

UNIVERSITÉ DE HAUTE ALSACE



THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : E.E.A

Déconvolution Adaptative en Microscopie Tridimensionnelle de Fluorescence

Présentée pour obtenir le titre de Docteur de l'Université de Haute-Alsace par

Bruno COLICCHIO

Cette thèse a été soutenue le — — — 2004.

Le jury était constitué de

René ALT (rapporteur)

Ernest HIRSCH (rapporteur)

Robert LUTZ

Eric JEANDIDIER

Olivier HAEBERLÉ

Serge JACQUEY (directeur)

à Stéphanie

REMERCIEMENTS

A faire

BRUNO COLICCHIO

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIÈRES	4
RÉSUMÉ	5
ABSTRACT	6
INTRODUCTION	9
1 Le microscope 3D de fluorescence	10
1.1 Le phénomène de la fluorescence	10
1.1.1 Spectres d'émission et d'absorption	11
1.1.2 Diminution de la fluorescence, photobleaching et phototoxicité	12
1.1.3 Durée de vie et efficacité quantique	13
1.2 Principe du microscope de fluorescence	13
1.2.1 Le microscope de fluorescence 3D conventionnel : technique des coupes sériées	15
1.2.2 Formation de l'image, calcul de la réponse impulsionnelle théorique, et caractérisation	16
1.2.3 Modèle de Gibson et Lanni	21
1.2.4 Profondeur de champ et résolution	23
1.3 Interprétation des images acquises, et amélioration de la mesure	24
1.3.1 Amélioration de la mesure par des moyens physiques	24
1.3.2 Amélioration de la mesure par la résolution de l'équation intégrale du modèle de formation d'image	27
1.4 Conclusions sur les contraintes de la microscopie de fluorescence	28
2 La déconvolution d'image en microscopie de fluorescence	30
2.1 Principes de la déconvolution d'image	30

2.2	Modèle déterministe de formation de l'image	31
2.3	Modèle statistique de formation de l'image	36
2.4	Difficultés et interprétation des résultats de déconvolutions	38
2.4.1	Sensibilité aux discontinuités dans les images	38
2.4.2	Problèmes d'acquisition des images expérimentales	39
2.5	Mauvaise caractérisation du système expérimental	40
2.5.1	Erreur sur l'estimation de l'indice de l'huile d'immersion	40
2.5.2	Erreur sur l'estimation de l'ouverture numérique	41
2.5.3	Influence de l'épaisseur de la lamelle.	43
2.5.4	Effet de la non-invariance spatiale de la PSF	46
2.6	conclusion	52
3	Optimisation des conditions de déconvolution	53
3.1	Détermination automatique du paramètre de déconvolution des algorithmes LLS et MAP	54
3.2	Pré-filtrage pour une régularisation optimale	59
3.2.1	Principe	59
3.2.2	Influence du filtrage	61
3.2.3	Application à des images biologiques en hémathologie	72
3.2.4	Application à des images acquises pour la cytogénétique	73
3.3	Conclusion	76
4	Déconvolution par méthode Monte-Carlo	77
4.1	Méthode de reconstruction par grains élémentaires	77
4.2	Utilisation du recuit simulé	81
4.3	Principe de la déconvolution Monte-Carlo en 1D	83
4.4	Implémentation en 1D	87
4.5	Extension de la méthode à la 2D	95
4.6	Extension de la méthode à la 3D	101
4.7	Conclusion	103
	CONCLUSION	104
	BIBLIOGRAPHIE	106

LISTE DES FIGURES 117

RÉSUMÉ

En biologie, le microscope de fluorescence a pris une place importante pour l'étude du fonctionnement des cellules vivantes. Cependant, les données issues des acquisitions en microscopie de fluorescence ne sont pas directement exploitables en vue de mesures quantitatives telles que la distribution spatiale des intensités ou les volumes des sites de fluorescence car ces données subissent des distorsions lors du processus d'acquisition. Pour effectuer des mesures fiables, il faut corriger ces distorsions.

La connaissance de la réponse impulsionnelle du microscope caractérisant l'instrument, permet d'envisager des corrections de l'image pour retrouver la scène originale. On réalise ainsi une déconvolution, le microscope réalisant une convolution de l'espace 'objet' vers l'espace 'image'. Pour des méthodes directes, des solutions ont été proposées, mais requièrent des connaissances de l'utilisateur pour le réglage de paramètres qui sont critiques, car ce problème inverse est "mal posé" et une étape de régularisation est nécessaire. Il y a deux tendances actuelles dans l'évolution des algorithmes de déconvolution 3D. La première est de faciliter l'utilisation de la déconvolution. La seconde tendance est de tenir compte dans les algorithmes de déconvolution de la possible non invariance du système optique, notamment selon l'axe optique.

La première partie de ce travail s'inscrit dans la première tendance en automatisant le choix des paramètres de régularisation des méthodes directes. L'objectif est de permettre une utilisation de routine de la déconvolution pour des non-spécialistes, permettant une constance des résultats ainsi qu'une stabilité accrue, écartant la subjectivité de l'utilisateur. Les méthodes directes ainsi automatisées ont été appliquées à des images de cytologie et de cytogénétique moléculaire. Cependant, les déconvolutions nécessitent une bonne caractérisation du système, et une étude sur les paramètres susceptibles de varier entre plusieurs acquisitions est présentée. La seconde partie de cette thèse s'inscrit dans la seconde tendance, en proposant un algorithme permettant la prise en compte de la non invariance du système.

Le mémoire s'articule autour de quatre chapitres. Le premier chapitre introduit le principe de la microscopie de fluorescence, et le modèle permettant le calcul d'une réponse impulsionnelle optique utilisée. Le deuxième chapitre présente les algorithmes de déconvolution qui sont utilisés dans cette thèse, et les formalismes liés à ceux-ci, ainsi qu'une étude sur l'effet de la non invariance de la réponse impulsionnelle du système d'acquisition sur les résultats de la déconvolution et l'influence de l'utilisation d'une psf mal estimée. Le troisième chapitre présente l'automatisation et l'amélioration de la stabilité des méthodes de déconvolutions directes, permettant une utilisation de routine par des opérateurs non spécialistes de la déconvolution. L'effet du pré-filtrage est étudié à partir de simulations, avec un filtre de Wiener permettant d'améliorer les résultats de plusieurs méthodes de déconvolutions. Des applications à des images en cytologie et en cytogénétique sont présentées. Le quatrième chapitre présente un nouvel algorithme de déconvolution basé sur le processus de formation d'images, qui permet de tenir compte d'une variation de la réponse du système dans l'espace. Par une approche Monte Carlo, la solution est calculée par essais successifs aléatoires, en suivant une distribution de probabilité qui est fonction de l'erreur de biais entre l'estimation dans le plan 'image' et l'image observée. La solution est obtenue en minimisant, par un algorithme de recuit simulé, une fonction d'erreur dans l'espace 'image', avec contraintes sur le voisinage dans l'espace 'objet'.

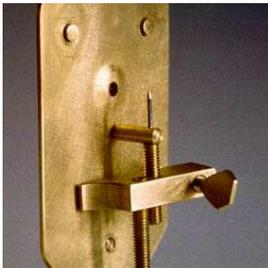
ABSTRACT

A short abstract of the thesis

INTRODUCTION

LA plus ancienne lentille de verre poli date du 7^e siècle AV J.C, retrouvée à Ninive, ancienne Assyrie, au Kurdistan. Dans l'antiquité, les romains utilisaient des moyens grossissant tels que des boules de verre remplies d'eau comme le mentionnait Sénèque, précepteur de Néron. Ce dernier utilisait des émeraudes taillées en lentilles concaves pour mieux voir... Il faudra attendre la fin du 16^e siècle pour voir l'invention du microscope composé, dont la vraisemblable paternité revient à Zacharias et Hans JANSEN à Middleburg en Hollande vers 1595. Anton VAN LEEUWENHOEK utilisa un microscope à une seule lentille pour l'étude des bactéries. La parution en 1665 de l'ouvrage MICROGRAPHIA, par Robert HOOKE, muni d'un microscope composé, confirma les travaux de VAN LEEUWENHOEK et attira l'attention sur cet instrument en tant qu'outil pour la recherche scientifique. Au 19^e siècle, la correction des aberrations sphériques et chromatiques, les perfectionnements dans la fabrication des lentilles et des éléments mécaniques permirent de donner au microscope une forme presque définitive.

Depuis son invention, le microscope optique a montré son intérêt dans des champs d'applications aussi variés que la biologie, la physique des matériaux, et même dans l'industrie de la micro-électronique. De nombreux types de microscopes ont été développés pour satisfaire les besoins toujours plus pointus en imagerie. Sont ainsi apparus les microscopes en transmission ou en réflexion suivant la nature de l'objet observé, les microscopes en lumière polarisée, les microscopes à contraste de phase.



Dans le domaine de la biologie, une des évolutions marquante pour l'étude des cellules du vivant est le microscope de fluorescence qui permet la détection de zones spécifiques qui sont celles qui présenteront une fluorescence. Pour ce type de microscopie, on observe uniquement des zones qui émettent de la fluorescence, ce qui permet donc des études localisées mettant en jeu des phénomènes biologiques. On a ainsi développé une immense variété de sondes et de marqueurs spécifiques à des zones ou fonctions cellulaires, ou encore à l'étude des gènes en génétique moléculaire. Pour mieux comprendre la répartition des marqueurs, l'acquisition d'un spécimen en trois dimensions a suscité un grand intérêt dans la communauté des biologistes. Une acquisition tridimensionnelle d'un spécimen est de plus possible en réalisant des acquisitions successives de sections optiques. Enfin, l'utilisation de l'ordinateur pour reconstruire le volume a

étendu les possibilités qu'offre la microscopie dans l'étude des spécimens biologiques, et de leur fonctionnement. Cependant, les images ainsi obtenues présentent une limitation du pouvoir de séparation, en raison du processus de formation d'image lui-même. Deux voies d'améliorations ont été explorées. La première voie, matérielle, a donné par exemple naissance à la microscopie confocale, dont les fondements datent de 1957 avec le brevet de Marvin MINSKY. La seconde voie a été d'utiliser un modèle mathématique pour formaliser le processus de formation d'image et de se servir de ce modèle pour tenter de résoudre le problème inverse. Dès les années 70, on voit apparaître les premiers algorithmes de restauration utilisés dans de nombreux domaines. Depuis lors, des améliorations ont été apportées en tenant compte des spécificités propres aux mécanismes de formation des images dans les différentes disciplines.

Dans le domaine de la microscopie de fluorescence, le laboratoire MIPS a entrepris depuis une dizaine d'années des travaux de recherche, tant dans la modélisation et la caractérisation instrumentale, que dans l'étude des algorithmes de déconvolution en microscopie de fluorescence. Une thèse¹ soutenue en 1997 présentait des résultats comparant différents algorithmes de déconvolution. Il apparut clairement que chaque algorithme convient spécifiquement à un certain type d'images ou d'applications, car le résultat est forcément le fait d'un compromis entre stabilité et amélioration de la résolution. Les déconvolutions directes sont sensibles aux paramètres de régularisation, et nécessitent une bonne caractérisation du système. Les algorithmes directs, plus rapides, sont souvent moins précis que les méthodes itératives. Mais celles-ci nécessitent souvent un temps de calcul qui peut empêcher tout traitement d'un nombre important d'images, malgré les progrès du matériel informatique. Cette thèse poursuit l'étude d'Alain Chomik tout en s'inscrivant dans un projet plus large. En effet, il y a actuellement deux tendances actuelles dans l'évolution des algorithmes de déconvolution.

La première est de faciliter l'utilisation de la déconvolution. Parmi ces travaux, beaucoup s'intéressent à la restauration d'image sans tenir compte de l'influence d'une mauvaise caractérisation du système optique. Sans mesure préalable pour caractériser la réponse impulsionnelle du système, la déconvolution est dite 'aveugle'. En partant d'une connaissance partielle du système, la déconvolution est alors dite 'myope'.

La seconde tendance est de tenir compte dans les algorithmes de déconvolution de la possible non invariance du système optique, notamment selon l'axe optique.

Une partie du travail présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans la première tendance. Cependant, plutôt que de proposer une déconvolution aveugle, nous proposons une automatisation des choix des paramètres de méthodes directes : l'objectif est de permettre une utilisation plus facile des méthodes de déconvolution.

Une autre partie de cette thèse s'inscrit dans la seconde tendance, en proposant un algorithme permettant la prise en compte de la non invariance du système. Nous avons suggéré l'utilisation d'une méthode Monte-Carlo, visant à une reconstruction simultanée de l'espace

¹[Chomik, 1997]

objet et de l'espace image, effectuée en accumulant des éléments de bases de chaque espace à des positions choisies aléatoirement. La reconstruction se base sur la minimisation d'une fonction d'erreur entre l'image acquise et son estimation, avec une contrainte de voisinage dans l'espace objet reconstruit. La minimisation est assurée par une technique de recuit simulé.

Le premier chapitre du mémoire introduit la microscopie de fluorescence et les modèles permettant le calcul d'une réponse impulsionnelle optique d'un microscope. Nous y abordons les problèmes liés à l'acquisition, ainsi que les pré-traitements qui peuvent être nécessaires. Le deuxième chapitre présente les algorithmes de déconvolution qui sont utilisés dans cette thèse, les formalismes liés à ceux ci, ainsi qu'une étude sur l'effet de la non invariance de la réponse impulsionnelle du système d'acquisition sur les résultats de la déconvolution. Le troisième chapitre présente l'automatisation et l'amélioration de la stabilité des méthodes de déconvolution directes, permettant une utilisation de routine par des opérateurs non spécialisés. Le quatrième chapitre présente un nouvel algorithme de déconvolution basé sur le processus de formation d'image, qui permet de tenir compte d'une variation de la réponse du système dans l'espace. Cette approche, coûteuse en temps de calcul, fonctionnant avec l'hypothèse de l'invariance ou celle de la non invariance, peut venir compléter la panoplie d'outils en proposant des résultats plus fins que ceux des algorithmes linéaires à inversion directe.

1 | LE MICROSCOPE TRIDIMENSIONNEL DE FLUORESCENCE : PRINCIPES ET LIMITATIONS

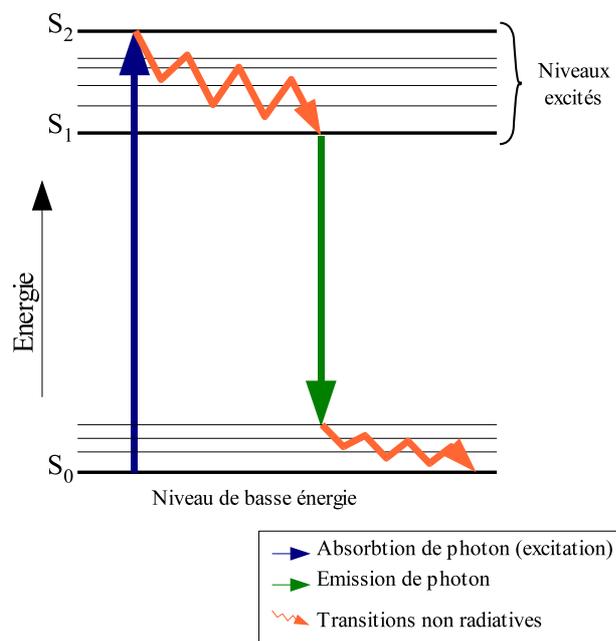
“Si vous ne pouvez expliquer un concept à un enfant de six ans, c’est que vous ne le comprenez pas complètement”

ALBERT EINSTEIN

POUR étudier à l’échelle microscopique des cellules vivantes dont des zones d’intérêt ont été marquées par des molécules fluorescentes, les biologistes se sont fortement intéressés à la microscopie de fluorescence tridimensionnelle. La grandeur mesurée pour former l’image est un signal généré en réponse à une stimulation lumineuse, la fluorescence. Une brève description du phénomène permettra de mieux comprendre le mécanisme de formation d’images dans le microscope de fluorescence. Les contraintes et les limitations liées à ce type d’instrument seront abordées pour sensibiliser le lecteur aux difficultés qui seront rencontrées lors de la restauration d’images présentée dans le troisième chapitre.

1.1 Le phénomène de la fluorescence

Le phénomène appelé “fluorescence” fait parti d’un ensemble de phénomènes lumineux appelés “photoluminescence” lui même appartenant à l’ensemble des phénomènes de luminescence (cet ensemble regroupe la radioluminescence, l’électroluminescence, la chimioluminescence, la bioluminescence, la thermoluminescence, et la photoluminescence). Sous certaines conditions, les molécules fluorescentes -ou fluorochromes- possèdent des électrons qui, sous l’effet d’un apport de photons, peuvent passer dans des niveaux supérieurs d’énergie. Pour revenir à son état bas, la molécule doit perdre cette même quantité d’énergie. Une partie seulement est retransmise en émission photonique. Selon la durée séparant l’absorption de la ré-émission,



[FIGURE. 1.1 | Diagramme de Jablonski d'un fluorophore organique : Après excitation du niveau de repos S_0 vers le niveau S_2 , il y a relaxation avec perte d'énergie vibrationnelle de S_2 vers le niveau S_1 . La fluorescence met en jeu la désexcitation radiative de S_1 vers l'un des niveaux de base.

on parlera de fluorescence si cette durée est faible, et de phosphorescence si cette durée est plus importante. Le reste de l'énergie non émise sous forme photonique est dissipée par émission de chaleur.

En conséquence, l'énergie émise sous forme lumineuse est inférieure à l'énergie d'excitation et la longueur d'onde d'émission est donc plus élevée, car $E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}$, on parle de déplacement de Stokes ou Stokes shift. La figure 1.1 est un diagramme qui décrit les niveaux d'énergie concernés dans un processus d'émission et d'excitation d'un fluorophore tel que l'a formalisé Jablonski¹.

1.1.1 Spectres d'émission et d'absorption

Un fluorochrome sera donc caractérisé par son spectre d'excitation et son spectre d'émission comme le montre l'exemple en figure 1.2. Cette propriété permet, par le biais de filtres, d'identifier les sites fluorescents marqués. En choisissant bien les fluorochromes, il est également possible d'observer différents spectres d'émissions et de réaliser un marquage multiple sur un même spécimen afin d'observer plusieurs zones d'intérêts. On parlera de fluorescence endogène pour la fluorescence de molécules

¹[Jablonski, 1935]

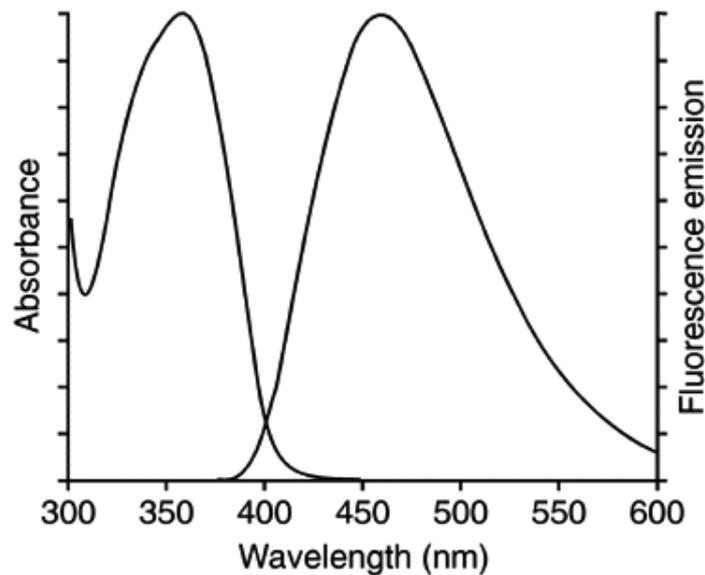


FIGURE. 1.2 | *Spectres d'émission et d'excitation du fluorochrome DAPI* : La molécule DAPI est utilisée dans le marquage de noyaux cellulaires, pour le marquage ADN. Cette molécule émet dans le bleu, avec un pic à 461nm (Source Molecular Probes[©])

présentes naturellement dans le spécimen considéré. Dans le cas contraire, lorsque qu'un produit fluorescent (solution de fluorochromes) est introduit dans le spécimen pour l'observation, on parlera de fluorescence exogène.

1.1.2 Diminution de la fluorescence, photobleaching et phototoxicité

Dans certaines conditions, les états excités de la molécule fluorescente peuvent entrer en résonance avec ceux d'une autre molécule, avec pour conséquence un transfert d'énergie. Ce transfert d'énergie, quand il a lieu, peut provoquer la fluorescence de la deuxième molécule et on parle de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Sinon cette énergie est dissipée de façon non-radiative. Dans tous les cas, ce transfert a toujours pour effet de diminuer la fluorescence de la première molécule. On dit qu'il y a quenching, c'est à dire un affaiblissement réversible du signal de fluorescence.

Dans leur état excité, les molécules sont souvent chimiquement beaucoup plus réactives et il est possible qu'elles interagissent avec des molécules proches. L'énergie d'activation est alors dissipée dans une réaction avec un agent (de l'oxygène par exemple).

Il ne peut donc plus y avoir émission de fluorescence et cette perte de fluorescence

est souvent irréversible. On appelle ce phénomène le blanchiment du fluorochrome ou bleaching (on parle aussi de fading). Les variations de Ph, de température ou encore la présence d'ions influencent ces deux derniers phénomènes. Un moyen de limiter le photobleaching est de diminuer l'excitation.

1.1.3 Durée de vie et efficacité quantique

Deux paramètres sont importants². Le premier est la durée de vie du fluorophore. Cette valeur est notamment utilisée pour un type de microscopie appelé "fluorescence lifetime-resolved imaging microscopy", car la durée de vie de fluorescence est un paramètre donnant une information discriminante et permettant la différenciation de sites d'intérêts.

Le second paramètre est le rendement quantique de fluorescence moléculaire ϕ_f (quantum yield), qui est le rapport entre le nombre molécules fluorescentes et le nombre total de molécules. Lorsque la concentration de fluorophore est faible, l'intensité de la fluorescence sera proportionnelle à la durée d'exposition. Pour des concentrations de fluorophores plus élevées, la relation cessera d'être linéaire en raison du phénomène d'auto-désactivation durant lequel des molécules réabsorbent la fluorescence émise par d'autres³.

1.2 Principe du microscope de fluorescence

Le microscope conventionnel est largement utilisé pour imager les spécimens fluorescents. Cette thèse s'intéresse donc principalement à ce type d'instrumentation. Les améliorations apportées par les microscopes confocal et bi-photon seront décrites plus tard au paragraphe décrivant les moyens d'améliorations matérielles du pouvoir de séparation. Dans son principe, le microscope de fluorescence est très proche du microscope optique classique. Il n'en diffère que dans l'utilisation des propriétés de la fluorescence, et donc par la présence de filtres d'excitation et d'émission. Le filtre d'excitation permet d'obtenir la stimulation aux longueurs d'ondes spécifiques au fluorophore, à partir d'une lumière blanche (lampe à arcs). Le filtre d'émission, placé à la détection, permet de visualiser uniquement la lumière émise par le spécimen. La figure 1.3 montre le microscope dont dispose le laboratoire, avec en superposition les trajets optiques du système d'éclairage, d'excitation et de détection en fluorescence.

²[Kasha, 1950], [Lakowicz, 1999]

³[Skoog *et al.*, 1997]

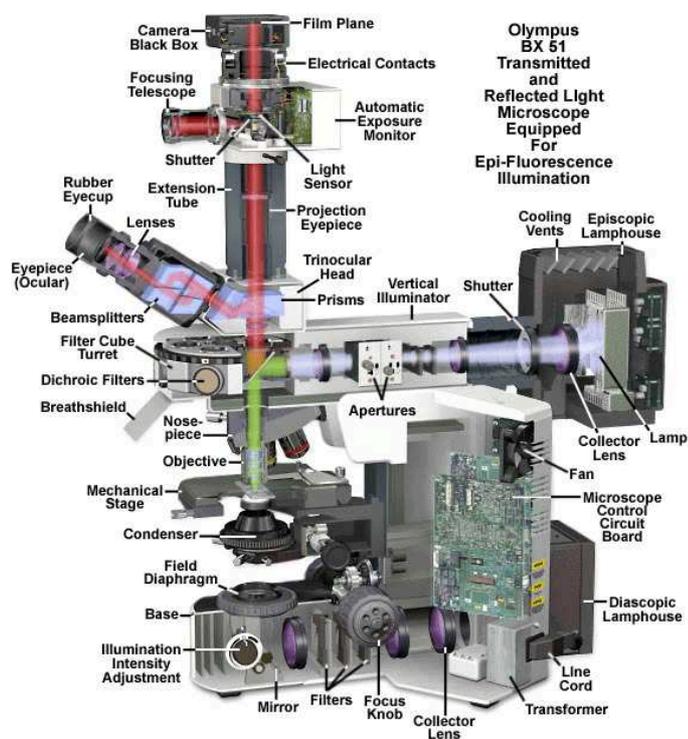


FIGURE. 1.3 | *Microscope Olympus BX51* : Microscope utilisé pour acquérir les spécimens présentés dans les applications biologiques de ce travail de thèse.

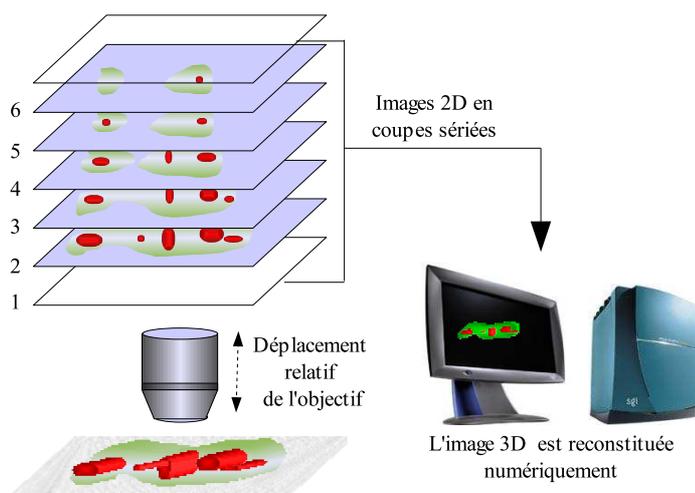


FIGURE. 1.4 | *Schéma d'un système d'acquisition par coupes sériées* : Il est constitué d'un microscope de fluorescence équipé d'un mécanisme de déplacement sur l'axe optique et d'un capteur permettant de former une image numérique. L'ensemble du pilotage et de l'acquisition se fait à partir de la station informatique qui accompagne cet équipement.

1.2.1 Le microscope de fluorescence 3D conventionnel : technique des coupes sériées

Par construction, le microscope de fluorescence est un instrument fait pour prendre des images en deux dimensions. L'objet biologique, marqué par des fluorophores, est éclairé par une lumière monochromatique et le fluorophore localisé à des zones spécifiques émet une lumière à une longueur d'onde plus élevée. La lumière émise par l'objet est séparée de la lumière incidente par un miroir dichroïque. Par déplacement du plan focal à travers le spécimen, il est possible d'acquérir une pile d'images 2D permettant de former une image en trois dimensions. C'est la technique des coupes sériées (Computational Optical Sectioning Microscopy).

On peut effectuer ce balayage axial soit en déplaçant l'objet via une platine motorisée, soit en déplaçant l'objectif par rapport au spécimen, généralement à l'aide d'un élément piézo-électrique. La figure 1.4 présente le schéma d'un microscope de fluorescence classique permettant l'acquisition par coupes sériées.

Pour chaque coupe, un obturateur (shutter) placé devant la lampe permet de contrôler la durée d'excitation. L'émission de fluorescence est récupérée par un capteur CCD puis transférée à l'ordinateur qui construit une pile d'images permettant la visualisation tridimensionnelle du spécimen. Une visualisation à l'oculaire est possible pour le cadrage du spécimen et la mise au point.

Cette technique permet d'obtenir l'image en trois dimensions d'un spécimen vivant transparent dont on a marqué des zones d'intérêts. Cependant, l'image ainsi ac-

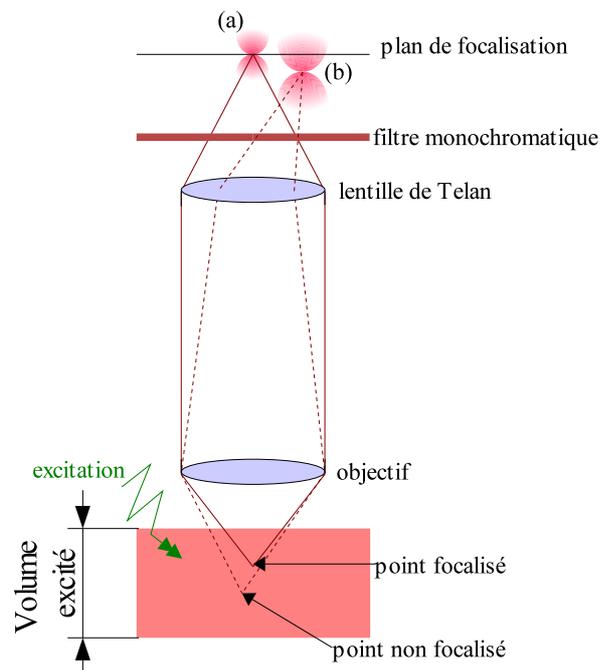


FIGURE. 1.5 | *Focalisation et lumière hors-focus* : L'image d'une source ponctuelle parfaite est vue à travers le microscope de manière déformée. Une partie de la lumière est hors-focus et s'étale dans d'autres plans. Pour une acquisition tridimensionnelle, on retrouve de la lumière provenant d'autres plans contenus dans le volume d'excitation (par exemple le plan qui contient le point (b)), qui se retrouve en partie présente dans le plan focal où se trouve le point (a). Les intensités provenant de sources ponctuelles sont donc mélangées.

quise est floutée, car les contributions des coupes non focalisées s'ajoutent à celles du plan focal. Concrètement, cela signifie que l'image d'un point n'est pas vue comme une source ponctuelle, mais s'accompagne d'un étalement de l'intensité. De la lumière est hors-focus, et se retrouve dans des plans voisins (voir figure 1.5). L'analyse de cette image est donc surtout qualitative, la distribution des intensités étant mélangée par le processus de formation d'image.

1.2.2 Formation de l'image, calcul de la réponse impulsionnelle théorique, et caractérisation

La formation d'une image tridimensionnelle peut être formalisée par une convolution de l'espace comportant les intensités objets $f(x,y,z)$, avec la réponse impulsionnelle du système optique $h(x,y,z)$:

$$g(x,y,z) = h(x,y,z) \otimes f(x,y,z) \quad (1.1)$$

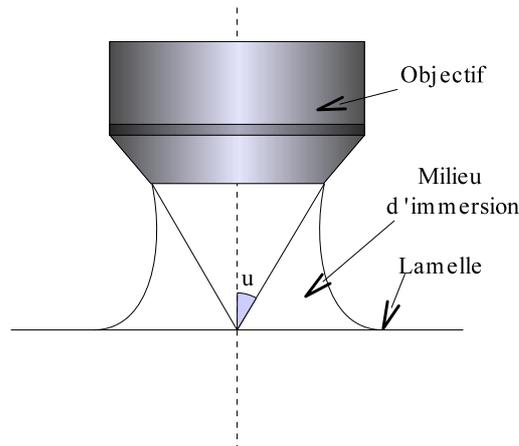


FIGURE. 1.6 | Ouverture Numérique d'un objectif : l'ouverture numérique (Numerical Aperture) est définie par $NA = n \cdot \sin(u)$, avec n , l'indice de réfraction du milieu d'immersion, et u , le demi-angle d'ouverture de l'objectif.

Cependant, un terme de bruit $n(x,y,z)$ intervient, combinant dans notre cas un bruit à statistique poissonnienne (dû à la détection des photons sur le capteur), un bruit à statistique gaussienne (pour l'électronique, et le bruit numérique), donnant finalement :

$$g(x,y,z) = h(x,y,z) \otimes f(x,y,z) + n(x,y,z) \quad (1.2)$$

la mesure effectuée par le capteur étant discrète, l'équation se réécrit donc :

$$g(x,y,z) = \sum_{i=0}^{L_x} \sum_{j=0}^{L_y} \sum_{k=0}^{L_z} h(x-i, y-j, z-k) \cdot f(x,y,z) + n(x,y,z) \quad (1.3)$$

L'équation (1.1) montre que si $f(x)$ est un pic de Dirac, on obtient l'image de $h(x)$. Pour caractériser le système optique, on observe donc l'image tridimensionnelle d'une source ponctuelle de lumière. Cette image appelée PSF (Point Spread Fonction / Fonction d'étalement ou réponse impulsionnelle en français) n'est jamais l'image d'un point, car l'ouverture de la lentille étant finie (voir figure 1.6), elle ne collecte pas l'intégralité de la lumière et la source ponctuelle est étalée en forme de double cône dans l'espace. La figure 1.7 présente une image de PSF dans des conditions réelles d'observation. L'image d'un point n'est donc pas un point, l'intensité est étalée dans l'espace.

La mesure de la PSF d'un système optique permet de déterminer la qualité de l'instrumentation. Idéalement, on doit observer une symétrie en Z (l'axe optique) et une symétrie circulaire des anneaux de diffraction. Lorsque des aberrations optiques (milieux, miroir dichroïque, lentilles) existent, on retrouve une dissymétrie dans la

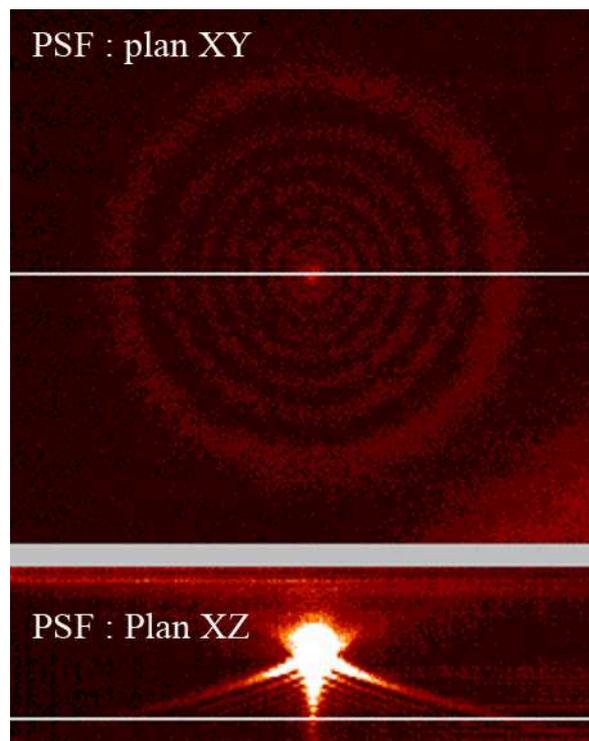


FIGURE. 1.7 | *PSF 3D réelle* : l'image est formée en observant une bille de latex de $0,2\mu\text{m}$ de diamètre : cette source ponctuelle est utilisée comme un pic de Dirac. L'image formée est donc la réponse impulsionnelle du microscope. On observe dans un plan XY les anneaux de diffraction qui modulent la structure en double cône visible dans un plan XZ

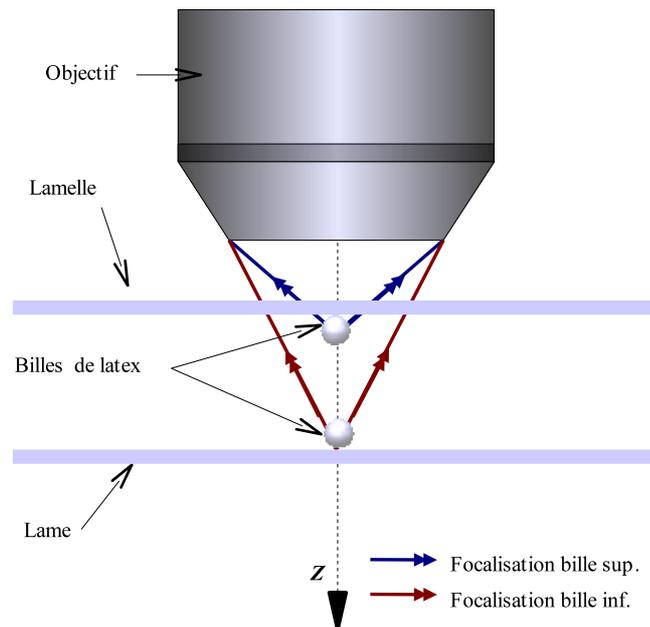


FIGURE. 1.8 | *Mesure de PSF* : Pour mesurer la réponse impulsionnelle du microscope, on peut fixer des billes sous la lamelle ou bien sur la lame (la bille ne doit pas bouger pendant l'acquisition). L'image d'une bille ainsi observée représentera la réponse impulsionnelle du microscope

réponse impulsionnelle optique. La mesure de la PSF est possible en pratique, en observant des billes de latex fluorescentes qui ont une taille proche de la limite de résolution du système, jouant le rôle de pic de Dirac (figure 1.8).

Cependant, cette mesure est limitée, car le signal est parfois très faible par rapport au bruit. On préfère donc parfois utiliser un modèle permettant le calcul théorique de la PSF. Si l'avantage principal est l'absence de bruit, le défaut de cette approche théorique est de ne pas tenir compte de la nature souvent très complexe du système d'acquisition. Le groupe LABEL du laboratoire MIPS de l'Université de Haute-Alsace s'est attaché à chercher des méthodes permettant de réunir les avantages de la mesure et du calcul théorique⁴.

L'analyse de la PSF nous permet de bien comprendre la déformation induite par le système optique. Si on considère le dispositif de mesure comme un filtre, on peut rattacher la notion de convolution à la transformation qui lie les données mesurées aux données originales, et la transformation inverse à la déconvolution, présentée dans le troisième chapitre. Ce lien, dans l'étude des filtres, est une fonction de transfert qui caractérise le dispositif de mesure et qui lie la sortie de ce système à son entrée.

Dans notre cas, pour caractériser le système optique, on le décrit par sa fonction de

⁴[Haeberlé *et al.*, 2001b]

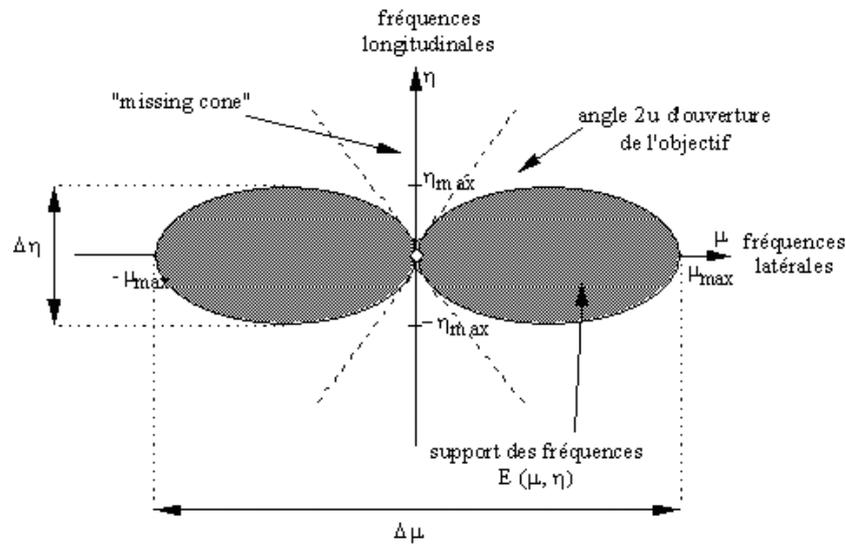


FIGURE. 1.9 | *OTF du microscope conventionnel* : Le support de l'OTF 3D est borné par la bande passante $(\Delta\mu, \Delta\eta)$. Les images vues à travers le microscope perdent les hautes fréquences dans leurs spectres. Il y a de plus un cône dans lequel les fréquences sont coupées : la résolution selon l'axe optique est donc moins bonne que la résolution latérale.

transfert optique, l'OTF (Optical Transfer Function). Par définition, l'OTF est la transformée de Fourier de la réponse impulsionnelle optique. On peut cependant étudier les caractéristiques principales de cette OTF à l'aide d'un modèle très simple proposé par Streibl⁵ pour en comprendre les limites. Dans ce modèle, les fréquences spatiales ω_x , ω_y et ω_z de l'objet doivent satisfaire l'équation :

$$\omega_x^2 + \omega_y^2 + \omega_z^2 = k^2 \quad (1.4)$$

Les objectifs ayant une ouverture numérique finie, toutes les fréquences latérales ne sont pas transmises et la résolution est donc limitée. Les fréquences transmises obéissent donc à la contrainte suivante :

$$\omega_x^2 + \omega_y^2 < 2 \cdot \pi \cdot \mu_{\max} \quad (1.5)$$

où μ_{\max} est la fréquence de coupure latérale. Pour une excitation ponctuelle, on obtient alors dans le modèle de Streibl que le support de l'OTF est donnée par la convolution de deux sphères définies par l'équation (1.4) avec la contrainte (1.5) La figure 1.9 représente le support 3D de l'OTF obtenu avec ce modèle simplifiée. On remarque

⁵[Streibl, 1984a]

la présence d'un cône de fréquences manquantes selon l'axe z . Ces fréquences non transmises selon l'axe z , qui forment ce qu'on appelle le "missing cone", vont entraîner une forte déformation de l'image (élongation) selon ce même axe. L'ouverture de ce cône est directement lié à l'ouverture numérique de l'objectif utilisé. D'autre part, les fréquences sont non séparables et de ce fait, une déconvolution 2D ou 3D ne peut être traitée comme une succession de déconvolutions selon chaque axe, mais doit être effectuée de manière globale.

1.2.3 Modèle de Gibson et Lanni

Cette première approche n'est pas suffisante pour calculer la réponse impulsionnelle théorique du microscope. De nombreux auteurs se sont intéressés à la modélisation et l'étude des effets des changements d'indices sur la PSF⁶. Gibson et Lanni⁷ ont proposé un modèle de formation d'images basé sur la diffraction scalaire. Ce modèle a l'avantage de sa simplicité d'utilisation, car il fait apparaître clairement les différentes composantes du système optique considéré, et peut aussi être utilisé pour calculer les PSF des microscopes confocaux et bi-photon. La PSF est calculée selon la relation suivante :

$$\text{PSF}(x_d, y_d, z_d) = \left| \frac{C}{z_d} \int_0^1 J_0 \left(ka\rho \frac{\sqrt{x_d^2 + y_d^2}}{z_d} \right) \exp \{iW(\rho)\} \rho d\rho \right|^2 \quad (1.6)$$

où C est une amplitude complexe constante, x_d, y_d, z_d sont les coordonnées du point d'observation, $W(\rho)$ est un terme de phase décrivant les différences de chemins optiques entre les conditions idéales préconisées par le constructeur, et les conditions réelles d'observation. Le terme a représente le rayon de l'ouverture limitante de l'objectif, projeté dans le plan focal arrière tel que $0 < \rho < 1$. Le montage considéré dans le modèle de Gibson et Lanni est constitué par le spécimen observé, la lamelle, le milieu d'immersion de l'objectif et l'objectif lui-même. Le modèle fait donc intervenir plusieurs paramètres optiques, avec leurs valeurs standard telles que préconisées par le constructeur, et leurs valeurs réelles, ainsi que des paramètres spécifiques à l'acqui-

⁶[Sheppard et Cogswell, 1991],[Hell et al., 1993],[Jacobsen et al., 1994],[Sheppard et Török, 1997],[Török et al., 1997]

⁷[Gibson et Lanni, 1989]

tion (taille et échantillonnage en x, y et z). On obtient pour le terme de phase⁸ :

$$\begin{aligned}
\frac{W(\rho)}{2\pi} \approx & n_{oil}\Delta z \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_{oil}}\right)^2} + n_s t_s \left(\sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_s}\right)^2} - \left(\frac{n_s}{n_{oil}}\right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_{oil}}\right)^2} \right) \\
& + n_g t_g \left(\sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_g}\right)^2} - \left(\frac{n_{oil}}{n_g}\right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_{oil}}\right)^2} \right) \\
& - n_{g^*} t_{g^*} \left(\sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_{g^*}}\right)^2} - \left(\frac{n_{oil}}{n_{g^*}}\right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_{oil}}\right)^2} \right) \\
& - n_{oil^*} t_{oil^*} \left(\sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_{oil^*}}\right)^2} - \left(\frac{n_{oil}}{n_{oil^*}}\right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA\rho}{n_{oil}}\right)^2} \right)
\end{aligned} \tag{1.7}$$

avec :

- θ : angle de propagation aux interfaces
- t_s : profondeur de l'objet sous la lamelle.
- n_s : indice de réfraction du milieu dans lequel se trouve l'objet.
- t_g : épaisseur de la lamelle.
- n_g : indice de réfraction de la lamelle.
- t_i : épaisseur du milieu d'immersion.
- n_i : indice de réfraction du milieu d'immersion.
- n : indice de réfraction de la lentille frontale de l'objectif.
- $*$: épaisseurs et indices de réfractions dans les conditions standard.

⁸[McNally *et al.*, 1999]

Ce terme de phase permet de calculer la PSF dans des conditions non standard. La PSF est souvent supposée invariante selon l'axe optique, ce qui peut être une bonne approximation s'il n'y a pas de sauts d'indices élevés entre les milieux, et sur une épaisseur limitée. Cependant cette approximation peut avoir des effets catastrophiques dans d'autres cas, abordés dans le chapitre suivant.

1.2.4 Profondeur de champ et résolution

Les données que nous obtenons sont discrètes car pour constituer une image 3D, il faut effectuer un déplacement le long de l'axe optique z d'un certain pas, et le capteur qui construit l'image est une matrice CCD (ou un photomultiplicateur pour le confocal). Pour permettre une bonne restauration de l'image, il est important d'échantillonner correctement cette image⁹. Nous utilisons donc le théorème de Shannon : la fréquence d'échantillonnage doit être au minimum le double de la fréquence maximale du spectre du signal étudié. Réécrit dans l'espace image, ce critère s'exprime en termes de profondeur de champ et de résolution latérale du microscope. La profondeur de champ d'un objectif peut être exprimée par¹⁰

$$D = \frac{\lambda}{4n \sin^2(\alpha/2)} \text{ avec } \alpha = \sin^{-1}(NA/n) \quad (1.8)$$

Cette profondeur de champ représente la distance physique le long de l'axe optique à travers laquelle le spécimen biologique fluorescent observé se trouve focalisé¹¹. Nous pouvons également écrire pour les pas d'échantillonnage¹² :

$$\delta z = \frac{\lambda}{\tan(\alpha)^2} \quad (1.9)$$

$$\delta x = \frac{\lambda}{4 \cdot \tan(\alpha)} \quad (1.10)$$

Pour notre objectif à immersion d'huile X100, $NA = 1,25$ et $n = 1,515$ nous avons une profondeur de champ $D = 0,4\mu m$ pour $\lambda = 530nm$. Avec les caractéristiques de notre objectif et pour $\lambda = 530nm$, nous obtenons alors un pas d'échantillonnage théorique de $dz = 0,248\mu m$ et $dx = dy = 0,09\mu m$. En pratique, nous avons : $\delta z = 0,25\mu m$ et $\delta x = \delta y = 0,068\mu m$.

⁹[Lanni et Baxter, 1992]

¹⁰[Inoue, 1987]

¹¹[Francon, 1961]

¹²[Streibl, 1984b],[Sheppard, 1986]

1.3 Interprétation des images acquises, et amélioration de la mesure

La microscopie de fluorescence s'est révélée être un outil incontournable dans l'étude des structures du vivant¹³. La fluorescence permet de localiser les molécules avec une grande spécificité. Elle peut avoir plusieurs origines selon la nature des molécules intervenant dans le phénomène. Cependant, étant donné l'étalement de la réponse impulsionnelle du microscope conventionnel, il est évident que toute mesure quantitative est discutable¹⁴. Pour pouvoir prétendre à une mesure même relative, il est nécessaire d'effectuer une correction des données en vue d'une analyse des sites au niveau de leurs intensités, de leurs localisations et de leurs formes. Des améliorations de l'instrument ont été réalisées afin d'obtenir des images à des résolutions plus fines. Nous présentons ici les plus notables et les plus utilisées.

1.3.1 Amélioration de la mesure par des moyens physiques

Pour palier aux défauts du microscope conventionnel, on peut utiliser un montage confocal. L'illumination est alors faite par un faisceau laser focalisé dans le plan d'observation et qui balaye celui-ci. L'excitation n'est plus globale, mais quasi-ponctuelle (figure 1.10).

D'autre part, la détection se fait au travers d'un "pin-hole" en position confocale par rapport au spot d'excitation, c'est-à-dire que le système de détection ne voit que la zone de focalisation du faisceau d'excitation. Ce montage permet de rejeter une très grande partie de la lumière qui provient des plans défocalisés : la résolution verticale du microscope confocal est donc meilleure que celle du microscope conventionnel. Le signal est détecté à l'aide d'un photomultiplicateur, l'image est formée point par point par balayage de l'objet. Si l'image est bien meilleure en terme de résolution, on peut cependant noter trois défauts inhérents à ce système :

- L'acquisition est souvent plus lente que dans le cas d'un microscope classique.
- Le rapport signal sur bruit est généralement plus faible que pour le microscope classique.
- L'illumination par un faisceau laser focalisé engendre des intensités locales très grandes qui peuvent endommager le spécimen.

Cependant, lorsqu'il est utilisable, l'amélioration apportée par le microscope confocal est indéniable car la lumière hors focus est fortement limitée. La PSF d'un microscope confocal peut également être calculée par le modèle de Gibson et Lanni, en com-

¹³[Wilson et Sheppard, 1984]

¹⁴[Abbott et Nugent, 1992],[Abbott et Nugent, 1993]

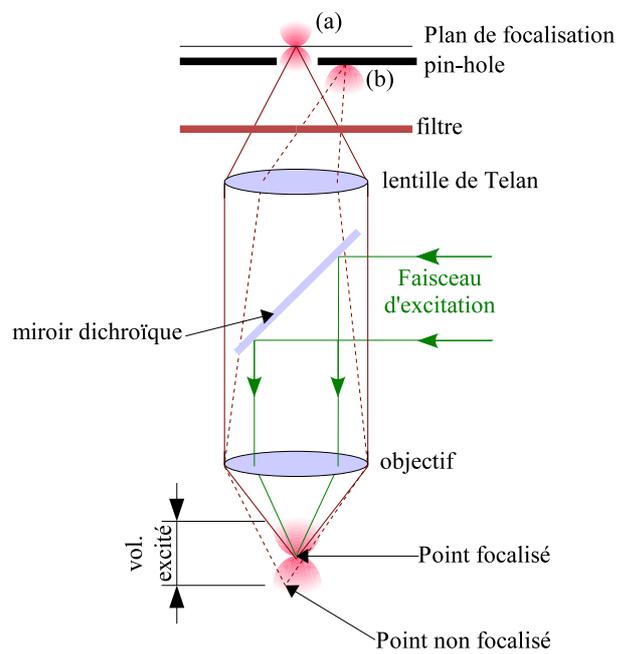


FIGURE. 1.10 | *Principe du microscope confocal* : La lumière hors focus est limitée par l'utilisation d'un diaphragme ("pin-hole") qui empêche la détection. De plus, le volume d'excitation est cette fois-ci faible.

binant une PSF d'illumination et de détection. Pour un microscope confocal parfait on peut écrire :

$$\text{PSF}_{\text{conf}}(x_d, y_d, z_d) = \text{PSF}_{\lambda_{\text{ill}}}(x_d, y_d, z_d) \cdot \text{PSF}_{\lambda_{\text{det}}}(x_d, y_d, z_d) \approx [\text{PSF}_{\lambda_{\text{det}}}(x_d, y_d, z_d)]^2 \quad (1.11)$$

et la PSF d'un microscope confocal idéal peut donc être calculée en première approximation à partir de la PSF d'un microscope classique par élévation au carré¹⁵. L'OTF d'un microscope confocal parfait est obtenue par convolution de l'OTF d'un microscope classique avec elle-même. Cette opération de convolution va remplir le "missing cone", ce qui explique les propriétés intrinsèques de sectionnement optique du microscope confocal par rapport au microscope classique. La méthode de mesure de la PSF du confocal est similaire à la méthode décrite pour le microscope conventionnel, ou peut être plus évoluée, profitant de l'éclairage laser pour acquérir une PSF complexe¹⁶. Conchello¹⁷ joue sur le mode confocal partiel (avec un pin-hole plus large) pour améliorer le rapport signal sur bruit, et utilise un algorithme de déconvolution pour retrouver des images proches de celles acquises en mode confocal.

Le microscope confocal a constitué un très grand progrès, mais certains problèmes mentionnés précédemment persistent avec les spécimens biologiques vivants. Lorsque les molécules d'un fluorochrome sont excitées, il arrive souvent qu'elles génèrent des radicaux libres toxiques pour le spécimen observé. Ainsi, si l'on veut conserver ce spécimen vivant, il faut donc limiter le temps d'observation et l'intensité lumineuse.

D'autre part, la fluorescence diminue avec l'exposition (phénomène de photobleaching). Le microscope bi-photon permet de réduire ces deux phénomènes. Pour cela, on utilise le phénomène d'absorption simultanée de deux photons par le fluorochrome. L'énergie nécessaire à la transition est fournie par deux photons délivrant chacun la moitié de l'énergie nécessaire. Comme la probabilité d'absorption décroît comme le carré de l'excitation, la transition d'excitation n'a lieu que dans un tout petit volume autour du point de focalisation. Loin de celui-ci, comme il n'y a pas d'excitation, il n'y a pas de photobleaching ni de phototoxicité, le transfert d'énergie n'ayant pas lieu. La détection se fait comme pour le confocal mono-photon à travers un "pin-hole".

On retrouve aussi les inconvénients du microscope confocal classique : relative lenteur d'acquisition, rapport signal sur bruit souvent faible. Pour calculer la PSF du bi-photon, on peut encore utiliser le modèle de Gibson et Lanni, et on obtient dans le

¹⁵une étude plus avancée dans [Van der Voort et Brakenhoff, 1989]

¹⁶[Juskaitis et Wilson, 1997]

¹⁷[Conchello *et al.*, 1994]

cas du bi-photon :

$$\text{PSF}_{\text{bi}}(x_d, y_d, z_d) = [\text{PSF}_{\lambda_{\text{ill}}}(x_d, y_d, z_d)]^2 \cdot \text{PSF}_{\lambda_{\text{det}}}(x_d, y_d, z_d) \quad (1.12)$$

Ces dix dernières années, diverses méthodes ont été proposées pour améliorer d'avantage la résolution spatiale en microscopie de fluorescence¹⁸. Parmi les plus prometteuses se trouvent la microscopie 4Pi et la microscopie STED. En microscopie 4Pi¹⁹, on utilise deux objectifs de microscope qui se font face pour mettre à profit le phénomène d'interférences pour améliorer la résolution longitudinale qui atteint 100nm . Proposée dès 1992, la technique est maintenant implémentée et disponible commercialement. La principale difficulté de la microscopie 4Pi vient cependant du positionnement très précis des deux objectifs de microscope pour obtenir les interférences désirées. La microscopie STED permet de palier à ce problème, et améliore encore la résolution²⁰. Dans cette technique, on utilise les phénomènes quantiques décrivant la fluorescence pour autoriser ou interdire l'émission de fluorescence dans des zones spécifiques et diminuer ainsi la taille de la réponse impulsionnelle optique du microscope. Cette technique s'applique aux méthodes utilisant un balayage laser pour former l'image, et il a été obtenu une résolution 3D de l'ordre de 100nm à l'aide d'un microscope confocal modifié. La combinaison de microscopie 4Pi et STED a déjà permis d'obtenir une résolution longitudinale d'environ 30nm .

1.3.2 Amélioration de la mesure par la résolution de l'équation intégrale du modèle de formation d'image

D'autres méthodes ont été et sont toujours actuellement en développement. Il est évident que l'amélioration de la mesure est primordiale. Cependant, lorsque la limite de résolution est atteinte pour une application donnée, il est possible par le calcul d'améliorer encore le résultat. La microscopie conventionnelle est très répandue chez les biologistes pour l'observation du vivant. Couplée à une restauration d'image, elle permet d'atteindre des résolutions proches de celles du confocal. Cette restauration, la déconvolution (voir figure 1.11), tente de résoudre l'équation intégrale à partir de l'équation (1.2) :

$$g(x, y, z) = \int_{V_h} h(x' - x, y' - y, z' - z) \cdot f(x', y', z') \cdot dx' dy' dz' + n(x, y, z) \quad (1.13)$$

¹⁸[Haeberlé *et al.*, 2002],[Haeberlé, 2004]

¹⁹[Nargoni et Hell, 2001a],[Nargoni et Hell, 2001b]

²⁰[Klar *et al.*, 2000],[Klar *et al.*, 2001]

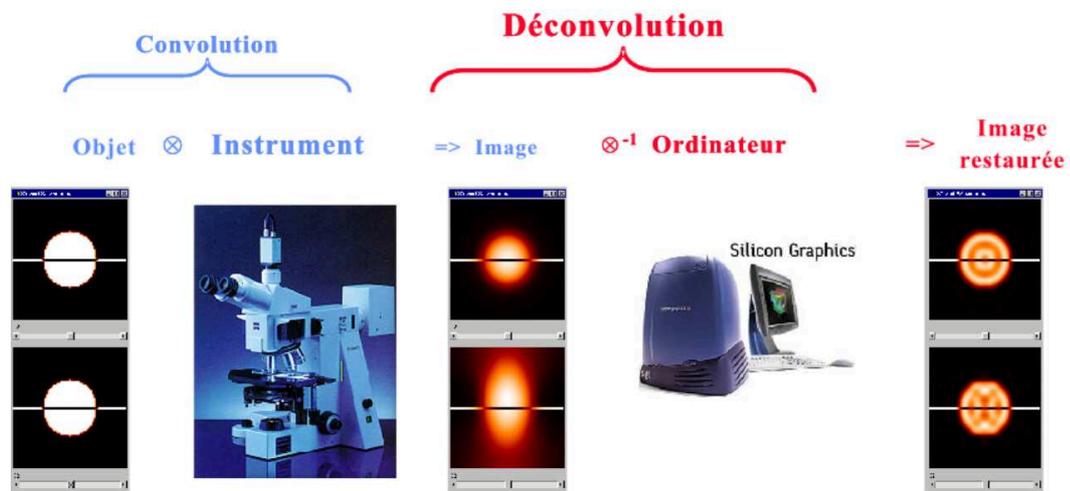


FIGURE. 1.11 | *Amélioration de l'image par déconvolution* : L'opération de déconvolution restaure les données issues de l'acquisition en coupes séries par l'application d'un filtre inverse. Le résultat obtenu est une estimation de l'objet original.

Cependant, lorsque l'on cherche à résoudre cette équation, il faut garder à l'esprit la nature mal posée du problème²¹. De plus, une solution ne peut être envisagée sans une connaissance a priori de l'espace objet. Toutefois, les hypothèses utilisées sont basées sur des contraintes physiques, comme la non-négativité de l'intensité lumineuse par exemple : ces hypothèses a priori ne sont donc pas illégitimes et permettent de trouver une solution satisfaisant l'équation de formation d'image. Le principal obstacle à la résolution du problème est le bruit inévitable contenu dans une image mesurée. Ce problème impose aux algorithmes de déconvolution de trouver une solution issue du compromis entre stabilité et précision. Parmi les méthodes d'améliorations de la résolution, il faut noter également certaines méthodes mélangeant traitements numériques, et modification du système d'éclairage conventionnel²².

1.4 Conclusions sur les contraintes de la microscopie de fluorescence

Dans ce chapitre, nous avons exposé le principe physique de formation d'images 3D pour les microscopes optiques conventionnels, confocaux et bi-photon. Le microscope, vu comme un filtre, présente donc certaines caractéristiques particulières. Les

²¹équation de Fredholm de première espèce, voir par exemple [Atkinson, 1997]

²²[Gustafsson *et al.*, 1999],[Gustafsson, 2000],[Frohn *et al.*, 2001]

informations présentées sur la formation d'images en 3D permettent d'envisager les difficultés à venir :

- l'acquisition des images doit se faire en suivant un protocole rigoureux (échantillonnage, fading)
- le mélange des fréquences selon les axes x,y et z , explique que la déconvolution ne peut être envisagée qu'en 3 dimensions
- à ces aspects optiques se rajoutent les problèmes liés au bruit qui est de deux natures : Poissonien à cause de l'émission photonique, et Gaussien à cause de l'électronique de détection.

Idéalement, les algorithmes de déconvolution devront tenir compte de ces différentes contraintes pour pouvoir prétendre améliorer la qualité des images obtenues. Pour réussir l'inversion, on visera en particulier à :

- la restauration correcte des formes et la réassignation des intensités,
- la stabilité de la solution par rapport aux conditions initiales et au bruit.

Pour la modélisation du microscope nous avons choisi d'utiliser le modèle de Gibson et Lanni, basé sur la diffraction scalaire de la lumière. Malgré certaines limitations, ce modèle est satisfaisant, et possède l'avantage de permettre de séparer les différents paramètres expérimentaux. Il existe d'autres modèles, vectoriels, permettant la prise en compte de phénomènes de polarisations de la lumière, mais dans le cas de la microscopie conventionnelle, le modèle de Gibson et Lanni est une bonne approximation, permettant des simulations intégrant des paramètres liés à la mesure pratique. Il faut cependant noter que dans le groupe LABEL du laboratoire MIPS, Olivier Haeberlé²³ s'est attaché à réunir la rigueur du modèle vectoriel de Torök²⁴ et les paramètres très proches de l'expérimentation du modèle de Gibson et Lanni.

²³[Haeberlé *et al.*, 2003]

²⁴[Török et Varga, 1997]

2 | LA DÉCONVOLUTION D'IMAGE EN MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE

LES techniques de déconvolution sont basées sur un modèle de dégradation des images par un système de mesure, dans notre cas, le microscope de fluorescence. Ce modèle peut être formulé mathématiquement par une convolution linéaire, ou par la statistique Bayésienne. La première partie de ce chapitre présente les algorithmes les plus couramment utilisés en microscopie de fluorescence. Nous abordons ensuite les difficultés de l'interprétation des résultats issus des déconvolutions, qui peuvent présenter des artefacts. Une dernière partie présente une étude de l'effet sur les résultats de déconvolutions d'un écart entre les paramètres estimés et réels lorsque l'on utilise une PSF théorique pour la restauration. Cette étude porte sur des écarts entre l'estimation de l'indice de l'huile d'immersion, l'épaisseur de la lamelle, et l'ouverture numérique effective par rapport aux vraies valeurs. Des simulations sur des objets synthétiques avec le modèle de Gibson et Lanni permettent de quantifier cette influence. Enfin, un dernier point est abordé concernant la non-invariance de la PSF dans certaines conditions d'acquisition.

2.1 Principes de la déconvolution d'image

La déconvolution est une technique numérique pour réduire le flou dans des images, appliquée ici à des images acquises en microscopie tridimensionnelle de fluorescence. L'acquisition d'un spécimen par ce type d'instrument est rendue délicate par le problème fondamental présenté dans le chapitre précédent. En effet, l'image est formée en collectant la lumière qui traverse le spécimen, et de la lumière hors-focus est également présente dans le plan focalisé. Toute mesure est alors entachée d'une erreur qui ne permet pas de quantifier le spécimen en terme de volumes ou d'intensités localisées dans ces volumes, les contributions d'autres sites, même distants, se mélangent entre elles. La microscopie confocale a permis de diminuer de façon significative la quantité de lumière hors-focus dans l'image. Malheureusement ce système a des défauts qui le rendent inutilisable dans certains cas, ramenant l'utilisateur à la microscopie tridimensionnelle conventionnelle. La déconvolution tente de réaliser

numériquement cette diminution de lumière hors-focus. Nous rappelons qu'elle n'est toutefois pas réservée à la microscopie conventionnelle, et peut aussi être utilisée sur des images de microscope confocal ou bi-photon pour améliorer encore l'image. La déconvolution est l'opération d'amélioration de l'image qui cherche à résoudre l'équation intégrale (1.13), avec l'espace image $f(x,y,z)$ pour inconnue. On suppose la réponse impulsionnelle $h(x,y,z)$ connue, calculée ou mesurée.

La connaissance de la PSF permet la caractérisation partielle du système d'acquisition, et elle sera utilisée dans le processus de déconvolution. Il existe des techniques de déconvolution dites "aveugles" ou "myopes" qui restaure l'image sans la connaissance complète de la PSF¹. Nous traiterons ici uniquement d'algorithmes qui supposent la PSF connue.

Une grande variété d'algorithmes de déconvolution existe mais qui suivent plus ou moins tous le même schéma. En effet, la plupart de ces algorithmes ont besoin :

- d'un critère d'erreur qui indique le degré de ressemblance des estimations
- d'une fonction de coût, permettant de régler le compromis entre la ressemblance et l'amplification du bruit
- de contraintes supplémentaires basées sur des connaissances a priori de l'espace objet observé
- d'un algorithme de minimisation permettant de trouver le minimum de la fonction de coût.

Nous présentons ici les algorithmes les plus utilisés en microscopie de fluorescence, et en particulier ceux qui seront optimisés dans le chapitre suivant. Cette description est destinée à donner une idée des principes utilisés pour parvenir à la restauration de l'image, sans entrer dans les détails concernant chaque méthode².

2.2 Modèle déterministe de formation de l'image

Lorsque les données sont discrétisées par le capteur, l'équation (1.13) peut s'écrire sous une forme vectorielle :

$$\mathbf{g} = \mathbf{H} \cdot \mathbf{f} + \mathbf{n} \quad (2.1)$$

Parmi les méthodes déterministes de résolution de cette équation, on trouve les méthodes de décomposition en valeurs singulières (SVD)³. En particulier, si la PSF est invariante dans l'espace le problème se résout en considérant \mathbf{H} comme étant une ma-

¹[Holmes et O'Connor, 2000],[Holmes, 1992]

²[Hunt, 1994],[Demoment et Idier, 2001]

³Revue des méthodes de déconvolution basées sur les matrices de Toeplitz (SVD)[Kamm, 1998]

trice de Toeplitz. L'analyse du problème revient alors à étudier les valeurs propres de \mathbf{f} pour réaliser l'inversion du système. La nature de \mathbf{H} qui comporte des sous-espaces nuls ou quasi-nuls, et la présence du bruit \mathbf{n} sont les deux obstacles à la résolution de l'équation. Une inversion directe permettant de trouver une estimation de \mathbf{f} exacte n'est pas possible mathématiquement. Les algorithmes de déconvolution tentent donc de trouver une estimation de \mathbf{f} qui minimise un critère d'erreur.

On peut réécrire l'équation (1.13) dans le domaine fréquentiel en appliquant une transformée de Fourier, l'opération de convolution étant alors remplacée par une multiplication :

$$\mathcal{F}(g(x,y,z)) = \mathcal{F}(h(x,y,z)) \cdot \mathcal{F}(f(x,y,z)) + \mathcal{F}(n(x,y,z)) \quad (2.2)$$

On obtient donc :

$$G(\nu_x, \nu_y, \nu_z) = H(\nu_x, \nu_y, \nu_z) \cdot F(\nu_x, \nu_y, \nu_z) + N(\nu_x, \nu_y, \nu_z) \quad (2.3)$$

Pour réaliser l'inversion, la division spectrale naïve conduirait à une amplification du bruit due aux petites valeurs de $|H(\nu_x, \nu_y, \nu_z)|$

Nous avons justement vu que pour le microscope, il manque une gamme de fréquences, y compris dans les basses fréquences (missing cone).

Pour réaliser l'inversion, on va donc chercher à annuler l'écart moyen entre l'image observée \mathbf{g} , et l'estimation \mathbf{f} , reconvoluée par \mathbf{H} . Ceci revient à calculer l'erreur quadratique :

$$MSE(\hat{\mathbf{f}}) = \left\| \mathbf{H}\hat{\mathbf{f}} - \mathbf{g} \right\|^2 \quad (2.4)$$

En considérant que le bruit \mathbf{n} est de statistique gaussienne à valeur moyenne nulle, la solution analytique donne le filtre de Wiener. L'estimation $\hat{\mathbf{f}}$ est donnée par :

$$\hat{\mathbf{f}} = \mathbf{H}_{inverse} \mathbf{g} \quad (2.5)$$

avec :

$$\mathbf{H}_{inverse} = \mathbf{H}_{wiener} = \frac{\mathbf{H}^T}{\mathbf{H}^T \mathbf{H} + \frac{\mathbf{S}_n}{\mathbf{S}_f}} \quad (2.6)$$

Cependant, les solutions issues du filtre de Wiener peuvent parfois ne pas correspondre à des réalités liées à la nature physique du problème, qui imposent par exemple que toutes les intensités soient positives. L'inversion directe ne permet pas de garantir la positivité. Une minimisation itérative du critère d'erreur quadratique

qui donne une estimation de \mathbf{f} est la méthode de Van-Cittert⁴ que l'on trouve simplement en cherchant à annuler la fonction d'erreur (2.4) :

$$0 = \mathbf{g} - \mathbf{H}\hat{\mathbf{f}} \quad (2.7)$$

En ajoutant de chaque coté de l'égalité l'estimation \mathbf{f} on obtient la forme itérative :

$$\hat{\mathbf{f}}^{(k+1)} = \hat{\mathbf{f}}^{(k)} + \mathbf{g} - \mathbf{H}\hat{\mathbf{f}}^{(k)} \quad (2.8)$$

Jansson⁵ a amélioré la vitesse de convergence de cet algorithme, en introduisant un terme de relaxation et en contrôlant l'intensité des pixels pour que leurs valeurs restent positives et dans une plage bornée :

$$\hat{\mathbf{f}}^{(k+1)} = \hat{\mathbf{f}}^{(k)} + \mu \left(\mathbf{g} - \mathbf{H}\hat{\mathbf{f}}^{(k)} \right) \quad (2.9)$$

La méthode de Gold-Meinel⁶ est une autre variante, qui introduit un facteur de relaxation variable. Toutes ces modifications de l'algorithme de Van-Cittert ont pour objectif l'amélioration de la vitesse de convergence.

Il est à noter que les méthodes itératives dérivées de la méthode de Van-Cittert peuvent être écrites sous forme de produit de convolution :

$$f(x,y,z)^{(k+1)} = f(x,y,z)^{(k)} + \mu \cdot \left(g(x,y,z) - f(x,y,z)^{(k)} \otimes h(x,y,z) \right) \quad (2.10)$$

Elles peuvent donc utiliser une convolution à noyau variable si le système a une réponse non-invariante. On perd cependant l'avantage de la vitesse de calcul des convolutions par transformée de Fourier rapide (FFT).

Le problème de cette méthode itérative est l'amplification du bruit lorsque l'algorithme converge. En effet l'erreur quadratique n'augmente pas car l'estimation est reconvoquée, masquant ainsi l'influence du bruit. Ceci est d'ailleurs le cas de toutes les méthodes qui n'appliquent pas de contraintes supplémentaires appropriées.

Pour éviter cette amplification du bruit, le mathématicien Andrei Nikolaevich Tikhonov propose de modifier le critère d'erreur⁷ :

$$\Phi(\hat{\mathbf{f}}) = \left\| \mathbf{H}\hat{\mathbf{f}} - \mathbf{g} \right\|^2 + \lambda \left\| \mathbf{R}\hat{\mathbf{f}} \right\|^2 \quad (2.11)$$

⁴[Van Cittert, 1931]

⁵[Jansson *et al.*, 1984]

⁶[Meinel, 1986]

⁷[Tikhonov et Arsenin, 1977]

en introduisant un terme $\lambda \|\mathbf{R}\hat{\mathbf{f}}\|^2$ pénalisant les solutions trop 'dures' (à forte variance), régularisant ainsi le problème.

La minimisation de l'équation (2.11) est donnée par :

$$\nabla_{\hat{\mathbf{f}}}\Phi(\hat{\mathbf{f}}) = 2\mathbf{H}^T(\mathbf{H}\hat{\mathbf{f}} - \mathbf{g}) + 2\lambda\mathbf{R}^T\mathbf{R}\hat{\mathbf{f}} = 0 \quad (2.12)$$

La solution analytique directe donne le filtre de Tikhonov-Miller, qui est donc une généralisation du filtre de Wiener :

$$\mathbf{H}_{inverse} = \mathbf{H}_{tm} = \frac{\mathbf{H}^T}{\mathbf{H}^T\mathbf{H} + \lambda\mathbf{R}^T\mathbf{R}} \quad (2.13)$$

Pour pouvoir incorporer la contrainte de non-négativité, la forme itérative minimise la fonction de Tikhonov (2.11) par la méthode du gradient conjugué.

La pénalisation des hautes fréquences permet de minimiser l'amplification du bruit, mais a aussi pour effet de lisser les éventuels bords à transitions franches dans l'espace objets. Cette approche fait donc l'hypothèse que ces spécimens ne présentent pas ce type de transitions. Le filtre de Tikhonov-Miller itératif est très proche de la méthode de Carrington⁸, qui incorpore la non négativité en modifiant la fonction de Tikhonov (2.11) qui devient alors convexe, ce qui garantit l'unicité de la solution. Cette méthode a été implémentée pour les systèmes d'acquisitions CellScan en microscopie de fluorescence.

La méthode de Carrington utilise en fait la méthode de la projection sur les espaces convexes. Cette approche formalise de manière rigoureuse l'incorporation de contraintes en appliquant une transformation sur $\hat{\mathbf{f}}$ à chaque itération. Ces contraintes, si elles représentent des espaces convexes fermés, vont faire converger la solution vers une solution unique. On appelle méthodes POCS toutes les méthodes qui intègrent des contraintes à projections convexes. Les contraintes bornent en général la solution au niveau de l'amplitude, et au niveau du support fréquentiel.

La détermination du paramètre λ dans l'équation (2.11) fait appel à l'expérience de l'opérateur. Si λ est faible, les données sont lissées et peu sensibles au bruit. La précision des données restaurées est cependant faible. Si λ est grand, la précision est meilleure, mais le résultat moins stable (voir figure 2.1). L'hypothèse de transitions douces pour l'espace objet est raisonnable, on considère en effet généralement que les spécimens biologiques fluorescents ne présentent pas de transitions brusques, pour un échantillonnage correct.

Encore une fois, ces méthodes s'étendent au cas de la PSF non-invariante, avec le sacrifice du temps utilisé pour la convolution dans l'espace.

⁸[Carrington *et al.*, 1995],[Fay *et al.*, 1989]

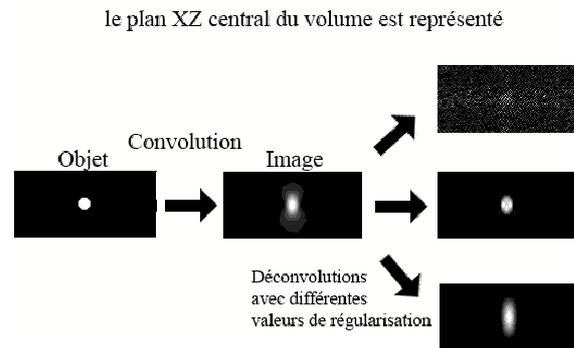


FIGURE. 2.1 | *Effet de la régularisation* : Le choix du paramètre de régularisation influence le résultat de façon importante. Sont représentés ici les résultats de déconvolution sans régularisation (en haut à droite), avec un paramètre de régularisation éliminant les singularités (au milieu à droite), et enfin avec un paramètre qui est surestimé (en bas à droite)

Enfin, partant du formalisme déterministe, une méthode simple, implémentée dans le domaine de la microscopie de fluorescence par Preza sous le nom de LLS⁹, permet de trouver une estimation partielle, en utilisant uniquement les valeurs propres (le module des coefficients de l'OTF) supérieures à un seuil fixé suivant une fonction de coût basée sur la jauge de Joyce et Root dans l'espace objet. Cette fonction intègre également un terme de ressemblance et un terme de pénalité, mais cette fois sur les coefficients de l'OTF plutôt que sur les hautes fréquences de $\mathcal{F}(f(x,y,z))$. L'idée est de dire que plus on garde de petites valeurs propres, plus le résultat aura une variance élevée (amplification du bruit), moins on en garde, plus la solution aura une variance réduite (solution lissée). Preza prédétermine le seuil optimal dans l'espace objet par une simulation, et l'utilise de manière directe sur les images de fluorescence. Une méthode de réglage de ce paramètre dans l'espace image sera proposée dans le chapitre suivant, en cherchant à minimiser la même fonction de coût dans l'espace image.

Pour toutes ces méthodes, un paramètre de régularisation est à fixer, soit de manière directe pour les inversions directes (Tikhonov-Miller, LLS, Wiener), soit par l'intermédiaire du coefficient qui pénalise des transitions brusques (Tikhonov-Miller-itératif, Carrington) et le nombre d'itérations. Ce réglage subjectif, et basé sur l'expérience de l'opérateur des simulations, ou des connaissances a priori du spécimen.

⁹[Preza, 1990], Preza *et al.* [1992]

2.3 Modèle statistique de formation de l'image

Le processus de formation de l'image peut être aussi décrit d'une manière statistique, par un modèle stochastique qui tient compte de l'équation de formation d'image (1.2) en termes de probabilité. Cette probabilité est $P(\mathbf{g}|\mathbf{f})$, qui est la probabilité d'obtenir l'image \mathbf{g} étant donnée la distribution de fluorophores \mathbf{f} . Le problème inverse peut s'écrire en utilisant la relation de Bayes¹⁰ :

$$P(\mathbf{f}|\mathbf{g}) = \frac{P(\mathbf{g}|\mathbf{f}) \cdot P(\mathbf{f})}{P(\mathbf{g})} \quad (2.14)$$

où $P(\mathbf{f}|\mathbf{g})$ est la probabilité d'obtenir \mathbf{f} étant donnée \mathbf{g} . La maximisation de cette probabilité, appelée probabilité a posteriori, donne la solution du Maximum A Posteriori (MAP) qui satisfait la relation de Bayes, supposant une probabilité de distribution a priori $P(\mathbf{f})$. Le dénominateur étant un terme constant, il n'intervient pas dans la maximisation. On cherche donc en fait à maximiser :

$$P(\mathbf{f}|\mathbf{g}) = P(\mathbf{g}|\mathbf{f}) \cdot P(\mathbf{f}) \quad (2.15)$$

qui donne la solution du Maximum A Posteriori.

Le terme $P(\mathbf{f})$ permet d'introduire toutes les connaissances et contraintes concernant l'objet. Si aucune information n'est utilisée, la solution du Maximum A Posteriori, devient la solution du Maximum de Vraisemblance (Maximum Likelihood, noté ML) qui revient à maximiser l'équation (2.15) lorsque $P(\mathbf{f})$ est uniforme, donc à maximiser :

$$P(\mathbf{f}|\mathbf{g}) = P(\mathbf{g}|\mathbf{f}) \quad (2.16)$$

Si on choisit des probabilités de distribution gaussiennes pour l'image et l'objet, on retrouve une solution équivalente au filtre de Wiener.

Preza utilise le formalisme MAP¹¹, en donnant la solution analytique dans l'espace de Fourier, le filtre inverse s'écrit alors :

$$\frac{\text{conj}(\mathcal{F}(h(x,y,z)))}{|\mathcal{F}(h(x,y,z))|^2 + 2 \cdot \lambda \cdot (\omega_x^2 + \omega_y^2 + \omega_z^2)} \quad (2.17)$$

Cette fois, toutes les valeurs propres sont utilisées, mais modifiées légèrement en fonction de leur fréquence. Ce paramètre permet de régler la variance du résultat de manière moins brutale, et limite ainsi certains artefacts, mais avec un risque de sur-

¹⁰[Hunt, 1994]

¹¹[Preza *et al.*, 1993]

lissage du résultat. Les basses fréquences sont faiblement modifiées, mais on agit fortement sur les hautes fréquences qui subissent plus d'atténuations. Dans la pratique, l'utilisateur saisit la valeur de λ (il connaît uniquement la valeur minimale et maximale que peut prendre λ de 0 à 1). Nous parlerons également de l'automatisation du choix de ce paramètre dans le chapitre suivant.

Si on utilise des probabilités de distribution plus complexes, la solution analytique n'existe pas. L'utilisation de l'algorithme Expectation-Maximisation (EM)¹² qui maximise l'espérance mathématique, permet de trouver une solution numérique. L'algorithme ML-EM (Maximum-Likelihood Expectation-Maximisation)¹³, connue dans le domaine de l'astronomie sous le nom de Richardson-Lucy¹⁴ utilise une densité de probabilité $P(x)$ Poissonienne.

Cette solution a été introduite dans le domaine de la microscopie de fluorescence par Holmes. Verveer a proposé d'introduire une pénalité de rugosité de Good¹⁵ à chaque itération afin d'améliorer la convergence. Des solutions pour MAP avec une statistique du bruit poissonienne et un modèle de distribution d'entropie de l'image d'origine ont aussi été présentées¹⁶.

Les méthodes bayésiennes généralisent en fait l'approche déterministe avec l'avantage de pouvoir incorporer les informations a priori de manière statistique.

Pour obtenir une restauration correcte, un nombre important d'itérations est nécessaire. Cependant le choix du nombre d'itérations est fait par l'utilisateur. Cela fait donc appel à son expérience personnelle.

Le formalisme bayésien démontre que les approches linéaires déterministes sont adaptées à une statistique gaussienne de l'espace objet. Ceci est discutable dans le cas de la microscopie de fluorescence, car l'émission de fluorescence suit en fait une statistique poissonienne¹⁷. Cependant, il faut considérer deux cas.

Dans le cas du confocal, on a une faible quantité de photons collectés, la statistique du bruit est donc fortement poissonienne.

Dans le cas du microscope conventionnel, le nombre de photons collectés est important, la statistique de l'émission photonique peut être approchée par une statistique gaussienne. En effet, lorsque le rapport signal sur bruit est élevé, la statistique poissonienne de l'accumulation des photons peut être approchée par la statistique gaussienne (théorème de la valeur centrale limite). Cependant, pour des temps d'expositions courts, cette approximation peut ne plus être valable.

La prise en compte de la nature poissonienne de la collecte de photons permet

¹²[Dempster *et al.*, 1977]

¹³[Holmes, 1988],[Holmes et Liu, 1989]

¹⁴[Richardson, 1972],[Lucy, 1974]

¹⁵[Good, 1971]

¹⁶[Joshi et Miller, 1993],[Verveer, 1998],[Kikuchi et Soffer, 1977],[Conchello, 1998]

¹⁷[Goodman, 1989]

à l'algorithme ML-EM de donner de meilleurs résultats sur des mesures d'intensité de sites fluorescents, si on les compare aux résultats obtenus par des méthodes d'inversion directes, la méthode de Van-Cittert ou par la méthode de Carrington, qui ne tiennent pas compte de la nature poissonnienne de bruit¹⁸.

2.4 Difficultés et interprétation des résultats de déconvolutions

Les résultats de déconvolutions doivent être interprétés avec précaution, car les conditions nécessaires à une restauration correcte ne sont pas toujours réunies. Nous présentons ici certaines configurations qui sont problématiques pour réussir l'inversion, ainsi que les solutions ou alternatives à envisager.

2.4.1 Sensibilité aux discontinuités dans les images

Après déconvolution, il peut apparaître des anneaux (ringing effect) autour de points nets, ou des échos près d'arrêtes franches¹⁹, lorsque le paramètre de régularisation est trop bas. Au contraire, le résultat peut être surlissé s'il est trop grand. Il est également possible de voir apparaître des sections qui apparaissent plus lumineuses (stripes) que d'autres. Si on examine l'image de départ, nous verrons des discontinuités d'un plan à l'autre. Ceci peut-être dû au scintillement de la lampe qui n'excite pas chaque plan de la même manière, ou bien dû à un défaut au niveau de la commande du shutter d'obturation de la lampe. Si l'optimisation du matériel ne résout pas le problème, il est nécessaire de normaliser les plans pour qu'ils comportent une intensité totale équivalente égale à :

$$\frac{1}{N_z} \cdot \sum_x \sum_y \sum_z g(x,y,z) = I_{plan} \quad (2.18)$$

Cette correction est justifiée par le principe même de formation d'image, car chaque plan doit contenir la même énergie²⁰.

La figure 2.2 présente l'application de cette normalisation plan par plan.

Des artefacts²¹ apparaissent également si l'image du spécimen est tronquée en bordure d'image. L'application d'une fenêtre de Hanning 3D est envisageable, mais les intensités seront affectées, et seule une partie réduite des données sera exploitable.

¹⁸[Van Kempen *et al.*, 1997]

¹⁹[Abbott et Nugent, 1992]

²⁰[Frieden, 1967]

²¹[McNally *et al.*, 1999]

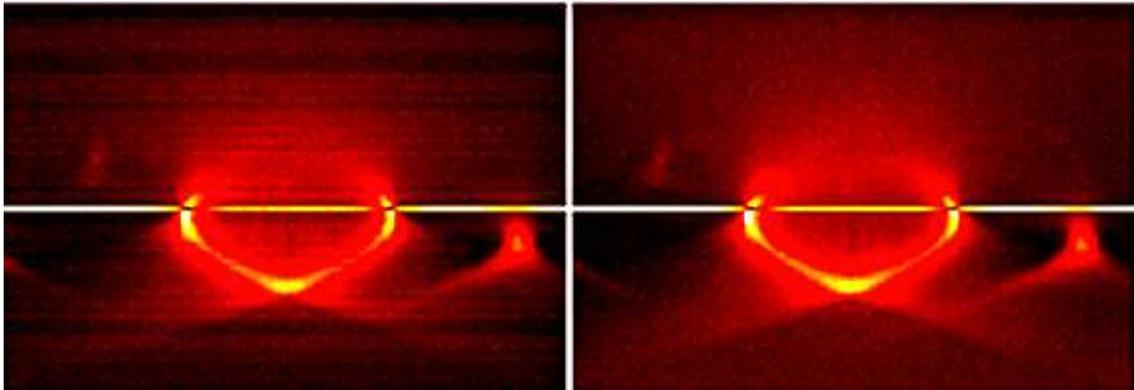


FIGURE. 2.2 | *Correction de la variation de l'éclairement des plans de l'image* : Coupe XZ d'une image de bille de $10\mu\text{m}$ de diamètre, le marquage fluorescent est fait sur la périphérie de l'objet, le fluorochrome est la FITC (courant en biologie) qui émet dans le vert (510 à 550nm) après excitation dans les longueur d'onde bleues (460 à 490nm). L'objectif utilisé est un X100 PL APO NA=1.4 à immersion à huile. (à gauche) sur l'image brute avant normalisation on voit des variations d'intensités entre les plans. La déconvolution accentuera anormalement les plans les plus intenses si on ne corrige pas préalablement l'image, (à droite) L'image normalisée ne laisse plus apparaître de telles variations

Il est également possible de voir des variations brusques d'un pixel à l'autre, car le capteur CCD n'est pas toujours homogène et la sensibilité des cellules est variable. La correction se base alors sur l'observation d'une surface plane fluorescente et homogène, mettant en évidence les variations d'intensités dans le plan d'un pixel à l'autre. Avec cette image de référence on pondérera les données acquises d'un spécimen quelconque.

2.4.2 Problèmes d'acquisition des images expérimentales

Saturation

La déconvolution suppose que le modèle de formation d'image soit linéaire, mais si l'acquisition provoque la saturation des cellules CCD, ceci n'est plus vérifié. Un bruit électronique ou une surexposition peut entraîné le dépassement de la pleine échelle du capteur. Les zones saturées peuvent être larges, et il est possible de voir apparaître un effet de diffusion sur les pixels adjacents. Les solutions existantes corrigent la saturation de pixels isolés par une interpolation des pixels voisins. Si la zone saturée s'étant au delà de quelques pixels, l'image est inexploitable.

Photoblanchiment

Dans le chapitre précédent nous avons parlé du problème de la perte de fluorescence. L'acquisition d'un spécimen 3D prend du temps, et si le temps de décroissance est plus rapide, on voit les plans successifs perdre de leur intensité. Le phénomène de perte de fluorescence dans le temps est difficilement corrigeable numériquement²².

Pour minimiser ce phénomène on peut jouer sur les temps et puissance d'exposition, ou encore utiliser des solutions anti-blanchiment préservant les fluorophores. Des corrections numériques ont été aussi envisagées, et parfois intégrées à l'algorithme de déconvolution lui même²³.

2.5 Mauvaise caractérisation du système expérimental

Nous avons vu dans le chapitre précédent que le modèle de Gibson et Lanni permet à partir de paramètres expérimentaux de simuler une PSF théorique présentant l'avantage d'être exempte de bruit. Les PSF ainsi calculées sont utilisées pour effectuer des déconvolutions d'images. Cependant, les paramètres choisis doivent être les plus proches possibles des paramètres réels du montage optique. Les valeurs nominales ne sont parfois pas les bonnes, et nous présentons ici l'influence d'un écart entre paramètres réels et estimés, par simulation. Les paramètres susceptibles d'être mal estimés sont l'indice de l'huile, l'ouverture numérique, l'épaisseur de la lamelle. Une dernière étude porte sur l'hypothèse de la non-invariance pour effectuer la déconvolution, alors que cette non-invariance n'est pas toujours vérifiée.

2.5.1 Erreur sur l'estimation de l'indice de l'huile d'immersion

Pour mieux quantifier la sensibilité à ce paramètre, on a simulé l'acquisition de l'image d'une bille de $680nm$ de diamètre située sous la lamelle, dans le cas où le microscope est utilisé dans une enceinte thermostaté à $37^\circ C$, ce qui est souvent le cas pour l'étude de milieux vivants. À cette température, en tenant compte de la valeur de $N_{oil} = 1,516$ trouvée en analysant les PSF expérimentales et en appliquant la correction en température donnée par le fabricant, on trouve que l'indice de l'huile vaut $N_{oil} = 1,512$ qui est non standard. On a donc calculé une PSF avec cette valeur pour convoluer la bille. L'image obtenue a été bruitée avec du bruit Gaussien et Poissonien pour imiter le type d'image obtenue avec le microscope. Etant donnée l'épaisseur du spécimen, on considère que la PSF est invariante. On déconvolue ensuite successivement avec

²²[Markham et Conchello, 2001]

²³[Conchello, 1995]

la PSF qui correspond aux conditions standard, donc incorrectes, puis avec la PSF qui correspond aux conditions réelles.

La Figure 2.3 présente le résultat de la simulation. Un seuillage à 15% sur l'image brute (non déconvoluée) entraîne une erreur de mesure de 692%. Lorsqu'on utilise la PSF correcte l'erreur est de 56%. Lorsqu'on utilise la PSF incorrecte en supposant que le microscope a été utilisé dans les conditions standard, l'erreur est plus importante et vaut 91%. On fait donc une erreur supplémentaire de l'ordre de 25% dans les mesures de volume. Les conditions de mesure doivent être donc rigoureusement spécifiées.

2.5.2 Erreur sur l'estimation de l'ouverture numérique

Il faut distinguer l'ouverture numérique effective de l'objectif de l'ouverture nominale. L'ouverture nominale est en fait l'ouverture maximale pour cet objectif. En effet, un objectif d'ouverture numérique 1,4 (utilisé avec une huile d'immersion d'indice supérieur) ne collecte la lumière émise sous l'angle d'incidence extrême correspondant que pour des points situés immédiatement sous la lamelle ($\sin(u) = NA/n_{imm}$ où n_{imm} est l'indice du milieu d'immersion).

Pour un point situé à une certaine profondeur dans le spécimen, l'ouverture numérique effective est alors limitée à au mieux 1,33 en raison de l'indice du milieu. Cette limitation est souvent négligée par les utilisateurs, qui déconvoluent leurs images 3D avec une PSF calculée pour l'ouverture numérique nominale de leur objectif. Pour estimer l'erreur induite par cette simplification, nous avons calculé l'image d'une bille de 680 nm de diamètre dans un milieu aqueux, et observée avec un objectif d'ouverture numérique 1,4.

L'image simulée est donc obtenue par une convolution linéaire invariante de la bille avec la PSF de l'objectif, calculée pour une ouverture numérique effective de 1,33. Cette image est ensuite déconvoluée à l'aide de l'algorithme ML-EM, en utilisant la PSF avec $NA = 1,33$ correspondant aux paramètres réels, et la PSF avec $NA = 1,4$ calculée à l'ouverture numérique nominale de l'objectif, mais négligeant la limitation d'ouverture dans l'eau. La figure 2.4 présente les résultats. Dans les trois cas, le centre de gravité de la bille est correctement retrouvé, au centre du volume d'observation. Ceci s'explique par le fait que les deux PSF considérées ne présentent pas d'aberration, la symétrie est conservée. Seul leur volume est légèrement différent. La bille originale a un volume de 4599 voxels. Lorsqu'on utilise la PSF calculée à $N.A. = 1,33$ pour la déconvolution (la PSF correcte), le volume mesuré après déconvolution est de 5101 voxels. Il subsiste une erreur résiduelle de 11% en volume. Lorsqu'on utilise la PSF calculée à $N.A. = 1,4$ (mauvaise estimation), le volume mesuré après déconvolution est de 5070 voxels, soit une erreur de 10%. L'écart est faible, la symétrie de la PSF n'étant pas affectée, l'influence sur la déconvolution est assez minime, la forme et

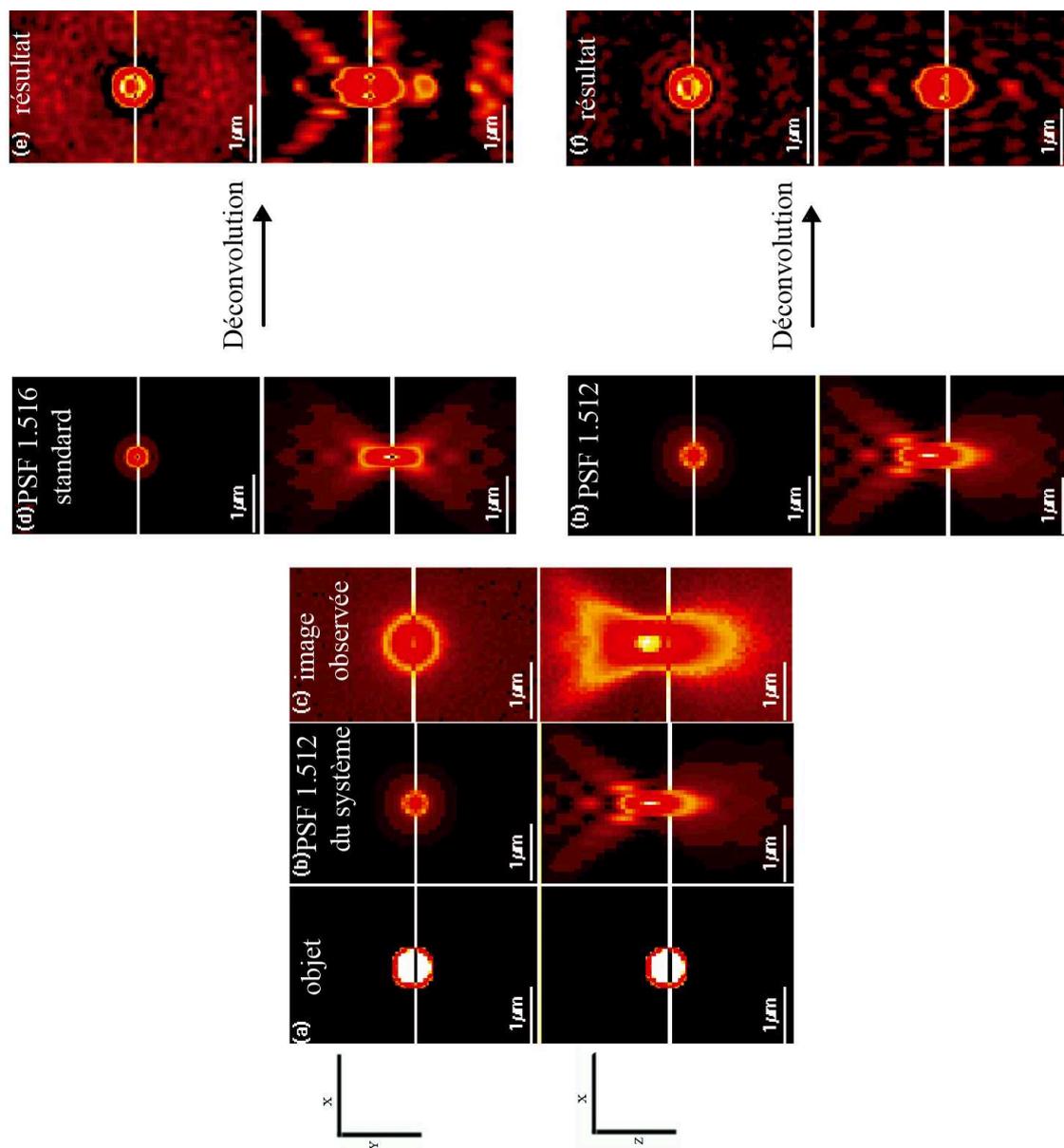


FIGURE. 2.3 | *Effets de la déconvolution avec des PSF avec et sans aberration due à un changement de l'indice de l'huile d'immersion induit par une variation de température : (a) objet (bille de 680nm), (b) réponse effective du système, (c) image simulée, (d) PSF dans des conditions standard (qui ne correspondent pas), (e) résultat de déconvolution avec la PSF incorrecte, (f) résultat de déconvolution avec la PSF qui correspond. Les coupes x-y (en haut de chaque vignette) et x-z (en bas de chaque vignette) sont représentées*

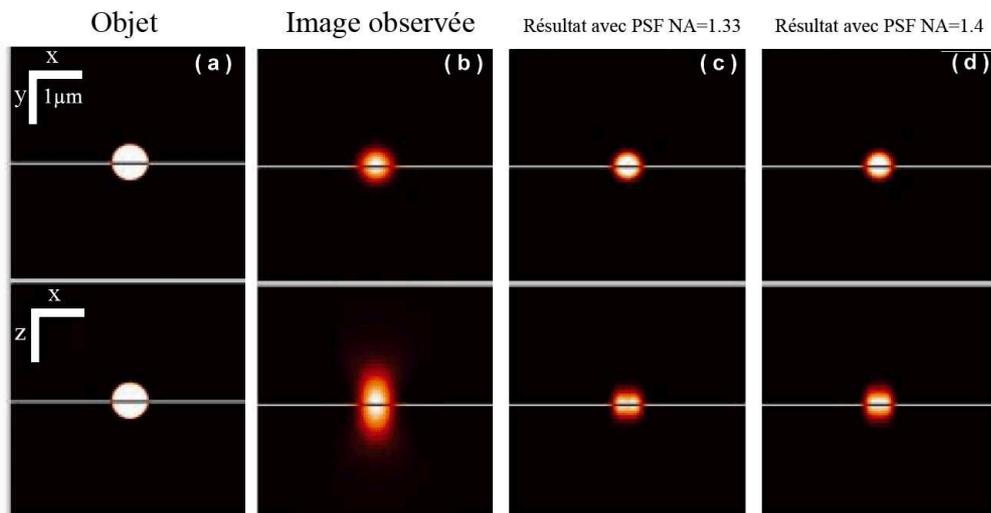


FIGURE. 2.4 | *Effets d'une mauvaise estimation de l'ouverture numérique pour la déconvolution* : (a) la bille originale, (b) la bille convoluée avec la PSF calculée à $N.A. = 1,33$, (c) la bille déconvoluée avec cette même PSF, (d) la bille déconvoluée avec la PSF calculée à $N.A. = 1,4$

donc la position du centre de gravité des objets n'est pas remise en question.

2.5.3 Influence de l'épaisseur de la lamelle.

Nous avons mené une étude similaire sur un autre paramètre important, et facile à contrôler dans la pratique, l'épaisseur de la lamelle. En effet, les objectifs de microscopes sont étudiés pour travailler avec des lamelles d'épaisseur standard $170\mu m$. Certains objectifs intègrent aussi un anneau de correction, qui permet de compenser l'aberration sphérique et d'utiliser des lamelles d'épaisseurs variables. On peut aussi utiliser cette correction en fonction de l'indice de réfraction du milieu d'immersion ou du spécimen. Cependant l'ajustement se fait manuellement et il est donc relativement peu précis. Il faut ajouter que dans un lot de lamelles de microscope, toutes n'ont pas une épaisseur parfaitement définie à $170\mu m$, le fabricant les donne avec une tolérance ($\pm 5\mu m$). On peut alors se demander si de petites variations d'épaisseur de la lamelle influencent de manière non négligeable la réponse du montage optique (présence d'aberration sphérique) et donc les résultats de déconvolution. Nous avons considéré le cas de lamelles de 165 , 170 et $175\mu m$ d'épaisseur, et simulé les observations correspondantes d'une bille de $680nm$ de diamètre dans un milieu aqueux avec un objectif à immersion à eau d'ouverture numérique $N.A. = 1,2$, à $\lambda = 530nm$ pour

que la seule source d'aberration sphérique soit donc due aux lamelles d'épaisseurs non standard (d'épaisseur 165 et 175 μm). L'image simulée avec la lamelle d'épaisseur standard 170 μm nous sert de référence. La déconvolution des trois images simulées est effectuée en utilisant une PSF calculée pour un montage optique qui comporte une lamelle d'épaisseur 170 μm .

La figure 2.5(a)-(c) présente la bille convoluée avec les PSF calculées pour une lamelle d'épaisseur 165, 170 et 175 μm respectivement. On note maintenant une dissymétrie due à l'aberration sphérique présente pour les images Figure 2.5(a) et Figure 2.5(c). La Figure 2.5(d)-(f) présente les résultats de déconvolution pour les trois cas considérés, en supposant que la lamelle utilisée était bien d'une épaisseur de 170 μm . Comme dans le cas de l'effet de l'indice de l'huile d'immersion, une dissymétrie persiste pour les images figure 2.5(d) et Figure 2.5(f). La bille originale a toujours un volume de 4599 voxels. Lorsqu'on utilise la PSF calculée pour une lamelle de 170 μm , le volume mesuré après déconvolution est de 4980 voxels, soit une erreur résiduelle de 8% seulement. Lorsqu'on utilise la PSF calculée pour une lamelle de 165 μm ou 175 μm , le volume mesuré après déconvolution est de 5357 voxels ou 5286 voxels, soit une erreur résiduelle de 16% ou 15%.

On voit donc qu'une faible erreur sur l'épaisseur de la lamelle (5 μm) conduit à doubler l'erreur sur les mesures de volume. L'épaisseur de la lamelle est donc un paramètre important à vérifier dans la pratique, d'autant plus que contrairement à l'indice du milieu d'immersion ou l'ouverture numérique effective de l'objectif, c'est un paramètre facilement mesurable.

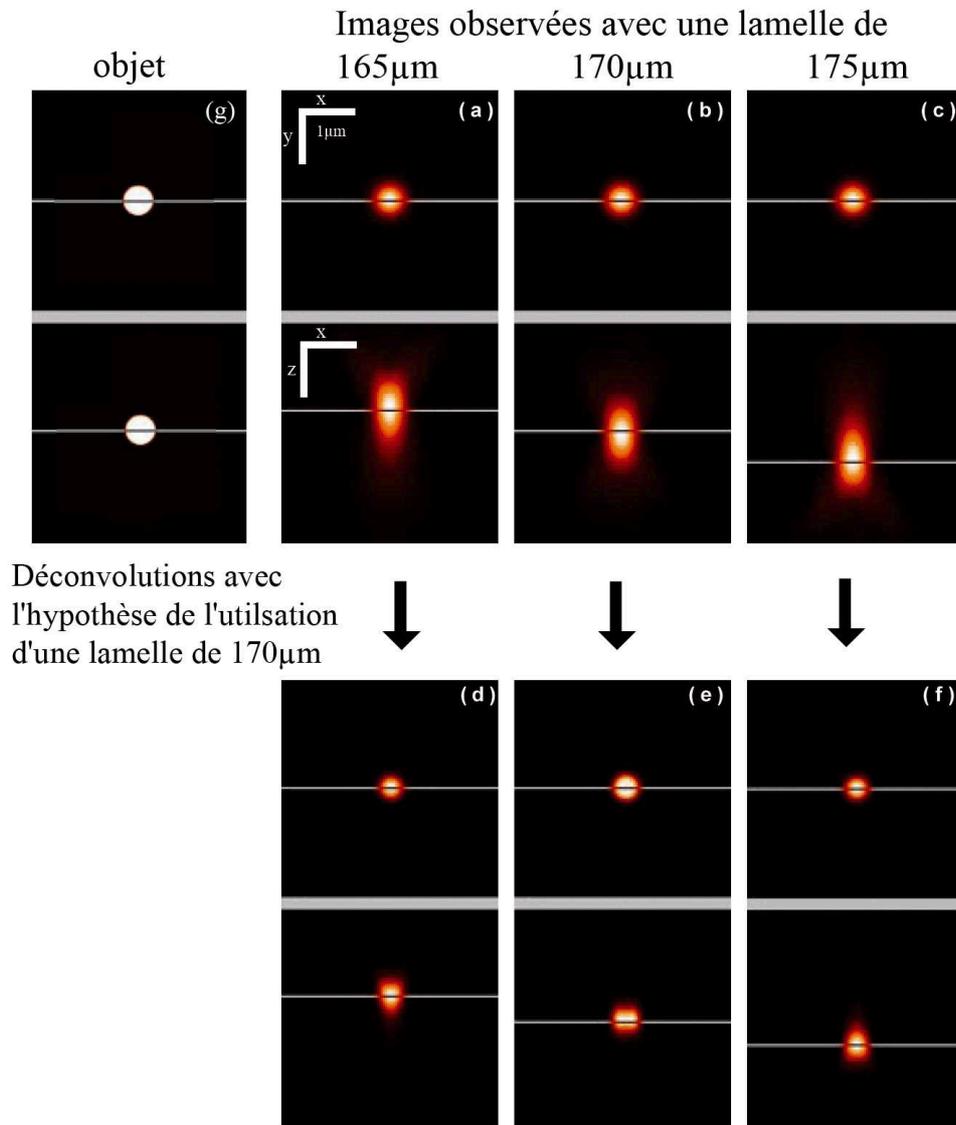


FIGURE. 2.5 | *Effet de l'épaisseur de la lamelle* : (a)(b)(c) bille convoluée avec des PSF calculées pour une lamelle d'épaisseur 165, 170 et 175 μm respectivement. (d)(e)(f) images (a)(b)(c) déconvoluées avec la PSF idéale calculée pour une lamelle d'épaisseur 170 μm . La bille semble décalée à cause de l'aberration

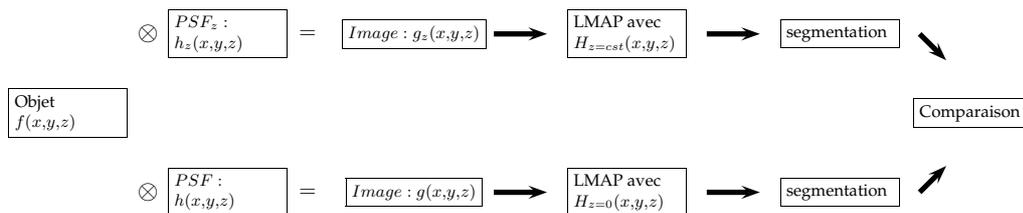


FIGURE. 2.6 | *Méthode pour mesurer l'effet de la non-invariance de la PSF : Méthode de comparaison de l'influence de la non-invariance sur les résultats de déconvolution avec une seule PSF. Deux images sont simulées en considérant la PSF invariante et non-invariante. L'image formée sous l'hypothèse de l'invariance est déconvoluée avec une PSF calculée à une profondeur nulle (sous la lamelle). L'image formée sous l'hypothèse de la non-invariance est déconvoluée avec une PSF calculée à une profondeur constante (sous la lamelle, à mi-hauteur dans le volume d'observation, et sur la lame)*

2.5.4 Effet de la non-invariance spatiale de la PSF

Les algorithmes de déconvolution supposent tous que la PSF utilisée pour la déconvolution, qu'elle soit calculée ou mesurée, est la même quelle que soit la profondeur. Pour les objectifs modernes, on peut en effet considérer que la PSF est invariante dans l'ensemble du champ d'observation, car ces objectifs sont bien corrigés. Cependant, l'invariance de la PSF avec la profondeur n'est pas toujours garantie. En particulier, lorsque l'on utilise des objectifs de grande ouverture numérique, à immersion à huile, il y a un désaccord entre l'indice de réfraction de l'huile (souvent 1,515) et l'indice de réfraction du spécimen, qui est généralement proche de celui de l'eau (1,33). A cause de ce désaccord, la PSF est entachée d'aberrations, la PSF n'est pas invariante en profondeur et ces aberrations dégradent la résolution du système avec la profondeur d'observation. Le modèle de formation d'image habituellement utilisé pour la déconvolution n'est donc plus valable.²⁴

Afin d'estimer les erreurs entraînées par l'utilisation de ce modèle de formation d'image lors d'une déconvolution, nous avons simulé l'image de différents objets en tenant compte de la variation de la PSF. Nous avons aussi calculé les images que l'on obtiendrait avec une PSF invariante en z (figure 2.6).

Le premier objet considéré est une bille fluorescente de $3,2\mu m$ de diamètre, d'intensité uniforme, observée avec un microscope confocal parfait (pin-hole infiniment petit) utilisant un objectif d'ouverture numérique 1,4 à immersion à huile (tous les paramètres correspondant aux recommandations du fabricant de l'objectif). La bille est supposée être immergée dans un milieu aqueux d'indice 1,33, et se trouve placée juste sous la lamelle (le haut de la bille est en contact avec la lamelle, à profondeur nulle)

²⁴[Kontoyannis et Lanni, 1996],[McNally *et al.*, 1994]

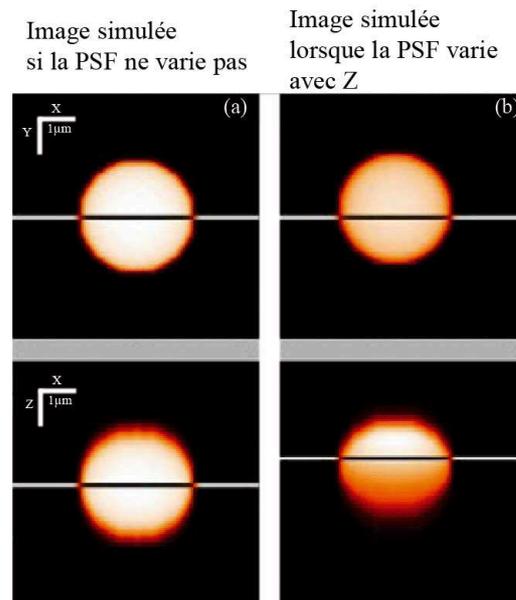


FIGURE. 2.7 | *Images observées sous l'hypothèse de l'invariance et de la non invariance de la réponse du système optique* : Image d'une bille de $3,2\mu\text{m}$ de diamètre simulée (a) sous l'hypothèse d'une PSF invariante en z et (b) en tenant compte de la non invariance de la PSF.

La figure 2.7(a) présente la bille convoluée avec une PSF calculée à une profondeur nulle et supposée invariante en profondeur. On note un léger flou, et une légère élongation de la bille, mais la forme générale est respectée, et de cette image, on déduirait effectivement une bille d'intensité constante. La Figure 2.7(b) présente la bille convoluée cette fois avec une PSF calculée en fonction de la profondeur. Le flou est nettement plus important sur la partie inférieure de la bille. Ce phénomène est dû au fait que l'étalement de la PSF augmente rapidement avec la profondeur, à cause de l'aberration induite par le désaccord entre les indices de réfraction de l'huile d'immersion et de l'eau²⁵. Ces images sont ensuite deconvoluées à l'aide de l'algorithme MAP avec une PSF supposée invariante, mais on utilisera plusieurs PSF calculées à plusieurs profondeurs différentes. Le schéma en figure 2.6 présente la méthode de simulation.

Pour quantifier les résultats, l'image déconvoluée est segmentée pour séparer l'objet du fond, et une mesure de volumes et d'intensités est effectuée. Ce travail consistant à tester l'erreur commise sous l'hypothèse de non-invariance de la PSF, et non sur la qualité des algorithmes eux-même ou leur sensibilité au bruit, le calcul des images se faisant sans bruit ajouté.

La figure 2.8 illustre les résultats obtenus pour la bille de diamètre $3,2\mu\text{m}$,

²⁵[Gibson et Lanni, 1992]

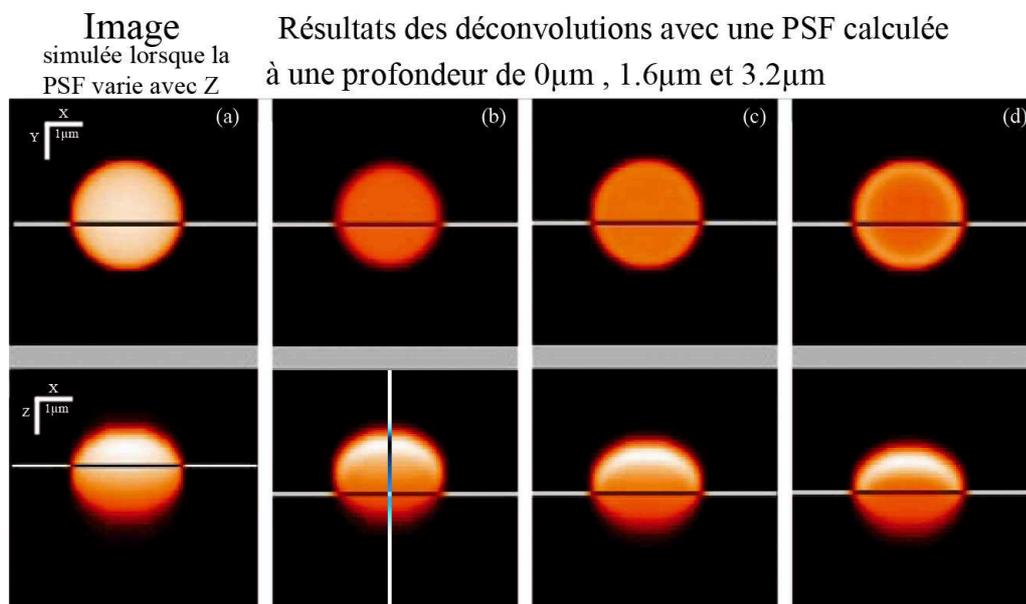


FIGURE. 2.8 | Résultats de la déconvolution pour la bille unique de $3,2\mu\text{m}$: (a) Bille calculée avec une PSF non-invariante en profondeur. Résultats de déconvolution avec la méthode MAP pour : (b) une PSF à profondeur nulle. (c) une PSF à profondeur $1,6\mu\text{m}$. (d) une PSF à profondeur $3,2\mu\text{m}$. Les coupes à profondeur constante montrent des profils différents

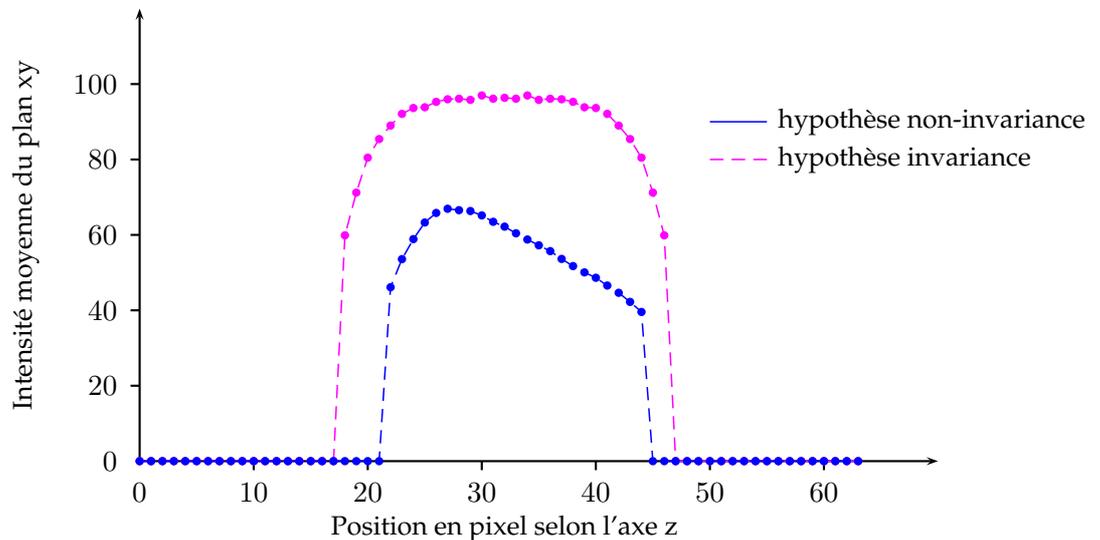


FIGURE. 2.9 | *Profils de l'intensité selon l'axe Z traversant la bille au centre, pour les résultats de déconvolutions avec la PSF à $Z = 0\mu\text{m}$: nous avons représenté ici les profils des résultats de déconvolution des images simulées sous les hypothèses de l'invariance et de la non-invariance pour l'acquisition du spécimen. Lorsque la PSF est non invariante, le fond du spécimen n'est pas correctement reconstruit.*

déconvoluée avec une PSF calculée à profondeur nulle (Figure 2.8(b)), à profondeur $1,6\mu\text{m}$ (à la moitié de la profondeur considérée, Figure 2.8(c)) et $3,2\mu\text{m}$, correspondant au fond de l'objet (Figure 2.8(d)). La figure 2.8(a) montre l'image de départ.

On remarque que la reconstitution est seulement partielle, et de bien moins bonne qualité qu'une déconvolution à PSF réellement invariante. En particulier, la baisse d'intensité observée sur le bas de la bille n'est jamais corrigée (voir figure 2.9). La forme de la bille reconstituée diffère légèrement selon la PSF considérée, et l'étalement de cette dernière n'étant pas la même, il y a un impact sur le volume. La reconstitution sera de ce fait plus étendue que si l'on utilise une PSF moins compacte. Dans notre exemple, la reconstitution avec une PSF calculée à profondeur nulle (sans aberration) est légèrement plus grande que celle calculée avec la PSF calculée à une profondeur de $3,2\mu\text{m}$ (avec aberration).

Pour estimer l'erreur commise sur les mesures de petits objets répartis à différentes profondeurs, nous avons calculé l'image d'un ensemble de 4 billes identiques de $1,6\mu\text{m}$ de diamètre, espacées de $3,2\mu\text{m}$, la première bille étant située juste sous la lamelle.

La figure 2.10(a) montre l'image de départ, calculée avec une PSF variante en profondeur. Celle-ci est déconvoluée avec une PSF à profondeur nulle (Figure 2.10(b)),

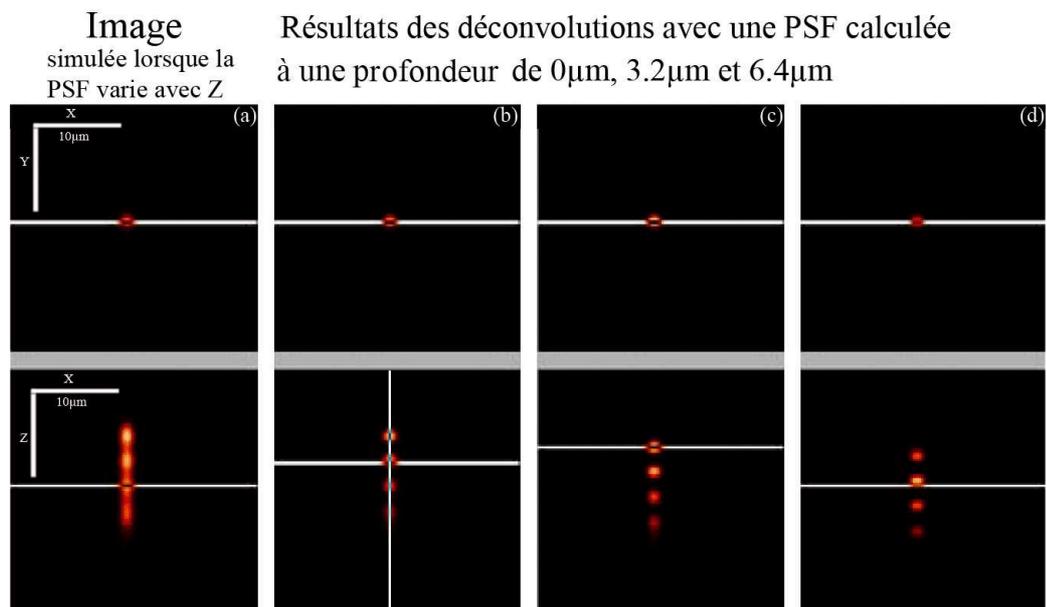


FIGURE. 2.10 | *Résultats de la déconvolution pour une pile de billes de $1,6\mu\text{m}$ de diamètre* : Pile de billes de $1,6\mu\text{m}$ de diamètre (a) convoluée en tenant compte de la variation en z de la PSF, (b) déconvoluée avec une PSF calculée à profondeur nulle, (c) à profondeur $3,2\mu\text{m}$ et (d) à profondeur $6,4\mu\text{m}$

une PSF à profondeur $3,2\mu\text{m}$ (Figure 2.10(c)), et une PSF calculée à la profondeur de $6,4\mu\text{m}$ (Figure 2.10(d)). L'observation est supposée faite avec le même système optique que précédemment. Sur l'image de départ, on note que les 4 billes sont quasiment fusionnées à cause de la résolution limitée du microscope. Une restauration est indispensable avant toute mesure quantitative.

Pour le résultat, à l'échelle d'une bille, on remarquera que la reconstruction est de bien meilleure qualité. En effet, la PSF ne varie que peu sur un intervalle de $1,6\mu\text{m}$ et chaque bille est relativement uniforme en intensité. On remarque cependant que la bille la plus profonde est mal reconstruite avec les PSF calculées à $0\mu\text{m}$ et $3,2\mu\text{m}$. A chaque fois, la bille la mieux reconstruite est celle qui est la plus proche de la PSF correspondante utilisée lors de la déconvolution.

La figure 2.11 montre les profils en intensités selon l'axe optique traversant la pile de billes en leurs centres, mesurés sur l'image déconvoluée avec la PSF à profondeur nulle, par rapport au résultat si l'image est formée selon l'hypothèse de l'invariance. L'intensité est de moins en moins bien reconstruite avec la profondeur.

La bille la plus profonde est vue avec une intensité moins grande que la première bille, alors qu'elles sont identiques. On en déduit qu'une mesure de concentration de fluorophores serait affectée de la même erreur. On observe également que la distance entre les billes n'est pas restaurée avec fidélité.

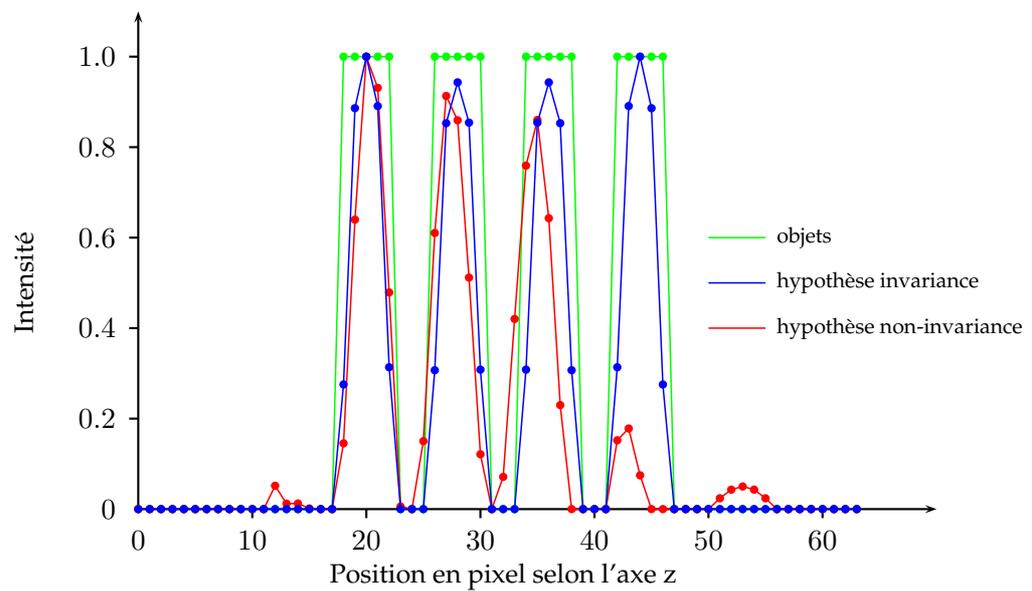


FIGURE. 2.11 | *Profils de l'intensité selon l'axe Z traversant la pile de billes en leurs centres, pour les résultats de déconvolutions avec la PSF à $Z = 0\mu m$: nous avons représenté ici les résultats des déconvolutions des images simulées avec les hypothèses de l'invariance et de la non-invariance, sous forme de profils. Dans le cas où le système d'acquisition présente une réponse impulsionnelle non invariante, le résultat est dégradé lorsque l'objet à reconstruire est éloigné de la PSF utilisée.*

2.6 conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté de façon générale les algorithmes de déconvolution utilisés en microscopie de fluorescence. L'idée de la déconvolution est donc de reconstruire le plus fidèlement possible les données de départ, malgré la nature mal posée du problème inverse. Le plus grand obstacle à la déconvolution est le bruit présent dans les images, qui rend encore plus délicat l'inversion d'un système singulier, très sensible aux petites variations des données initiales.

Pour parvenir à réaliser l'inversion, des hypothèses sont faites concernant la nature physique de l'espace objet, telles que la non-négativité des intensités et le support bornée des amplitudes. Les solutions itératives et non linéaires permettent d'imposer ces contraintes, et donnent de meilleurs résultats mais pour un coût en temps beaucoup plus important que les méthodes directes. Ceci peut être incompatible avec le travail de routine visant à traiter un grand nombre de données pour obtenir des statistiques fiables sur les analyses biologiques.

Lorsqu'une réponse impulsionnelle théorique est utilisée, elle doit être le plus proche possible de celle effectivement existante pour le système de mesure, particulièrement aux niveaux des aberrations. Des écarts entre les paramètres expérimentaux et les paramètres du modèle introduisent une erreur dans les résultats de déconvolution. Les travaux du laboratoire conduit par Olivier Haeberlé²⁶ et Alain Dieterlen²⁷ vont dans le sens d'une meilleure caractérisation et modélisation des systèmes optiques. L'étude de l'utilisation de la déconvolution lorsque la réponse du système optique varie montre la limite des méthodes classiques.

Nous présentons dans le chapitre suivant une méthode pour améliorer la précision et la répétabilité des mesures avec des méthodes de déconvolution rapides telles que LLS ou MAP. Une méthode de déconvolution sur le principe de Monte-Carlo est présentée dans le dernier chapitre pour répondre au problème de la non-invariance de la PSF.

²⁶[Haeberlé *et al.*, 2001b]

²⁷[Dieterlen *et al.*, 2002]

3 | OPTIMISATION DES CONDITIONS DE DÉCONVOLUTION

“Ne dites pas que vous n’avez pas le temps. Vous avez exactement le même nombre d’heures par jour qu’ont eu Pasteur, Michel-Ange, de Vinci ou Albert Einstein...”

H. JACKSON BROWN

LES méthodes directes (LLS et MAP) ne peuvent pas restituer les fréquences éliminées par la fonction de transfert du microscope, mais l’amélioration est réelle, et souvent suffisante pour une première approche. Si une image le nécessite, des méthodes itératives peuvent être utilisées pour atteindre des résolutions supérieures. Les méthodes directes ont l’avantage de la vitesse, cependant ces méthodes souffrent d’un problème majeur qui les rend difficilement utilisables pour un opérateur non averti. Le compromis entre l’erreur de biais qui traduit la fidélité du résultat et la valeur de la variance des intensités de l’espace objet estimé est recherché par la minimisation d’une fonction de coût, permettant ainsi la régularisation du problème. Mais le problème est mal-posé, et le réglage du paramètre de régularisation est critique. Ce chapitre présente donc une automatisation des méthodes directes présentées dans le chapitre précédent, en vue d’une utilisation routinière, en utilisant un même critère pour fixer le paramètre de régularisation. Cependant même avec cette automatisation, lorsque le bruit est trop important, la déconvolution régularisée conduit à des résultats surlissés, le paramètre de régularisation étant choisi trop grand pour éviter l’amplification du bruit. Nous présentons donc une méthode de pré-filtrage pour améliorer les résultats de déconvolution. Le filtre employé est un filtre de Wiener, qui utilise le résultat de la déconvolution comme estimation du signal. Quelques itérations permettent d’améliorer les estimations successives de la déconvolution et du filtrage, qui fonctionnent alors comme un système en boucle fermée. Le pré-filtrage peut être lui-même considéré comme une régularisation. Dans un cas pratique, les objets réels sont inconnus, nous ne disposons

que de l'image observée. Pour évaluer la qualité de la déconvolution, nous utilisons donc des images de synthèse, obtenues par convolution d'un objet numérique avec une PSF calculée qui modélise le processus de formation d'image. On peut enfin ajouter du bruit à l'image obtenue. L'image ainsi simulée est déconvoluée, et l'objet reconstruit peut être alors comparé à l'objet de départ pour estimer la qualité de la reconstruction. Cette étape de simulation permet de quantifier l'apport de la méthode, car les objets numériques sont parfaitement connus. La méthode est ensuite appliquée à deux cas concrets, en cytologie et en cytogénétique moléculaire.

3.1 Détermination automatique du paramètre de déconvolution des algorithmes LLS et MAP

Les algorithmes de déconvolution couramment utilisés en microscopie de fluorescence, présentés dans le chapitre précédent, nécessitent généralement une intervention de l'opérateur qui doit fixer les paramètres de régularisation, ou prédéterminer le nombre d'itérations pour les algorithmes itératifs. Cette étape nécessite une certaine expérience de la part de l'utilisateur. D'autre part, les résultats peuvent varier d'un opérateur à un autre, en fonction des connaissances à priori sur le spécimen, du niveau de bruit dans l'image, ou de l'expérience et du savoir-faire.

Cette intervention manuelle est donc subjective, et la qualité du résultat final est souvent jugée de manière seulement qualitative. Pour faciliter l'adoption de la déconvolution par des utilisateurs non-avertis, il convient donc d'éliminer l'incertitude liée à cette intervention manuelle, et se baser sur des critères quantitatifs pour juger de la qualité finale de la restauration. Le critère d'erreur quadratique seul, lorsqu'il est appliqué entre l'image reconstruite et l'image observée, conduit à des solutions qui présentent une forte variance, les hautes fréquences étant privilégiées. En effet, pour obtenir l'estimation de l'image, on reconvoit le résultat de la déconvolution pour pouvoir le comparer à l'observation qui devrait être proche. Toutes les solutions qui comportent des fréquences présentes dans le "missing cone" (voir figure 1.9 page 20 dans le chapitre 1), quelles qu'elles soient, présenteront une erreur quadratique dans l'espace image qui sera similaire, car ces fréquences seront éliminées par la convolution avec la PSF. Le critère seul de l'erreur quadratique conduit donc à des solutions à trop fortes variances. La régularisation limite l'amplification du bruit et restreint les solutions à celles qui ont une variance bornée. Nous avons vu que les algorithmes LLS et MAP nécessitent le choix d'un paramètre de régularisation. Pour que ceci soit possible, leurs auteurs proposent un réglage basé sur des simulations dans l'espace objet,

en utilisant la jauge de joyce et Root¹ :

$$\min \left(\sum_{x,y,z}^{L_x,L_y,L_z} \left(f(x,y,z) - \hat{f}_{\lambda_s}(x,y,z) \right)^2 + \sigma^2 \sum_{i=1}^m \frac{1}{\lambda_i} \right) \quad (3.1)$$

Cette fonction de coût, contient un terme de fidélité aux données $\sum_{x,y,z}^{L_x,L_y,L_z} \left(f(x,y,z) - \hat{f}_{\lambda_s}(x,y,z) \right)^2$ où $\hat{f}_{\lambda_s}(x,y,z)$ est le résultat de la déconvolution avec le paramètre de régularisation λ_s . Le terme de pénalisation $\sigma^2 \sum_{i=1}^m \frac{1}{\lambda_i}$ est fonction de la sommes des inverses des valeurs propres conservées (les valeurs propres $\lambda_i > \lambda_s$). Les petites valeurs propres feront donc augmenter l'erreur globale très rapidement. La pénalisation est d'autant plus grande que la variance du bruit σ^2 est grande. Les auteurs suggèrent une phase de simulation, et appliquent la jauge dans l'espace objet, ils précalculent alors l'OTF inverse qui satisfait l'équation (3.1) pour accélérer le traitement. Cependant, les conditions de mesures sont variables, et dépendent de nombreux facteurs comme le type de marqueurs fluorescents, la qualité de la caméra, le vieillissement, la température, etc... . Dans le chapitre précédent nous avons vu que certains paramètres sont susceptibles de varier et de s'écarter des valeurs standard. Il est préférable, de manière idéale, de mesurer la PSF dans les mêmes conditions que le spécimen. Le calcul de l'OTF inverse doit donc être effectué à nouveau. Cependant, pour profiter de la vitesse de calcul liée à l'inversion directe par l'utilisation de FFT, et conserver de bonnes conditions de traitement, nous proposons l'utilisation de la jauge de Joyce et Root dans le domaine image :

$$\sum_{x,y,z}^{L_x,L_y,L_z} \left(\left(g(x,y,z) - h(x,y,z) \otimes \hat{f}_{\lambda_s}(x,y,z) \right)^2 \right) + \sigma^2 \sum_i^m \frac{1}{\lambda_i} \quad (3.2)$$

La minimisation de cette fonction permet de réaliser un compromis entre la fidélité du résultat et l'effet lissant assure des amplitudes bornées. En effet, le premier terme qui traduit la fidélité au résultat, l'erreur quadratique, est maximal lorsque le seuil λ_s tend vers 0, c'est à dire lorsqu'on garde le maximum de valeurs propres pour réaliser l'inversion dans le cas de LLS, ou que l'on ne modifie pas les valeurs propres dans le cas de MAP. Cependant on se trouve dans des conditions de singularité, et l'image obtenue, proche selon le critère d'erreur quadratique, est inacceptable au niveau de la variance. On retrouve cette erreur dans le second terme qui traduit le nombre de valeurs propres utilisées dans le calcul, qui est alors maximale. Inversement, lorsque λ_s augmente, le résultat est fortement lissé, le terme d'erreur quadratique est élevé,

¹[Joyce et Root, 1984],[Preza et al., 1992]

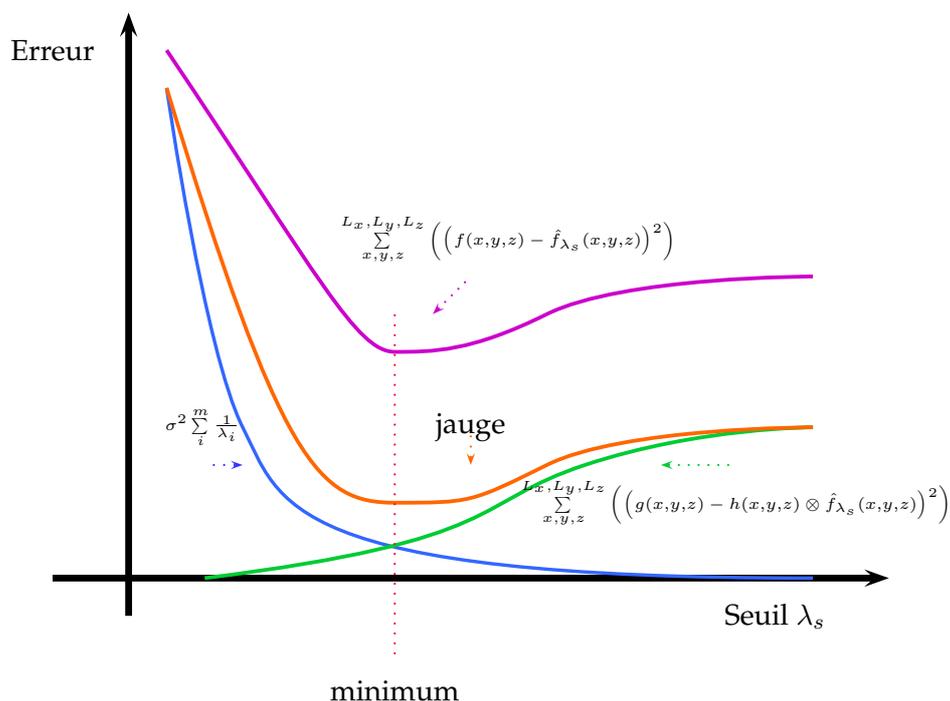


FIGURE. 3.1 | *Fonctionnement de la jauge de Joyce et Root* : Un terme est minimal lorsque l'autre augmente et inversement. La somme des deux termes d'erreur (l'erreur de biais et l'erreur de variance) admet un minimum unique qui correspond au minimum de l'erreur quadratique dans l'espace objet

et le second terme diminue. Il est possible de trouver un compromis réalisant une fidélité aux données suffisante, pour une variance acceptable. La figure 3.1 illustre le fonctionnement de la jauge. La fonction de coût de Tikhonov-Miller est similaire, car elle comporte un terme relatif à la fidélité aux données observées et restaurées, et un terme traduisant la variance des intensités de l'espace objet reconstruit en passant par un calcul de dérivées (ou un filtrage passe-haut). Ce terme représente alors une pénalité pour les hautes fréquences.

La figure 3.2 montre l'évolution de la valeur de la fonction de coût normalisée avec MAP pour une simulation avec un bruit minimum ($S/N=48\text{dB}$ pour une image codée sur 8bits). La connaissance de l'objet de synthèse permet de calculer l'écart quadratique dans l'espace objet, et montre la superposition du minimum de l'erreur de la jauge calculée dans l'espace image. Cette fonction permet donc d'avoir accès à ce minimum dans l'espace image, qui est le seul espace accessible pour faire une comparaison en pratique, entre l'image acquise et l'estimation de l'image faite à partir du résultat de déconvolution. L'algorithme de minimisation est simplement la minimisa-

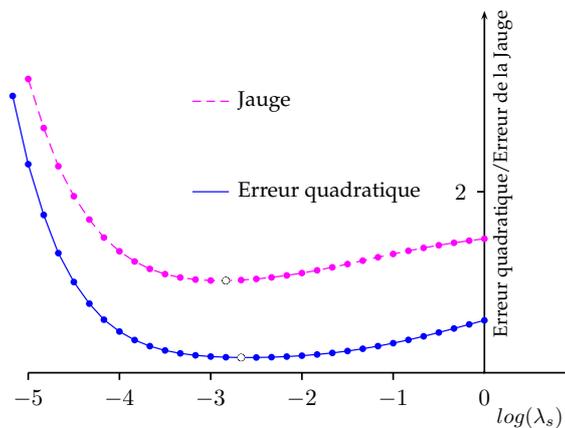


FIGURE. 3.2 | *Utilisation de la jauge avec MAP pour un signal peu bruité ($S/N=48\text{dB}$)* : Comparaison de la jauge dans l'espace image et de l'erreur quadratique dans l'espace objet, les minima sont proches, 0,00187 pour l'erreur quadratique et 0,00215 avec la jauge. Dans la pratique, l'évaluation de l'erreur n'est possible que pour l'espace image, l'erreur quadratique sur les objets n'est pas accessible.

tion du golden ratio². En ajoutant d'avantage de bruit ($S/N=20\text{dB}$) nous obtenons le résultat présenté sur la figure 3.3

Nous avons constaté que lorsque nous travaillons sur des images synthétiques peu bruitées (entre 20dB et 40dB), cette méthode fonctionne très bien, avec cependant un décalage des valeurs de seuils de régularisation qui a pour effet un sur-lissage du résultat pour les images les plus bruitées. L'image obtenue par déconvolution étant très sensible au bruit, l'application de cette méthode sur des images biologiques échoue souvent à donner un résultat exploitable, le résultat est souvent trop 'lisse'. Il conviendrait encore de diminuer la sensibilité de la méthode au bruit, pour ramener le rapport signal-sur-bruit dans la gamme acceptable. La prochaine section présente une méthode de pré-filtrage des données qui résout en grande partie ce problème.

²[Press et al., 1995]

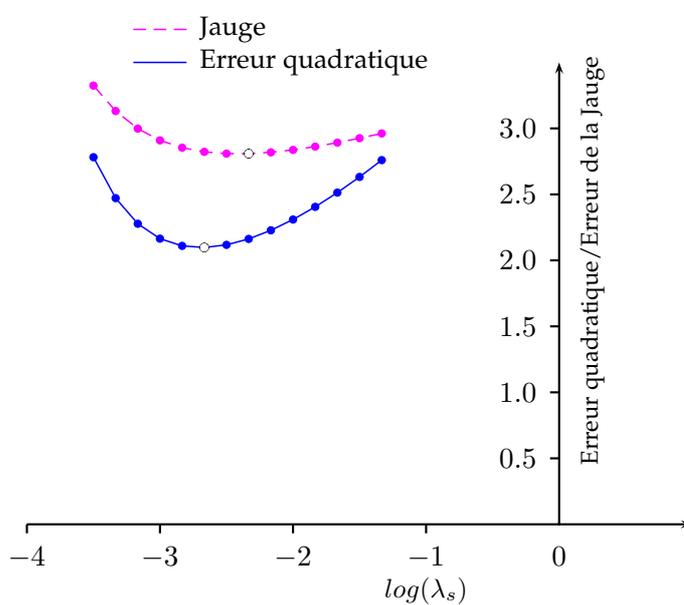


FIGURE. 3.3 | *Utilisation de la jauge de Joyce et Root avec MAP pour un signal bruité (S/N=20dB) : Comparaison de la jauge dans l'espace image et de l'erreur quadratique dans l'espace objet, les minima sont proches, mais l'écart augmente. 0,0046 pour l'erreur quadratique et 0,0126 avec la jauge. A partir de 20dB le résultat est sur-lissé.*

3.2 Pré-filtrage pour une régularisation optimale

3.2.1 Principe

Les données expérimentales acquises sur un microscope de fluorescence sont toujours bruitées. On distingue dans la pratique deux types de bruit. Le bruit additif, de type gaussien, est dû au système d'acquisition et de numérisation électronique. Cependant l'électronique moderne a fait des progrès considérables de ce point de vue, aussi bien au niveau des capteurs CCD que des amplificateurs électroniques. Si les niveaux de lumière en jeu sont faibles, on voit alors apparaître la nature aléatoire des phénomènes d'émission lumineuse, qui se traduit mathématiquement par un bruit de type poissonien et non simplement additif, dont la variance est proportionnelle au signal lumineux. La encore, nous avons vu comment certains algorithmes de déconvolution (MAP, ML-EM) tiennent compte de cette nature particulière de bruit. Lorsque les images sont acquises dans de bonnes conditions, on peut souvent négliger l'influence du bruit. On parle d'images acquises avec un bon rapport signal-sur-bruit. La déconvolution dans ce cas est relativement facile, et donne de bons résultats. Lorsque le niveau de bruit augmente, la déconvolution devient impossible. Le bruit est alors responsable de l'instabilité du processus d'inversion. On doit alors accepter un compromis entre la précision et la stabilité de déconvolution, en régularisant le problème.

Cependant, ce compromis peut aboutir à un résultat qui n'améliore pas vraiment la résolution, si le bruit est trop présent. On peut alors se demander s'il faut vraiment travailler sur les données brutes d'acquisition, ou si un pré-traitement des données peut améliorer les résultats. Le pré-filtrage des données est une technique qui permet justement de séparer le processus de réduction du bruit et le processus d'inversion du problème. Certains auteurs³ utilisent simplement une convolution par une gaussienne sur l'image brute, répercutée sur la PSF (l'image et la PSF sont convoluées par la même gaussienne) pour tenir compte du filtrage dans la déconvolution et compenser celui-ci. Sekko⁴ propose une méthode intéressante pour déconvoluer des images bruitées, en utilisant un filtre de Wiener de manière récursive. Le filtre de Wiener utilise une estimation de la puissance spectrale de l'image non bruitée, et une estimation spectrale du bruit. Ces estimations sont faites à partir d'un résultat de déconvolution précédent, ce qui par itération, permet une amélioration des estimations successives. Sekko montre en 1D et 2D l'amélioration de l'estimation basée sur le schéma présenté

³[Van Kempen *et al.*, 1997],[Van Kempen et Van Vliet, 1997]

⁴[Sekko *et al.*, 1999]

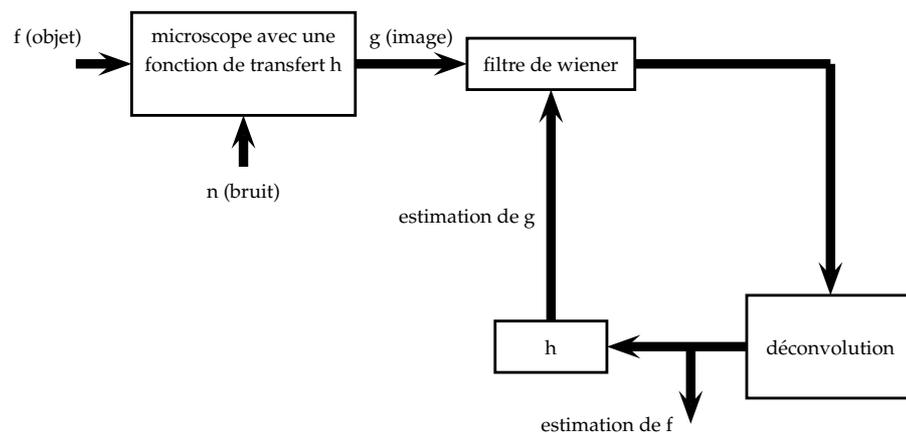


FIGURE. 3.4 | *Principe du pré-filtrage itératif* : Le résultat de la déconvolution est utilisé pour améliorer le filtrage. une estimation de f reconvoquée par h donne au filtre de Wiener une nouvelle estimation de g , donnant elle même une version non bruitée de l'image pour la déconvolution

par la figure 3.4.

Le filtre de Wiener, ainsi que les méthodes LLS ou MAP, sont basés sur l'hypothèse d'une image contaminée par un bruit gaussien. En toute rigueur, cette hypothèse n'est valable que pour des images pour lesquelles une grande quantité de photons ont été collectés, mais même pour le cas de la microscopie de fluorescence à faibles niveaux de signal, on peut utiliser, comme certains auteurs⁵, la transformation d'Anscombe⁶.

Dans son principe, il est possible d'adapter la méthode à tout type de filtre utilisant des informations issues de la déconvolution, pour améliorer progressivement la solution. On peut donc envisager un système de déconvolution adaptatif, dans lequel le pré-filtrage des données est ajusté au bruit présent dans les images. La méthode d'inversion est adaptée aux caractéristiques des images considérées et au type de mesures désirées. En effet, il a été vu que certains algorithmes donnaient de meilleurs résultats pour les mesures de forme ou de taille, alors que d'autres respectent mieux les distributions d'intensités⁷.

Reprenant la même méthodologie que Sekko, nous présentons une extension en 3D de la méthode, en l'adaptant à notre application. Nous présentons donc d'abord des simulations qui mettent en évidence l'influence du filtrage sur la déconvolution, en faisant varier le niveau de réduction du bruit.

⁵[Homem *et al.*, 2002],[Kervrann et Trubuil, 2004],[Starck et Murtagh, 2001]

⁶[Anscombe, 1948]

⁷[Chomik *et al.*, 1997]

3.2.2 Influence du filtrage

Nous utilisons un objet de synthèse, composé de neuf billes de même diamètre et d'intensités différentes, disposées dans les huit coins d'un cube, avec une dernière bille au centre. Dans cette étude, le modèle scalaire de Gibson et Lanni vu dans le premier chapitre est utilisé. La réponse impulsionnelle optique est calculée dans des conditions correspondant aux conditions expérimentales, et l'objet est convolué avec cette PSF. La liste suivante donne les paramètres utilisés dans le modèle de Gibson et Lanni avec les conditions d'acquisition des images du système dont dispose le Laboratoire en collaboration avec l'Hopital Emile Muller de Mulhouse :

Nxy	128	size of the image in x and y (taille de l'image en x et y)
deltaxy	0,068	pixel size in image space in μm (largeur d'un pixel dans l'espace image)
Nz	64	size of the image in z (optical axis) (nombre de plans)
deltaz	0,068	pixel size in z in μm (distance entre deux plans)
mag	100	lateral magnification (grandissement)
NA	1,4	numerical aperture of the objective (ouverture numérique)
workdist	0,16	working distance of the objective in mm (distance de travail)
lamda	0,000530	fluorescence wavelength in mm (longueur d'onde de la fluorescence)
slipdesri	1,525	coverslip design refractive index (valeur standard de l'indice de réfraction de la lamelle)
slipactri	1,525	coverslip actual refractive index (valeur effective de l'indice de réfraction de la lamelle)
slipdesth	0,170	coverslip design thickness in mm (épaisseur standard de la lamelle)
slipactth	0,170	coverslip actual thickness in mm (épaisseur effective de la lamelle)
medesri	1,515	immersion oil design refractive index (indice de réfraction standard de l'huile d'immersion)
medactri	1,515	immersion oil actual refractive index (indice de réfraction effectif de l'huile d'immersion)
specri	1,33	specimen refractive index (indice de réfraction du spécimen)
specthick	0,0	specimen depth in mm (profondeur du spécimen)
desot	160	design tube length in mm (longueur standard du tube)
actot	160	actual tube length in mm (longueur effective du tube)

Un bruit Gaussien est ensuite ajouté, pour imiter les conditions expérimentales. En toute rigueur, il faudrait aussi générer un bruit Poissonien, mais en suivant la remarque faite plus haut, on garde les hypothèses de base admises pour LLS et MAP sur la statistique du bruit. La figure 3.5 décrit le processus de formation des images simulées bruitées. Elle présente des coupes x-y et x-z des objets, PSF, image sans bruit, bruit, et image bruitée.

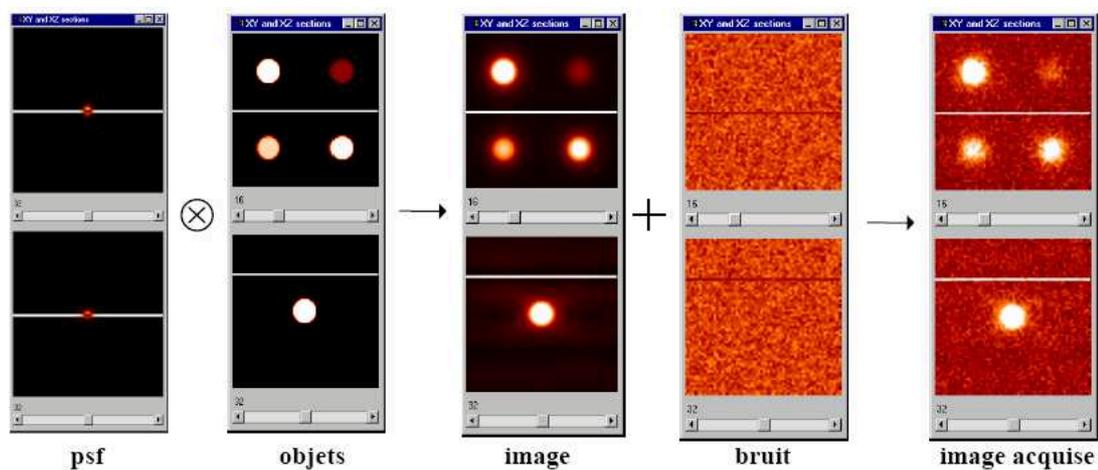


FIGURE. 3.5 | *Image acquise simulée* : Construction de l'image test par convolution d'un objet (9 billes d'intensités différentes et de même diamètre) avec une PSF calculée et rajout de bruit. L'image en haut de chaque vue représente le plan XY des images 3D, l'image en bas de chaque vue représente le plan XZ de l'image 3D

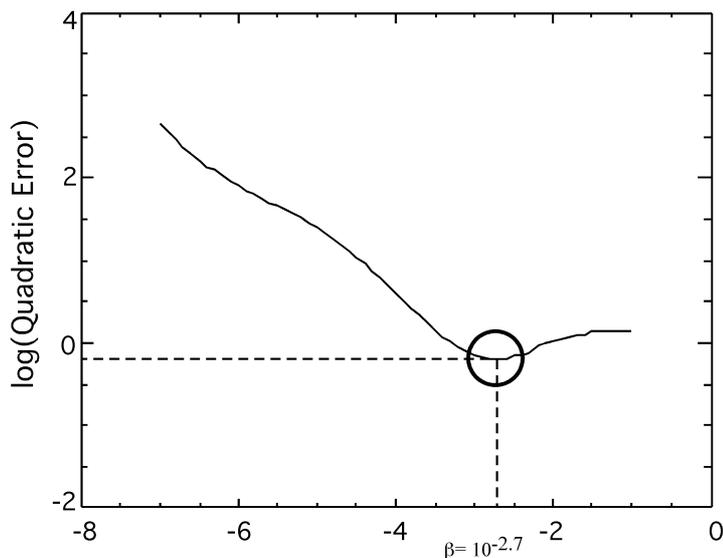


FIGURE. 3.6 | *Courbe d'erreur de déconvolution en fonction du paramètre de régularisation β : Erreur quadratique en fonction de β . On constate que cette erreur varie très rapidement en fonction du paramètre de régularisation. Une petite erreur sur le paramètre de régularisation entraîne une grande erreur sur la qualité du résultat final.*

Dans la suite nous négligerons l'influence du bruit Poissonien. Le niveau de bruit de 40% ($S/N=8\text{dB}$), relativement élevé, a été choisi par rapport à des images expérimentales pour lesquelles LLS et MAP sans pré-traitement échouent à donner des résultats de déconvolution exploitables. Ces images sont loin d'atteindre la pleine échelle du capteur, et sont fortement dégradées. Dans le cas d'images fortement bruitées, les algorithmes LLS et MAP auront tendance à lisser trop fortement le résultat. De plus Le bruit est redistribué dans le signal, faussant toute mesure de volumes ou d'intensités.

L'image simulée a été déconvoluée à l'aide de l'algorithme LLS (sans pré-filtrage), et le résultat est comparé à l'objet original. On a calculé l'erreur quadratique entre l'objet original et l'objet estimé, en fonction du paramètre de régularisation β qui définit le seuil à partir duquel on supprime les valeurs propres inférieures pour stabiliser l'inversion numérique ($\lambda_s = \beta$). La figure 3.6 montre (en échelle logarithmique) l'erreur quadratique en fonction de β . On constate que cette erreur varie très rapidement en fonction du paramètre de régularisation. On en déduit qu'une petite variation sur le paramètre de régularisation entraîne une grande erreur sur la qualité du résultat final. De plus, même en prenant la valeur de β correspondant à la plus petite erreur quadratique ($\beta = 10^{-2.7}$), le résultat de déconvolution est loin d'être satisfaisant, comme on le voit sur la figure 3.7, qui montre l'objet reconstruit pour cette valeur. Les profils

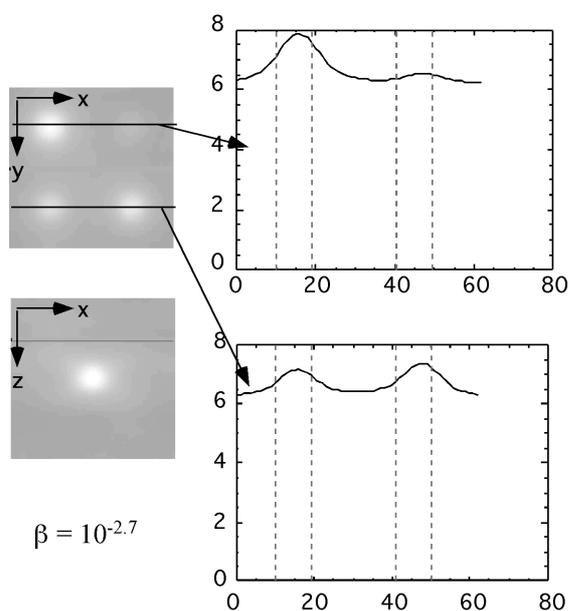


FIGURE. 3.7 | *Profils de l'image test déconvoluée sans pré-filtrage* : le résultat de déconvolution qui donne la plus petite erreur quadratique est présenté ici. Une coupe XY centrée sur 4 des 9 billes, et une coupe XZ centré sur la bille au milieu du volume. Les profils sont très mal reconstruits (sont représentés ici les profils de quatre billes, l'axe passant au centre des billes dans le plan XY, en traits pleins, les profils des billes d'origines en traits interrompus).

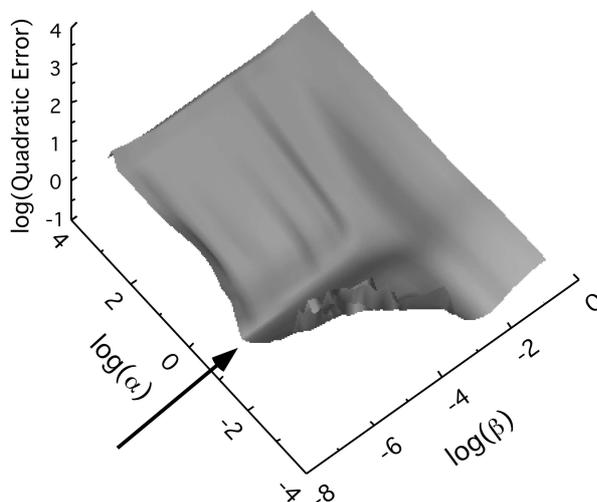


FIGURE. 3.8 | *Surface d'erreur de la déconvolution en fonction des paramètres de pré-filtrage α et de régularisation β : Une vallée de stabilité apparaît pour $\alpha = 10^{-0.4}$: une grande variation du facteur de régularisation β est alors possible*

des billes mesurés sur l'image déconvoluée, en trait plein, sont très différents de ceux des billes théoriques (traits pointillés). Toute mesure de taille et/ou d'intensité serait entachée d'erreurs inacceptables. Ce résultat est clairement dû au bruit présent dans les images, car les mêmes mesures sur les images non-bruitées donnent de très bons résultats.

Nous avons alors proposé d'étendre l'approche proposée par Sekko à nos travaux en 3D. Nous utilisons un filtre de Wiener (voir équation (2.6)) avec un facteur supplémentaire noté α qui pondère de rapport des puissances spectrales du bruit et de l'image non bruitée (qui est à estimer). Le filtre n'est pas utilisé pour déconvoluer mais uniquement pour améliorer le rapport signal-sur-bruit ($\mathbf{H} = 1$) :

$$\mathbf{W} = \frac{1}{1 + \alpha \cdot \frac{\mathbf{S}_g}{\mathbf{S}_n}} \quad (3.3)$$

Pour une valeur de $\alpha = 0$, aucun filtrage n'est appliqué. La valeur $\alpha = 1$ correspond au filtre de Wiener classique. Des valeurs plus grandes pour α peuvent être utilisées, mais vont aussi fortement filtrer le signal, ce qui entraînera une grande perte d'information.

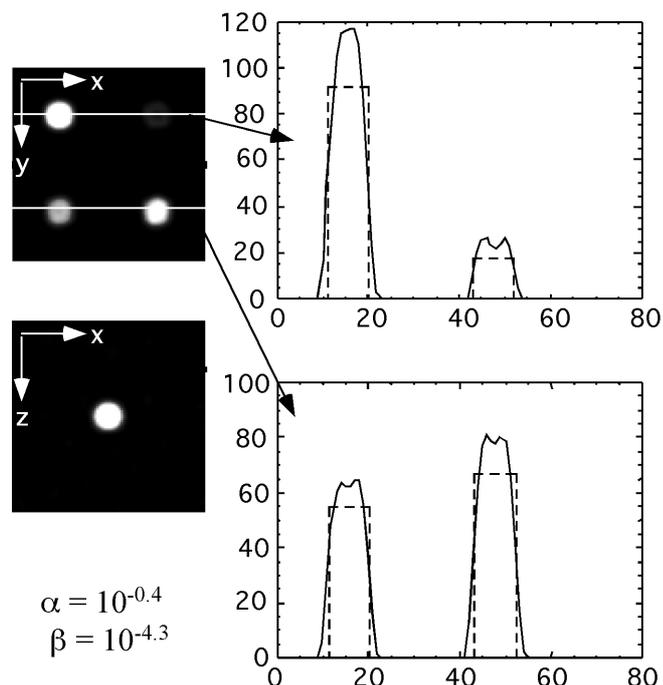


FIGURE. 3.9 | Profil de l'image test déconvoluée par LLS avec pré-filtrage : Une coupe XY centrée sur 4 des 9 billes, et une coupe XZ centrée sur la bille au milieu du volume. Les profils sont cette fois mieux reconstruits (sont représentés ici les profils de quatre billes, l'axe passant au centre des billes dans le plan XY, en traits pleins, les profils des billes d'origines en traits interrompus). L'ordonnée est en niveau de gris, l'abscisse en pixels.

Nous avons étudié les résultats de déconvolution à l'aide des algorithmes LLS et MAP, sans et avec pré-filtrage. Dans ce cas nous avons calculé l'erreur quadratique entre le résultat final et l'objet de départ, qui est ici connu. Nous avons donc effectué une étude à deux paramètres, α pour le pré-filtrage et β pour la régularisation, pour tracer la surface d'erreur obtenue (par extension de la courbe d'erreur présentée à la figure 3.6).

La figure 3.8 présente le résultat obtenu pour notre image simulée des 9 billes, pour une déconvolution avec LLS. On constate la présence d'une vallée de stabilité pour une valeur de pré-filtrage $\alpha = 10^{-0.4}$. Dans cette vallée de stabilité (indiquée par une flèche sur la figure), on voit que l'erreur de restauration est maintenant bien moins sensible au choix du paramètre de régularisation, qui peut maintenant varier sur plusieurs décades sans grand changement du résultat de déconvolution final. Le minimum d'erreur est observé pour une valeur de pré-filtrage $\alpha = 10^{-0.4}$ et un seuil de régularisation $\beta = 10^{-4.3}$. La figure 3.9 présente le résultat de la déconvolution LLS pour ces valeurs. Les profils reconstitués sont maintenant très proches des profils originaux, et ce pour les 9 billes.

Une segmentation de l'image à 45% montre que les mesures de volumes sont entachées d'une erreur de 23% et les mesures d'intensité d'une erreur de 20% par rapport à l'image originale, ce qui montre une bonne restauration malgré le bruit, alors que la déconvolution sans pré-filtrage donne des résultats inutilisables (289% d'erreur sur le volume et 93% sur l'intensité). On note cependant que le pré-filtrage, limite la résolution à un niveau qui dépend de l'estimation du bruit, le filtre de Wiener réduisant les hautes fréquences.

Néanmoins, la méthode peut s'appliquer avec n'importe quel type de filtres, plus adaptés peut-être à des objets à transitions raides. Malgré cette remarque, l'amélioration du filtre de Wiener permet la déconvolution. Cette méthode de pré-filtrage est classique, et le pré-filtrage supprimant les hautes fréquences responsables de l'instabilité de la déconvolution, il n'est guère étonnant que la régularisation soit stabilisée.

On peut observer sur la figure 3.9 que les profils reconstitués présentent des rebonds. Ceci est aussi dû au pré-filtrage, qui supprime les hautes fréquences responsables des instabilités, ce qui est justement le but recherché, mais ces hautes fréquences sont aussi justement celles nécessaires à la reconstruction correcte d'un profil à transitions brusques tel que celui adopté pour nos billes de synthèse.

Ce phénomène ne devrait pas être gênant dans la pratique, car une hypothèse couramment admise est que justement les objets de fluorescence ne présentent pas de transitions brusques (et donc leurs spectres ne contiennent pas de hautes fréquences), à cause du phénomène de diffusion des fluorophores dans le spécimen.

Pour l'application de la méthode dans un cas réel, la difficulté est d'estimer S_g qui n'est pas connu. On peut cependant revenir au schéma de principe 3.4 page 60. La première estimation est donnée de manière classique en prenant simplement comme paramètre du filtre de Wiener la variance du bruit. Après déconvolution, on utilise le résultat reconvolué, comme estimation dans le calcul de S_g , et on recommence à itérer la déconvolution.

Ces résultats confirment en 3D le résultat de Sekko, le pré-filtrage permet de séparer le processus de réduction du bruit du processus de déconvolution (présence de la vallée de stabilité). La méthode MAP combinée au pré-filtrage donne des résultats de qualité similaire.

Nous avons néanmoins étudié l'effet du pré-filtrage sur le spectre des images. Pour ce faire, nous considérons maintenant un objet synthétique composé de 9 sphères de même intensité, mais de diamètres différents. La figure 3.10(a) montre en perspective cet objet composé des 9 sphères dans une configuration semblable à l'objet considéré précédemment. La figure 3.10(a') montre le spectre de cet objet.

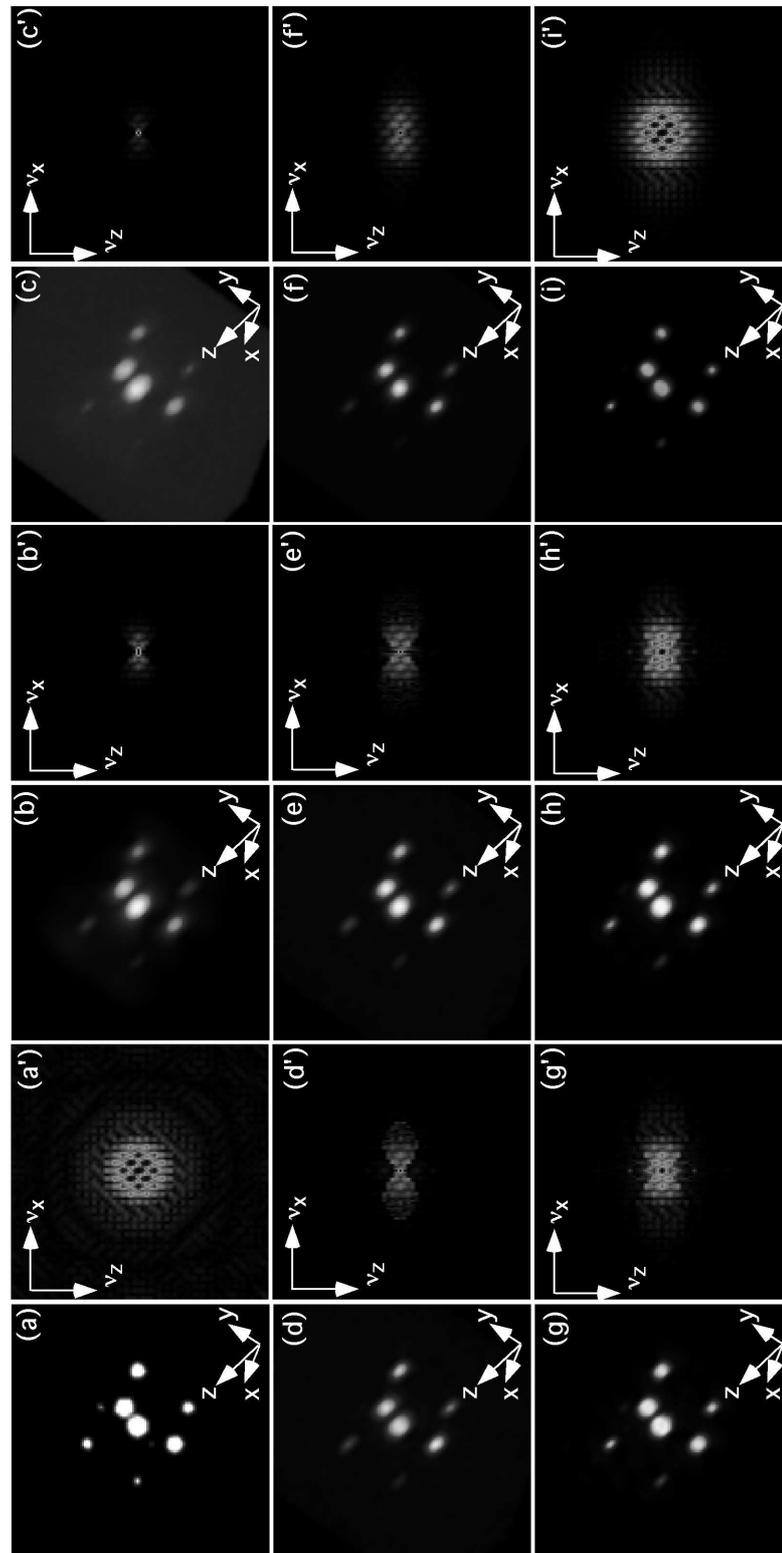


FIGURE. 3.10 | *Résultats de différentes méthodes de déconvolutions avec et sans pré-filtrage* : en (a) vue du volume 3D des objets originaux composé de 9 sphères de diamètres différents, en (a') coupe centrale du spectre de (a). En (b) résultat de la convolution avec la PSF et les objets (a). En (c) l'image obtenue après l'addition d'un bruit (rapport signal-sur-bruit de 8dB), en (c') son spectre. Les résultats de déconvolutions par LLS en figure (d), MAP en figure (e), et ML-EM en figure (f), les figures 3.10(d')(e')(f') montrent les spectres associés. Les résultats de déconvolutions avec pré-filtrage par LLS en figure (g), MAP en figure (h), et ML-EM en figure (i), les figures 3.10(g')(h')(i') montrent les spectres associés.

Les fréquences sont représentées selon les axes x et z . Pour mieux faire apparaître les hautes fréquences (de faibles amplitudes), les fréquences spectrales sont codées en niveaux de gris sur une échelle logarithmique, selon l'équation $S_{log} = \log_{10}(1 + 30 \cdot abs(S))$, où S représente la FFT de l'objet. Cet objet a été convolué avec la même PSF que précédemment, et le même niveau de bruit de 40% a été ajouté. Le flou et l'élongation selon l'axe z , caractéristique du microscope conventionnel, sont clairement visible sur la figure 3.10(b). Cet allongement selon l'axe z est illustré sur la figure 3.10(b'), qui représente le spectre de l'objet convolué, par l'apparition du "missing cone" qui traduit le fait que le microscope classique ne transmet pas les informations selon l'axe z . La figure 3.10(c) est l'image après addition du bruit, ce qui a pour effet de la brouiller encore plus. Sur le spectre, l'effet du bruit est de diminuer encore le contraste en diminuant de manière relative l'amplitude des basses fréquences par rapport celles des hautes fréquences.

Cette image de synthèse a tout d'abord été deconvoluée à l'aide des algorithmes LLS, MAP et ML-EM. Les résultats sont visibles sur les figures 3.10(d) à 3.10(f), les figures 3.10(d') à (f') montrant les spectres associés. A cause du bruit, la valeur du seuil de régularisation de LLS et MAP doit être maintenue à une valeur assez élevée, en éliminant ou minorant les composantes instables, et ce dès une fréquence relativement basse. Ceci a pour conséquence une mauvaise correction de l'élongation en z . Cette limitation est clairement visible sur les spectres, où l'on voit que les fréquences présentes, mais atténuées de la figure 3.10(b') sont partiellement restaurées seulement, et le cône de fréquences manquantes est encore bien visible.

L'utilisation de ML-EM donne des résultats sensiblement meilleurs, visible sur la figure 3.10(f), pour laquelle on note une meilleure correction de l'élongation en z . Ceci se traduit sur le spectre (figure 3.10(f')) par une reconstruction partielle du missing cone. Lorsque l'on applique un pré-filtrage, les résultats obtenus sont clairement de meilleure qualité, et ce pour les trois méthodes de déconvolution considérée ici. Les Figures 3.10(g) à (i) sont à comparer aux figures 3.10(d) à (f). On voit le gain en qualité aussi sur les spectres associés, qui montrent clairement que plus de fréquences sont retrouvées. Le meilleur résultat est obtenu pour ML-EM avec pré-filtrage, qui reconstruit presque correctement l'ensemble du spectre de l'objet de départ.

Les gains en déconvolution du pré-filtrage sont de deux ordres. Tout d'abord, les objets (les 9 sphères) sont mieux séparés du fond diffu (du au bruit), grâce au pré-filtrage. Ceci se traduit par une segmentation plus facile de l'image finale. De ce fait, on peut s'attendre à des mesures de dimensions, volumes ou intensités de meilleure qualité. Nous avons quantifié le gain obtenu pour les 9 sphères (présentées par ordre de taille croissante) de la figure 3.10. Le tableau de la figure 3.11 présente les résultats pour les mesures de volumes, intensités totales (intégrées sur le volume), et intensité

maximale pour chaque sphère. Les images, obtenues avec les différentes méthodes de déconvolution, ont toutes été segmentées, en appliquant un seuillage à 15% du maximum. Les trois premières lignes donnent les valeurs de référence pour les objets de départ. Nous avons utilisé les méthodes LLS, MAP et ML-EM sans pré-filtrage d'abord, puis avec pré-filtrage, que nous avons appelées respectivement LLS+, MAP+ et ML-EM+. Les résultats sont présentés en pourcentage de variation par rapport aux valeurs de référence.

On notera tout d'abord que pour les deux plus petites sphères, on n'obtient pas de résultat significatif, quelle que soit la méthode employée car ces objets ne sont pas clairement séparés du bruit. Pour les mesures de volume, le pré-filtrage améliore la qualité des mesures pour les trois méthodes considérées. Typiquement, LLS+ présente des résultats 40% plus précis que LLS. LLS+ et MAP+ donnent des résultats similaires pour ce qui est de l'identification des sites de fluorescence et la mesure de leur taille. Les meilleurs résultats en volume sont obtenus avec ML-EM+. Non seulement l'erreur absolue sur les mesures de volume est la plus petite, mais contrairement à LLS+ ou MAP+, l'erreur est très similaire d'une bille à une autre. Ceci montre aussi que ML-EM+ reconstruit mieux les profils des objets, ce qui est confirmé par le fait que le spectre de l'objet reconstruit avec ML-EM+ est le plus proche de celui de l'objet de départ.

Pour les mesures d'intensité totale, un gain en qualité similaire est obtenu pour LLS+, MAP+ et ML-EM+. Dans l'ordre les meilleurs résultats sont obtenus avec LLS+ (en négligeant la sphère de diamètre 2 pixels), MAP+ puis ML-EM+. Curieusement, ML-EM+ donne dans ce cas des mesures moins bonnes que ML-EM seul. Ceci s'explique par le fait que ML-EM+ reconstruit mieux les profils presque plats des sphères, mais avec une intensité maximale plus faible, ce qui se traduit par une erreur similaire sur l'intensité totale. Il faut cependant noter que, là encore, les variations des erreurs sur les intensités maximales et les intensités intégrées (somme) sont les plus faibles pour ML-EM+. Ceci montre que cette méthode, au contraire des autres, donne des résultats dont la qualité est indépendante de la taille de l'objet considéré.

Pour conclure, on peut dire qu'on peut utiliser LLS+ ou MAP+ pour une première évaluation rapide des résultats, ce qui permet de traiter un grand nombre d'échantillons dans un temps raisonnable et de retenir les meilleurs images qui seront alors traitées avec ML-EM+. ML-EM demande plus de temps de calcul, mais fournit des résultats de meilleure qualité pour ce qui est des mesures de forme et de taille ou de volume, car c'est la méthode qui reconstruit le mieux les profils, et pour les mesures d'intensité relative entre les sites. C'est la méthode qui fournit les résultats présentant le moins de variations pour ce type de mesure.

		Bille(01) (0.068 μ m)	Bille(02) (0.136 μ m)	Bille(03) (0.204 μ m)	Bille(05) (0.340 μ m)	Bille(06) (0.408 μ m)	Bille(07) (0.476 μ m)	Bille(08) (0.544 μ m)	Bille(010) (0.680 μ m)	Bille(011) (0.748 μ m)
Original	$Volume_{(vox)}$	1	7	27	81	115	251	341	515	739
	$\sum I$	100	700	2700	8100	11500	25100	34100	51500	73900
	$Max(I)$	100	100	100	100	100	100	100	100	100
LLS	$\Delta Volume(\%)$	×	×	266,7	232,0	226,0	157,0	157,7	162,3	133,8
	$\Delta \sum I(\%)$	×	×	-21,4	2,7	7,6	3,0	3,9	8,5	7,0
	$\Delta Max(I)(\%)$	×	×	-63,3	-39,4	-26,7	-1,6	7,6	-0,6	-3,3
MAP	$\Delta Volume(\%)$	×	×	207,4	258,0	247,8	211,6	186,7	168,8	148,7
	$\Delta \sum I(\%)$	×	×	-39,6	-6,1	-0,5	7,2	7,2	8,0	7,4
	$\Delta Max(I)(\%)$	×	×	-72,4	-47,2	-36,6	-15,7	-6,1	-4,0	-1,4
MLEM	$\Delta Volume(\%)$	×	×	×	0	69,6	96,0	88,9	84,9	87,7
	$\Delta \sum I(\%)$	×	×	×	-74,0	-47,7	-26,6	-23,8	-19,6	-15,1
	$\Delta Max(I)(\%)$	×	×	×	-56,7	-23,2	-7,4	8,4	9,5	18,9
LLS+	$\Delta Volume(\%)$	×	171,4	174,1	155,6	131,3	107,6	103,8	87,0	79,7
	$\Delta \sum I(\%)$	×	-49,9	-8,7	-1,9	-5,1	-0,4	-1,4	-0,9	-0,7
	$\Delta Max(I)(\%)$	×	-73,7	-33,3	-3,4	-6,6	-6,5	-5,5	-2	1,6
MAP+	$\Delta Volume(\%)$	×	×	174,1	155,6	153,9	117,1	121,1	106,0	96,5
	$\Delta \sum I(\%)$	×	×	-31,3	-10,4	-9,7	-5,1	-3,0	-1,9	-1,1
	$\Delta Max(I)(\%)$	×	×	-58,0	-19,8	14,3	-5,5	-3,2	-4,6	-2,7
MLEM+	$\Delta Volume(\%)$	×	×	-7,4	-8,6	7,8	9,6	4,1	14,0	9,1
	$\Delta \sum I(\%)$	×	×	-52,3	-39,8	-29,7	-23,6	-23,8	-18,4	-19,3
	$\Delta Max(I)(\%)$	×	×	30,1	78,2	46,6	39,8	38,1	43,8	40,8

FIGURE. 3.11 | *Tableau de mesures sur les résultats de différentes méthodes de déconvolutions avec et sans pré-filtrage* : Résultats pour les mesures de volumes, intensités totales (intégrées sur le volume), et intensité maximale pour chaque sphère. Les images obtenues avec les différentes méthodes de déconvolution ont toutes été segmentées de la même manière, en appliquant un seuillage à 15% du maximum. Les trois premières lignes donnent les valeurs de référence pour les objets de départ, qui sont supposés correctement reconstruits après déconvolution. Nous avons utilisé les méthodes LLS, MAP et ML-EM sans pré-filtrage d'abord, puis avec pré-filtrage, que nous avons appelées respectivement LLS+, MAP+ et ML-EM+. Les résultats sont présentés en pourcentage de variation par rapport aux sphères de référence. Le minimum en valeur absolue de chacune des erreurs est représenté en gras, pour chaque colonne

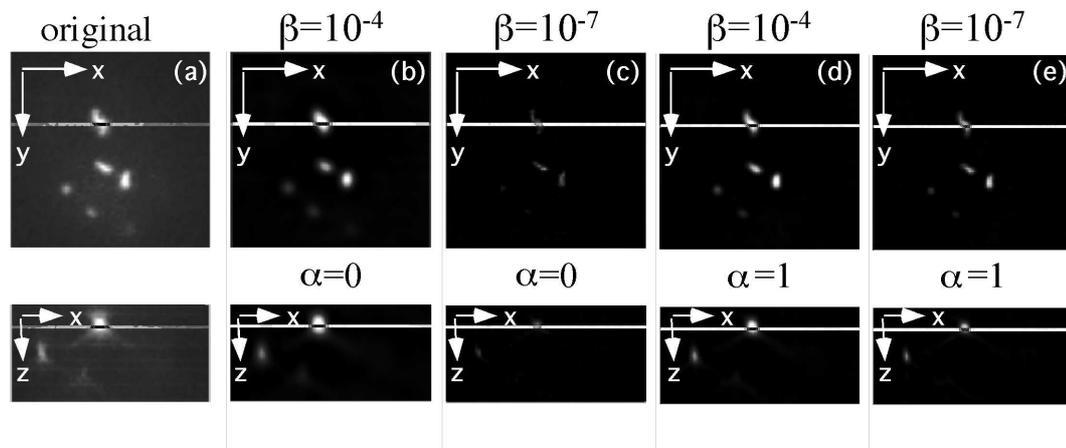


FIGURE. 3.12 | *Effet du pré-filtrage et de la déconvolution sur une image biologique.* : (a) : image originale, une image de cellules CD34 de cordon ombilical. (b) : sans pré-filtrage, régularisation $\beta = 10^{-4}$ (c) : sans pré-filtrage, régularisation $\beta = 10^{-7}$ (d) : avec pré-filtrage, régularisation $\beta = 10^{-4}$ (e) : avec pré-filtrage, régularisation $\beta = 10^{-7}$ Les images (d) et (e) sont beaucoup plus ressemblantes que (b) et (c), ce qui montre que le pré-filtrage stabilise la déconvolution.

3.2.3 Application à des images biologiques en hématologie

Au Laboratoire d'Hématologie de l'Hôpital Emile Muller de Mulhouse, le Dr Georges Jung a entrepris une étude sur les cellules CD34 du cordon ombilical. Deux populations différentes semblent apparaître durant la maturation de ces cellules, et nous souhaitons améliorer la méthode de classification de ces populations. Cela nécessite de traiter des échantillons relativement importants en nombre (quelques centaines de cellules) de manière à obtenir des résultats statistiquement significatifs. Pour ce faire, il convient donc d'utiliser des algorithmes de déconvolution rapides, tels que MAP ou LLS.

Nous avons donc appliqué notre méthode à des images biologiques acquises sur le système que nous avons installé au Laboratoire d'Hématologie de l'Hôpital Emile Muller à Mulhouse⁸. La réponse impulsionnelle optique a été mesurée à l'aide de billes de latex fluorescentes comme le décrit la figure 1.8 du chapitre 1. La figure 3.12 montre les résultats de la déconvolution avec et sans pré-filtrage sur une image typique. La figure 3.12(a) montre l'image brute, Les figures 3.12(b) et (c) montrent le résultat d'une déconvolution par MAP sans pré-filtrage, et en changeant le paramètre de régularisation $\beta = 10^{-4}$ et $\beta = 10^{-7}$. On peut voir que le résultat final varie de manière importante. Ceci prouve donc que les mesures quantitatives peuvent varier de façon significative d'un opérateur à un autre, qui estimera différemment la qualité

⁸[Colicchio *et al.*, 2001]

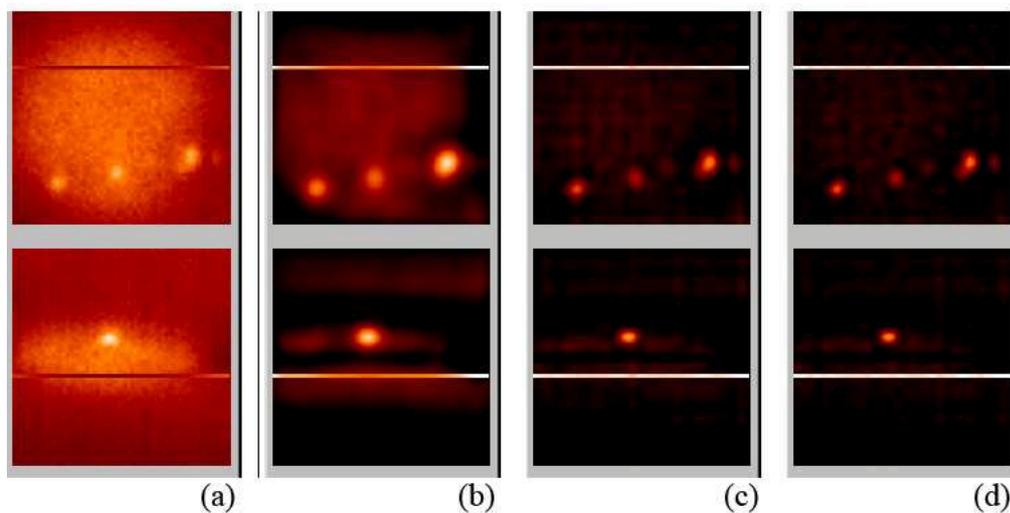


FIGURE. 3.13 | *Itération du filtrage et de la déconvolution* : La figure (a) (un plan XY en haut, et XZ en bas) est l'image d'une cellule cancéreuse du sein, résistante à la chimiothérapie, sur laquelle nous voulons effectuer des mesures géométriques afin de déterminer les sites de séquestration. les figures (b), (c) et (d) sont les résultats des déconvolutions successives, avec un pré-filtrage qui utilise la déconvolution précédente comme estimation. Le résultat ne change plus après deux itérations

de la déconvolution. Les figure 3.12(d) et (e) montrent le résultat d'une déconvolution par MAP avec un pré-filtrage de Wiener avec $\alpha = 1$ et une estimation de la variance du bruit, pour la même variation du paramètre de régularisation $\beta = 10^{-4}$ et $\beta = 10^{-7}$. On voit maintenant que le résultat de la déconvolution varie peu.

Dans l'exemple présenté en figure 3.13 nous réalisons trois déconvolutions successives qui améliorent le résultat de l'estimation, suivant le principe présenté sur la figure 3.4. Il est intéressant de montrer que le résultat est stabilisé après un très faible nombre d'itérations.

3.2.4 Application à des images acquises pour la cytogénétique

Nous avons aussi appliqué cette méthode dans le domaine de la génétique (cytogénétique)⁹. Il est possible d'envisager une approche qualitative et quantitative pour l'étude de certaines régions du génome pour lesquelles on dispose de sondes d'ADN spécifiques marquées par des fluorochromes (FISH, Fluorescent In-Situ Hybridization).

Pour cette étude, il est nécessaire de composer 4 images, en effet on s'intéresse à 4 marqueurs fluorescent différents, et notre équipement ne permet l'acquisition qu'à une longueur d'onde à la fois. Ces images ont été traitées par la méthode

⁹[Colicchio et al., 2004]

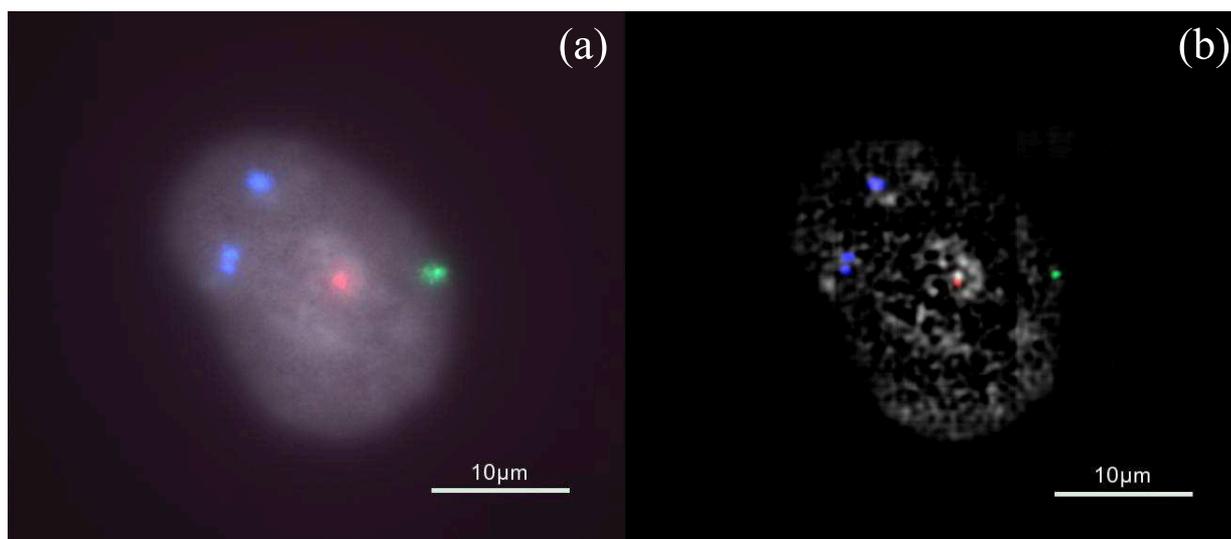


FIGURE. 3.14 | *Image avant et après déconvolution d'un noyau en interphase* : Les images présentées sont composées de quatre images acquises à quatre longueurs d'onde différentes et marquent les chromosomes X Y et 18 en leurs centres (centromères). La figure (a) présente l'image brute, et la figure (b) est le résultat de la déconvolution

précédente, avec comme difficulté supplémentaire des dimensions très importantes pour les images (1006X996X85). La déconvolution est alors effectuée par parties avec la méthode "overlapp-save"¹⁰. Les résultats sur les noyaux normaux montrent une amélioration de la définition des sites de fluorescence en interphase, avec une redistribution des intensités pour les sites marquants des zones spécifiques du chromosome¹¹. La segmentation des images est simplifiée, permettant une meilleure définition et quantification des volumes des sites de fluorescence représentant des centromères, des télomères ou des locus spécifiques (ici les centromères des chromosomes X, Y et 18 marquent la présence et le nombre de ces chromosomes). L'intérêt est de faire l'analyse sur l'interphase (figure 3.14), plutôt qu'en métaphase (figure 3.15) où les chromosomes apparaissent clairement, mais il n'est pas toujours possible de l'obtenir.

¹⁰[Press *et al.*, 1995]

¹¹[Monier *et al.*, 1996]

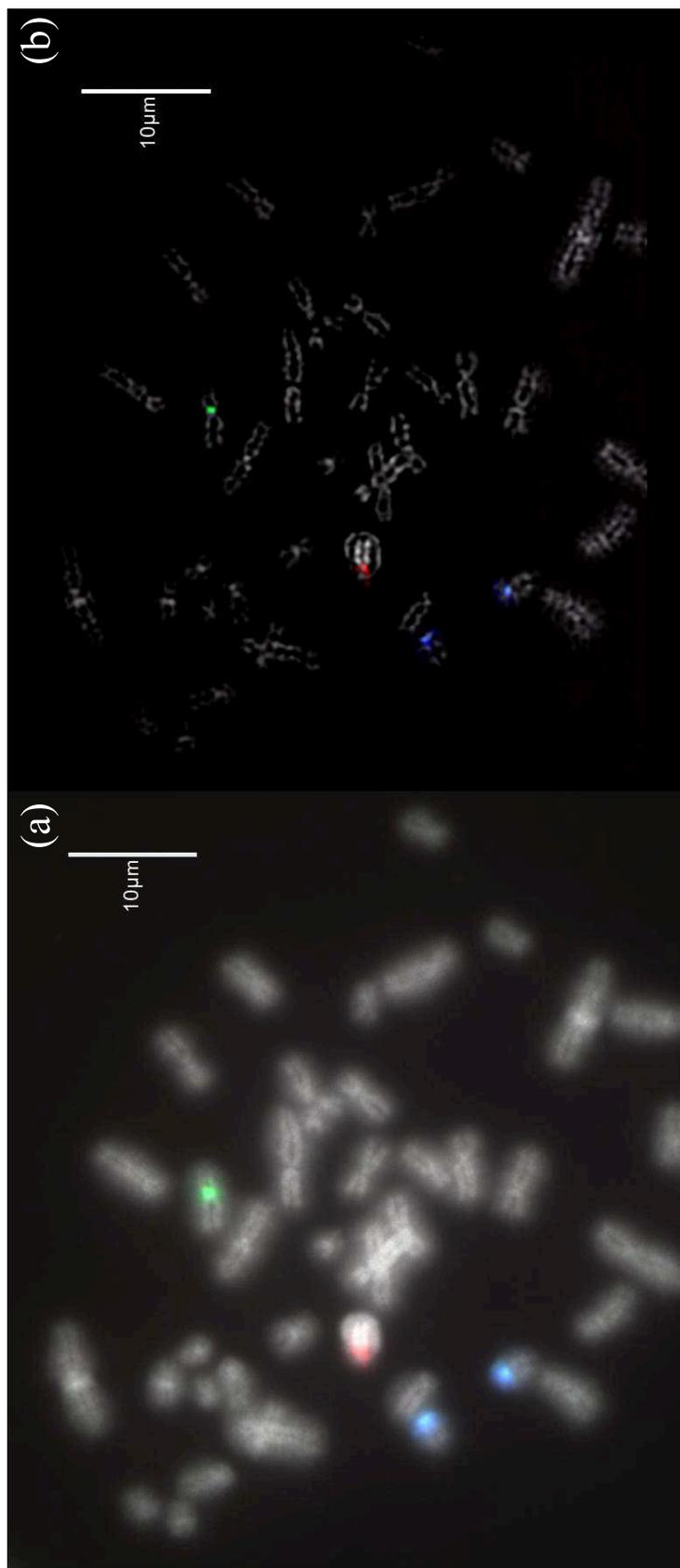


FIGURE. 3.15 | *Image avant et après déconvolution du spécimen en métaphase : Les marqueurs sont les mêmes que pour le noyau en interphase. La figure (a) présente l'image brute, et la figure (b) est le résultat de la déconvolution*

3.3 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté une méthode d'automatisation de recherche du paramètre de régularisation des algorithmes directs LLS et MAP, avec un pré-filtrage des données pour améliorer la stabilité du résultat. Le pré-filtrage des données améliore le processus de déconvolution de deux façons.

Tout d'abord, des images qui ne pourraient être utilisées à cause de leur trop grand bruit peuvent quand même être étudiées. Ceci aide à augmenter la statistique des résultats pour des applications qui nécessitent un grand nombre de mesures. Enfin, en éliminant l'ajustement manuel des paramètres de déconvolution, très dépendant de l'expérience et des connaissances à priori de l'observateur, l'automatisation de la déconvolution, combinée au pré-filtrage des données, permet d'améliorer la reproductibilité et donc la fiabilité des résultats. L'étude théorique sur des objets de synthèse a aussi montré que la précision des mesures quantitatives était aussi améliorée.

Il faut cependant nuancer le résultat, en précisant que le filtrage élimine des fréquences supplémentaires, et que le risque est de limiter le gain en résolution maximal qu'une déconvolution sans pré-filtrage pourrait apporter. Néanmoins, pour des images présentant un bruit élevé, la déconvolution est rendue possible. De plus l'utilisation du filtrage est raisonnable si on traite des spécimens qui ont une distribution d'intensités qui ne présente pas de transitions brusques, ce qui généralement le cas pour une image biologique correctement échantillonnée. La méthode exposée devrait permettre de contribuer à une plus large adoption des méthodes de déconvolution pour un usage routinier par des non-spécialistes. Enfin, la méthode a été appliquée à des études en cytologie et en cytogénétique moléculaire, de manière probante¹².

¹²[Colicchio *et al.*, acceptée en août 2004]

4 | DÉCONVOLUTION PAR MÉTHODE MONTE-CARLO

“J’ai des questions à toutes vos
réponses”

Woody Allen

CE chapitre présente une méthode de reconstruction d’image qui peut tenir compte de possibles variations spatiales de la PSF, contrairement aux méthodes couramment utilisées, par une reconstruction simultanée des estimations de l’espace objet et de l’espace image. Cette méthode est inspirée de l’interprétation statistique du processus de formation d’image décrite par l’équation discrète de convolution. L’approche est d’abord présentée sur des signaux tests monodimensionnels, étendue par la suite à des images à deux dimensions, et enfin à trois dimensions. L’exploration des espaces objet et image est réalisée par un déplacement aléatoire (*random walk*), l’acceptation du placement d’un grain élémentaire étant ensuite fonction de l’amélioration d’un critère d’erreur dans l’espace image (erreur quadratique), et d’une contrainte dans l’espace objet sur la variance des intensités. Des exemples sur des images simulées sont présentés.

4.1 Méthode de reconstruction par grains élémentaires

L’approche bayésienne de la modélisation du système de mesure a donné lieu à l’élaboration de la déconvolution ML-EM, reconnue comme étant celle qui donne les résultats les plus convaincants dans de nombreuses disciplines¹. L’approche bayésienne qui associe à chaque voxel une variable aléatoire se prête bien à une approche voxel par voxel. En se basant sur cette approche, Frieden² a imaginé une approche granulaire de la reconstruction d’image, reprise par Jansson³ dans le domaine de la spectroscopie.

¹[Lange et Carson, 1984],[Shepp et Vardi, 1982],[Holmes, 1988],[Richardson, 1972],[Lucy, 1974]

²[Frieden, 1972]

³[Jansson *et al.*, 1984]

Cependant, du fait de la puissance de calcul importante nécessaire à ce type de traitement, cette approche a été longtemps inexploitable en pratique. C'est à partir des années 80 que la puissance des ordinateurs a permis d'envisager l'utilisation de tels algorithmes. L'approche par une méthode "Monte-carlo" est maintenant utilisée dans de nombreux domaines pour résoudre un problème inverse en utilisant un modèle direct associé⁴. Des modifications aléatoires de l'estimation de l'espace objet, minimisant l'écart entre une estimation de l'image observée et l'image observée elle-même, permettent d'aboutir à une solution du problème inverse. Le lien entre l'estimation de l'image et l'estimation des objets est donné par la modélisation directe. Geman et Geman^{5,6} sont à l'origine de l'échantillonneur de Gibbs, qui reprend ce principe et l'applique au traitement d'image⁷. Cette méthode a été utilisée pour la déconvolution aveugle en 2D⁸, les modifications apportées étant purement aléatoires.

La méthode de reconstruction grain par grain est intéressante car elle permet son contrôle local. De plus, elle permet de simuler le processus de formation de l'image lui-même, par une accumulation de grains élémentaires. On considère l'image comme étant une collection de PSF correspondant à des sources ponctuelles constituant l'objet. L'équation intégrale peut être simulée par une accumulation de PSF, permettant une estimation de l'image, et une construction parallèle de l'espace objet en ayant l'image observée comme référence.

Cette approche n'a pas encore été utilisée pour résoudre le problème inverse de la microscopie de fluorescence. Nous proposons donc ici une méthode de Monte-Carlo adaptée à ce problème⁹. Elle peut être classée parmi les méthodes bayésiennes. Il s'agit donc de chercher la distribution lumineuse de l'objet la plus probable compte tenu de la distribution observée et les informations a priori sur l'objet.

Le principe, simple, est basé sur l'algorithme de Metropolis¹⁰. La reconstruction repose sur la séquence suivante :

1. on génère une position aléatoire
2. on essaye de modifier les estimations de l'espace objet et de l'espace image correspondant, pour les améliorer (suivant un critère d'erreur) par rapport à l'image réelle
3. si l'estimation est effectivement améliorée, les modifications sont acceptées, sinon, les modifications ne sont pas appliquées
4. on recommence à l'étape 1 tant qu'un critère d'arrêt n'est pas vérifié.

⁴[Mosegaard et Sambridge, 2002]

⁵[Geman et Geman, 1984]

⁶Pour une revue des évolutions des algorithmes de Geman et Geman voir [Künsch, 1993]

⁷voir également[Robini *et al.*, 2002]

⁸[MacCallum, 1990],[Robini *et al.*, 1999]

⁹[Colicchio *et al.*, 2002]

¹⁰[Metropolis *et al.*, 1953],[Hastings, 1970]

La recherche d'une estimation reproduisant l'observation est considérée d'un point de vue énergétique. L'écart (dans notre cas, l'erreur quadratique) entre l'estimation de l'observation et l'observation elle-même peut être considérée comme une énergie qu'il faut minimiser¹¹. Pour chaque position de l'espace, choisie aléatoirement, on modifie les estimations, puis on vérifie l'évolution de cette énergie. La diminution de cette énergie signifie une amélioration de l'estimation, et entraîne donc une acceptation de des modifications considérées. La diminution de la fonction énergie s'effectue jusqu'à atteindre un minimum, que l'on souhaite être le minimum global pour que la reconstruction soit optimale. La figure 4.1 présente le principe de la méthode.

¹¹[Yang, 1993],[Amini, 2000]

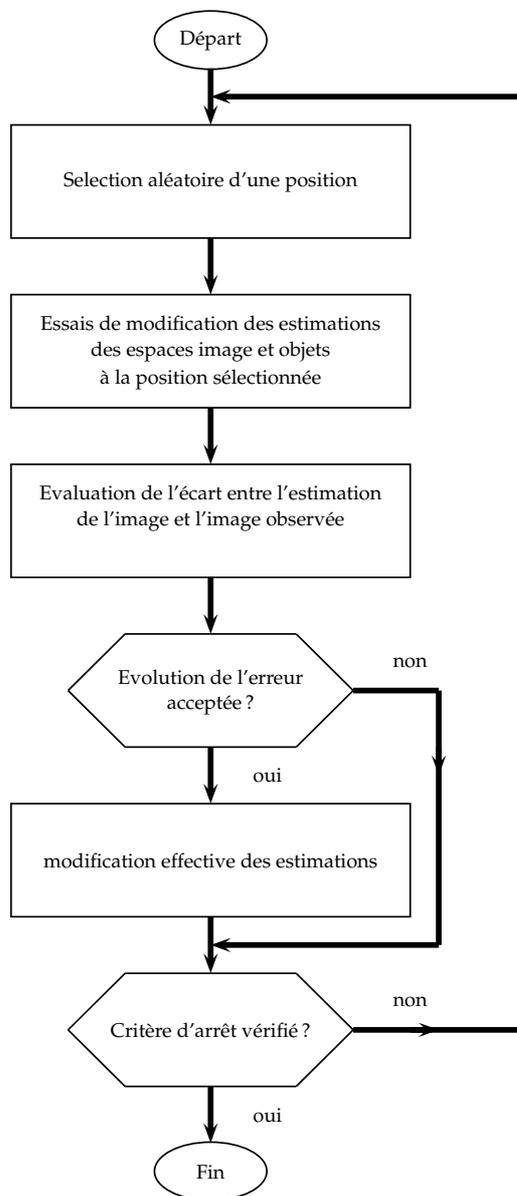


FIGURE. 4.1 | *Principe de la méthode de déconvolution Monte-carlo : l'organigramme présente les étapes de la méthode*

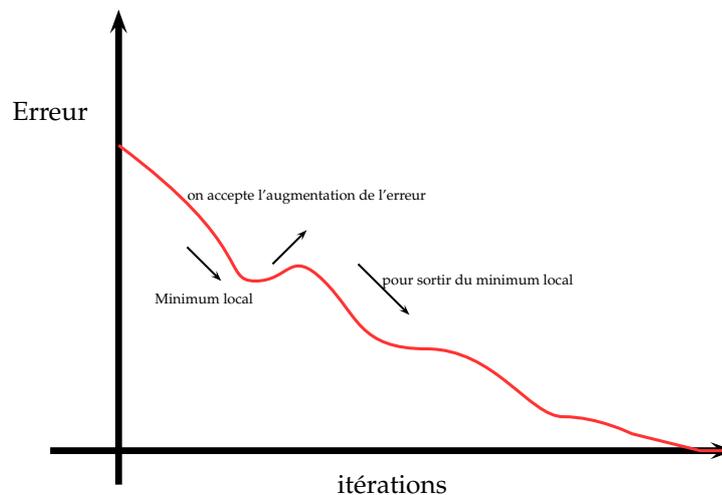


FIGURE. 4.2 | *Principe du recuit* : lorsque la fonction de coût arrive sur un minimum local, il est possible de sortir ce minimum en acceptant une augmentation temporaire de la fonction de coût

4.2 Utilisation du recuit simulé

Cependant la fonction d'énergie présente en général un grand nombre de minima locaux, ce qui complique la minimisation. Si, pour un état initial donné, l'algorithme arrive après quelques itérations à un minimum local, il se trouve alors piégé : toute évolution est alors refusée, car l'énergie augmenterait. Cette augmentation temporaire serait pourtant bénéfique pour sortir d'un minimum local. Afin d'éviter ce problème lié aux minima locaux, l'idée de l'algorithme de recuit simulé a été introduite.

Dans leurs articles, Geman et Geman[Geman et Geman, 1984] utilisent cette technique de minimisation dont le principe est emprunté au phénomène de retour à l'équilibre d'un système physique en refroidissement (simulated annealing ou recuit simulé). Cette technique a connu un fort succès, car elle est censée garantir la convergence vers le minimum global de la fonction de coût¹². Il s'agit de donner la possibilité de 'sortir' des minima locaux en autorisant une augmentation temporaire de la fonction de coût avec une certaine probabilité(voir figure 4.2).

Cette probabilité d'accepter une augmentation de l'erreur est calculée en s'inspirant du principe thermodynamique :

$$P \propto e^{\frac{-\Delta E}{k \cdot T}} \quad (4.1)$$

¹²[Kirkpatrick *et al.*, 1983]

La valeur de la température T permet à la fonction d'énergie de remonter avec une probabilité P proportionnelle à cette fonction. Au départ, on souhaite donner beaucoup d'amplitude à la fonction d'énergie (à température T élevée, la probabilité d'accepter l'augmentation est élevée), pour 'figer' progressivement le système (la température tant vers zéro, la probabilité également). Dans l'implémentation de la méthode, l'analogie avec un système en refroidissement est conservée, et on note T la variable permettant le contrôle de la probabilité d'accepter une augmentation de l'erreur.

4.3 Principe de la déconvolution Monte-Carlo en 1D

Pour simplifier les notations, la méthode est présentée en une dimension. Elle s'étend ensuite aux cas en deux et trois dimensions.

Soit :

\hat{f} l'estimation de l'objet de longueur L_f

g l'image observée de longueur L_g

h la réponse impulsionnelle de longueur L_h

\hat{g} l'estimation de l'image de longueur $L_f + L_h$

Remarque : la dimension de l'estimation \hat{g} est $L_f + L_h$ car c'est le résultat de la convolution de \hat{f} par h .

Etape de déplacement aléatoire

On génère un nombre aléatoire ξ_x entre 0 et 1. Ce nombre est ensuite utilisé dans une étape dite de déplacement aléatoire (Random walk)¹³ de la manière suivante :

$$x_{rand}^{(t+1)} = x_{rand}^{(t)} + (\xi_x - 0.5) \cdot \Delta X \quad (4.2)$$

la coordonnée correspond à un déplacement local d'amplitude maximale ΔX .

Le déplacement est accepté suivant une distribution de probabilité $pdf(x_i)$ en suivant la règle suivante :

$$pdf(x_{rand}^{(t+1)}) \geq pdf(x_{rand}^{(t)}) \cdot \xi_x \quad (4.3)$$

Les positions les plus souvent sélectionnées seront les positions où $pdf(x_i)$ est grand. Nous avons proposé d'utiliser une probabilité de distribution pour le tirage aléatoire qui est fonction de l'écart entre l'estimation et l'image observée. Ainsi, les positions, pour lesquelles l'observation et l'estimation correspondante présentent une grande différence d'intensité, seront essayés plus souvent :

$$pdf^{(t)}(x_k) = \frac{|\hat{g}^{(t)}(x_k) - g^{(t)}(x_k)|}{\sum_{i=0}^{L_g-1} |\hat{g}^{(t)}(i) - g^{(t)}(i)|} \quad (4.4)$$

Le but de cette approche est d'accélérer la vitesse de convergence de l'algorithme.

¹³[Fishman, 1996]

Modification des estimations

Après l'étape de déplacement, l'algorithme passe à une étape d'essais de modification des estimations objet et image. Il est possible d'ajouter ou d'enlever aux estimations, à la position courante, une intensité Δf dans l'espace objet, et la distribution d'intensité $\Delta f \cdot h(x)$ dans l'espace image, centrée sur la même position.

$$\hat{f}^{(t+1)}(x_i) = \hat{f}^{(t)}(x_i) + \Delta f \quad (4.5)$$

$$\hat{g}^{(t+1)}(x_i + x_k) = \hat{g}^{(t)}(x_i + x_k) + \Delta f \cdot h(x_k + \frac{L_h}{2}) \quad (4.6)$$

pour chaque $x_k \in \left[\frac{-L_h}{2}, \frac{+L_h}{2} \right]$ entier

L'algorithme cherche quelle modification apporte la plus grande amélioration (l'addition ou la soustraction d'un 'grain'), en comparant la fonction énergie dans les deux cas :

$$\Phi^{(t)} = \sum_l^{L_f} \left[\left(g^{(t)}(x_l) - \hat{g}^{(t)}(x_l + \frac{L_h}{2}) \right)^2 \right] \quad (4.7)$$

Ceci donne le signe de Δf . On évalue ensuite la variation de l'erreur :

$$\Delta\Phi^{(t+1)} = \Phi^{(t+1)} - \Phi^{(t)} \quad (4.8)$$

Il se présente ainsi deux cas : si l'erreur diminue, la modification est acceptée. Si l'erreur augmente, on vérifie l'équation suivante :

$$e^{\left(\frac{-\Delta\Phi^{(t+1)}}{T}\right)} > \xi_x \quad (4.9)$$

Si elle est vérifiée, on accepte quand même la modification. Cette condition supplémentaire permet l'augmentation temporaire de l'erreur. Si la modification est refusée on fixe $pdf(x_{rand}) = 0$, pour que cette position ne soit plus visitée jusqu'à ce qu'une nouvelle modification soit acceptée et que la distribution $pdf(x_i)$ soit recalculée selon la relation (4.4).

La probabilité d'acceptation d'un point qui fait remonter l'erreur dépend de T. Lorsque T tend vers 0, la probabilité tend vers 0. T est graduellement diminuée, à chaque fois que l'erreur diminue :

$$T^{(t)} = \frac{\Delta\Phi^{(t)}}{\Delta\Phi^{(t-1)}} \cdot T^{(t-1)} \quad (4.10)$$

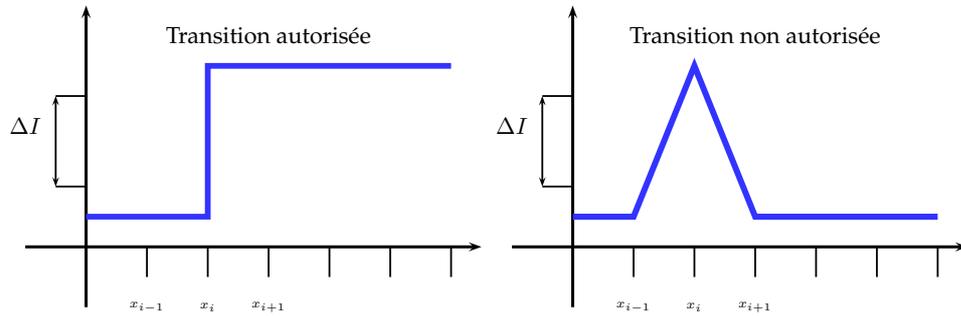


FIGURE. 4.3 | *Contrainte sur le voisinage* : la contrainte appliquée interdit l'apparition de pics isolés d'amplitude supérieure à ΔI , mais autorise les transitions de type échelon

La valeur initiale de T est calculée de la manière suivante :

$$T^{(0)} = \frac{-\Delta\Phi_{\max}}{P_{\text{accept}}} \quad (4.11)$$

Pour autoriser au départ une déviation de l'erreur maximale $\Delta\Phi_{\max}$ avec une probabilité noté P_{accept} .

Cet algorithme cumule donc des PSF pondérées dans l'espace image, et reconstruit l'espace l'objet en parallèle en cherchant à minimiser l'écart avec l'observation. La PSF peut être différente à chaque position considérée, permettant donc une reconstruction avec des PSF non-invariantes, sans augmentation du temps de calcul (avec cependant une augmentation du coût d'échanges en mémoire). L'équation devient simplement :

$$\hat{g}^{(t)}(x_i + x_k) = \hat{g}^{(t-1)}(x_i + x_k) + \Delta f \cdot h_{x_i}(x_k + \frac{L_h}{2}) \quad (4.12)$$

Utilisation d'une contrainte pour régulariser le problème

La nature mal posée du problème se retrouve aussi dans ce cas. En l'absence de régularisation, les solutions calculées de cette manière présenteront une variance très élevée si l'erreur quadratique est minimale. Pour régulariser le problème, un contrôle du voisinage des points est effectué avant de modifier ou non le résultat. Si les voisins ont une valeur dépassant un certain seuil (ΔI), le point est refusé, l'itération suivante passe à une autre position choisie en prenant le maximum de $pdf(x_i)$. Ceci permet le contrôle de la variance maximale de l'estimation de l'espace objet.

Pour éviter un lissage du même type que pour la régularisation de Tikhonov, et en profitant du caractère local du test du voisinage, on vérifie si au moins un voisin à une valeur inférieure à (ΔI), auquel cas le point est alors accepté. On autorise la reconstruction de transitions (ΔI) dans l'espace objet (correspondantes au bords d'une

bille ou à la membrane d'une cellule par exemple), mais on veut interdire l'apparition de pics isolés d'intensité supérieure à (ΔI) (voir figure 4.3). On considère que de tels pics seraient dus au bruit ou à un mauvais échantillonnage.

Le test du voisinage est donc le suivant :

$$\text{si } \left| \hat{f}(x_{rand-1}^{(t+1)}) - \hat{f}(x_{rand}^{(t+1)}) \right| < \Delta I \quad \text{ou} \quad \left| \hat{f}(x_{rand+1}^{(t+1)}) - \hat{f}(x_{rand}^{(t+1)}) \right| < \Delta I \quad (4.13)$$

le point est pris en considération, sinon l'itération est abrégée pour passer à une position différente, et $pdf(x_{rand}) = 0$.

Initialisation et fin de la reconstruction

La distribution d'intensités de l'estimée initiale de l'espace objet \hat{f} peut être quelconque, il suffit de convoluer cette estimation initiale pour obtenir l'estimation dans l'espace image \hat{g} . Le choix le plus intéressant pour l'estimation \hat{f} est cependant de prendre l'image observée elle-même (qui est une version dégradée mais quand même plus vraisemblable qu'une estimation vide, moyenne, ou aléatoire par exemple) :

$$\hat{f}^{(0)}(x) = g(x) \quad (4.14)$$

$$\hat{g}^{(0)}(x) = g(x) \otimes h(x) \quad (4.15)$$

La reconstruction se termine si la somme de $pdf(x_i)$ est inférieure à un seuil (un nombre de rejets successifs suffisant arrête le processus), ou si l'erreur ne diminue pas plus qu'une valeur fixée pour un nombre d'itérations donné (l'erreur n'évolue plus assez, c'est ce qu'on observe lorsque l'algorithme approche du minimum global)

Bords de l'image

Comme pour les algorithmes classiques des artefacts de reconstruction apparaissent si l'image de l'objet est tronquée. On a alors le problème suivant : à cause de l'étalement de la PSF, on peut avoir de la lumière sur un pixel près du bord qui provient en réalité d'un point situé en dehors du champ d'observation et qui ne sera donc pas traité par l'algorithme. Ce problème du bord de l'image est traité en utilisant une fenêtre de Hanning appliquée sur $pdf(x_i)$. Le centre de l'image est donc favorisée, les bords (positions extrêmes) étant complètement ignorés. En conséquence, seule la

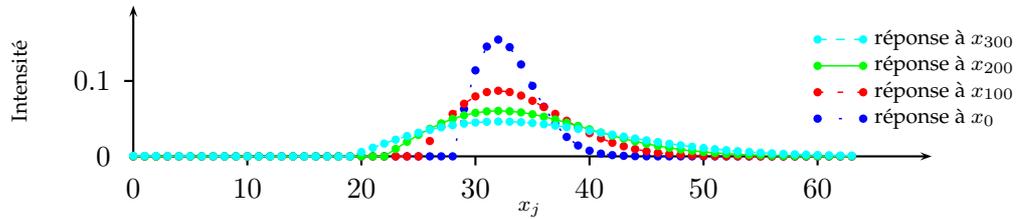


FIGURE. 4.4 | *Réponses impulsionnelles utilisées pour les simulations 1D* : représentation de quelques PSF calculées à différentes profondeurs utilisées pour les simulations. La réponse est de plus en plus étalée lorsque x_i augmente

partie centrale de l'image peut être correctement reconstituée. Pour éviter ce problème, il conviendrait de centrer correctement les objets observés.

4.4 Implémentation en 1D

Afin de mettre en pratique l'algorithme présenté, nous générons un signal $f(x_i)$ de 512 points (trois gaussiennes), convolué avec une réponse impulsionnelle $h_x(x_i)$ simulant un étalement des intensités visibles dans $g(x_i)$.

Pour simuler une réponse impulsionnelle, la distribution de Rayleigh est utilisée (cette fonction a été choisie à titre d'illustration) :

$$h_{x_i}(j = 0..L_h - 1) = \frac{j}{b \cdot \frac{x_i + 0.25}{L_f}} \cdot e^{\left(\frac{-j^2}{2 \cdot \left(b \cdot \frac{x_i + 0.25}{L_f} \right)^2} \right)} \quad (4.16)$$

Les réponses impulsionnelles obtenues pour plusieurs positions sont représentées en figure 4.4.

Cependant, dans un premier temps on supposera la PSF invariante, et la réponse impulsionnelle est calculée avec la relation (4.16) pour x_i fixé à 250 et b à 0,5.

On ajoute enfin un bruit poissonnien selon la relation :

$$b(g(x), \beta) = \frac{e^{-g(x)} \cdot g(x)^\beta}{\beta!} \quad (4.17)$$

La figure 4.5 présente les résultats de déconvolutions Monte-Carlo sous l'hypothèse d'une PSF invariante pour plusieurs valeurs du niveau de bruit poissonnien. La figure 4.6 présente les résultats obtenus lorsque le système d'observation est non-invariant. Le temps d'exécution sur une machine de type PC Pentium IV 2GHz est de $150\mu s$ par itération. le temps d'exécution est de l'ordre de quelques dizaines de secondes (100 000 à 150 000 itérations)

Considérons d'abord le cas-invariant, en figure 4.5. On trouve sur la figure 4.5(a) le signal d'origine, et pour les figures 4.5(b) à (g) les résultats de déconvolution, l'estimée du signal observé, et le signal observé lui-même.

Il faut noter tout d'abord que la reconstruction permet de retrouver la position et l'amplitude correcte jusqu'à un niveau de bruit important ($\beta = 10$), avec cependant une dégradation de la qualité de la reconstruction.

Dans le cas non-invariant en figure 4.6, on constate bien que le signal observé 4.6(b) présente trois réponses différentes, alors que le signal d'origine 4.6(a) est composé de gaussiennes identiques. La restauration permet de retrouver les objets d'origines, mais on note cependant que l'influence du bruit est plus importante, et que la qualité de la reconstruction baisse rapidement.

Ces résultats restant valables dans l'extension à la deuxième et troisième dimension, nous présentons quelques exemples pour la déconvolution d'image 2D et 3D.

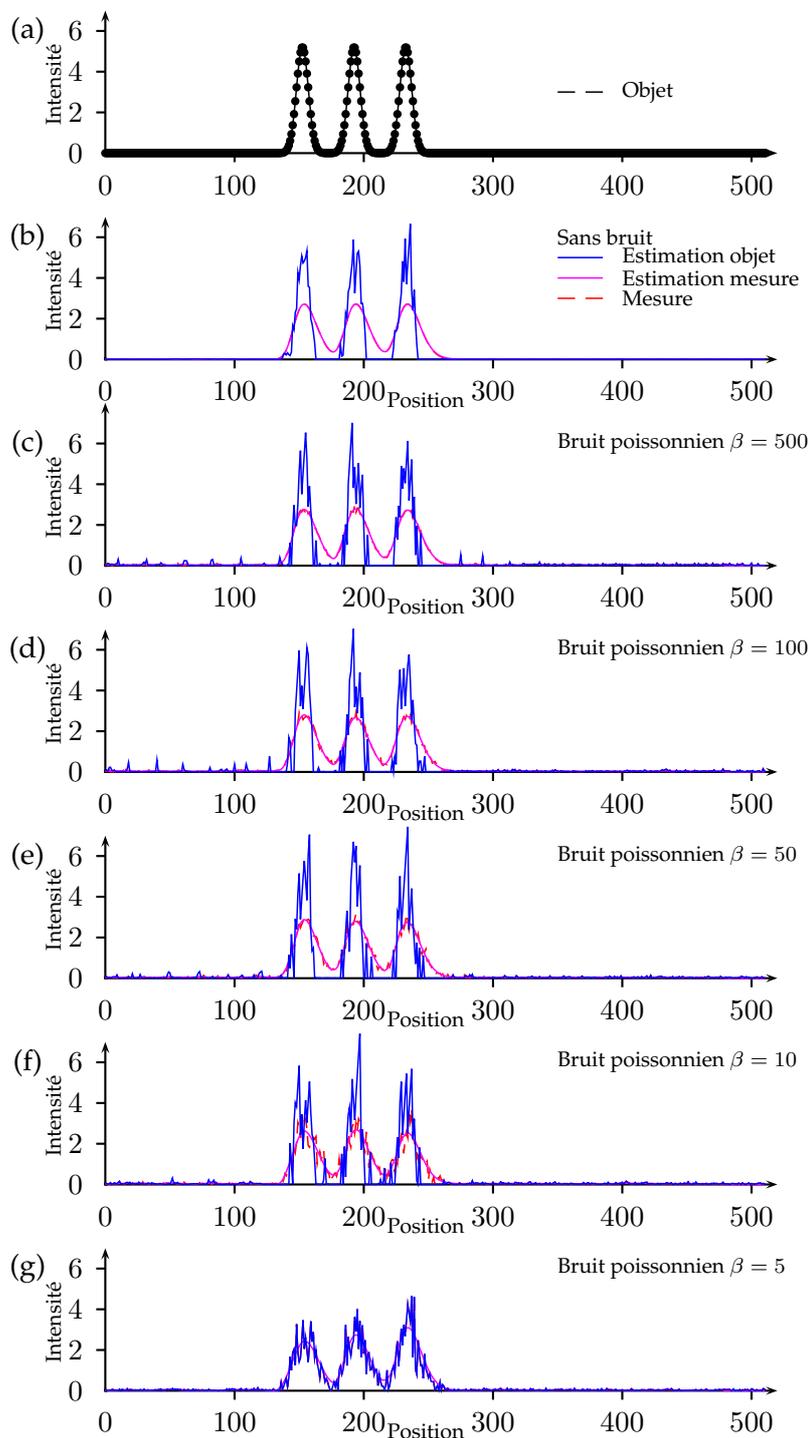


FIGURE. 4.5 | Résultats sur un signal 1D vu par un système à réponse impulsionnelle non-invariante : L'objet original est présenté sur le premier graphique, les courbes suivantes présentent le résultat de la déconvolution, l'estimation de la mesure et la mesure elle-même simulée avec un niveau de bruit variable. La déconvolution retrouve bien l'intensité originale, l'estimation de la mesure et la mesure sont très proches. Le résultat est cependant sensible au bruit.

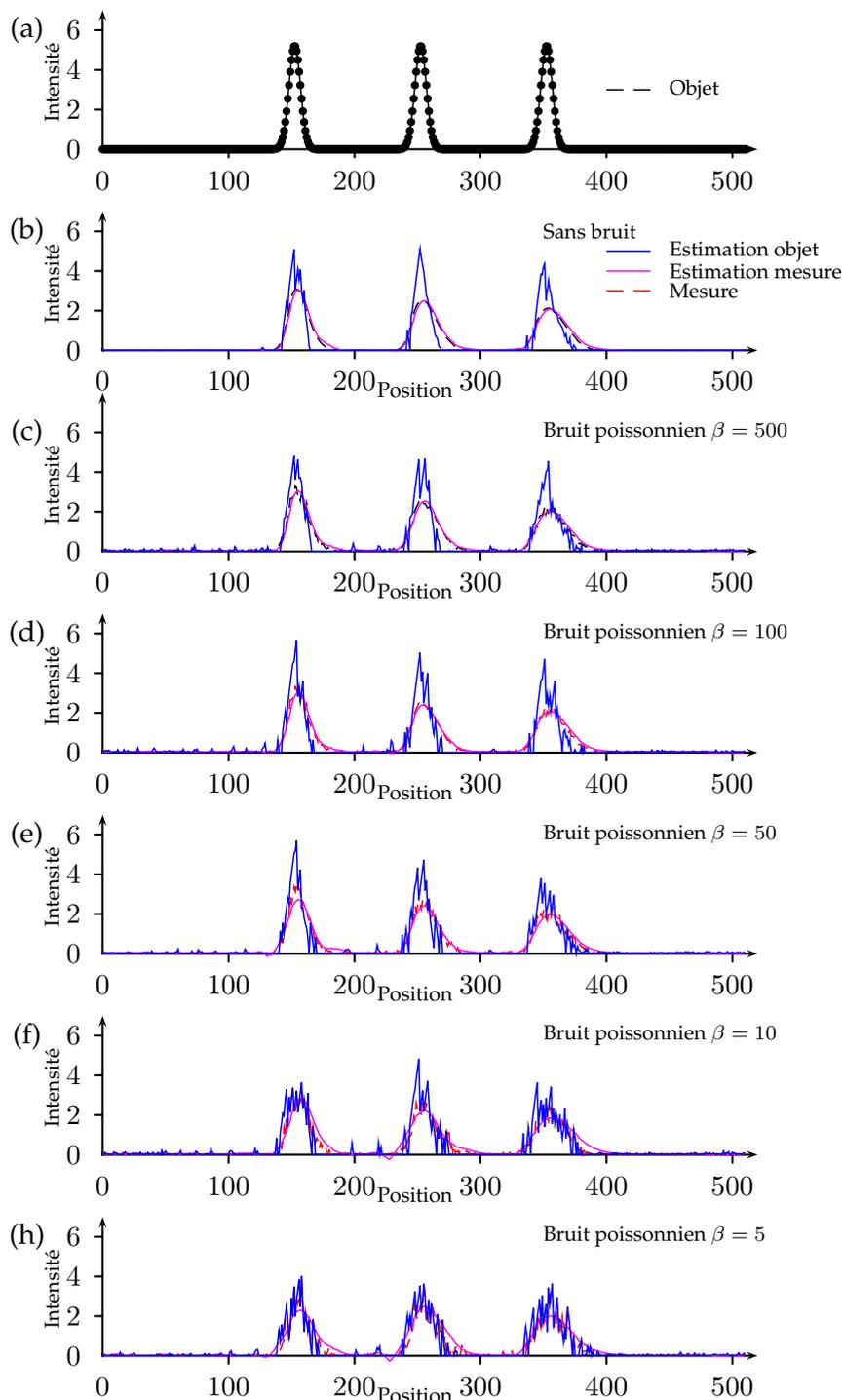


FIGURE. 4.6 | Résultats sur un signal 1D vu par un système à réponse impulsionnelle invariante : L'objet original est présenté sur le premier graphique, les courbes suivantes présentent le résultat de la déconvolution, l'estimation de la mesure et la mesure elle-même simulée avec plusieurs niveaux de bruit. La déconvolution permet de retrouver l'intensité originale, l'estimation de la mesure et la mesure sont très proches pour des valeurs de $\beta > 100$. Le résultat est cependant sensible au bruit qui empêche la restauration à partir d'une valeur de $\beta < 50$.

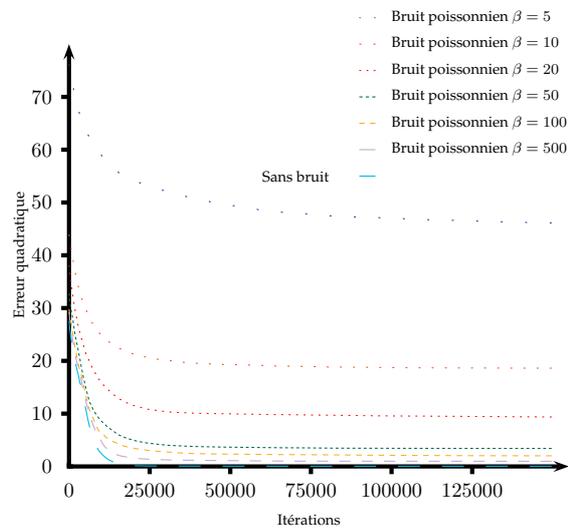


FIGURE. 4.7 | *Evolution de l'erreur quadratique en fonction du nombre d'itérations dans le cas invariant* : L'erreur diminue jusqu'à atteindre une valeur minimale, qui augmente en fonction du niveau de bruit. Le temps de calcul pour une itération est d'environ $150\mu s$

Les courbes 4.7 et 4.8 décrivent l'évolution de l'erreur quadratique dans le cas invariant et non-invariant. On constate que la fiabilité de reconstruction décroît très vite lorsque le bruit augmente. On observe la convergence, mais avec un biais en rapport avec le bruit présent dans le signal observé.

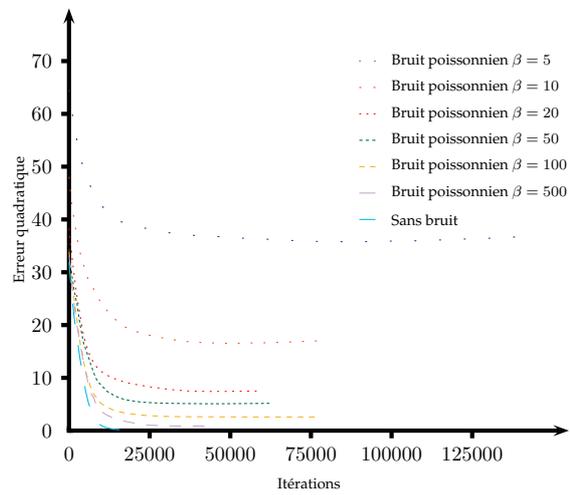


FIGURE. 4.8 | *Evolution de l'erreur quadratique en fonction du nombre d'itérations dans le cas non-invariant : L'erreur diminue jusqu'à atteindre une valeur minimale, qui augmente en fonction du niveau de bruit comme pour le cas invariant*

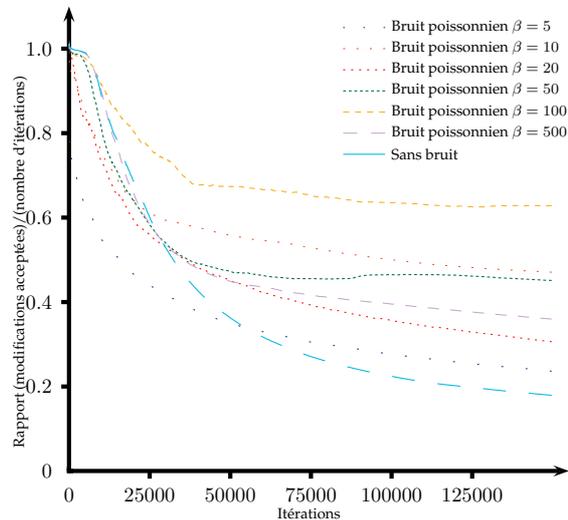


FIGURE. 4.9 | *Evolution du pourcentage de modifications acceptées en fonction du nombre d'itérations dans le cas invariant* : On observe la diminution du nombre de modifications acceptées, l'amélioration de la solution étant de plus en plus faible

Les courbes en figure 4.9 et 4.10 présentent le rapport entre le nombre d'itérations qui ont modifié les estimations (modifications des estimations réussies) et le nombre total d'itérations nécessaires à la reconstruction dans le cas invariant et non-invariant. Ces courbes permettent de savoir, si on observe la diminution du nombre de modifications acceptées, que l'amélioration de la solution est de plus en plus faible. La proportion de modifications acceptées baisse lentement en fin de reconstruction, mais l'erreur ne diminue plus, la reconstruction peut donc être stoppée.

Les résultats présentés en 1D se retrouvent en 2D et 3D. Dans les deux cas nous présenterons uniquement des simulations sans bruit, en présentant des résultats à partir de simulations supposant un système invariant en 2D, et non-invariant en 3D, ce qui est l'objectif final.

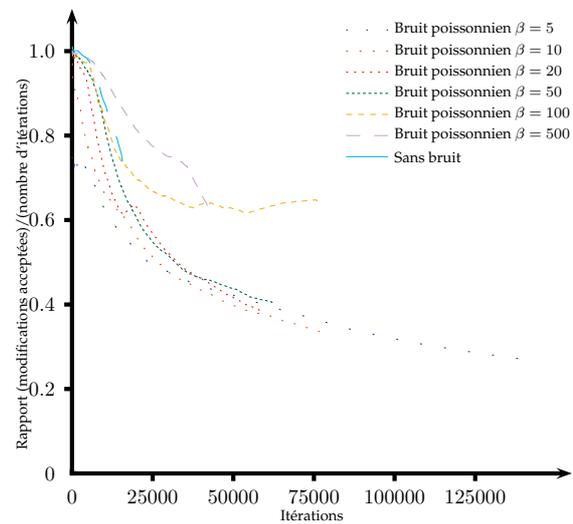


FIGURE. 4.10 | *Evolution du pourcentage de modifications acceptées en fonction du nombre d'itérations dans le cas non-invariant* : On observe la diminution du nombre de modifications acceptées, l'amélioration de la solution étant de plus en plus faible comme pour le cas invariant

4.5 Extension de la méthode à la 2D

Pour évaluer les capacités de la méthode sur des images 2D, nous générons des images de synthèse dégradées. Un premier exemple présenté sur la figure 4.11 montre le résultat de la déconvolution Monte-Carlo (4.11(d)) sur une image réelle (4.11(a)) rendue floue par la convolution avec une gaussienne (4.11(b)). Le temps de calcul est cette fois de $8ms$ par itération en moyenne, et le nombre d'itérations nécessaires était de 360 000 itérations (l'ordre de grandeur est l'heure), dans le cas d'une image 200 par 200 pixels. L'image utilisée provient de la banque d'images tests du logiciel libre du National Institutes of Health (ImageJ), nommée 'embryos.jpg'. Les profils présentés en figure 4.5 montrent une correspondance des bords des objets présents, malgré un artefact de reconstruction visible autour des objets qui présentent des arrêtes très nettes (contour noir, à zero).

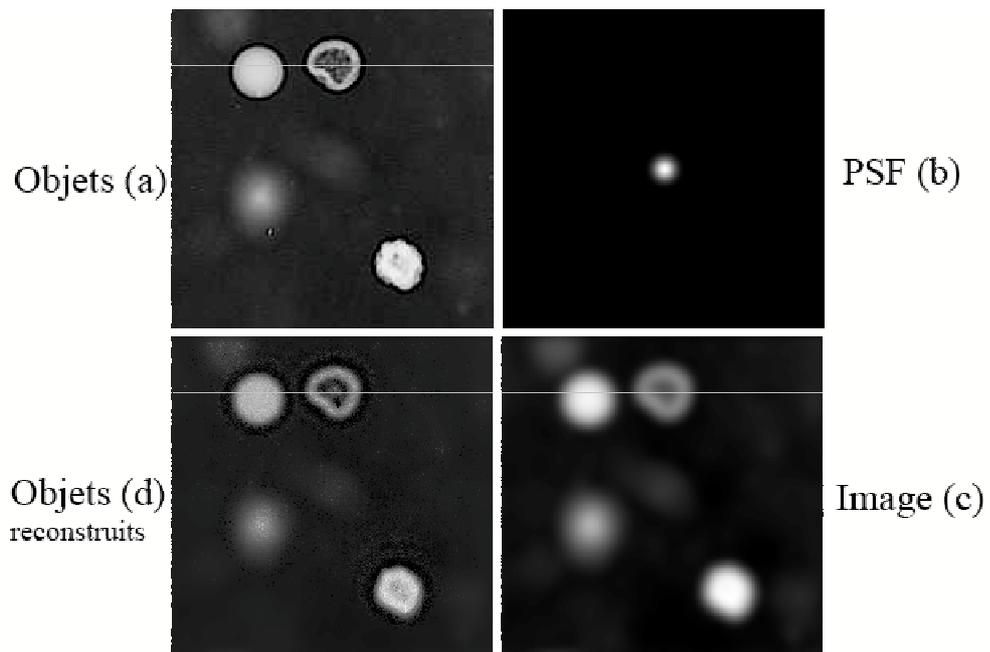


FIGURE. 4.11 | Résultats de la déconvolution sur une image 2D vue par un système à réponse impulsionnelle invariante : l'objet (a) est convolué avec une gaussienne (b) qui nous donne l'image (c). Le résultat de la déconvolution est présenté sur l'image (d). On représente sur la figure 4.14 le profil des intensités sur la ligne indiquée dans les images.

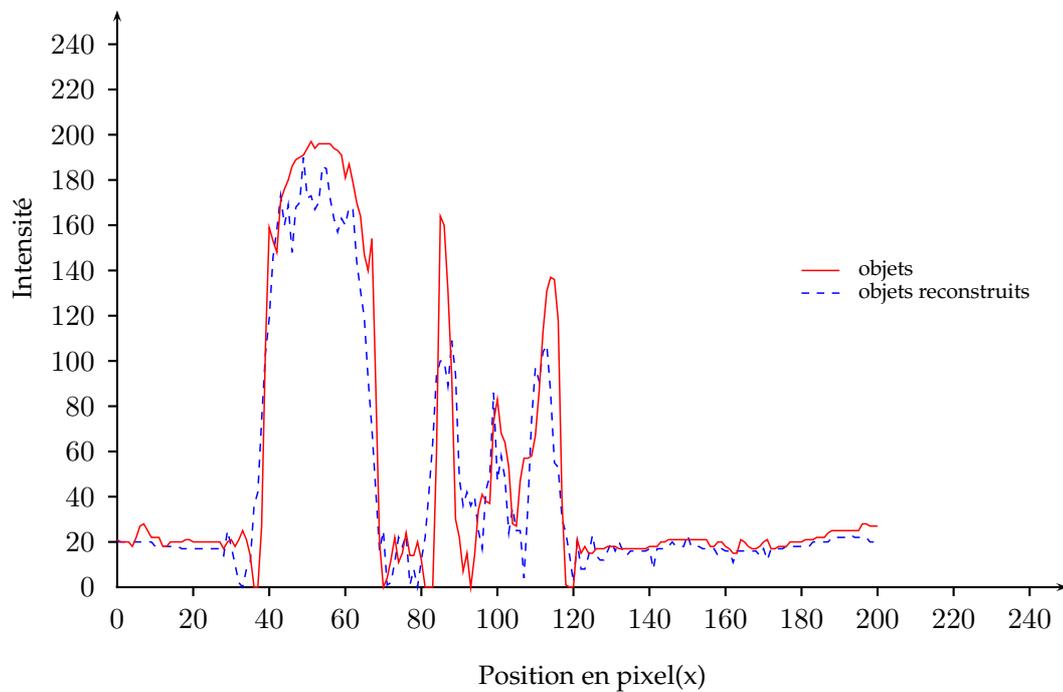


FIGURE. 4.12 | Profils des résultats de déconvolution 2D : les transitions sont correctement retrouvées après déconvolutions

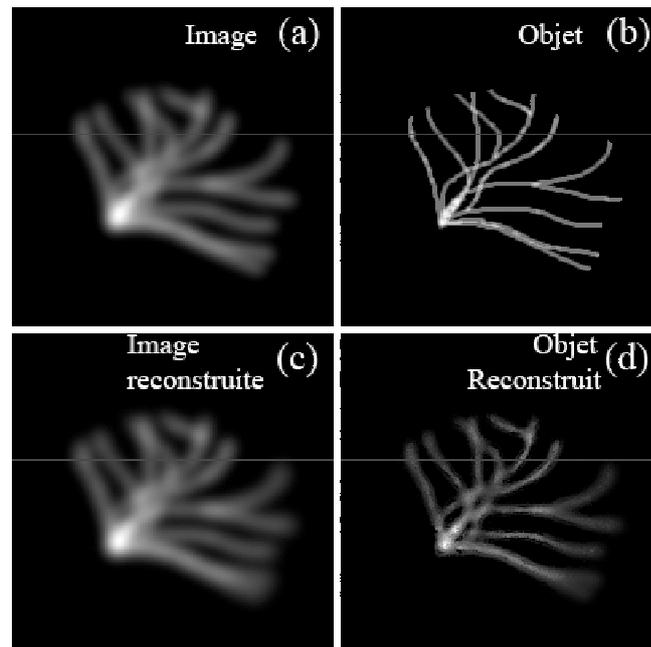


FIGURE. 4.13 | *Autre exemple de déconvolution 2D* : Les figures (a) et (b) correspondent respectivement à l'image observée et l'objet réel (objet de synthèse), les figures (c) et (d) sont les estimations calculées par la déconvolution Monte-Carlo. On représente sur la figure 4.5 le profil des intensités sur la ligne indiquée dans les images.

Un autre exemple est présenté sur la figure 4.13 qui présente les espaces objet (figure 4.13(d)) et image reconstruits (figure 4.13(c)), faces aux espaces objet (figure 4.13(b)) et image réels (figure 4.13(a)). La PSF utilisée est une gaussienne identique à celle utilisée pour l'exemple précédent. On observe sur cette simulation l'effet de la fenêtre de Hanning qui a favorisé le centre de l'image. On représente sur la figure 4.14 le profil des intensités sur la ligne indiquée, pour l'image, l'image reconstruite, l'espace objet reconstruit et l'objet. L'effet de la contrainte dans l'espace objet se voit sur les profils qui ne sont pas correctement reconstitués.

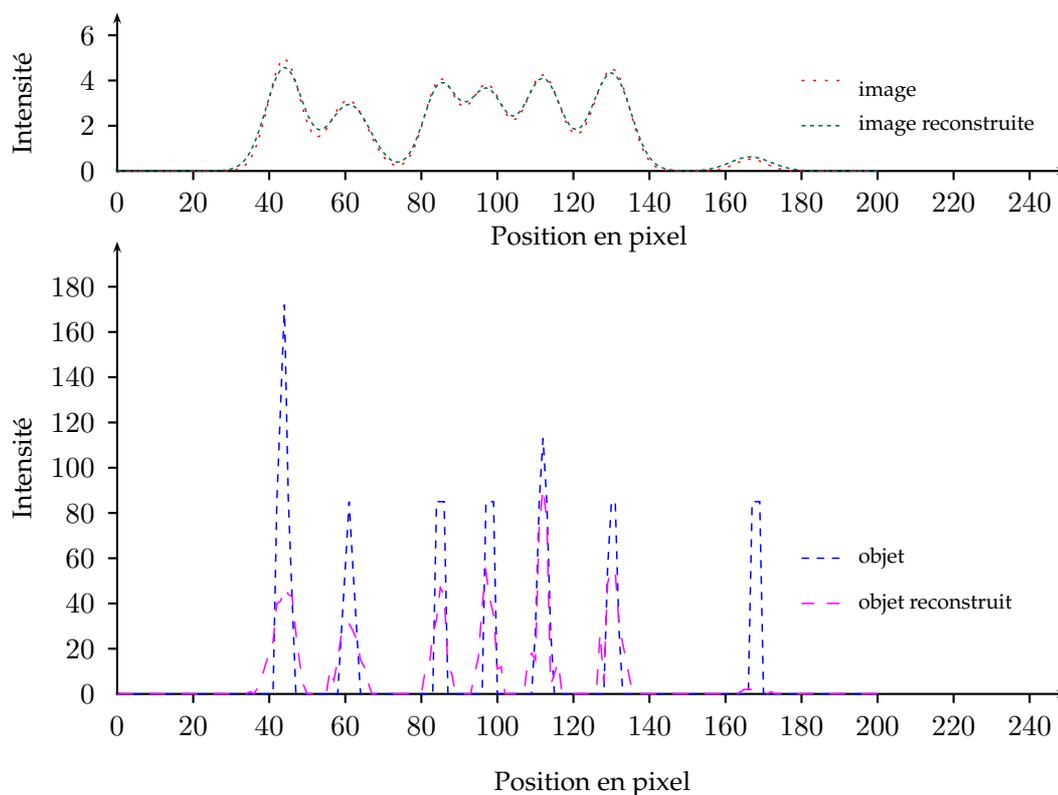


FIGURE. 4.14 | *Profils des résultats de déconvolution 2D* : L'estimation d'image et l'image simulée sont très proches. La reconstruction retrouve les positions des transitions, mais l'intensité n'est pas correctement restituée. La contrainte appliquée ici était $\Delta I = 10$.

Le dernier exemple 2D présente une image de synthèse (figure 4.15(a)), dégradée par une réponse impulsionnelle gaussienne (figure 4.15(b)), qui forme l'image observée (figure 4.15(c)). Le résultat de la déconvolution est présenté en figure 4.15(d). Les spectres respectifs des images sont représentés en figure 4.15(e) à (h). La convolution par la gaussienne a agi comme un filtre passe bas, des fréquences sont manquantes.

La déconvolution a restauré des fréquences qui correspondent au critère d'erreur quadratique entre l'image observée et estimée, avec la contrainte sur le voisinage. Cette reconstruction partielle dans l'espace des fréquences, améliore la résolution de l'image d'origine. On remarque cette amélioration notamment en observant les trois petites barres au centre de l'image qui étaient fusionnées dans l'image dégradée.

Ces résultats montrent les capacités de super-résolution de l'algorithme présenté, en plus de la possibilité de tenir compte de la non-invariance de la PSF. Ces résultats sur des images en deux dimensions montrent également l'utilisation possible dans d'autres domaines où la détection de la position des objets d'origine est importante.

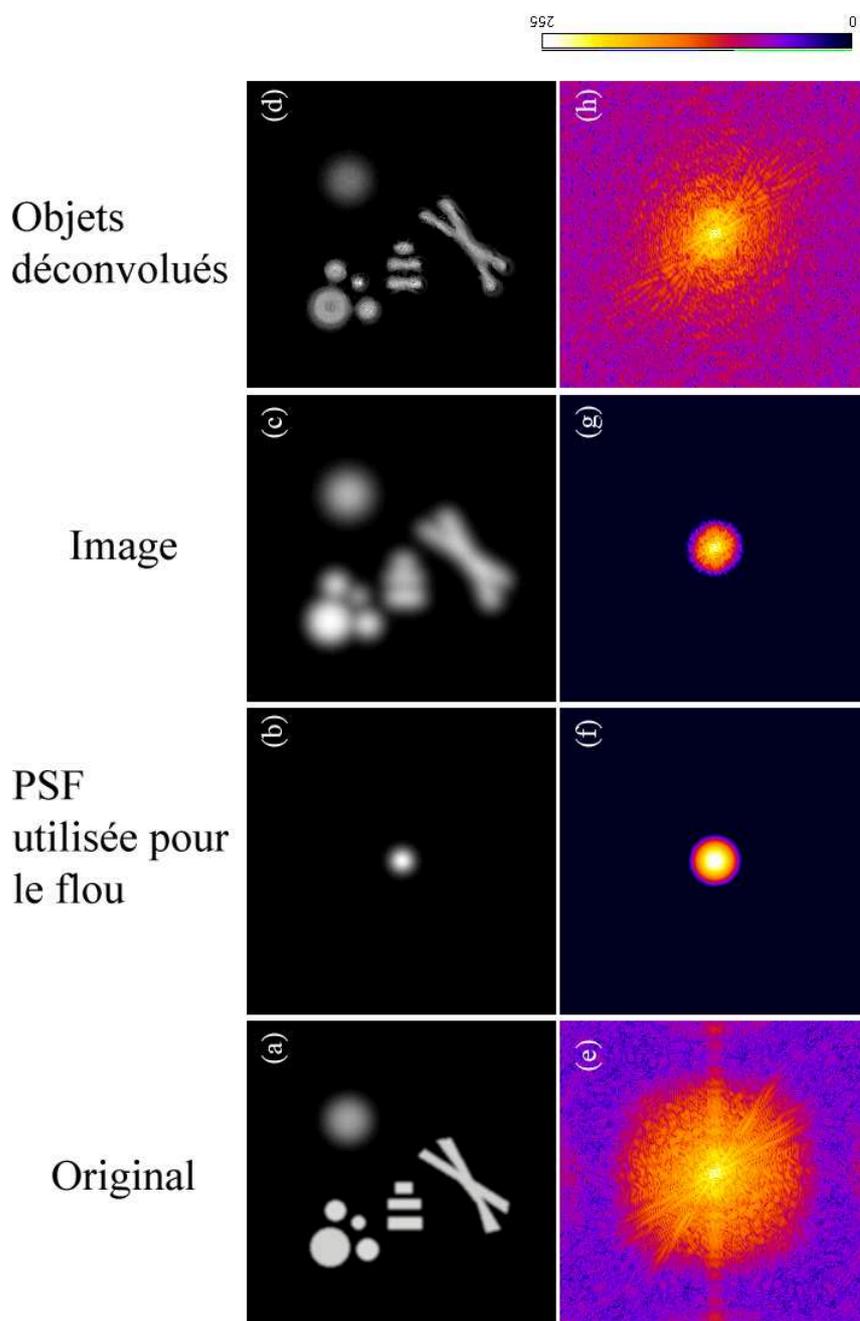


FIGURE. 4.15 | *Influence sur le spectre de l'image* : (a) objet, (b) réponse impulsionnelle, (c) image observée, (d) image déconvoluée. (e)-(h) Spectres respectifs. La convolution par la gaussienne a agi comme un filtre passe bas : des fréquences sont manquantes et la résolution est dégradée. La déconvolution a restauré partiellement des fréquences perdues.

4.6 Extension de la méthode à la 3D

Nous appliquons enfin la méthode au cas tridimensionnel. Les objets de départ sont convolués avec une PSF calculée pour chaque plan (100X, NA=1.35 objectif à immersion à huile), simulant ainsi la non-invariance du système optique comme présenté dans le chapitre 2.

En reprenant l'exemple des quatre billes réparties sur la profondeur dans un volume de $6,4 \times 6,4 \times 6,4 \mu\text{m}^3$, après déconvolution Monte-Carlo, nous obtenons les résultats présentés sur la figure 4.16. Le résultat obtenu par une déconvolution classique non invariante est présenté pour comparaison. Le temps de calcul est cette fois de 0,34 secondes par itération (329900 itérations). Les intensités de chacune des billes sont réassignées et après déconvolution les quatre billes apparaissent identiques. Il faut noter que les billes d'origine sont des objets à intensité constante qui se détachent nettement du fond, ce qui favorise la méthode Monte-Carlo, par rapport à la méthode directe régularisée.

Pour un objet plus grand (une bille creuse d'un diamètre de $3,2 \mu\text{m}$) pour laquelle l'image présente une dégradation en augmentation en fonction de la profondeur (figure 4.17), la déconvolution permet une reconstruction homogène de la bille (726900 itérations).

Les temps de calcul sont cette fois très importants (plusieurs jours) pour des images relativement petites. Des optimisations sont à envisager pour réduire le temps de calcul. Il faut toutefois noter que l'implémentation de l'algorithme est réalisée avec un logiciel de traitement de données, et non pas implémenté directement dans un langage performant de type C.

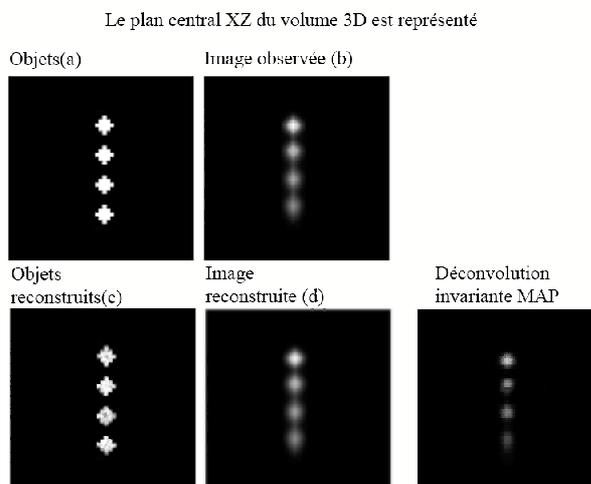


FIGURE. 4.16 | *Application de la déconvolution 3D* : Les figures (a) et (b) correspondent respectivement à l'objet réel (objet de synthèse d'une pile de billes) et l'image observée, les figures (c) et (d) sont les estimations calculées par la déconvolution Monte-Carlo (726900 itérations)

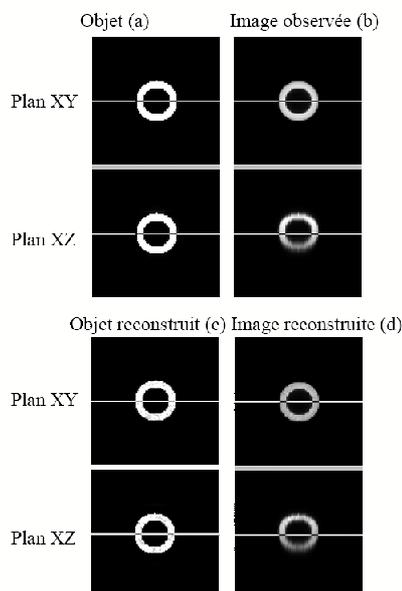


FIGURE. 4.17 | *Application de la déconvolution 3D* : Les figures (a) et (b) correspondent respectivement à l'objet réel (objet de synthèse d'une bille creuse) et l'image observée, les figures (c) et (d) sont les estimations calculées par la déconvolution Monte-Carlo (927900 itérations).

4.7 Conclusion

Nous avons présenté une méthode de déconvolution basée sur une reconstruction simultanée de l'estimation de l'objet et de l'image. Le critère d'erreur quadratique est utilisé pour guider le processus Monte-Carlo, qui modifie les estimations à des positions aléatoires. L'élément de base utilisé pour les modifications est la réponse impulsionnelle du système optique, normalisée pour correspondre à un niveau d'intensité élémentaire. La méthode du recuit simulé est utilisée afin de minimiser la fonction de coût.

Le temps de calcul est important pour les images tridimensionnelles : les simulations ont donc été réalisées pour des échantillons de petites tailles. Cependant, la méthode présente l'avantage de pouvoir incorporer de manière directe les contraintes appliquées, ce qui permet de tenir compte d'informations a priori sur les objets (non-négativité, variance bornée).

L'utilisation de la déconvolution pour un cas biologique réel nécessite la connaissance de la collection de PSF correspondantes aux différents plans selon l'axe optique, mais cette mesure n'est pas réalisable au laboratoire actuellement. Un projet de microscope optique tomographique¹⁴ couplé à un microscope de fluorescence a débuté au laboratoire MIPS.

La construction d'un tel microscope permettra d'obtenir une carte des indices optiques des spécimens. L'utilisation de modèles de formation d'image diffractifs plus élaborés que le modèle de Gibson et Lanni, sur lesquels travaille aussi le laboratoire, permettra alors de calculer la distribution de PSF nécessaire à une déconvolution Monte-Carlo.

L'objectif final est de pouvoir tenir compte d'un phénomène supplémentaire : l'influence des spécimens sur la réponse impulsionnelle optique. Cette étude a débuté en 2004 par un nouveau sujet de thèse proposé par le groupe LABEL du laboratoire MIPS pour poursuivre cette approche.

¹⁴[Lauer, 2002]

CONCLUSION

EN biologie, le microscope de fluorescence a pris une place prépondérante. En effet, c'est la seule technique permettant une étude en 3D, voire 4D (3D + temps) des cellules vivantes. Le marquage de zones précises par des substances fluorescentes spécifiques à ces zones permet de les mettre en évidence et de comprendre les mécanismes cellulaires qui leur sont associés.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons présenté les principes de fonctionnement du microscope de fluorescence en 3D. Nous avons ainsi vu les problèmes spécifiques liés à ce type d'instrument. En particulier, les données issues des acquisitions en microscopie de fluorescence ne sont pas directement exploitables en vue de mesures quantitatives (telles que la distribution spatiale des intensités ou les volumes des sites de fluorescence) car ces données subissent des distorsions lors du processus d'acquisition.

Pour espérer effectuer des mesures fiables, il faut tout d'abord corriger ces distorsions. La connaissance de la réponse impulsionnelle optique du microscope caractérisant cet instrument permet alors d'envisager des corrections de l'image pour retrouver une version plus fidèle de l'objet réel. On peut soit mesurer cette réponse impulsionnelle optique, soit la modéliser. Dans ce travail, nous avons utilisé le modèle introduit par Gibson et Lanni pour la modélisation du processus de formation de l'image, modèle qui a été présenté dans cette première partie.

Les déformations que subit l'image acquise en microscopie de fluorescence sont décrites mathématiquement par une opération de convolution de l'espace "objet" par la réponse impulsionnelle optique vers l'espace "image". Pour restaurer les images, on peut donc envisager de réaliser numériquement l'opération inverse, à savoir une déconvolution. Dans la seconde partie de ce mémoire, nous avons donc présenté les algorithmes de déconvolution les plus couramment utilisés en microscopie de fluorescence, et décrit leur formalisme mathématique.

Nous avons en particulier abordé les problèmes liés à l'acquisition, ainsi que les pré-traitements qui peuvent être nécessaires avant même d'effectuer la déconvolution. En effet, les déconvolutions nécessitent une bonne connaissance des paramètres d'acquisition du système qui seront utilisés dans le modèle de Gibson et Lanni pour modéliser la réponse impulsionnelle optique. Nous avons effectué une étude de l'influence d'une mauvaise estimation des paramètres sur le résultat de déconvolution.

En particulier, nous avons montré la grande importance d'une bonne maîtrise de l'indice optique du milieu d'immersion, d'une bonne connaissance de l'ouverture numérique de l'objectif, et de l'épaisseur de la lamelle utilisée. Nous avons enfin mis en évidence l'effet de la non-invariance de la PSF du système d'acquisition sur les résultats de la déconvolution. Cette

non-invariance est en effet une hypothèse sous-jacente pour la déconvolution, alors qu'elle est souvent mise en défaut, par exemple lors de l'utilisation d'objectif à immersion à huile pour observer en 3D des spécimens aqueux.

Les algorithmes de déconvolution les plus courants nécessitent un choix manuel par l'opérateur de paramètres dits de régularisation. Le résultat final étant très sensible à ce choix, la déconvolution fait donc appel à l'expérience de l'opérateur et à une connaissance a priori du spécimen observé. Ceci constitue un frein à l'adoption de ces techniques par le non-spécialiste. Nous avons donc travaillé sur une méthode d'automatisation du choix des paramètres et d'amélioration de la stabilité des méthodes de déconvolution. Ce travail est présenté dans la troisième partie du manuscrit.

Un autre problème est le bruit toujours présent dans les images, qui limite les possibilités de déconvolution. Par des simulations, nous avons étudié l'effet d'un pré-filtrage de Wiener des données. Pour garantir la stabilité, nous avons proposé l'utilisation d'un filtre de Wiener fonctionnant de manière itérative, en boucle fermée avec le processus de déconvolution. Nous avons ainsi montré que plusieurs méthodes de déconvolution pouvaient bénéficier de ce pré-filtrage, et qu'une recherche automatique des paramètres de pré-filtrage et de déconvolution permet une constance des résultats, en augmentant la stabilité, ce qui écarte la subjectivité de l'utilisateur.

Les méthodes directes ainsi automatisées ont été appliquées à des images de cytologie et de cytogénétique moléculaire. En cytologie, une application à des images est présentée sur l'étude d'une population de cellules CD34 par le Dr Georges Jung du Laboratoire d'Hématologie de l'Hopital Emile Muller de Mulhouse. En cytogénétique, pour l'étude interphasique des gènes, une étude sur les translocations a été menée avec le Dr Eric Jeandidier du Laboratoire de Cytogénétique. Notre contribution a donc aussi été de faciliter l'adoption et l'utilisation routinière des méthodes de déconvolution par des opérateurs non-spécialistes du traitement des images. Dans la dernière partie de cette thèse, Nous avons étudié un algorithme permettant la prise en compte de la non-invariance en translation de la réponse impulsionnelle du système, dont nous avons vu les problèmes qu'elle peut poser pour les méthodes de déconvolution classiques.

L'idée est de permettre une reconstruction simultanée de l'espace objet et de l'espace image, en utilisant une technique de type Monte-Carlo. La solution est calculée par essais successifs aléatoires, en suivant une distribution de probabilité qui est fonction de l'erreur de biais entre l'estimation de l'image reconstruite et l'image réellement observée. La reconstruction se base sur une fonction d'erreur à minimiser entre l'image acquise et son estimation, ainsi qu'à des contraintes de voisinage dans l'espace objet reconstruit.

Un problème dû à cette méthode Monte-Carlo et dû à la nature mal posée de la déconvolution d'images de fluorescence 3D en microscopie conventionnelle et la présence de nombreux minima locaux pour la fonction à minimiser. Nous avons alors proposé d'utiliser une méthode de minimisation par une technique de recuit simulé. Par des simulations nous

avons montré la possibilité de résoudre par cette méthode le problème de la déconvolution, y compris dans le cas de la non-invariance de la PSF.

Cependant, cette méthode nécessite encore de connaître la réponse du système à chaque position de l'espace, ce qui est difficile en pratique. Le laboratoire a justement entrepris la construction d'un microscope tomographique optique qui doit permettre la cartographie 3D des indices optiques dans un spécimen de fluorescence. L'utilisation de modèles de formation d'image diffractifs plus élaborés que le modèle de Gibson et Lanni, sur lesquels travaille aussi le laboratoire, permettra alors de calculer la distribution de PSF nécessaire à une déconvolution Monte-Carlo précise.

Ce travail de thèse s'inscrit donc dans une thématique appelée à se poursuivre au MIPS-LabEl. Tout d'abord, les méthodes que nous avons mises au point pour des images de microscope de fluorescence classique peuvent aussi s'appliquer au traitement d'images de microscopes confocaux et bi-photons. En effet, ces images sont souvent caractérisées par un rapport signal/bruit plus défavorable et l'utilisation d'un préfiltrage devrait permettre d'améliorer les résultats de déconvolution. Parmi les extensions envisageables, on peut citer l'amélioration de la rapidité de convergence des méthodes de déconvolution, en particulier les méthodes Monte-Carlo, très gourmandes en temps de calcul. Ceci devrait aussi en faciliter l'utilisation routinière dans le cadre de laboratoires de biologie, qui ont souvent de grands volumes de données à traiter.

L'extension de l'automatisation du choix des paramètres de régularisation et de préfiltrage à des méthodes de déconvolution aveugles ou myopes est aussi à envisager. En effet, la connaissance précise de la PSF est souvent difficile, et ces méthodes permettent justement de traiter des images alors que l'on a seulement une connaissance partielle de la PSF.

Enfin, de nombreux autres domaines d'application de ces travaux sont possibles.

BIBLIOGRAPHIE

D. ABBOTT ET K. NUGENT.

Limitations on cell volume determination using three-dimensional optical microscopy.

Micron and Microscopica Acta p. 491–500, 1992, 1992.

D. ABBOTT ET K. NUGENT.

3-D widefield microscopy : towards an optimal filter for optical section data.

Bioimaging p. 207–213, 1993.

A. M. AMINI.

Metropolis monte carlo annealing.

In Proc. SPIE Vol. 4041, p. 163-171, Visual Information Processing IX, Stephen K. Park ; Zia-ur Rahman ; Eds., pages 163–171, 2000.

F. ANSCOMBE.

The transformation of poisson, binomial and negative -binomial data.

Biometrika, vol. 15 p. 246–254, 1948.

K. ATKINSON.

The Numerical Solution of Integral of Equations of the Second Kind.

Cambridge university press, 1997.

W. CARRINGTON, R. LYNCH, E. MOORE, G. ISENBERG, K. FOGARTY ET F. FAY.

Superresolution three-dimensional images of fluorescence in cells with minimal light exposure.

Science p. 1483–7, 1995.

A. CHOMIK.

Deconvolution 3D orientée vers la reconstruction d'objets biologiques observés en microscopie optique de fluorescence.

Thèse de Doctorat, Univeristé de Haute-Alsace, 1997.

A. CHOMIK, C. DIETERLEN, A. XU, O. HAEBERLÉ, J. MEYER ET S. JACQUEY.

Quantification in optical sectioning microscopy : a comparison of some deconvolution algorithms in view of 3d image segmentation.

J. Opt., vol. 28 p. 225–233, 1997.

- B. COLICCHIO, O. HAEBERLÉ, A. DIETERLEN ET C. XU.
Improvement of the LLS and MAP deconvolution algorithms by automatic determination of the optimal regularization parameters and pre-filtering of original data.
 Optics Communications, *acceptée en août 2004.*
- B. COLICCHIO, E. JEANDIDIER, A. DIETERLEN ET O. HAEBERLÉ.
Application des outils d'analyse 3d en microscopie de fluorescence à la cytogénétique moléculaire (fish).
 5ème Colloque national Diagnostique et Imagerie Optiques en Médecine OPT-DIAG 2004, Val de Grace Paris, 11-13 Mai, 2004.
- B. COLICCHIO, C. XU, O. HAEBERLÉ, A. DIETERLEN ET S. JACQUEY.
Monte-carlo reconstruction of images from a psf variant system.
 Focus on Microscopy 2002, Kaohsiung (Taiwan), April 7-10, 2002 Technical Digest of Focus on Microscopy 2002, p. 56, 2002.
- B. COLICCHIO, C. XU, G. JUNG, A. DIETERLEN, O. HAEBERLÉ ET S. JACQUEY.
Pre-filtering applied to 3-d fluorescence microscopy deconvolution.
 Analytical Cellular Pathology, Vol 22, N°1-2, 91, CAEN April, 2001.
- J.-A. CONCHELLO.
Three-Dimensional microscopy : image acquisition and processing.
 SPIE, 1995.
 "Fluorescence photobleaching correction for expectation maximization algorithm" pp138-146.
- J. CONCHELLO.
Superresolution and convergence properties of the expectation-maximization algorithm for maximum-likelihood deconvolution of incoherent images.
 J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis. p. 2609-19, 1998.
- J. CONCHELLO, J. KIM ET E. HANSEN.
 Enhanced three-dimensional reconstruction from confocal scanning microscope images. II. depth discrimination versus signal-to-noise in partially confocal images.
 Monograph 575, Biomedical Computer Laboratory Institute for Biomedical Computing, Washington University in St. Louis, 1994.
- G. DEMOMENT ET J. IDIER.
Problèmes inverses et problèmes mal-posés. Approche bayésienne pour les problèmes inverses.
 Série traitement du signal et de l'image. Hermès, 2001.
- A. DEMPSTER, N. LAIRD ET D. RUBIN.
Maximum likelihood from incomplete data via the em algorithm.
 J. R. Stat. Soc., vol. 39 p. 1-38, 1977.

- A. DIETERLEN, C. XU, M.-P. GRAMAIN, O. HAEBERLÉ, B. COLICCHIO, C. CUDEL, S. JACQUEY, E. GINGLINGER, G. JUNG ET E. JEANDIDIER.
Validation of image processing tools for 3-D fluorescence microscopy.
C. R. Biol. p. 327–34, 2002.
- F. FAY, W. CARRINGTON ET K. FOGARTY.
Three-dimensional molecular distribution in single cells analysed using the digital imaging microscope.
Journal of Microscopy, vol. 153 (Pt 2) p. 133–49, 1989.
- G. FISHMAN.
Monte-Carlo Methods Concepts and Application.
New York, 1996.
- M. FRANCON.
Progress in Microscopy.
Pergamon Press, 1961.
- B. FRIEDEN.
Optical transfer of the three-dimensional object.
J. Opt. Soc. Am., vol. 57 p. 56–66, 1967.
- B. FRIEDEN.
Restoring with maximum likelihood and maximum entropy.
J. Opt. Soc. Am. p. 511–518, 1972.
- J. FROHN, H. KNAPP ET A. STEMMER.
Three-dimensional resolution enhancement in fluorescence microscopy by harmonic excitation.
Optics Letters p. 828–830, 2001.
- S. GEMAN ET D. GEMAN.
Stochastic relaxation, gibbs distributions and the bayesian restoration of images.
IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence p. 721–741, 1984.
- S. GIBSON ET F. LANNI.
Diffraction by a circular aperture as a model for three-dimensional optical microscopy.
J. Opt. Soc. Am. A p. 1357–1367, 1989.
- S. GIBSON ET F. LANNI.
Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy.
J. Opt. Soc. Am. A p. 154–66, 1992.

I. GOOD.

Non-parametric roughness penalty for probability densities.

Nature physical science, vol. 229 p. 29–30, 1971.

J. GOODMAN.

Statistical Optics.

Wiley, 1989.

M. GUSTAFSSON.

Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy.

Journal of Microscopy, vol. 198 (Pt 2) p. 82–7, 2000.

M. GUSTAFSSON, D. AGARD ET J. SEDAT.

15M : 3D widefield light microscopy with better than 100 nm axial resolution.

Journal of Microscopy, vol. 195 (Pt 1) p. 10–6, 1999.

O. HAEBERLÉ.

Kindling molecules : a new way to break the abbe limit.

C. R. Physique, vol. 5 p. 143–148, 2004.

O. HAEBERLÉ, M. AMMAR, H. FURUKAWA, K. TENJIMBAYASHI ET P. TÖRÖK.

The point spread function of optical microscopes imaging through stratified media.

Opt. Express p. 2964–2969, 2003.

<http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=OPEX-11-22-2964>.

O. HAEBERLÉ, F. BICHA, C. SIMLER, A. DIETERLEN, C. XU, M. GRAMAIN, B. COLICCHIO ET S. JACQUEY.

Identification of acquisition parameters from the point spread function of a fluorescence microscope.

Optics Communications, vol. 196 p. 109, 2001b.

O. HAEBERLÉ, H. FURUKAWA ET H. TENJIMBAYASHI.

Polarized confocal theta microscopy.

C. R. Physique, vol. 3 p. 1445–1450, 2002.

W. HASTINGS.

Monte carlo sampling methods using markov chains and their applications.

Biometrika, vol. 57 p. 97–109, 1970.

S. HELL, G. REINER, C. CREMER ET E. STELTZER.

Aberations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index.

Journal of Microscopy p. 391–405, 1993.

- T. J. HOLMES.
Blind deconvolution of quantum-limited incoherent imagery : maximum-likelihood approach.
J. Opt. Soc. Am. A, vol. 9 p. 1052–1061, 1992.
- T. HOLMES.
Maximum-likelihood image restoration adapted for noncoherent optical imaging.
J. Opt. Soc. Am. A, vol. 5 p. 666–673, 1988.
- T. HOLMES ET Y. LIU.
Richardson-lucy/maximum likelihood image restoration algorithm for fluorescence microscopy : further testing.
Applied Optics, 1989.
- T. HOLMES ET N. O'CONNOR.
Blind deconvolution of 3D transmitted light brightfield micrographs.
Journal of Microscopy, vol. 200 (Pt 2) p. 114–27, 2000.
- M. HOMEM, N. MASCARENHAS, L. COSTA ET C. PREZA.
Biological image restoration in optical-sectioning microscopy using prototype image constraints.
Real-Time Imaging p. 475–490, 2002.
- B. HUNT.
Prospects for image restoration.
J. of Modern Physics C p. 151–178, 1994.
- S. INOUE.
Video Microscopy.
Plenum Press, 1987.
- A. JABLONSKI.
Über den mechanismus der photolumineszenz von farbstoffphosphoren.
Zeitschrift für Physik, vol. 96 p. 38–46, 1935.
- H. JACOBSEN, P. HÄNNINEN, E. SOINI ET S. HELL.
Refractive-index-induced aberrations in two-photon confocal fluorescence microscopy.
Journal of Microscopy p. 226–230, 1994.
- P. JANSSON, W. BLASS, G. HALSEY, B. FRIEDEN ET S. HOWARD.
Deconvolution with applications in spectroscopy.
ACADEMIC PRESS, INC, 1984.
- S. JOSHI ET M. MILLER.
Maximum a posteriori estimation with good's roughness for three-dimensional optical-sectioning microscopy.
J. Opt. Soc. Am. A p. 1078–1085, 1993.

- L. S. JOYCE ET W. L. ROOT.
Precision bounds in superresolution processing.
 Optical Society of America Journal, vol. 1 p. 149–168, 1984.
- R. JUSKAITIS ET T. WILSON.
The measurement of the amplitude point spread function of microscope objective lens.
 Journal of Microscopy p. 8–11, 1997.
 SHORT COMMUNICATION.
- J. KAMM.
Singular value decomposition-based methods for signal and image restoration.
 Thèse de Doctorat, Southern methodist university, 1998.
- M. KASHA.
Characterization of electronic transitions in complex molecules.
 Chem. Soc., vol. 9 p. 14–19, 1950.
- C. KERVRANN ET A. TRUBUIL.
An adaptive window approach for poisson noise reduction and structure preserving in confocal microscopy.
 In *International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI'04)*, Arlington, VA, 2004.
- R. KIKUCHI ET B. SOFFER.
Maximum entropy image restoration.
 J. Opt. Soc. Am. p. 1656–1665, 1977.
- S. KIRKPATRICK, C. D. GELATT ET M. P. VECCHI.
Optimization by simulated annealing.
 Science, Number 4598, 13 May 1983, vol. 220, 4598 p. 671–680, 1983.
- T. KLAR, E. ENGEL ET S. HELL.
Breaking abbe's diffraction resolution limit in fluorescence microscopy with stimulated emission depletion beams of various shapes.
 Physucal review E, vol. 64 p. 1–9, 2001.
- T. KLAR, S. JAKOBS, M. DYBA, A. EGNER ET S. HELL.
Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission.
 PNAS p. 8206–8210, 2000.
- H. KÛNSCH.
 Robust priors for smoothing and image restoration.
 Research report 67a, Seminar für Statistik, ETH Zentrum CH-8092 Zürich Switerland, 1993.

N. KONTOYANNIS ET F. LANNI.

Measured and computed point spread functions for an indirect water immersion objective used in three-dimensional fluorescence microscopy.

Proceedings of the SPIE, vol. 2655 p. 34–42, 1996.

J. LAKOWICZ.

Principles of fluorescence spectroscopy 2nd ed.

Plenum publ., New York., 1999.

K. LANGE ET R. CARSON.

Em reconstruction algorithms for emission and transmission tomography.

Journal of Computer Assisted Tomography p. 306–316, 1984.

F. LANNI ET G. BAXTER.

Sampling theorem for square-pixel image data.

Biomedical Image Processing and the Three-Dimensional Microscopy (SPIE), vol. 1660 p. 140–147, 1992.

V. LAUER.

New approach to optical diffraction tomography yielding a vector equation of diffraction tomography and a novel tomographic microscope.

Journal of Microscopy p. 165–76, 2002.

L. LUCY.

An iterative technique for the rectification of observed distributions.

The Astronomica Journal p. 745–765, 1974.

B. M. MACCALLUM.

Blind deconvolution by simulated annealing.

Optics Communications p. 101–105, 1990.

J. MARKHAM ET J. CONCHELLO.

Artefacts in restored images due to intensity loss in three-dimensional fluorescence microscopy.

Journal of Microscopy p. 93–8, 2001.

J. MCNALLY, T. KARPOVA, J. COOPER ET J. CONCHELLO.

Three-dimensional imaging by deconvolution microscopy.

Methods, vol. 19 p. 373–385, 1999.

J. MCNALLY, C. PREZA, J. CONCHELLO ET L. THOMAS.

Artefacts in computational optical-sectioning microscopy.

J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image. Sci. Vis. p. 1056–67, 1994.

- E. MEINEL.
Origins of linear and nonlinear recursive restoration algorithms.
J. Opt. Soc. Am. A, vol. 3 p. 787–799, 1986.
- N. METROPOLIS, A. W. ROSENBLUTH, M. N. ROSENBLUTH, A. H. TELLER ET E. TELLER.
Equations of state calculations by fast computing machine.
J. Chem. Phys., vol. 21 p. 1087–1091, 1953.
- K. MONIER, Y. USSON, F. MONGELARD, P. SZERPETOWSKI, M. ROBERT-NICOUD ET C. VOURC'H.
Metaphase and interphase mapping by FISH : Improvement of chromosome banding and signal resolution in interphase nuclei by means of iterative deconvolution.
Cytogenet Cell Genet p. 200–204, 1996.
- K. MOSEGAARD ET M. SAMBRIDGE.
Monte carlo analysis of inverse problems.
Inverse Problems, vol. 18 p. R29–R54, 2002.
- M. NARGONI ET S. HELL.
Coherent use of opposing lenses for axial resolution increase. i. comparative study and concepts.
J. Opt. Soc. Am. A p. 36–48, 2001a.
- M. NARGONI ET S. HELL.
Coherent use of opposing lenses for axial resolution increase. ii. power and limitation of nonlinear image restoration.
J. Opt. Soc. Am. A. p. 49–54, January 2001b.
- W. PRESS, B. P. FLANNERY ET V. W. TEUKOLSKY, S.A.
Numerical Recipes in C.
Cambridge University Press, 1995.
- C. PREZA.
A regularized linear reconstruction method for optical-sectioning microscopy.
Thèse de Maîtrise, Sever Institute of Technology, Washington University, St. Louis, MO, 1990.
- C. PREZA, M. MILLER, L. THOMAS ET J. MCNALLY.
Regularized linear method for reconstruction of three-dimensional microscopic objects from optical sections.
J. Opt. Soc. Am. A p. 219–28, 1992.
- C. PREZA, M. I. MILLER ET J.-A. CONCHELLO.
Image reconstruction for 3-d light microscopy with a regularized linear method incorporating a smoothness prior.
In R. S. Acharya ET D. B. Goldgof, editors, *Biomedical image processing and biomedical visualization*, volume 1905 of *Science and Technology*, pages 129–139. Proceedings of the IS&T/SPIE symposium on Electronic Imaging, 1993.

- W. RICHARDSON.
Bayesian-based iterative method of image restoration.
J. Opt. Soc. Am. A p. 55–59, 1972.
- M. C. ROBINI, Y. BRESLER ET I. MAGNIN.
On the convergence of metropolis-type relaxation and annealing with constraints.
Proba. Engrg. Inform. Sci. p. 427–452, 2002.
- M. C. ROBINI, T. RASTELLO ET I. MAGNIN.
Simulated annealing, acceleration techniques, and image restoration.
IEEE Trans. Image Processing p. 1374–1387, 1999.
- E. SEKKO, G. THOMAS ET A. BOUKROUCHE.
A deconvolution technique using optimal wiener filtering and regularization.
Signal processing, vol. 72 p. 23–32, 1999.
- L. SHEPP ET Y. VARDI.
Maximum likelihood reconstruction for emission tomography.
IEEE Transactions on Medical Imaging p. 113–122, 1982.
- C. SHEPPARD.
The spatial frequency cut-off in three dimensional imaging ii.
Optik, vol. 74 p. 128–129, 1986.
- C. SHEPPARD ET C. COGSWELL.
Effects of aberrating layers and tube length on confocal imaging.
Optik p. 34–38, 1991.
- C. SHEPPARD ET P. TÖRÖK.
Effects of specimen refractive index on confocal imaging.
Journal of microscopy p. 366–374, 1997.
- SKOOG, WEST ET HOLLER.
Chimie analytique.
7eme edition De Boeck, 1997.
- J. STARCK ET F. MURTAGH.
Astronomical image and signal processing : Looking at noise, information, and scale, 2001.
- N. STREIBL.
Depth transfer by an imaging system.
Optica Acta p. 1233–1241, 1984a.

- N. STREIBL.
Fundamental restrictions for 3-d light distributions.
Optik p. 1233–1241, 1984b.
- A. N. TIKHONOV ET V. Y. ARSEININ.
Solutions of Ill-Posed Problems.
Wiley, 1977.
- P. TÖRÖK, S. HEWLETT ET P. VARGA.
The role of specimen-induced spherical aberration in confocal microscopy.
Journal of microscopy p. 158–172, 1997.
- P. TÖRÖK ET P. VARGA.
Electromagnetic diffraction of light focused through a stratified medium.
Applied Optics p. 2305–2312, 1997.
- P. VAN CITTERT.
Zum einfluss der spaltbreite auf die intensitätsverteilung in spektrallinien II.
Z. Physik, 1931.
- H. VAN DER VOORT ET G. BRAKENHOFF.
3-D image formation in high-aperture fluorescence confocal microscopy : a numerical analysis.
Journal of Microscopy p. 49–54, 1989.
- G. VAN KEMPEN ET L. VAN VLIET.
Improving the restoration of textured objets with prefiltering.
In *Proc. 3rd Annual Conference of the advanced school for computing and imaging*, pages 174–179, Heijden, NL, 1997. ASCI'97, ASCI.
- G. VAN KEMPEN, L. VAN VLIET ET H. VERVEER, P.J. VAN DER VOORT.
A quantitative comparison of image restoration methods for confocal microscopy.
Journal of microscopy p. 354–365, 1997.
- P. J. VERVEER.
Computational and Optical Methods for Improving Resolution and Signal Quality in Fluorescence Microscopy.
Thèse de Doctorat, Technische Universiteit Delft, 1998.
- T. WILSON ET C. SHEPPARD.
Theory and practice of Scanning Optical Microscopy.
Academic Press, 1984.
- C. YANG.
Efficient stochastic algorithms on locally bounded image space.
CVGIP : GRAPHICAL MODELS AND IMAGE PROCESSING p. 494–506, 1993.

TABLE DES FIGURES

1.1	Diagramme de Jablonski d'un fluorophore organique	11
1.2	Spectres d'émission et d'excitation du fluorochrome DAPI	12
1.3	Microscope Olympus BX51	14
1.4	Schéma d'un système d'acquisition par coupes sériées	15
1.5	Focalisation et lumière hors-focus	16
1.6	Ouverture Numérique d'un objectif	17
1.7	PSF 3D réelle	18
1.8	Mesure de PSF	19
1.9	OTF du microscope conventionnel	20
1.10	Principe du microscope confocal	25
1.11	Amélioration de l'image par déconvolution	28
2.1	Effet de la régularisation	35
2.2	Correction de la variation de l'éclairement des plans de l'image	39
2.3	Effets de la déconvolution avec des PSF avec et sans aberration due à un changement de l'indice de l'huile d'immersion induit par une variation de température	42
2.4	Effets d'une mauvaise estimation de l'ouverture numérique pour la déconvolution	43
2.5	Effet de l'épaisseur de la lamelle	45
2.6	Méthode pour mesurer l'effet de la non-invariance de la PSF	46
2.7	Images observées sous l'hypothèse de l'invariance et de la non in- variance de la réponse du système optique	47
2.8	Résultats de la déconvolution pour la bille unique de $3,2\mu m$	48
2.9	Profils de l'intensité selon l'axe Z traversant la bille au centre, pour les résultats de déconvolutions avec la PSF à $Z = 0\mu m$	49
2.10	Résultats de la déconvolution pour une pile de billes de $1,6\mu m$ de diamètre	50
2.11	Profils de l'intensité selon l'axe Z traversant la pile de billes en leurs centres, pour les résultats de déconvolutions avec la PSF à $Z = 0\mu m$	51
3.1	Fonctionnement de la jauge de Joyce et Root	56
3.2	Utilisation de la jauge avec MAP pour un signal peu bruité (S/N=48dB)	57

3.3	Utilisation de la jauge de Joyce et Root avec MAP pour un signal bruité (S/N=20dB)	58
3.4	Principe du pré-filtrage itératif	60
3.5	Image acquise simulée	62
3.6	Courbe d'erreur de déconvolution en fonction du paramètre de régularisation β	63
3.7	Profils de l'image test déconvoluée sans pré-filtrage	64
3.8	Surface d'erreur de la déconvolution en fonction des paramètres de pré-filtrage α et de régularisation β	65
3.9	Profil de l'image test deconvoluée par LLS avec pré-filtrage	66
3.10	Résultats de différentes méthodes de déconvolutions avec et sans pré-filtrage	68
3.11	Tableau de mesures sur les résultats de différentes méthodes de déconvolutions avec et sans pré-filtrage	71
3.12	Effet du pré-filtrage et de la déconvolution sur une image biologique.	72
3.13	Itération du filtrage et de la déconvolution	73
3.14	Image avant et après déconvolution d'un noyau en interphase	74
3.15	Image avant et après déconvolution du spécimen en métaphase	75
4.1	Principe de la méthode de déconvolution Monte-carlo	80
4.2	Principe du recuit	81
4.3	Contrainte sur le voisinage	85
4.4	Réponses impulsionnelles utilisées pour les simulations 1D	87
4.5	Résultats de la déconvolution sur un signal 1D vu par un système à réponse impulsionnelle non-invariante	89
4.6	Résultats de la déconvolution sur un signal 1D vu par un système à réponse impulsionnelle invariante	90
4.7	Evolution de l'erreur quadratique en fonction du nombre d'itérations dans le cas invariant	91
4.8	Evolution de l'erreur quadratique en fonction du nombre d'itérations dans le cas non-invariant	92
4.9	Evolution du pourcentage de modifications acceptées en fonction du nombre d'itérations dans le cas invariant	93
4.10	Evolution du pourcentage de modifications acceptées en fonction du nombre d'itérations dans le cas non-invariant	94
4.11	Résultats de la déconvolution sur une image 2D vu par un système à réponse impulsionnelle invariante	96
4.12	Profils des résultats de déconvolution 2D	96
4.13	Autre exemple de déconvolution 2D	97

4.14	Profils des résultats de déconvolution 2D	98
4.15	Influence sur le spectre de l'image	100
4.16	Application de la déconvolution 3D	102
4.17	Application de la déconvolution 3D	102