et al.*, 2002] FEUERBACH, F., GALY, V., TRELLES-STICKEN, E., FROMONT-RACINE, M., JACQUIER, A., GILSON, E., OLIVO-MARIN, J.-C., SCHERTHAN, H. et NEHRBASS, U. (2002). Nuclear architecture and spatial positioning help establish transcriptional states of telomeres in yeast. *Nature Cell Biology*, 4:214–221.
- [Figueiredo et Jain, 2002] FIGUEIREDO, M. A. et JAIN, A. K. (2002). Unsupervised Learning of Finite Mixture Models. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 24:381–396.
- [Galy *et al.*, 2000] GALY, V., OLIVO-MARIN, J. C., SCHERTHAN, H., DOYE, V., RASCALOU, N. et NEHRBASS, U. (2000). Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature*, 403(6765):108–112.
- [Garini *et al.*, 2005] GARINI, Y., VERMOLEN, B. J. et YOUNG, I. T. (2005). From micro to nano : recent advances in high-resolution microscopy. *Current Opinion in Biotechnology*, 16:3–12.
- [Genovesio, 2005] GENOVESIO, A. (2005). *Une methode de poursuite de taches multiples : application a l'etude de la dynamique d'objets biologiques en microscopie 3D+T*. Thèse de doctorat, Université Paris V.
- [Gheissari et Bab-Hadiashar, 2003] GHEISSARI, N. et BAB-HADIASHAR, A. (2003). Model selection criteria in computer vision : are they different ? *In Proceedings VIIIth Digital Image Computing : Techniques and Applications*.
- [Ghosh et Webb, 1994] GHOSH, R. et WEBB, W. (1994). Automated detection and tracking of individual and clustered cell surface low density lipoprotein receptor molecules. *Biophysical Journal*, 66:1301–1318.
- [Gibson et Lanni, 1991] GIBSON, S. et LANNI, F. (1991). Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy. *Journal of the Optical Society of America A*, 8(10):1601–1613.
- [Goodman, 1985] GOODMAN, J. (1985). *Statistical Optics*. Wiley, New York.
- [Goodman, 1968] GOODMAN, J. W. (1968). *Introduction to Fourier optics*. McGraw-Hill.
- [Gu, 1996] GU, M. (1996). *Principles of Three-Dimensional Imaging in Confocal Microscopes*. World Scientific.
- [Gu, 2000] GU, M. (2000). *Advanced optical imaging theory*. Springer-Verlag, Berlin.
- [Haeberlé *et al.*, 2003] HAEBERLÉ, O., AMMAR, M., FURUKAWA, H., TENJIMBAYASHI, K. et TÖRÖK, P. (2003). The point spread function of optical microscopes imaging through stratified media. *Optics Express*, 11(22):2964–2969.
- [Harris et Stephens, 1988] HARRIS, C. et STEPHENS, M. (1988). A combined corner and edge detection. *In The Fourth Alley Vision Conference*, pages 147–151.
- [Hediger *et al.*, 2002] HEDIGER, F., NEUMANN, F. R., HOUWE, G. V., DUBRANA, K. et GASSER, S. M. (2002). Live Imaging of telomeres. yKu and Sir Proteins Define Redundant Telomere-Anchoring Pathways in Yeast. *Current Biology*, 12:2076–2089.
- [Heintzmann et FicZ, 2006] HEINTZMANN, R. et FICZ, G. (2006). Breaking the resolution limit in light microscopy. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 5(4):289–301.

- [Hell *et al.*, 1993] HELL, S., REINER, G., CREMER, C. et STELZER, E. (1993). Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index. *Journal of Microscopy*, 169:391–405.
- [Helstrom, 1964] HELSTROM, C. (1964). The detection and resolution of optical signal. *IEEE Transaction on Information Theory*, 10:1964.
- [Hiraoka *et al.*, 1990] HIRAOKA, Y., SEDAT, J. et AGARD, D. (1990). Determination of three-dimensional imaging properties of a light microscope system. *Biophysical*, 57:325–333.
- [Kay, 1993a] KAY, S. (1993a). *Fundamentals of Statistical Signal Processing : Detection Theory*. Prentice Hall.
- [Kay, 1993b] KAY, S. (1993b). *Fundamentals of Statistical Signal Processing : Estimation Theory*, volume 1. Prentice Hall.
- [Keller, 1995] KELLER, H. (1995). Objective lenses for confocal microscopy. In PAWLEY, J. B., éditeur : *Handbook of biological confocal microscopy*, pages 111–126. Plenum Press, New York, 2nd édition.
- [Kervrann et Boulanger, 2006] KERVRANN, C. et BOULANGER, J. (2006). Optimal spatial adaptation for patch-based image denoising. *IEEE Transaction on Image Processing*, 15:2866–2878.
- [Kervrann *et al.*, 2004] KERVRANN, C., LEGLAND, D. et PARDINI, L. (2004). Robust incremental compensation of the light attenuation with depth in 3d fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, 214:297–314.
- [Koester, 1980] KOESTER, C. (1980). Scanning mirror microscope with optical sectioning characteristic : Applications in ophthalmology. *Applied Optics*, 19:1749–1757.
- [Kozubek et Matula, 2000] KOZUBEK, M. et MATULA, P. (2000). An efficient algorithm for measurement and correction of chromatic aberrations in fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, 200:206–217.
- [Lebarbier et Mary-Huard, 2004] LEBARBIER, E. et MARY-HUARD, T. (2004). Le critère bic : fondements théoriques et interprétation. Rapport technique, Institut national de recherche en informatique et automatique.
- [Lidke *et al.*, 2005] LIDKE, K. A., RIEGER, B., JOVIN, T. M. et HEINTZMANN, R. (2005). Superresolution by localization of quantum dots using blinking statistics. *Optic Express*, 13(18):7052–7062.
- [Lindeberg, 1998] LINDBERG, T. (1998). Feature detection with automatic scale selection. *International Journal of Computer Vision*, 30:77–116.
- [Lucy, 1974] LUCY, L. (1974). An iterative technique for the rectification of observed distributions. *Astronomical Journal*, 79:745–754.
- [Mallat, 1989] MALLAT, S. G. (1989). A theory for Multiresolution Signal Decomposition : The Wavelet Representation. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 11:674–693.
- [Manders, 1997] MANDERS, E. M. M. (1997). Chromatic shift in multicolour confocal microscopy. *Journal of Microscopy*, 185:321–328.
- [Markham et Conchello, 2001] MARKHAM, J. et CONCHELLO, J. (2001). Artefacts in restored images due to intensity loss in 3d fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, 204:93–98.
- [Martin *et al.*, 2002] MARTIN, D. S., FORSTNER, M. B. et KAS, J. A. (2002). Apparent subdiffusion inherent to single particle tracking. *Biophysical Journal*, 83(4):2109–2117.
- [Maxwell, 1873] MAXWELL, J. (1873). *A treatise on electricity and magnetism*. Oxford.
- [McLachlan et Peel, 2000] MCLACHLAN, G. et PEEL, D. (2000). *Finite Mixture Models*. Wiley Series in probability and statistics.

-
- [McNally *et al.*, 1997] McNALLY, J., COGSWELL, J., FEKETE, P. et CONCHELLO, J.-A. (1997). Comparison of 3d microscopy methods by imaging a well characterized test object. In WILSON, T., éditeur : *Proceedings of SPIE, Three-dimensional Microscopy : Image Acquisition and Processing IV*.
- [Molenaar *et al.*, 2003] MOLENAAR, C., WIESMEIJER, K., P.VERWOERD, N., KHAZEN, S., EILS, R., J.TANKE, H. et W.DIRKS, R. (2003). Visualizing telomere dynamics in living mammalian cells using PNA probes. *The EMBO Journal*, 22:6631–6641.
- [Moraes *et al.*, 2007] MORAES, C., DUSCH, E., DUFOUR, A., DOSSIN, F., GENOVESIO, A. et FREITAS-JUNIOR, L. (2007). Transcription architecture and gene expression in plasmodium falciparum. In *XXIII Meeting of the Brazilian Society of Protozoology*, Caxambu, Brazil.
- [Ngoc *et al.*, 1997] NGOC, S. N., BRIQUET-LAUGIER, F., BOULIN, C. et OLIVO-MARIN, J.-C. (1997). Adaptive detection for moving biological objects in video microscopy sequences. In *Proceedings of the International Conference on Image Processing*, volume 3, pages 484–487.
- [Ober *et al.*, 2004] OBER, R. J., RAM, S. et WARD, E. S. (2004). Localization accuracy in single-molecule microscopy. *Biophysical Journal*, 86(2):1185–1200.
- [Olivo-Marín, 2002] OLIVO-MARIN, J.-C. (2002). Extraction of spots in biological images using multiscale products. *Pattern Recognition*, 35(9):1989–1996.
- [Olympus,] OLYMPUS. The olympus web site : Theory of confocal microscopy.
- [Patwardhan, 1997] PATWARDHAN, A. (1997). Subpixel position measurement using 1d, 2d and 3d centroid algorithms with emphasis on applications in confocal microscopy. *Journal of Microscopy*, 186:246–257.
- [Pawley, 2006a] PAWLEY, J. (2006a). *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer, New York, 3rd édition.
- [Pawley, 2006b] PAWLEY, J. (2006b). More than you ever really wanted to know about charge-coupled-device. In PAWLEY, J., éditeur : *Handbook of biological confocal microscopy*, pages 918–931.
- [Pawley, 1995] PAWLEY, J. B. (1995). *Handbook of Biological Confocal Microscopy - 2nd edition*. Plenum Press, New York.
- [Polak, 1971] POLAK, E. (1971). *Computational Methods in Optimization*, chapitre 2.3. New York : Academic Press.
- [Qu *et al.*, 2004] QU, X., WU, D., METS, L. et SCHERER, N. F. (2004). Nanometer-localized multiple single-molecule fluorescence microscopy. *PNAS*, 101(31):11298–11303.
- [Ram *et al.*, 2006] RAM, S., WARD, E. S. et OBER, R. J. (2006). Beyond rayleigh’s criterion : A resolution measure with application to single-molecule microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103:4457–4462.
- [Richards et Wolf, 1959] RICHARDS, B. et WOLF, E. (1959). Electromagnetic diffraction in optical systems. ii. structure of the image field in an aplanatic system. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 253:358–379.
- [Richardson, 1972] RICHARDSON, W. (1972). Bayesian-based iterative method of image restoration. *Journal of the Optical Society of America*, 62:55–59.
- [Rigaut et Vassy, 1991] RIGAUT, J. et VASSY, J. (1991). High-resolution 3d 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*, 13:223–232.
- [Ronchi, 1961] RONCHI, V. (1961). Resolving power of calculated and detected images. *Journal of the Optical Society of America*, 51:458–460.

- [Sage *et al.*, 2005] SAGE, D., NEUMANN, F. R., HEDIGER, F., GASSER, S. M. et UNSER, M. (2005). Automatic Tracking of Individual Fluorescence Particles : Application to the Study of Chromosome Dynamics. *IEEE Transactions on Image Processing*, 14(9):1372–1384.
- [Samson *et al.*, 2004] SAMSON, V., CHAMPAGNAT, F. et GIOVANNELLI, J.-F. (2004). Point target detection and subpixel position estimation in optical imagery. *Applied Optics*, 43:257–263.
- [Santos et Young, 2000] SANTOS, A. et YOUNG, I. (2000). Model-Based Resolution : Applying the theory in quantitative microscopy. *Applied Optics*, 39(17):2948–2958.
- [Sarder et Nehorai, 2006] SARDER, P. et NEHORAI, A. (2006). Deconvolution methods for 3-D fluorescence microscopy images. *IEEE Signal Processing Magazine*, 23(3):32–45.
- [Saxton et Jacobson, 1997] SAXTON, M. J. et JACOBSON, K. (1997). SINGLE-PARTICLE TRACKING : Applications to Membrane Dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 26:373–399.
- [Schmidt *et al.*, 2000] SCHMIDT, C., MOHR, R. et BAUCKHAGE, C. (2000). Evaluation of interest point detectors. *International Journal of Computer Vision*, 37:151–172.
- [Shahram et Milanfar, 2004] SHAHRAM, M. et MILANFAR, P. (2004). Imaging Below the Diffraction Limit : A Statistical Analysis. *IEEE Transactions on Image Processing*, 13(5):677–689.
- [Shahram et Milanfar, 2006] SHAHRAM, M. et MILANFAR, P. (2006). Statistical and information-theoretic analysis of resolution in imaging. *IEEE Transactions on Information Theory*, 52:3411–3437.
- [Shaw et Rawlins, 1991] SHAW, P. et RAWLINS, D. (1991). The point-spread function of a confocal microscope : its measurement and use in deconvolution of 3d data. *Journal of Microscopy*, 163:151–165.
- [Sheppard et Cosgwell, 1991] SHEPPARD, C. et COSGWELL, C. (1991). Effects of aberrating layers and tube length on confocal imaging properties. *Optik*, 87:34–38.
- [Sheppard et Matthews, 1987] SHEPPARD, C. et MATTHEWS, H. (1987). Imaging in high-aperture optical systems. *Journal of the Optical Society of America A*, 4(8):1354–1360.
- [Sheppard et Török, 1997] SHEPPARD, C. et TÖRÖK, P. (1997). Effects of specimen refractive index on confocal imaging. *Journal of microscopy*, 185(3):366–374.
- [Sheppard et Wilson, 1979] SHEPPARD, C. et WILSON, T. (1979). Effect of spherical aberration on the imaging properties of scanning optical microscopes. *Applied Optics*, 18:1058–1063.
- [Sheppard et Mao, 1988] SHEPPARD, C. J. R. et MAO, X. Q. (1988). Confocal microscopes with slit apertures. *Journal of Modern Optics*, 35(7):1169–1185.
- [Starck *et al.*, 2000] STARCK, J.-L., MURTAGH, F. et BIJAOU, A. (2000). *Image Processing and Data Analysis : the Multiscale Approach*. Cambridge University Press.
- [Stelzer, 1998] STELZER, E. (1998). Contrast, resolution, pixelation, dynamic range and signal-to-noise ratio : fundamental limits to resolution in fluorescence light microscopy. *Journal of Microscopy*, 189:15–24.
- [Stoica et Selén, 2004] STOICA, P. et SELÉN, Y. (2004). Model-order selection. *IEEE Signal Processing Magazine*, 21:36–47.
- [Tao et Nicholson, 1995] TAO, L. et NICHOLSON, N. (1995). The three dimensional point spread function of a microscope objective in image and object space. *Journal of Microscopy*, 178:267–271.
- [Thomann *et al.*, 2002] THOMANN, D., RINES, D., SORGER, P. et DANUSER, G. (2002). Automatic fluorescent tag detection in 3D with super-resolution : application to the analysis of chromosome movement. *Journal of Microscopy*, 208(1):49–64.

-
- [Thompson *et al.*, 2002] THOMPSON, R., LARSON, D. et WEBB, W. (2002). Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophysical Journal*, 82:2775–2783.
- [Tiedemann *et al.*, 2006] TIEDEMANN, M. V., FRIDBERGER, A., ULFENDAHL, M. et de MONVEL, J. B. (2006). Image adaptive point-spread function estimation and deconvolution for in vivo confocal microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 69:10–20.
- [Török et Varga, 1997] TÖRÖK, P. et VARGA, P. (1997). Electromagnetic diffraction of light focused through a stratified medium. *Applied Optics*, 39(11):2305–2312.
- [Tvarusko *et al.*, 1999] TVARUSKO, W., BENTELE, M., MISTELI, T., RUDOLF, R., KAETHER, C., SPECTOR, D., GERDES, H. et EILS, R. (1999). Time-resolved analysis and visualization of dynamic processes in living cells. *Cell Biology*, 96:7950 – 7955.
- [Valeur, 2004] VALEUR, B. (2004). *Invitation à la fluorescence moléculaire*. De boeck.
- [van den Bos, 1987] van den BOS, A. (1987). Optical resolution : an analysis based on catastrophe theory. *Journal of the Optical Society of America A*, 4:1402–1406.
- [van den Bos et den Dekker, 1996] van den BOS, A. et den DEKKER, A. (1996). Coherent model-based optical resolution. *Journal of the Optical Society of America*, 13:1667–1669.
- [van Kempen, 1999] van KEMPEN, G. M. (1999). *Image Restoration in Fluorescence Microscopy*. Thèse de doctorat, Advanced School for Computing and Imaging.
- [van Vliet, 1993] van VLIET, L. (1993). *Grey-scale measurements in multi-dimensional digitized images*. Thèse de doctorat, Delft University.
- [van Vliet et Verbeek, 1994] van VLIET, L. et VERBEEK, P. (1994). Better geometric measurements based on photometric information. In *IEEE Conference on Instrumentation and Measurement Technology*.
- [Verveer, 1998] VERVEER, P. J. (1998). *Computational and Optical Methods for Improving Resolution and Signal Quality in Fluorescence Microscopy*. Thèse de doctorat, Delft University of Technology.
- [Verveer *et al.*, 1999] VERVEER, P. J., GEMKOW, M. J. et JOVIN, T. M. (1999). A comparison of image restoration approaches applied to three-dimensional confocal and wide-field fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, 50-61:193.
- [Viola et Wells, 1997] VIOLA, P. et WELLS, W. M. (1997). Alignment by maximization of mutual information. *International Journal of Computer Vision*, 24(2):137–154.
- [Visser et Wiersma, 1991] VISSER, T. et WIERSMA, S. (1991). Spherical aberration and the electromagnetic field in high-aperture systems. *Journal of the Optical Society of America A*, 8:1404–1410.
- [Vonesch et Unser, 2007] VONESCH, C. et UNSER, M. (2007). Fast wavelet-regularized image deconvolution. In *IEEE International Symposium on Biomedical Imaging : From Nano to Macro*.
- [Voort et Strasters, 1995] VOORT, H. V. D. et STRASTERS, K. (1995). Restoration of confocal images for quantitative image analysis. *Journal of Microscopy*, 178(2):165–181.
- [Webb, 1996] WEBB, R. (1996). Confocal optical microscopy. *Reports on Progress in Physics*, 59(3): 427–471.
- [Widrow *et al.*, 1995] WIDROW, B., KOLLAR, I. et LIU, M. (1995). Statistical theory of quantization. *IEEE Transaction on Instrumentation and Measurement*, 45:353–361.
- [Wilson et Hancock, 1999] WILSON, R. C. et HANCOCK, E. (1999). Consistent topographic surface labelling. *Pattern Recognition Letters*, 32:1211–1223.
- [Wilson, 1995] WILSON, T. (1995). The role of the pinhole in confocal imaging system. In PAWLEY, J., éditeur : *Handbook of biological confocal microscopy*, pages 167–182. Plenum Press, New York, 2nd édition.

- [Wolf, 1951] WOLF, E. (1951). The diffraction theory of aberrations. *Reports on Progress in Physics*, 14:95–120.
- [Wolf, 1959] WOLF, E. (1959). Proceedings of the royal society of london. series a, mathematical and physical. *Sciences*, 253:349–357.
- [Wolleschensky *et al.*, 2005] WOLLESCHENSKY, R., ZIMMERMANN, B., ANKERHOLD, R. et KEMPE, M. (2005). High-speed scanning confocal microscope for the life sciences. In WILSON, T., éditeur : *Confocal, Multiphoton, and Nonlinear Microscopic Imaging II. Proceedings of the SPIE*, volume 5860, pages 87–94.
- [Yoo *et al.*, 2006] YOO, H., SONG, I. et GWEON, D. (2006). Measurement and restoration of the point spread function of fluorescence confocal microscopy. *Journal of Microscopy*, 221:172–176.
- [Young, 1989] YOUNG, I. (1989). Image fidelity : characterizing the imaging transfer function. *Methods in Cell Biology*, 30:1–45.
- [Zhang *et al.*, 2006] ZHANG, B., ENNINGA, J., OLIVO-MARIN, J.-C. et ZIMMER, C. (2006). Automated super-resolution detection of fluorescent rods in 2d. In *IEEE International Symposium on Biomedical Imaging : From Nano to Macro*.
- [Zhang *et al.*, 2007a] ZHANG, B., FADILI, M., STARCK, J.-L. et OLIVO-MARIN, J.-C. (2007a). Multiscale variance-stabilizing transform for mixed-poisson-gaussian processes and its application in bioimaging. In *IEEE International Conference on Image Processing*.
- [Zhang *et al.*, 2007b] ZHANG, B., ZERUBIA, J. et OLIVO-MARIN, J.-C. (2007b). Gaussian approximations of fluorescence microscope point-spread function models. *Applied Optics*, 46:1819–1829.
- [Zwier *et al.*, 2004] ZWIER, J. M., ROOIJ, G. J. V., HOFSTRAAT, J. W. et BRAKENHOFF, G. J. (2004). Image calibration in fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, 216:15–24.