



**HAL**  
open science

# Modélisation et estimation du trafic intracellulaire par tomographie de réseaux et microscopie de fluorescence

Thierry Pecot

► **To cite this version:**

Thierry Pecot. Modélisation et estimation du trafic intracellulaire par tomographie de réseaux et microscopie de fluorescence. Interface homme-machine [cs.HC]. Université Rennes 1, 2010. Français. NNT: . tel-00541304

**HAL Id: tel-00541304**

**<https://theses.hal.science/tel-00541304>**

Submitted on 30 Nov 2010

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Traitement du signal et télécommunications*

**Ecole doctorale Mathématiques, Télécommunications,  
Informatique, Signal, Systèmes, Électronique**

présentée par

**Thierry Pécot**

préparée à l'unité de recherche UMR 6074 - IRISA  
Centre INRIA Rennes - Bretagne Atlantique  
Structure et Propriétés de la Matière

---

**MODÉLISATION ET  
ESTIMATION DU TRAFIC  
INTRACELLULAIRE PAR  
TOMOGRAPHIE DE  
RÉSEAUX ET  
MICROSCOPIE DE  
FLUORESCENCE**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 15 mars 2010**

devant le jury composé de :

**Daniel CHOQUET**

Directeur de recherche, CNRS/président du jury

**Bernard CHALMOND**

Professeur, École Normale Supérieure de Cachan/  
rapporteur

**Laure BLANC-FÉRAUD**

Directrice de recherche, CNRS/rapporteur

**Yves USSON**

Chargé de recherche, CNRS/examineur

**Patrick BOUTHEMY**

Directeur de recherche, INRIA/examineur

**Charles KERVRANN**

Chargé de recherche, INRA/directeur de thèse

**Jean SALAMERO**

Directeur de recherche, CNRS/co-directeur de thèse



*“[...] Et si jamais j’échoue, mes enfants prendront la relève.”*

Gordon B.



---

## Remerciements

---

Je souhaite tout d'abord remercier Bernard Chalmond et Laure Blanc-Féraud d'avoir accepté de rapporter cette thèse, et d'y avoir apporté une analyse approfondie et constructive. Je remercie également Yves Usson pour son rôle d'examineur, ainsi que le président du jury, Daniel Choquet.

Je voudrais ensuite remercier Patrick Bouthemy qui commença par encadrer cette thèse, puis la suivit d'un peu plus loin lorsque de nouvelles fonctions lui incombèrent. Cela ne l'a pas empêché de continuer à s'intéresser à mes travaux et à me prodiguer de précieux conseils. Je voudrais également remercier Jean Salamero d'avoir accepté de co-encadrer cette thèse, et surtout de m'avoir introduit dans l'univers de la biologie. Son enthousiasme pour cette discipline a été pour moi une grande motivation tout au long de ces trois années. Enfin, je ne pourrais jamais remercier suffisamment Charles pour son savoir, sa disponibilité, ses conseils et son investissement tout au long de cette thèse. Il ne m'a jamais fait défaut et a représenté un solide appui. Je ne saurais oublier de remercier Jérôme qui initia mon travail de thèse, et eut toujours réponse à mes questions.

Je remercie par la même occasion toutes les personnes que j'ai cotoyées dans l'équipe VISTA et dans les nouvelles équipes FLUMINANCE et SERPICO pour leurs conseils avisés, leur relecture et leur bonne humeur, ainsi qu'à Huguette pour son organisation et son caractère. Je n'oublie pas de remercier les personnes avec qui j'ai travaillé à l'institut Curie, et tout particulièrement Sabine qui a acquis les séquences d'images que j'ai utilisées au cours de cette thèse.

Plus personnellement, je souhaiterais remercier mes amis, ma famille et la musique. Et bien sûr, ma femme qui m'a supporté pendant le long, difficile mais nécessaire travail de rédaction.



---

## Table des matières

---

<b>Introduction générale</b>	<b>7</b>
Contributions . . . . .	10
Organisation du document . . . . .	11
<b>1 Instrumentation, contexte biologique et pré-traitements</b>	<b>13</b>
1.1 Le microscope optique . . . . .	13
1.1.1 Le microscope à champ large . . . . .	13
1.1.2 Le microscope confocal . . . . .	16
1.2 La microscopie de fluorescence . . . . .	17
1.2.1 La protéine fluorescente GFP . . . . .	17
1.2.2 Le photoblanchiment . . . . .	19
1.3 Contexte biologique . . . . .	20
1.3.1 La cellule . . . . .	20
1.3.2 Le trafic intracellulaire . . . . .	21
1.3.3 Le cytosquelette, support du trafic vésiculaire . . . . .	22
1.3.4 La protéine Rab6 . . . . .	22
1.4 Acquisition et pré-traitements . . . . .	26
1.4.1 Instrumentation . . . . .	26
1.4.2 Micro-patrons . . . . .	26
1.4.3 Restauration d'images . . . . .	26
1.4.4 Approximation d'une séquence d'images 3D+T par une séquence 2D+T . . . . .	27
1.4.5 Correction du courant d'obscurité et compensation du photoblanchiment . . . . .	28
1.5 Conclusion . . . . .	29
<b>2 Analyse du trafic intracellulaire</b>	<b>31</b>
2.1 Approche locale : suivi individuel . . . . .	32
2.1.1 Mise en correspondance d'objets intracellulaires en vidéo-microscopie . . . . .	32
2.1.2 Méthodes séquentielles de Monte Carlo et filtrage stochastique pour le suivi d'objets en microscopie de fluorescence . . . . .	38
2.2 Estimation du trafic par approche globale . . . . .	43
2.2.1 Modélisation et estimation du trafic sur des réseaux de télécommunications . . . . .	43
2.3 Conclusion . . . . .	52

<b>3</b>	<b>Simulation du trafic intracellulaire par tomographie de réseaux</b>	<b>55</b>
3.1	Simulation du trafic vésiculaire de la protéine Rab6	56
3.1.1	Approches existantes pour la simulation du trafic vésiculaire	56
3.1.2	Modèle dynamique	57
3.1.3	Modèle photométrique	60
3.1.4	Caractéristiques dynamiques	61
3.1.5	Simulation du trafic vésiculaire	63
3.2	Cycle de la protéine Rab6	66
3.2.1	Diffusion dans le cytosol	67
3.2.2	Représentation de l'appareil de Golgi	70
3.2.3	Cohérence entre les différentes phases du cycle de la protéine Rab6	71
3.3	Simulation de la protéine Rab6	72
3.4	Bilan	77
3.5	Conclusion	78
<b>4</b>	<b>Séparation des composantes “objet” et “fond” en vidéo-microscopie</b>	<b>79</b>
4.1	État de l'art	80
4.1.1	Détection d'objets d'intérêt en vidéo-microscopie	80
4.1.2	Méthodes de séparation des composantes “objet” et “fond” en vidéo-microscopie	84
4.2	Une nouvelle approche : champs aléatoires conditionnels pour la séparation des composantes “objet” et “fond”	88
4.2.1	Modélisation markovienne et analyse d'images	88
4.2.2	Champs aléatoires conditionnels pour la détection en vidéo-microscopie	92
4.2.3	Estimation conjointe des composantes “fond” et “objet”	98
4.2.4	Évaluation en vidéo-microscopie de différentes approches de détection	102
4.3	Comparaison des méthodes de séparation des composantes “objet” et “fond”	109
4.3.1	Évaluation quantitative des différentes méthodes de séparation	109
4.3.2	Évaluation qualitative des différentes méthodes de séparation	111
4.3.3	Synthèse	115
4.4	Conclusion	115
<b>5</b>	<b>Analyse du trafic intracellulaire par tomographie de réseaux</b>	<b>117</b>
5.1	Présentation générale de l'estimation du trafic par tomographie de réseaux	118
5.2	Détection des zones origine-destination	119
5.2.1	Détection des zones de stockage	119
5.2.2	Évaluation des méthodes de détection des zones de stockage	122
5.3	Partitionnement de l'image	124
5.3.1	Partition de Voronoï	127
5.3.2	Partitions d'images et cellules contraintes par micro-patrons	130
5.4	Estimation du nombre de vésicules se déplaçant d'une région à une autre	130
5.5	Estimation de la matrice de routage	136
5.5.1	Définition du coût des arêtes	136
5.5.2	Définition de la matrice de routage	137
5.6	Estimation du trafic sur les paires origine-destination	142
5.6.1	Stratégies d'estimation du trafic sur les paires origine-destination	142
5.6.2	Approche hiérarchique pour l'estimation des paires origine-destination	151
5.7	Bilan	171
5.7.1	Détection de zones origine-destination	171

5.7.2	Analyse du trafic intracellulaire par tomographie de réseaux . . . . .	171
5.8	Conclusion . . . . .	173
	<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>174</b>
	Synthèse des travaux effectués . . . . .	175
	Perspectives . . . . .	176
<b>A</b>	<b>Modélisation du transport routier</b>	<b>179</b>
A.1	Estimation d'une matrice origine-destination . . . . .	180
A.2	Approches de type "trafic" . . . . .	181
A.3	Approches statistiques . . . . .	184
<b>B</b>	<b>Algorithme de coupe minimale-flot maximal</b>	<b>187</b>
B.1	Graphe . . . . .	187
B.2	Coupe . . . . .	187
B.3	Flot . . . . .	188
B.4	Coupe minimale et flot maximal . . . . .	188
B.5	Extraction du flot maximal . . . . .	190
<b>C</b>	<b>Estimation des échanges de fluorescence entre régions voisines</b>	<b>191</b>
C.1	Définition des échanges de fluorescence entre régions voisines . . . . .	191
C.2	Stratégies de résolution . . . . .	192
C.3	Évaluation des stratégies de résolution . . . . .	193
C.4	Modélisation des échanges de fluorescence avec une motivation biologique . . . . .	195
C.5	Évaluation de l'estimation des échanges de fluorescence . . . . .	197
	<b>Notations</b>	<b>208</b>



---

## Introduction générale

---

Les progrès conjoints en biologie moléculaire et en optique ont révolutionné les méthodes d'investigation dans le domaine des sciences du vivant. En particulier, la microscopie optique photonique associée au marquage par fluorescence de molécules d'intérêt permettent d'analyser spatialement et temporellement des processus dynamiques à l'échelle subcellulaire. Cette démarche rend désormais possible la mise en relation de comportements spatio-temporels (phénotypes) observés à l'intérieur de la cellule, avec des altérations contrôlées du génome. À ce titre, l'imagerie biologique occupe une place prépondérante en biologie cellulaire, se positionnant au croisement de différentes disciplines : la biologie, l'optique, l'électronique, l'analyse d'images et les mathématiques appliquées. Cette pluridisciplinarité nécessite une grande ouverture d'esprit afin de comprendre les enjeux des autres disciplines, et de communiquer entre personnes issues d'horizons différents. La synergie de ces disciplines et de ces technologies propose par ailleurs de nombreux défis en analyse d'images.

L'analyse de comportements spatio-temporels est généralement effectuée par des méthodes de suivi et d'estimation de dynamiques en imagerie biologique. Ces méthodes permettent d'extraire les coordonnées spatiales d'objets d'intérêt en mouvement au cours du temps dans une séquence d'images. Les coordonnées spatiales sont ensuite exploitées pour mesurer des caractéristiques plus précises, telles que la vitesse ou l'orientation des objets au cours de leur trajectoire. Cependant, à mesure que le nombre d'objets augmente et/ou que le comportement collectif de ces objets se complexifie, il devient de plus en plus difficile de les suivre individuellement. Si le but est d'analyser le trafic intracellulaire décrit par quelques objets en mouvement, les méthodes de suivi sont capables d'extraire un nombre limité de trajectoires ou fractions de trajectoires. Ceci permet de caractériser par exemple la vitesse de ces objets à l'intérieur de la cellule. En revanche, les méthodes en question ne permettent pas toujours d'extraire les trajectoires complètes, notamment à cause des phénomènes suivants :

- distance parcourue trop importante entre deux instants consécutifs,
- fusion d'objets,
- division d'objets,
- croisements des trajectoires,
- densité trop grande d'objets,
- ...

Afin de contourner ces problèmes très difficiles à traiter, nous avons considéré le problème d'analyse de trafic de manière globale. Au lieu de chercher à suivre individuellement chaque objet d'intérêt, notre approche tente plutôt d'établir des statistiques de comptage sur le nombre de passages de ces objets

en certains points précis de la cellule, selon une analogie avec des véhicules franchissant des points de contrôle. En combinant ces statistiques de comptages avec une procédure de routage, les trajectoires globales des objets sont ensuite établies. Cette approche globale du trafic a été développée précédemment dans le domaine des réseaux de télécommunications sous le nom de tomographie de réseaux. Le but est d'estimer les origines, les destinations et les volumes de paquets de données transitant sur des réseaux de télécommunications, tels que le réseau Internet. Une méthode similaire a été développée bien auparavant pour estimer le trafic routier sur des réseaux routiers relativement denses, tels que ceux des grandes villes. L'objectif principal de cette thèse est de développer une méthode issue des travaux en tomographie de réseaux qui permette d'analyser de manière globale le trafic membranaire intracellulaire de molécules particulières telles que des protéines de la famille des RabGTPases. Nous nous intéresserons au cas particulier de la protéine Rab6 impliquée dans la communication entre l'appareil de Golgi et le reticulum endoplasmique. Dans ce document, nous désignons par *vidéo-microscopie* la microscopie de fluorescence *in vivo* qui permet d'observer des événements dynamiques à l'échelle de la cellule.

## Contributions

Pour analyser le trafic intracellulaire de manière globale, nous proposons deux contributions majeures en analyse d'images et en modélisation de contenus dynamiques en vidéo-microscopie.

### 1) Adaptation de la tomographie de réseaux à l'analyse du trafic vésiculaire de la protéine Rab6

*Modélisation du trafic intracellulaire de la protéine Rab6.* Quand le fonctionnement d'une entité biologique est connu, la modélisation au cours du temps de cette entité est assez aisée. Mais les mécanismes qui régulent le fonctionnement des RabGTPases telles que la protéine Rab6 sont loin d'être complètement établis. Nous proposons d'exploiter la tomographie de réseaux pour simuler le trafic vésiculaire de cette protéine. Cette modélisation originale permet de simuler le trafic de manière globale. Pour simuler les autres étapes du cycle de la protéine Rab6, c'est-à-dire les phases de diffusion dans le cytosol et d'ancrage à l'appareil de Golgi, nous utilisons tous les comportements dynamiques et caractéristiques physiques connus de cette protéine. Pour le reste, nous nous sommes efforcés de mimer ce qui est observé sur les séquences d'images réelles. À terme, notre étude s'inscrit dans le développement d'un modèle cellulaire *in silico* du trafic membranaire.

*Estimation du trafic vésiculaire de la protéine Rab6.* L'exploitation de la tomographie de réseaux pour l'estimation du trafic vésiculaire est certainement notre contribution la plus originale. Dans ce cadre, l'analyse du trafic est obtenue par le comptage local des vésicules et la mise en oeuvre d'une procédure de routage. Cette méthode nécessite de traiter un certain nombre de tâches avant d'être mise en oeuvre (définition d'un graphe, comptage des vésicules, modélisation d'une procédure de routage). L'avantage de cette méthode est double : i) elle est capable de traiter des séquences d'images pour lesquelles le trafic est difficile à caractériser ; ii) le trafic estimé correspond au régime permanent du trafic observé.

### 2) Séparation des composantes "objet" et "fond" en vidéo-microscopie

L'adaptation de la tomographie de réseaux à l'analyse du trafic vésiculaire exige le comptage local des objets d'intérêt. Cette opération est souvent associée à la détection spatio-temporelle de ces objets. Elle peut aussi coïncider avec une opération de séparation des composantes "objet" et "fond", suivie d'une analyse des échanges entre différentes régions au sein de la composante "objet". Nous proposons

ici une modélisation originale de la séquence temporelle d'images dans le but de séparer ces deux composantes. Dans une première phase, une détection reposant sur les fortes variations d'intensité est effectuée. Ensuite, les régions détectées sont interpolées afin de définir une composante "fond". L'estimation jointe des régions détectées et de la composante "fond" améliore les résultats de manière significative.

## Organisation du document

Le contexte biologique et quelques éléments introductifs en microscopie optique sont présentés dans le chapitre 1. Le document est par ailleurs organisé en quatre chapitres.

### Chapitre 2 : Analyse du trafic intracellulaire

Le second chapitre dresse dans une première partie un panorama des algorithmes de suivi utilisés en microscopie de fluorescence. Ces algorithmes peuvent être classés en deux catégories. La première catégorie d'approche dite *connexionniste* repose sur une détection des objets d'intérêt sur une séquence d'images, suivie d'une mise en correspondance des détections d'une image à l'autre. La deuxième catégorie d'approche exploite les méthodes séquentielles de filtrage stochastique, les méthodes de Monte Carlo et les méthodes particulières. Ces méthodologies incluent dans un même cadre de modélisation la détection et la mise en correspondance. Dans une deuxième partie, nous dressons un état de l'art des approches globales pour l'estimation du trafic sur des réseaux de télécommunications.

### Chapitre 3 : Simulation du trafic intracellulaire par tomographie de réseaux

Le troisième chapitre est consacré à la description et la modélisation du trafic de la protéine Rab6. Il débute par la caractérisation du trafic vésiculaire en cohérence avec les principes généraux de la tomographie de réseaux. Il est complété par une description des autres états de cette protéine. Enfin, une modélisation complète du cycle de la protéine Rab6 à l'intérieur de la cellule est proposée.

### Chapitre 4 : Séparation des composantes "objet" et "fond" en vidéo-microscopie

Le quatrième chapitre est dédié à la séparation des composantes "objet" et "fond" sur des séquences de vidéo-microscopie de fluorescence. L'estimation du trafic par tomographie de réseaux nécessite en effet de compter le nombre de vésicules en certains lieux choisis de la cellule. Cette opération exige soit une détection des vésicules, soit une séparation des composantes "objet" et "fond", suivie de l'exploitation des fluctuations d'intensité entre régions. Dans la première partie de ce chapitre, une revue des méthodes de détection et de séparation déjà existantes en microscopie de fluorescence est proposée. Ensuite, notre méthode de séparation des composantes est décrite et évaluée pour résoudre un problème de détection. Dans la dernière partie de ce chapitre, la séparation obtenue est comparée à d'autres approches utilisées en vidéo-microscopie.

### Chapitre 5 : Estimation du trafic intracellulaire par tomographie de réseaux

Le cinquième et dernier chapitre est consacré à l'estimation du trafic intracellulaire par tomographie de réseaux. Tout d'abord, nous présentons une méthode de détection des régions d'origine et de destination des vésicules sur des séquences d'images de vidéo-microscopie. Cette détection permet ensuite de partitionner l'image en fonction des lieux détectés d'origine et de destination des vésicules. La partition de l'image peut aussi être définie de manière identique pour un ensemble de cellules, afin de pouvoir comparer les résultats entre eux. Nous proposons ensuite une méthode d'estimation du nombre de vésicules franchissant chaque frontière entre deux régions voisines en opérant un comptage grâce à un

suivi local. Nous exposons également différentes procédures de routage. Enfin, nous décrivons plusieurs stratégies d'estimation du trafic, ainsi qu'une approche hiérarchique. La fin du chapitre est consacrée à l'évaluation de notre méthode d'analyse du trafic.

Avant d'aborder ces différents chapitres, nous commençons par exposer le contexte biologique de notre étude, ainsi que l'instrumentation utilisée pour les acquisitions, et les pré-traitements nécessaires avant la mise en oeuvre de nos méthodes et de nos modélisations.

---

## Instrumentation, contexte biologique et pré-traitements

---

Le travail effectué durant cette thèse avait pour but de développer des méthodes d'analyse d'images adaptées au traitement de séquences d'images de microscopie de fluorescence dans un contexte biologique. Avant de détailler les méthodes développées, il nous paraît indispensable de décrire le contexte biologique et de positionner ces méthodes d'analyse pour la problématique posée. Dans ce chapitre, nous décrivons succinctement les éléments nécessaires à la bonne compréhension du manuscrit. Nous commençons par rappeler les principes généraux des microscopes optiques à champ large et confocaux multipoints ("spinning disk"). Nous abordons ensuite le marquage par fluorescence d'objets biologiques. Puis nous présentons la problématique biologique. Enfin, nous décrivons les techniques de pré-traitement que nous appliquons aux séquences de microscopie de fluorescence afin d'en faciliter l'analyse.

### 1.1 Le microscope optique

Les premiers microscopes optiques ont vu le jour au début du XVII<sup>ème</sup> siècle. Leur invention a été revendiquée par les Hollandais Hans Janssen et son fils Zacharias, mais Galilée les a peut-être devancés. La capacité des microscopes à grossir l'image d'un objet de petite dimension a attiré l'attention des biologistes dès le XVII<sup>ème</sup> siècle.

#### 1.1.1 Le microscope à champ large

Les premiers microscopes optiques s'appuyaient sur l'utilisation de deux lentilles (microscopes à champ large).

#### Principe du microscope à champ large

Le principe du microscope à champ large réside dans l'utilisation de deux lentilles convergentes appelées *objectif* et *oculaire*. Ces deux lentilles forment une image agrandie de l'objet observé. Cette opération est illustrée sur la figure 1.1. Dans cet exemple, l'objet AB observé est situé au-delà de la distance focale de l'objectif, ce qui donne une image A'B' renversée et agrandie. L'oculaire est positionné de sorte que A'B' soit dans son plan focal. Ainsi, l'oeil observe une image à l'infini, ce qui permet aux muscles chargés de l'accommodation d'être relâchés et facilite le confort visuel.

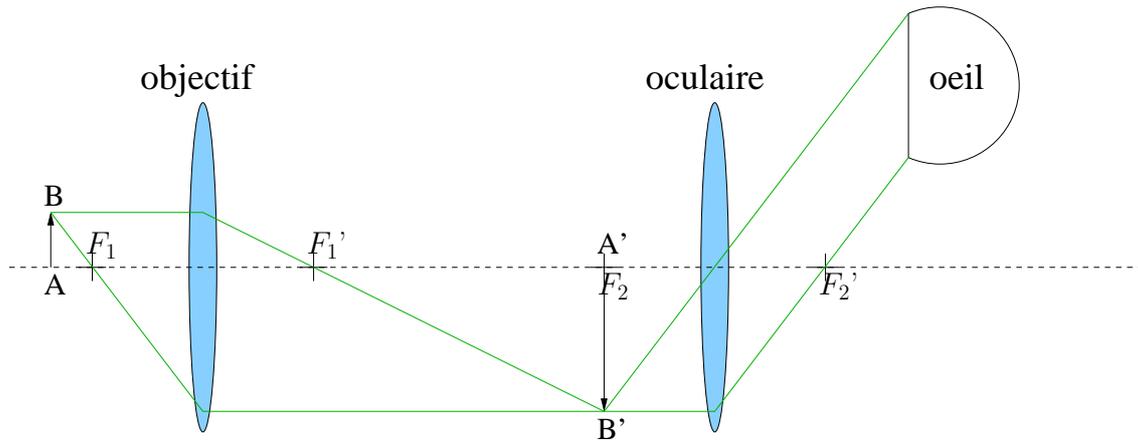


FIGURE 1.1: Grossissement d'un objet réel par l'utilisation de deux lentilles convergentes.

En plus des deux lentilles, un microscope utilise une source de lumière pour éclairer l'échantillon observé. Afin de réaliser des acquisitions numériques, l'oculaire est remplacé par un appareil photographique numérique, une caméra vidéo ou un photomultiplicateur. De plus, il est possible de faire des acquisitions à différentes coupes de l'échantillon, et d'automatiser cette opération par l'utilisation par exemple d'un quartz piézoélectrique. Ainsi, un objet est observable avec un microscope dans les trois dimensions spatiales et dans le temps.

### Résolution d'un microscope optique à champ large

La résolution d'un microscope est définie par sa capacité à séparer des structures très proches. Elle ne dépend pas de l'optique géométrique, mais seulement de l'optique ondulatoire. Du fait de la diffraction de la lumière, l'image d'un point de l'objet observé n'est pas un point dans l'image obtenue, mais une figure de diffraction appelée tâche d'Airy, du nom de George Biddell Airy. L'effet de la diffraction de la lumière sur la distribution d'intensité acquise est illustré sur la figure 1.2 (a). Si deux structures sont très proches dans l'échantillon observé, l'étalement de leur intensité dans le plan image entraîne leur fusion dans l'image observée (figure 1.2 (b)). En fait, la diffraction de la lumière entraîne un *floutage* car toutes les structures observées ne se situent pas dans le plan focal. En d'autres termes, l'image d'une structure appartenant à l'objet observé est toujours floutée par la contribution des structures voisines qui ne se situent pas dans le plan focal. Si l'objet observé était parfaitement plat, ce problème serait résolu. Mais ce n'est évidemment jamais le cas en pratique.

Selon la théorie d'Abbe, la limite de résolution axiale  $d$  d'un microscope, c'est-à-dire la plus petite distance en-dessous de laquelle deux points voisins ne sont plus distingués s'exprime en fonction de la longueur d'onde d'illumination  $\lambda$ , de l'indice de réfraction  $n$  en sortie d'objectif, et du demi-angle du cône de lumière accessible  $\alpha$  :

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin(\alpha)}. \quad (1.1)$$

On appelle *ouverture numérique* d'un objectif le produit  $n \sin(\alpha)$ . La résolution peut être augmentée simplement de trois façons différentes. La première consiste à augmenter l'indice de réfraction, ce qui est possible en immergeant la frontale de l'objectif dans un liquide dont l'indice de réfraction est grand (l'huile à immersion possède un indice de réfraction égal à 1,515). La seconde consiste à diminuer la longueur d'onde. La lumière visible présente des longueurs d'onde comprises entre 400 nm et 700 nm, la limite se situe donc dans le violet (aux alentours de 400 nm). La troisième consiste à modifier l'angle  $\alpha$

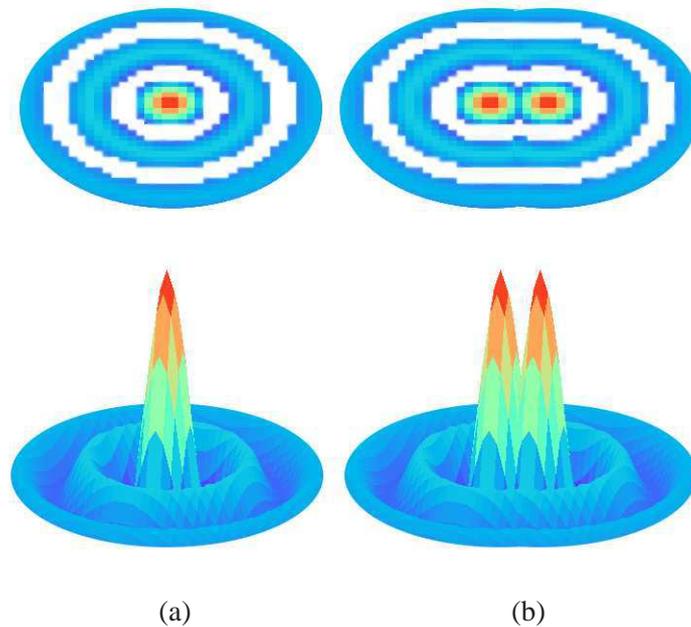


FIGURE 1.2: Illustration de l'effet de la diffraction de la lumière. Première ligne : projection de la distribution de l'intensité dans le plan image; deuxième ligne : distribution de l'intensité en trois dimensions; (a) effet de la diffraction de la lumière sur l'acquisition d'un point; (b) effet de la diffraction de la lumière sur l'acquisition de deux points proches.

de la lumière accessible. À la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, Köhler proposa dans ce but un système d'éclairage qui reste à ce jour le plus utilisé. La lumière possède deux structures différentes menant à deux types d'éclairage opposés : le premier est appelé *cohérent* (les rayons de la lumière sont parallèles) et le second est appelé *incohérent* (pas de parallélisme des rayons). L'éclairage parfait qui restitue au mieux les détails est l'éclairage totalement incohérent. Dans ce cas, le pouvoir séparateur est maximal et le nombre d'artefacts est minimal. En revanche, l'image ne présente ni contraste, ni profondeur de champ. À l'inverse, davantage d'éclairage cohérent permet de contraster l'image. Mais aussi, plus la profondeur de champ augmente, plus la résolution diminue et plus le nombre d'artefacts augmente. Dans l'éclairage de Köhler, un diaphragme est ajouté juste après la source de lumière. Le diaphragme permet de limiter la quantité de lumière utilisée pour éclairer l'échantillon, et donc de contrôler le degré de cohérence de la lumière.

Pour améliorer la résolution d'un microscope, il est possible de corriger l'effet de diffraction par des méthodes numériques, appelées méthodes de déconvolution.

### La déconvolution

Le *floutage* consécutif au phénomène de diffraction de la lumière n'est pas dû à des processus aléatoires. Il peut être relativement bien défini par les propriétés optiques de la formation d'une image dans un système de microscopie. La tâche d'Airy correspond à l'image obtenue quand un point seul est acquis (figure 1.2 (a)). Cette tâche résulte de la convolution du point initial avec la fonction d'étalement d'un point appelée PSF ("Point Spread Function") du microscope utilisé. Le but de la déconvolution est d'estimer les objets imagés à partir de l'observation faite au microscope en utilisant la PSF du microscope. C'est un problème inverse qui a été, et continue d'être largement étudié (Chalmond 1991, Goldenshuger 1999, Sibarita, Magnin & De Mey 2002, Dey, Blanc-Féraud, Zimmer,

Kam, Roux, Olivo-Marin & Zerubia 2006, Pankajashkan, Zhang, Blanc-Féraud, Kam, Olivo-Marin & Zerubia 2009). D'autres techniques de microscopie photonique permettent de dépasser la limite de résolution définie par Abbe.

### Méthodes de super-résolution

Parmi les méthodes de super-résolution, on peut citer les techniques d'illumination structurée ((Lukosz 1961), Structured Illumination Microscopy (SIM) (Gustafsson, Shao, Carlton, Wang, Golubovskaya, Agard & Sedat 2008)), celles qui tirent profit des ondes évanescentes (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM) (Axelrod 1981)), ou encore celles utilisant la localisation successive de molécules individuelles (Photo-Activated Localization Microscopy (PALM) (Betzig, Patterson, Sougrat, Lindwasser, Olenych, Bonifacino, Davidson, Lippincott-Schwartz & Hess 2006) et STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) (Rust, Bates & Zhuang 2006)). Il est également possible de dépasser la limite de résolution définie par Abbe en évitant l'acquisition des faisceaux situés hors du plan focal.

#### 1.1.2 Le microscope confocal

Un microscope confocal est un microscope optique qui a la particularité de permettre l'acquisition d'images de très faible profondeur de champ. Le principe du microscope confocal a été décrit par Minsky en 1953, mais les premiers modèles commerciaux ne sont apparus qu'à partir de la fin des années 80.

#### Principe du microscope confocal

Le mot confocal est issu de la combinaison des mots *conjugaison* et *focal*. Le principe de ce microscope consiste à utiliser deux *trous d'aiguille*, un pour l'éclairage et un pour la détection de la lumière émise par l'objet. La confocalité revient à positionner les deux *trous d'aiguille* (*conjuguer*) sur le même plan focal. Cette opération a pour conséquence de bloquer le passage des faisceaux hors plan focal, et de limiter ainsi les effets dus à la diffraction de la lumière. Ceci est illustré sur la figure 1.3. Le *trou d'aiguille* a une ouverture correspondant à la première tâche d'Airy. Cette détection du plan focal n'est possible que pour l'acquisition d'un point unique. Pour l'acquisition d'une image entière, il faut effectuer un balayage du laser sur l'ensemble du plan. Le balayage du champ observé par le laser se fait à l'aide de deux miroirs orthogonaux galvanométriques très rapides. La microscopie confocale permet d'atteindre une résolution environ égale à 150 nm.

Malheureusement, le fait de n'avoir qu'une seule source d'illumination et de devoir balayer toute l'image point par point nécessite un temps d'acquisition important.

#### Microscope "spinning disk"

Bien avant l'avènement de la microscopie confocale, Paul Nipkow inventa en 1884 un appareil qui transmettait des images, un principe utilisé plus tard dans les premières caméras de télévision. Cet appareil utilisait un disque rotatif sur lequel des trous disposés en spirale transformaient l'information bidimensionnelle en une série séquentielle de signaux. Ces signaux pouvaient ensuite être traduits en images en réutilisant un disque présentant la même disposition de trous. Le microscope "spinning disk" est basé sur ce même principe. Le *trou d'aiguille* placé juste après l'échantillon imagé est remplacé par un disque rotatif sur lequel de nombreux *trous d'aiguilles* sont disposés, de telle sorte que l'ensemble de l'échantillon est parcouru quand le disque tourne. Lors de l'acquisition, les rayons lumineux passant à travers les trous couvrent l'image entière grâce à la rotation du disque. Ce dispositif permet une acquisition d'images plus rapide que celle obtenue avec un microscope confocal classique.

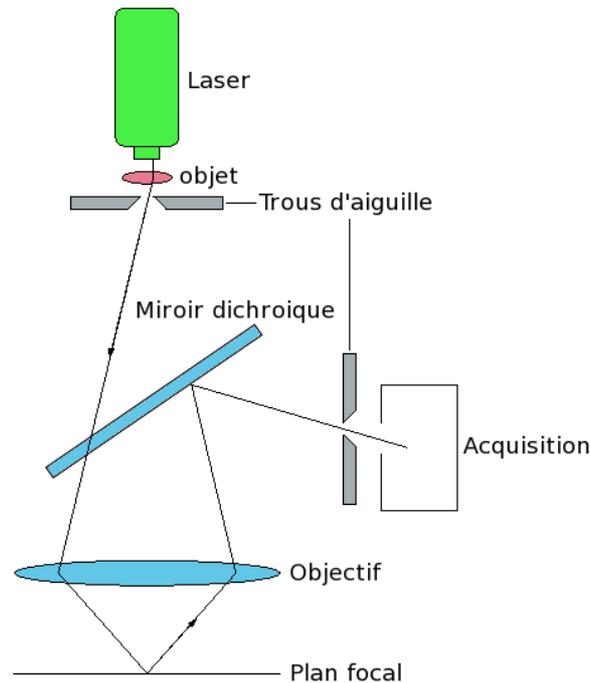


FIGURE 1.3: Utilisation des trous d'aiguille dans le microscope confocal.

## 1.2 La microscopie de fluorescence

La microscopie de fluorescence peut être utilisée pour *marquer* par fluorescence une protéine, puis suivre les différents processus biologiques et chimiques associés à cette protéine à l'intérieur de la cellule. Une cellule est constituée de protéines, d'acides gras, de glucides et autres molécules dont l'observation nécessite souvent une résolution inférieure à celle proposée par un microscope optique classique. En fusionnant le gène d'une protéine fluorescente à une protéine d'intérêt, il est possible de suivre le comportement, le mouvement et les interactions de cette protéine avec son environnement, même si la résolution du microscope n'est pas suffisante pour l'observer précisément. La protéine fluorescente la plus célèbre et qui a valu le prix nobel de Chimie 2008 à Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Tsien est la protéine fluorescente verte appelée GFP ("Green Fluorescent Protein") (Salamero 2008).

### 1.2.1 La protéine fluorescente GFP

À son arrivée aux États-Unis, Osamu Shimomura s'intéresse à la bioluminescence de *Aequora victoria*, une méduse qui vit aux abords de la côte pacifique d'Amérique du Nord. Cette méduse produit une luminescence verte à partir de petits photo-organes présents dans l'anneau de son ombrelle. C'est lors de la production et de la purification à grande échelle qu'Osamu Shimomura co-purifia en 1961 la GFP. Il découvre que pour effectuer de la bioluminescence, *Aequora* relargue des ions calcium. Ceux-ci se lient sur une protéine appelée aequorine, laquelle, en retour, va émettre une lumière bleue. Shimomura découvre ensuite que la future GFP se met à briller dans le vert sous les UV. C'est donc la lumière bleue émise localement et chimiquement par l'aequorine après liaison du calcium qui est absorbée par la GFP, laquelle en retour émet par fluorescence une lumière verte, un mécanisme décrit par Morin & Hastings (1971). Sans aller aussi loin dans la description de ce mécanisme, Shimomura, Johnson & Saiga (1962) montrent que la GFP possède un fluorophore particulier qui absorbe et émet de la lumière. Ainsi, quand

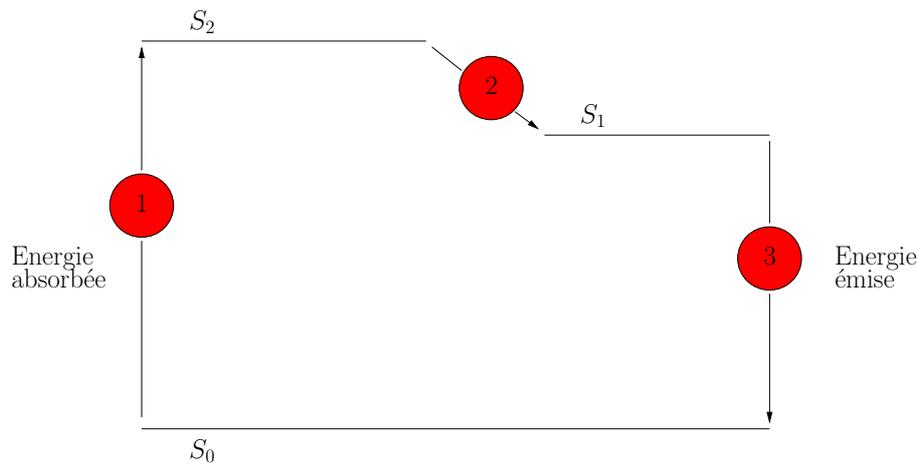


FIGURE 1.4: Principe de l'émission lumineuse d'un fluorophore ; 1) l'énergie d'excitation absorbée par le fluorophore crée un état excité  $S_2$  ; 2) une partie de l'énergie est échangée via des interactions avec le milieu et le niveau d'excitation diminue pour atteindre  $S_1$  ; 3) un photon est émis par le fluorophore qui retourne dans son état fondamental  $S_0$ .

la GFP est soumise à une lumière bleue, le fluorophore de la GFP passe dans un état excité du fait de l'absorption de cette énergie lumineuse. Il restitue ensuite cette énergie en émettant un photon afin de revenir à son état fondamental. Cette désexcitation coïncide avec la longueur d'onde du vert. Le principe de l'émission lumineuse d'un fluorophore est illustré sur la figure 1.4. Pour qu'un fluorophore passe de l'état fondamental à un état excité, il faut qu'il reçoive une quantité d'énergie équivalente à la différence entre ces deux niveaux. Pour une molécule complexe comme une protéine, les niveaux  $S_0$  et  $S_2$  sont multiples, et il y a des pertes lors du retour d'un état excité  $S_2$  à un état excité  $S_1$ . En conséquence, l'énergie d'émission est toujours plus faible que l'énergie d'excitation, et la longueur d'onde de la lumière d'émission est toujours plus élevée que celle de la lumière d'excitation.

S'il est possible d'associer la GFP à n'importe quel élément protéique de la cellule, alors la GFP devient une sorte de balise pour la molécule étudiée qui devient observable dans l'espace et dans le temps. Même si la molécule étudiée présente une résolution inférieure à celle du microscope, son aspect fluorescent va permettre de la suivre à l'intérieur de la cellule. C'est dans ce sens que Douglas Prasher isole le gène codant de la GFP (Prasher, Eckenrode, Ward, Prendergast & Cormier 1992). Il partage ensuite ses découvertes avec Martin Chalfie et Roger Y. Tsien. Pour obtenir des protéines fluorescentes, le principe consiste à attacher le gène codant pour la GFP à celui codant pour la protéine que l'on souhaite voir devenir fluorescente. En 1994, Chalfie et son équipe injectent le gène de la GFP au niveau des neurones impliqués dans la perception tactile du ver "C. Elegans" (Chalfie, Tu, Euskirchen, Ward & Prasher 1994).

L'étape suivante est la stabilisation de la GFP, ainsi que sa déclinaison en variantes de propriétés physico-chimiques diverses. C'est avec cet objectif que Roger Y. Tsien développe des GFP capables d'émettre plus longtemps, plus intensément, et à des longueurs d'onde différentes. Il devient possible, par exemple, de marquer simultanément plusieurs protéines avec différentes GFP, et de les suivre en même temps à l'intérieur de la cellule. Cette innovation facilite l'étude des interactions entre protéines. Par des échanges astucieux des différents acides aminés de la GFP, Tsien et son équipe parviennent à créer des variantes de la GFP émettant dans différentes teintes de bleu et de jaune (Tsien 1998). Ils mettent ensuite au point d'autres protéines de type GFP à partir de l'étude de coraux fluorescents : mPlum, mCherry, mStrawberry, mOrange et mCitrine. De nombreuses équipes de recherche ont considérablement augmenté la palette de teintes des protéines fluorescentes. Les longueurs d'onde d'excitation et

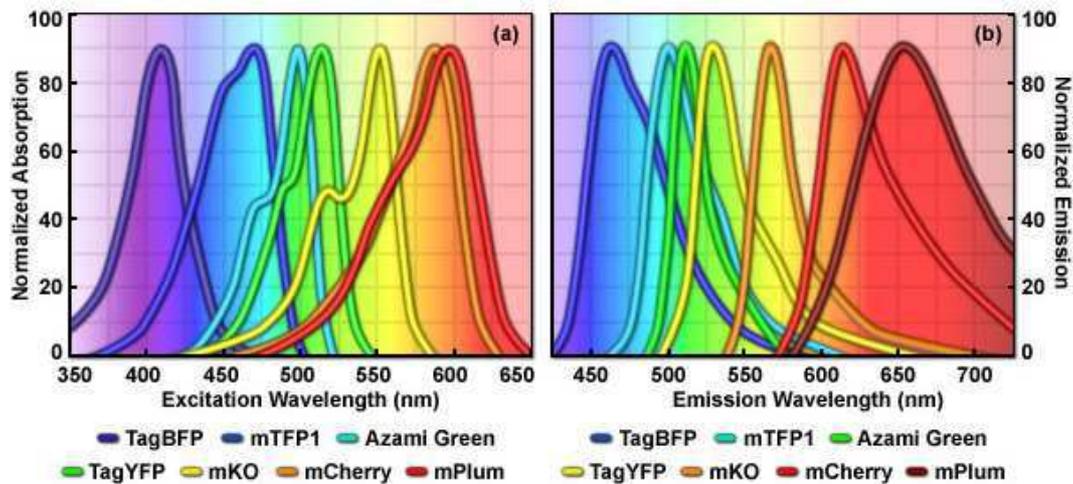


FIGURE 1.5: Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission pour différents fluorophores (image extraite d'un cours sur la fluorescence réalisé par la société Zeiss).

d'émission pour différents fluorophores sont présentées sur la figure 1.5.

### 1.2.2 Le photoblanchiment

Lorsqu'un fluorophore est à l'état excité ( $S_2$  sur la figure 1.4), il intervient dans des réactions chimiques avec une probabilité non nulle, en particulier avec l'oxygène sous forme de radicaux libres. Il perd alors ses propriétés de fluorescence. Ainsi, quand une solution de molécules fluorescentes est excitée, une certaine proportion d'entre elles est annihilée à chaque excitation. Par conséquent, l'intensité totale de la fluorescence dans une séquence d'images décroît au cours du temps. Ce phénomène est appelé *photoblanchiment*. Les temps caractéristiques de chaque molécule fluorescente pour passer de l'état excité  $S_2$  à un état inactif (photoblanchi) suivent une caractéristique exponentielle. Ces temps dépendent des caractéristiques moléculaires et de la puissance de la source lumineuse (Garcia-Parajo, Segers-Nolten, Veerman, Greve & van Hulst 2000). À cause du photoblanchiment, le nombre d'images acquises est limité. Il faut donc rechercher le meilleur compromis échantillonnage temporel/horizon temporel de la séquence d'images acquise.

En présence d'une lumière de très forte intensité, les fluorophores sont *éteints* de manière irréversible. Cette réaction est utilisée pour des manipulations de retour de fluorescence après photoblanchiment appelées FRAP ("Fluorescence Recovery After Photobleaching"). L'idée est d'*éteindre* la fluorescence dans une certaine région de l'image, et d'étudier le retour de fluorescence dans cette même région. Si les protéines marquées par fluorescence dans l'expérimentation coïncident avec une diffusion à l'intérieur de la cellule, cette manipulation permet de calculer la constante de diffusion associée. La microscopie du temps de vie de la fluorescence appelée FLIM ("Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy") est une autre modalité qui tire aussi profit du phénomène de photoblanchiment. Cette technique produit une image de la cartographie du temps de vie des fluorophores dans leur état excité. Une variation du temps de vie peut témoigner d'une variation de la concentration en ions, d'une variation du pH ou du passage d'énergie d'un fluorophore vers une autre molécule. Le transfert d'énergie par résonance Förster appelée FRET ("Förster Resonance Energy Transfer") est le passage d'une quantité d'énergie entre deux molécules proches. Le couplage FLIM-FRET permet de colocaliser deux marqueurs différents, voire de mesurer une interaction en un endroit précis.

## 1.3 Contexte biologique

Avant d'aborder le contexte biologique précis de notre étude, à savoir le trafic intracellulaire, et plus particulièrement celui des protéines de la famille des RabGTPases, nous évoquons quelques éléments fondamentaux et quelques dates historiques en biologie cellulaire.

### 1.3.1 La cellule

En 1665, Robert Hooke observe des cellules mortes dans du liège, et leur donne le nom de cellule, par analogie aux cellules d'un monastère. Il observera par la suite des cellules dans des plantes vivantes en utilisant les premiers microscopes. En 1839, Theodor Schwann découvre que les plantes et les animaux sont tous constitués de cellules. C'est le premier axiome de la théorie cellulaire. En 1855, Virchow suggère que toute cellule provient d'une autre cellule, ce qui constitue le second axiome de la théorie cellulaire. En démontrant que la théorie de la génération spontanée (une forme de vie peut apparaître spontanément) est erronée en 1861, Pasteur démontre ce second axiome. La théorie cellulaire moderne est définie par les cinq points suivants :

- tout être vivant est composé d'une ou de plusieurs cellules,
- toute cellule provient d'une autre cellule (principe de la division cellulaire),
- la cellule est une unité vivante et l'unité de base du vivant,
- il y a individualité cellulaire,
- la cellule contient l'information sous forme d'acide désoxyribonucléique (ADN) nécessaire à son fonctionnement et à sa reproduction.

Plus brièvement, la cellule est l'unité structurale, l'unité fonctionnelle et l'unité reproductrice.

La cellule est un espace clos délimité par la membrane plasmique, qui est constituée d'une bi-couche lipidique. Loin d'être hermétique, la membrane plasmique est le lieu d'échanges (molécules, lumière, chaleur, informations) entre cellules. L'intérieur de la cellule est hautement organisé et divisé en organelles aux fonctionnalités propres. Il existe deux types de cellules : les cellules eucaryotes (plantes et animaux) et les cellules procaryotes (bactéries). La compartimentation de la cellule en organelles est particulièrement importante dans le cas des eucaryotes. On identifie une vingtaine d'organelles dans la cellule animale, contenant leur lot d'enzymes spécifiques et de molécules spécialisées. Divers mécanismes permettent d'acheminer les molécules d'un organelle à l'autre. Pour comprendre l'organisation globale de la cellule eucaryote, il est essentiel de connaître ce qui se passe dans chaque organelle. Dans la cellule eucaryote animale, illustrée sur la figure 1.6, nous dénombrons plus particulièrement les organelles suivants :

- *Noyau* : il contient la plupart du matériel génétique de la cellule. Il a deux fonctions principales : il contient l'ADN, support de l'information génétique héréditaire, et permet la synthèse des protéines par l'intermédiaire de l'ARN (ARN messenger). Son diamètre varie de 10 à 20  $\mu\text{m}$ , ce qui fait de lui le plus grand des organites.
- *Reticulum Endoplasmique* : il est constitué d'un ensemble de replis et de tubules membranaires, dont certains sont en continuité avec l'enveloppe nucléaire. Une partie du reticulum endoplasmique est couverte de ribosomes (reticulum endoplasmique rugueux) qui assemblent les acides aminés en protéines suivant l'information venue du noyau. L'autre partie est appelée reticulum endoplasmique lisse. Le reticulum endoplasmique assure de multiples fonctions à l'intérieur de la cellule, et est notamment impliqué dans le transport des protéines.
- *Appareil de Golgi* : il est constitué d'un empilement de saccules membranaires de forme discoïdale. L'appareil de Golgi est le point de passage obligé et régulateur du trafic vésiculaire.
- *Mitochondries* : elles représentent les centrales énergétiques de la cellule.

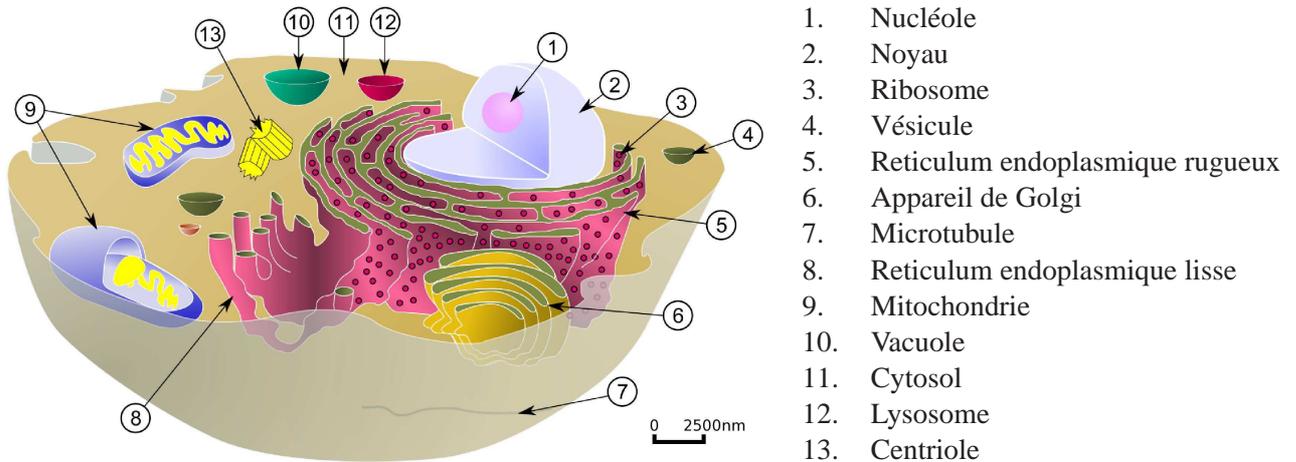


FIGURE 1.6: La cellule eucaryote animale (figure extraite de l'encyclopédie numérique Wikipedia).

- **Vésicules de transport** : ces petits compartiments séparés du cytosol par au moins une bi-couche lipidique (comme la membrane plasmique) circulent dans le cytosol et peuvent stocker, transporter ou encore digérer des produits et déchets cellulaires.
- **Cytosquelette** : il constitue un ensemble organisé de polymères biologiques qui confèrent à la cellule l'essentiel de ses propriétés mécaniques. Toutes les composantes du cytosquelette sont renouvelées en permanence par polymérisation. Le cytosquelette est à l'origine de la plupart des forces exercées par la cellule pour se déplacer et se nourrir. Les polymères du cytosquelette sont classés en trois grandes catégories : les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules.

Les protéines jouent un grand rôle dans cette compartimentation. Elles catalysent les réactions dans chaque compartiment, trient, importent, ou exportent sélectivement des molécules *cargo* à l'intérieur ou vers les autres compartiments. La cellule de mammifère contient environ 10 milliards de protéines de 10000 sortes. Leur synthèse débute généralement dans le cytosol, l'espace commun qui entoure les compartiments. Chaque nouvelle protéine synthétisée est délivrée spécifiquement au compartiment cellulaire où elle doit assurer sa fonction. L'analyse du trafic intracellulaire des protéines permet de comprendre le fonctionnement des divers compartiments intracellulaires ainsi que les relations qui les lient.

### 1.3.2 Le trafic intracellulaire

Le transport intracellulaire est une fonction essentielle de la cellule eucaryote, et l'étude de ses mécanismes est l'un des domaines les plus actifs de la recherche en biologie cellulaire.

Le paradigme du transport intracellulaire est établi en 1975 par Palade (1975). Prenant pour modèle la cellule exocrine du pancréas, il postule que la protéine synthétisée dans le cytosol au niveau des ribosomes est transportée dans le reticulum endoplasmique, puis parcourt successivement plusieurs compartiments membranaires. Elle pénètre d'abord dans le reticulum endoplasmique rugueux, puis atteint l'appareil de Golgi. À sa sortie, elle est concentrée dans des granules entourés d'une membrane lisse, qui libèrent ensuite leur contenu à l'extérieur de la cellule par un processus complexe décrit sous le terme d'exocytose. La membrane entre en contact avec la face cytosolique de la membrane plasmique. La fusion ponctuelle des deux membranes permet la libération du contenu dans le milieu extracellulaire. Ce concept du transport intracellulaire des protéines reposait sur des bases expérimentales apportées par l'autoradiographie à haute résolution qui permet de localiser, en microscopie électronique, les protéines ayant incorporé un acide aminé radioactif et de suivre leur trajet intracellulaire en fonction du temps

écoulé depuis leur synthèse. En revanche, les mécanismes mis en jeu au cours de ce transport étaient purement hypothétiques. Palade émet l'hypothèse selon laquelle les compartiments cellulaires communiquent entre eux de façon intermittente par l'intermédiaire d'une *navette* de vésicules. Ce phénomène implique quatre étapes : la formation d'un bourgeon à partir d'un compartiment *donneur*, la fission du bourgeon en une vésicule, l'acceptation de cette vésicule à un compartiment *accepteur* et la fusion de la vésicule au compartiment *accepteur* selon un processus analogue à celui de l'exocytose. L'hypothèse vésiculaire a rapidement été étendue à tous les mouvements membranaires intracellulaires, quelle que soit leur direction. Ceux de direction centrifuge constituent la *voie de biosynthèse-exocytose* empruntée par les protéines solubles destinées à être exportées hors de la cellule, ainsi que par les protéines membranaires qui seront incorporées par exemple dans la membrane plasmique. Les mouvements membranaires intracellulaires de direction centripète constituent la *voie d'endocytose* assurant l'entrée dans la cellule de macromolécules provenant du milieu extracellulaire. Les mécanismes moléculaires qui régulent le trafic vésiculaire et les différentes voies de transport classiques et nouvelles sont loin d'être appréhendés dans leur globalité, malgré des progrès étonnants depuis deux décennies.

### 1.3.3 Le cytosquelette, support du trafic vésiculaire

Le cytosquelette est le support du trafic vésiculaire. Il est composé de trois types de polymères : les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. Ces filaments sont dynamiques. En effet, les protéines intervenant dans leur constitution existent sous deux formes dans la cellule : monomériques, solubles et dispersées dans le cytosol, ou insolubles et organisées en filaments. Si la concentration en filaments est supérieure à un seuil haut, il y a polymérisation. En revanche, si cette concentration est inférieure à un seuil bas, il y a dépolymérisation. Le filament est polarisé. L'extrémité notée '+' présente un seuil de polymérisation plus faible que l'extrémité notée '-'. Comme l'illustre la figure 1.7 (a), à concentration égale, le côté '+' croît plus vite (ou se dépolymérise plus lentement) que le côté '-'. Il existe également une plage de concentration pour laquelle le côté '+' croît tandis que le côté '-' décroît, ce qui entraîne la migration du filament à l'intérieur de la cellule. Les myosines, kinésines et dynéines sont des moteurs moléculaires capables de se déplacer le long du cytosquelette en consommant de l'ATP (adénosine triphosphate), le "carburant cellulaire". Ils permettent notamment de propulser des vésicules à l'intérieur de la cellule.

### 1.3.4 La protéine Rab6

Les GTPases de la famille Rab (environ 60 protéines chez l'homme (Seabra, Mules & Hume 2002)) sont des régulateurs des voies de transport membranaire entre les compartiments donneurs et accepteurs. La famille des protéines Rab peut directement ou indirectement réguler diverses étapes du transport vésiculaire, comme la sélection des cargos, le bourgeonnement des membranes, la motilité des vésicules, leur capture et leur amarrage, et enfin leur fusion à la membrane (Chavrier & Goud 1999). La localisation des différentes protéines Rab dans la cellule est illustrée sur la figure 1.7 (b) (Zerial & McBride 2001). Les protéines Rab6 appartiennent à cette famille et existent sous trois isoformes (Rab6A, Rab6A' et Rab6B) chez l'homme. L'isoforme Rab6B n'est présente que dans une sous-population des cellules neuronales et sa fonction précise est inconnue pour l'instant (Opdam, Echard, Croes, van den Hurk, van de Vorstenbosch, Ginsel, Goud & Franssen 2000). Nous nous intéressons plus particulièrement aux deux autres isoformes de Rab6. Elles sont impliquées dans une nouvelle voie de transport entre l'appareil de Golgi et le reticulum endoplasmique ne faisant pas intervenir les mécanismes classiques (White, Johannes, Mallar, Girod, Stephan, Reinsh, Keller, Tzschaschel, Echard, Goud & Stelzer 1999, Girod, Storrie, Simpson, Johannes, Goud, Roberts, Lord, Nilson & Pepperkok 1999).

Les protéines Rab6 sont présentes sous la forme de trois états dans la cellule :

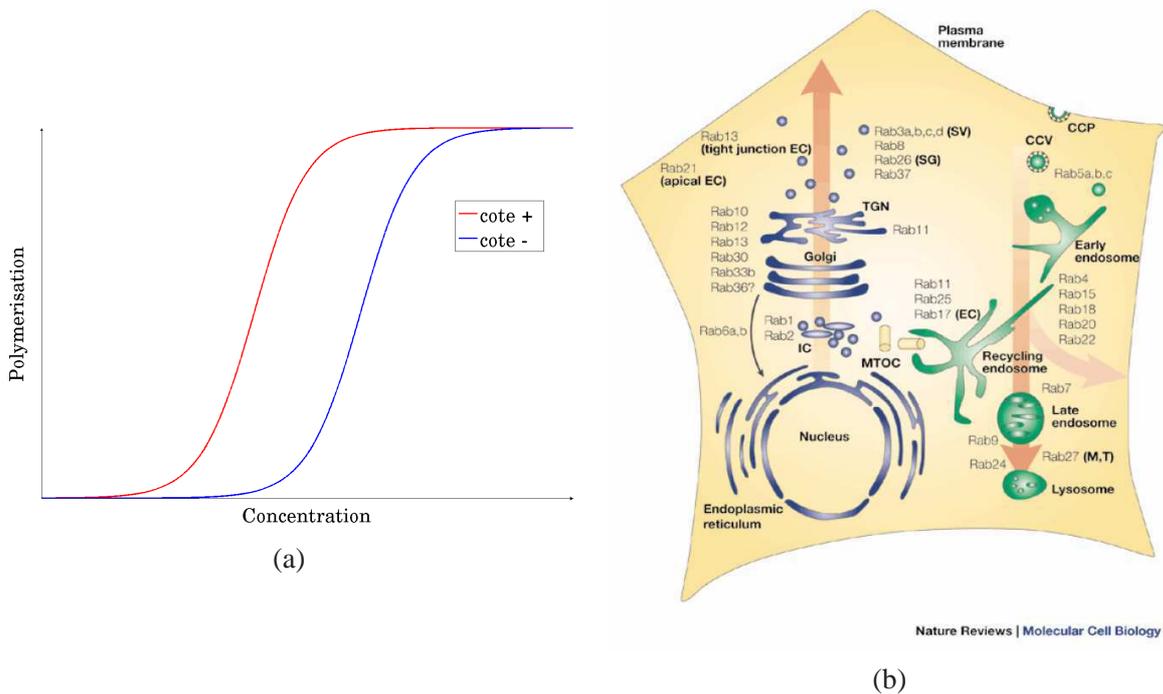


FIGURE 1.7: (a) Polymérisation des côtés “+” et “-” d’un filament du cytosquelette en fonction de sa concentration ; (b) localisation des différentes protéines Rab dans la cellule (figure extraite de (Zerial & McBride 2001)).

- ancrées à l’appareil de Golgi,
- en diffusion dans le cytosol,
- ancrées à la membrane des vésicules et transitant entre l’appareil de Golgi et le reticulum endoplasmique.

Une hypothèse maintenant partagée par un grand nombre de biologistes repose sur l’idée que cette protéine circule en circuit fermé à l’intérieur de la cellule. Les protéines fixées à l’appareil de Golgi sont ancrées à la membrane des vésicules. Sous cette forme, elles participent au trafic vésiculaire depuis l’appareil de Golgi vers des points d’entrée du reticulum endoplasmique localisés à la périphérie de la cellule. Arrivées à leur destination, les protéines se dissocient des vésicules pour se déplacer en diffusion dans le cytosol en direction de l’appareil de Golgi. À cet endroit, elles s’ancrent à nouveau et le cycle recommence. Ce cycle est illustré sur la figure 1.8. L’étape clé dans ce cycle est le trafic entre l’appareil de Golgi et le reticulum endoplasmique, qui correspond très vraisemblablement à une communication intracellulaire. Lors de cette étape, les protéines Rab6 sont embarquées dans des vésicules qui se déplacent le long du réseau de microtubules sous l’action de moteurs moléculaires (Hirokawa 1998). Ce déplacement est illustré sur la figure 1.10.

Une cellule pour laquelle les protéines Rab6 sont marquées par fluorescence et acquises avec un microscope “spinning disk” est illustrée sur la figure 1.9. Dans cette image, une région de forte intensité et entourée en vert est présente au centre de la cellule. Cette région correspond à l’appareil de Golgi. Elle est fortement lumineuse car un grand nombre de protéines Rab6 y sont ancrées. On observe également un certain nombre de spots (entourés en rouge). Ces derniers correspondent aux protéines Rab6 ancrées à la membrane des vésicules qui sont en phase de trafic. Le reste de l’image présente une intensité moindre et correspond en partie à la phase de diffusion de la protéine Rab6 dans le cytosol.

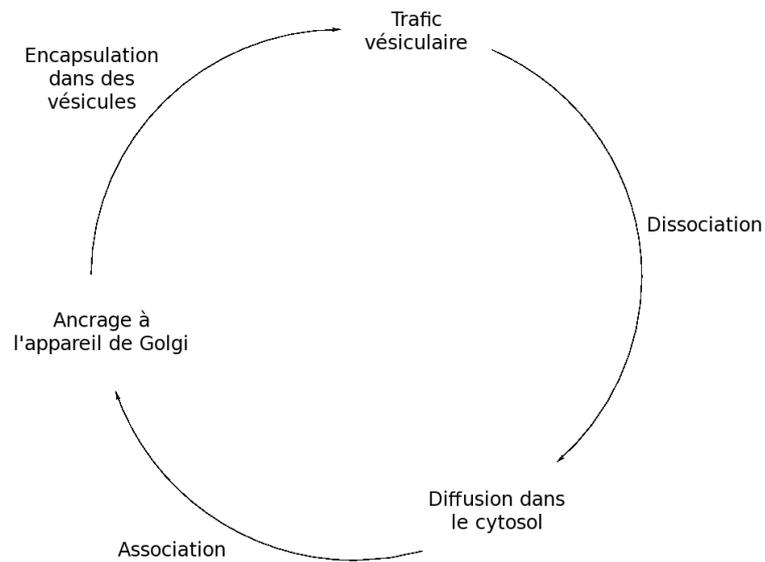


FIGURE 1.8: Succession d'états de la protéine Rab6 à l'intérieur de la cellule.

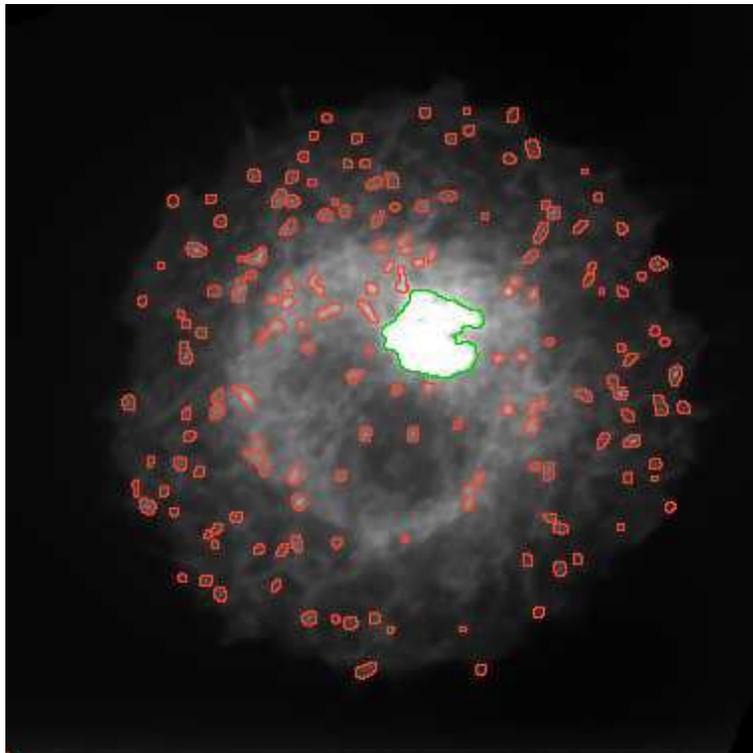


FIGURE 1.9: Cellule contrainte par un micro-patron de forme circulaire pour laquelle les protéines Rab6 sont marquées par fluorescence. L'appareil de Golgi est entouré en vert et les vésicules, en rouge.

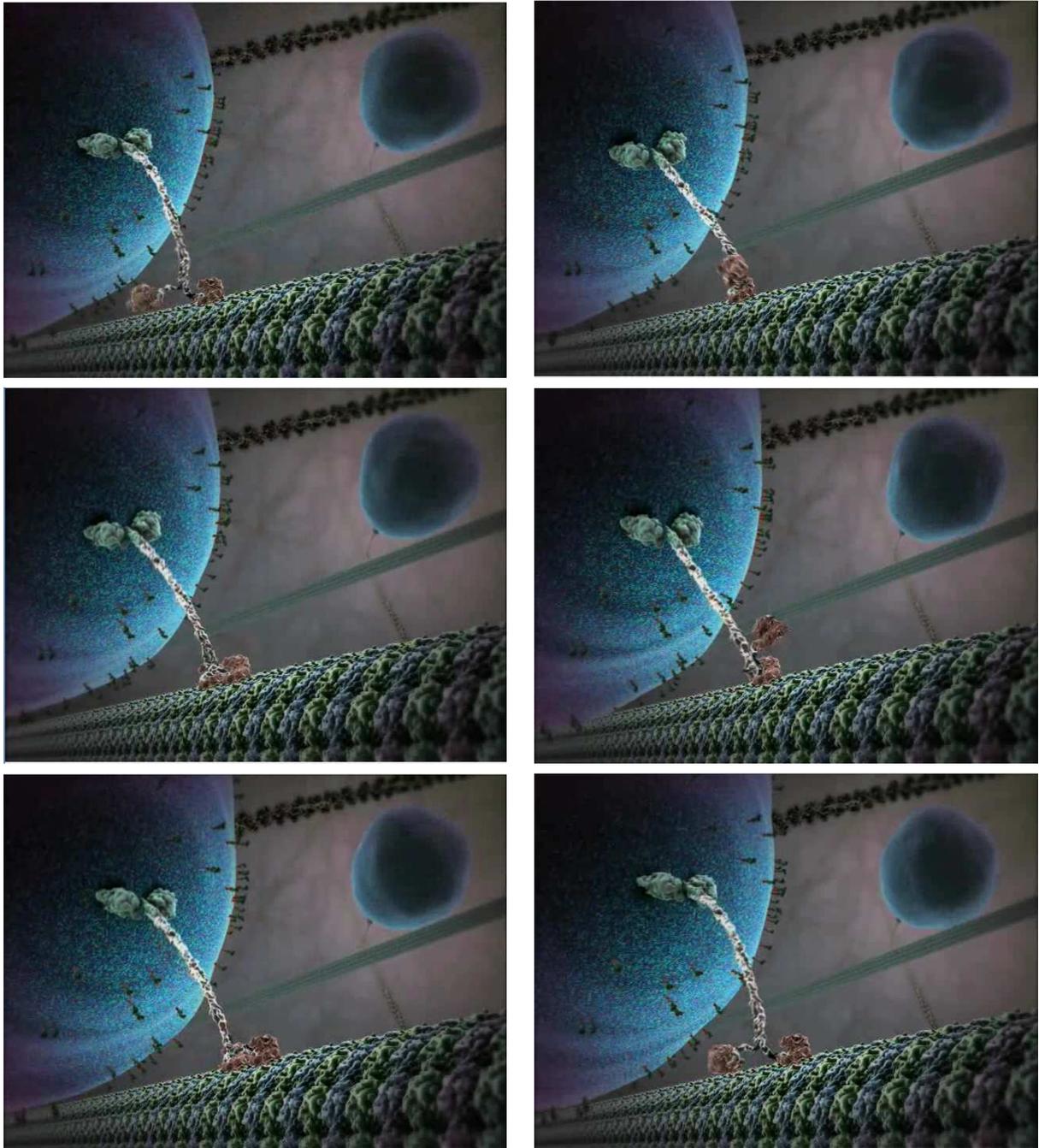


FIGURE 1.10: Six images successives illustrant le déplacement d'une vésicule (grosse boule bleue) le long d'un microtubule par l'intermédiaire d'un moteur moléculaire. Ce dernier se déplace à la manière d'un piéton, en marchant sur le microtubule. Ces images sont extraites du film d'animation "The inner life of the cell", développé par l'équipe "BioVisions", université de Harvard.

## 1.4 Acquisition et pré-traitements

Dans cette section, nous présentons les caractéristiques des acquisitions utilisées au cours de la thèse, ainsi que les pré-traitements associés à ces acquisitions.

### 1.4.1 Instrumentation

Les données étudiées au cours de cette thèse ont été acquises par Sabine Bardin de l'équipe "Compartimentation et dynamique cellulaires" de l'institut Curie. Ces acquisitions ont été réalisées par l'intermédiaire de microscopes à champ large 3D+T(emps), et pour l'essentiel de microscopes "spinning disk" 3D+T. Les acquisitions ont été réalisées en 3D sur 8 plans dans l'axe du microscope espacés de  $0,3 \mu\text{m}$ , avec un temps d'exposition égal à 100 ms. Le volume acquis ( $2,1 \mu\text{m}$  de hauteur) permet en général d'imager l'essentiel du volume cellulaire. Les cellules acquises sont des cellules Hela (cellules de cancer de l'ovaire) transfectées de façon stable (introduction d'ADN exogène dans les cellules) pour la protéine GFP-Rab6A. L'enjeu de la microscopie est d'acquérir un maximum d'informations en un minimum de temps afin de réduire le plus possible le phénomène de photoblanchiment, tout en perturbant le moins possible la cellule.

### 1.4.2 Micro-patrons

La forme très hétérogène des cellules influence la dynamique intracellulaire. L'activité des cellules très étalées semble différente de celles présentant une direction privilégiée ou contraintes spatialement comme c'est le cas dans les tissus organisés (cellules MDCK et MDCK polarisées). De plus, il est difficile de comparer l'activité dynamique d'objets intracellulaires s'ils se déplacent dans des environnements de topologie différente. Ce problème peut être contourné en contraignant physiquement la forme de la cellule à l'aide d'un *micro-patron* (ou *micro-pochoir*). Cette technique permet de contrôler la forme et l'organisation interne de centaines de cellules (polarité), sur une seule lamelle. Il est donc plus aisé de comparer les cellules entre elles (normalisation topologique).

La technique des *micro-patrons* (Thery, Racine, Pepin, Piel, Chen, Sibarita & Bornens 2005) consiste à tamponner des motifs de fibronectine de la taille d'une cellule sur une lamelle. La fibronectine contribue à l'organisation de la matrice extracellulaire (composée de nombreux domaines de liaison avec les cellules) et à l'adhésion cellulaire (ensemble des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en oeuvre pour faire adhérer les cellules entre elles ou avec le milieu qui les entoure). Ces motifs sont répétés de manière régulière et le reste de la surface de la lamelle est recouvert de polyéthylène glycol (polymère synthétique hydrophobe). L'hydrophobie du polyéthylène glycol repousse les cellules tandis que la fibronectine, impliquée dans l'adhésion cellulaire, leur permet de bien adhérer à la lamelle. Comme le motif de fibronectine possède approximativement la taille d'adhésion de la cellule, cette dernière va adhérer sur toute la surface tamponnée de fibronectine. Les cellules vont se distribuer de manière très reproductible sur les motifs. Ce système permet notamment une analyse quantitative plus précise qui s'affranchit des différences morphologiques entre les cellules. Dans notre étude, nous avons étudié des cellules contraintes par deux types de *micro-patrons* : des *micro-patrons* circulaires, et des *micro-patrons* en forme d'arbalète. Ces deux *micro-patrons*, ainsi que deux cellules contraintes par ces *micro-patrons* sont illustrés sur la figure 1.11.

### 1.4.3 Restauration d'images

La vidéo-microscopie est une modalité d'acquisition connue pour présenter des niveaux de bruit élevés. La restauration des séquences d'images de microscopie de fluorescence nous semble indispensable à tout traitement. Les images de microscopie de fluorescence comportent un grand nombre de dégra-

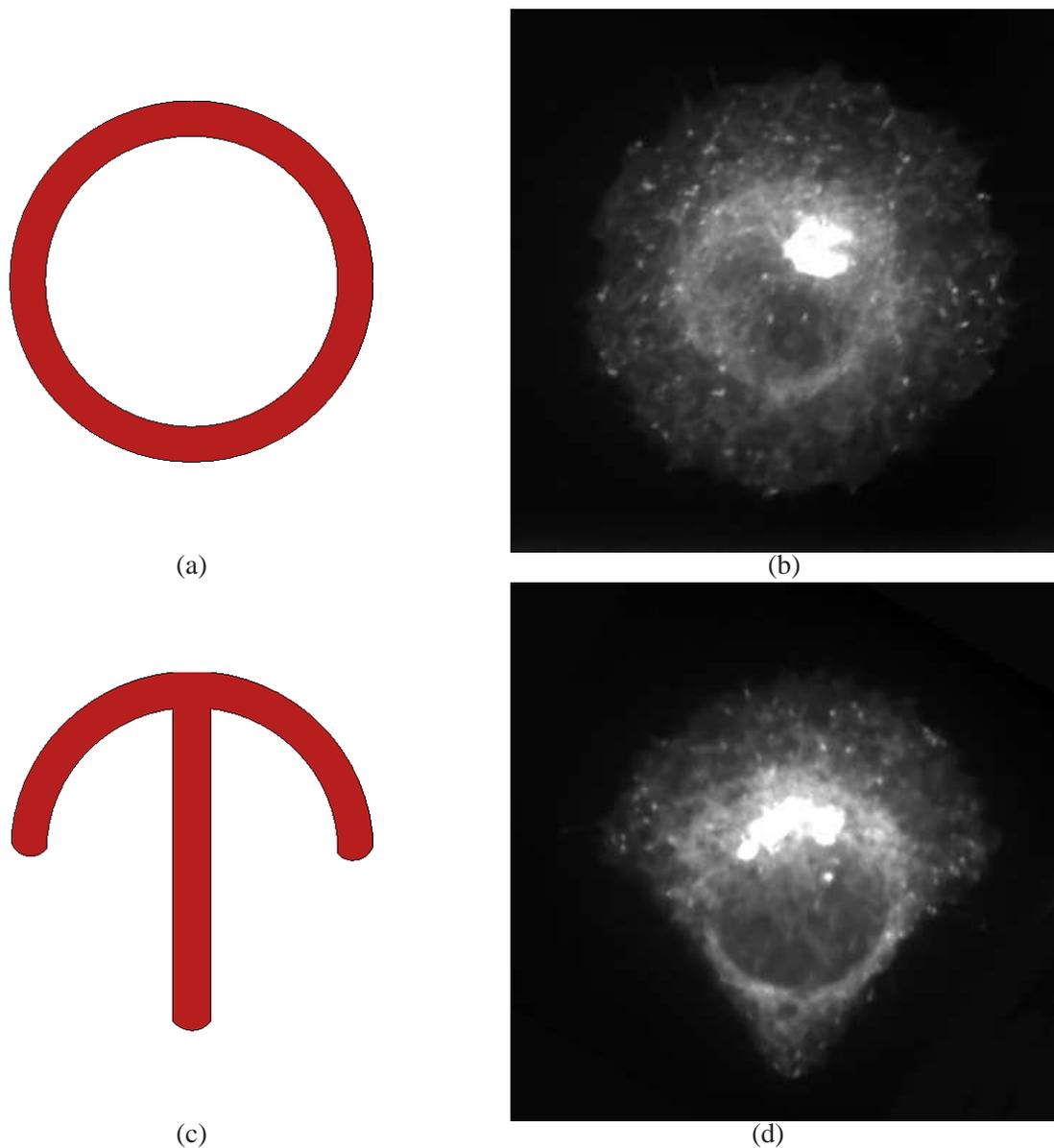


FIGURE 1.11: (a) Micro-patron circulaire; (b) cellule contrainte par un micro-patron circulaire pour laquelle les protéines Rab6 sont marquées par fluorescence; (c) micro-patron en forme d'arbalète; (d) cellule contrainte par un micro-patron en forme d'arbalète pour laquelle les protéines Rab6 sont marquées par fluorescence (une correction gamma est appliquée aux images (b) et (d) pour une meilleure visualisation).

dations dues à la nature quantique du phénomène à l'origine de la création des photo-électrons. Pour ne pas être perturbés par ce phénomène, nous utilisons la méthode de restauration proposée par Boulanger *et al.*, présentée dans (Boulanger, Sibarita, Kervrann & Bouthemy 2008, Boulanger, Kervrann, Bouthemy, Sibarita & Salameo 2009).

#### 1.4.4 Approximation d'une séquence d'images 3D+T par une séquence 2D+T

L'étude du trafic vésiculaire doit être réalisée dans les trois dimensions spatiales pour être appréhendée de manière complète. Cependant, l'acquisition n'est possible que sur un nombre limité de coupes dans l'axe du microscope, ce qui n'est pas suffisant pour étudier les phénomènes observés en

3D. C'est pourquoi nous développons des méthodes d'analyse d'images en 2D. Le passage d'un volume 3D+T à un volume 2D+T est réalisé en moyennant l'intensité observée en un point sur l'ensemble des coupes. En fluorescence, si deux objets se trouvent dans l'axe du microscope, l'intensité observée est égale à l'addition de l'intensité des deux objets, contrairement au monde réel où on n'observe que l'objet situé au premier plan. Le fait de moyenner l'intensité suivant l'axe optique n'entraîne, par conséquent, aucune perte d'information en ce qui concerne l'intensité. Cette projection entraîne en revanche une perte d'information spatiale suivant cet axe, mais qui n'est pas cruciale pour l'étude poursuivie au cours de cette thèse.

Soit  $I_t^{3D}(s_x, s_y, s_z) \in \mathbb{R}$  l'intensité observée dans la séquence d'images 3D+T au point de coordonnées spatiales  $(s_x, s_y, s_z)$  à l'instant  $t$ . L'intensité observée dans la séquence d'images 2D+T est définie comme :

$$I_t^{2D}(s_x, s_y) = \frac{1}{N_z} \sum_{s_z=1}^{N_z} I_t^{3D}(s_x, s_y, s_z), \quad (1.2)$$

où  $N_z$  désigne le nombre de coupes pour chaque volume de la séquence 3D+T.

#### 1.4.5 Correction du courant d'obscurité et compensation du photoblanchiment

En l'absence de photons, l'agitation thermique des électrons dans les composants du capteur, le plus souvent une caméra CCD, induit un courant électrique, appelé *courant d'obscurité*. Le nombre d'électrons ainsi produit dépend de la température et du temps d'exposition. Il peut varier au cours du temps à cause des effets de charge de la caméra, mais est identique en tout point de l'image à un instant donné. Pour supprimer ce phénomène, il faut définir une zone de référence non fluorescente dans l'image, sensée représenter l'évolution du *courant d'obscurité* au cours du temps, et retrancher la moyenne des intensités dans cette zone de référence à tous les pixels de l'image en chaque instant. Cette zone doit impérativement être non fluorescente pour ne pas subir l'influence du photoblanchiment.

Le photoblanchiment est une propriété physique des fluorophores qui s'apparente à une décroissance exponentielle de l'intensité qu'ils émettent au cours du temps. Toutefois, lorsqu'un grand nombre de molécules fluorescentes se côtoient, comme dans le cas d'une cellule, des effets collectifs et des effets photochimiques apparaissent (Hoogenboom, van Dijk, Hernando, van Hulst & Garcia-Parajo 2005). De plus, la protéine Rab6 évolue en circuit fermé à l'intérieur de la cellule. Il n'y a donc pas d'échange de fluorescence avec l'extérieur de la cellule. C'est pourquoi nous préférons imposer de manière empirique une intensité totale constante dans chaque image.

Soit  $\mathcal{R}^{ext}$  l'ensemble des pixels situés en dehors de la cellule. Le *courant d'obscurité* est calculé à chaque instant de la séquence de la manière suivante :

$$\bar{I}_t^{ext} = \frac{1}{|\mathcal{R}^{ext}|} \sum_{(s_x, s_y) \in \mathcal{R}^{ext}} I_t^{2D}(s_x, s_y), \quad (1.3)$$

où  $|\mathcal{R}^{ext}|$  désigne le nombre de points de la région  $\mathcal{R}^{ext}$ . Soit  $\mathcal{R}^{cell}$  l'ensemble des points situés à l'intérieur de la cellule. L'intensité moyenne observée à l'intérieur de la cellule à chaque instant est simplement définie comme :

$$\bar{I}_t^{cell} = \frac{1}{|\mathcal{R}^{cell}|} \sum_{(s_x, s_y) \in \mathcal{R}^{cell}} I_t^{2D}(s_x, s_y), \quad (1.4)$$

où  $|\mathcal{R}^{cell}|$  représente le nombre de points situés à l'intérieur de la cellule. Afin de corriger à la fois le *courant d'obscurité* et le photoblanchiment, l'image corrigée à l'instant  $t$  est définie comme :

$$I_t(s_x, s_y) = \frac{I_t^{2D}(s_x, s_y) - \bar{I}_t^{ext}}{\bar{I}_t^{cell} - \bar{I}_t^{ext}} (\bar{I}_0^{cell} - \bar{I}_0^{ext}), \quad (1.5)$$

où  $\bar{I}_0^{cell}$  (respectivement  $\bar{I}_0^{ext}$ ) désigne la moyenne de l'intensité à l'intérieur (respectivement à l'extérieur) de la cellule à l'instant  $t = 0$ . Par la suite,  $\mathbf{I}_t$  représentera l'information image observée à l'instant  $t$ . Notons qu'il existe des méthodes plus sophistiquées permettant de corriger conjointement le photoblanchiment et de stabiliser la variance du bruit (bruit Poisson-Gaussien) (Boulanger, Kervrann, Bouthemy, Sibarita & Salamero 2009, Boulanger, Gidon, Kervrann & Salamero 2010).

## 1.5 Conclusion

Ce premier chapitre nous a permis de présenter l'instrumentation associée aux acquisitions réalisées pour l'étude du trafic intracellulaire et exploitées dans le cadre de cette thèse. Nous avons vu que l'observation d'objets biologiques localisés à l'intérieur de la cellule n'est pas aisée, notamment à cause de la diffraction de la lumière. Des méthodes optiques et d'analyse d'images permettent d'y remédier. Nous avons également brièvement décrit le principe de marquage fluorescent par ingénierie génétique. Cette technique a révolutionné l'observation des phénomènes biologiques. Nous avons ensuite discuté brièvement du contexte biologique dans lequel s'inscrit cette thèse. Nous avons finalement présenté les différents pré-traitements que nous appliquons aux séquences d'images de microscopie de fluorescence considérées. Dans le chapitre suivant, nous nous intéressons au problème de l'estimation du trafic intracellulaire à l'aide de méthodes numériques et de traitement d'images.



---

### Analyse du trafic intracellulaire

---

Au cours de la dernière décennie, les progrès en biophotonique, biochimie et optique ont permis le développement de systèmes de microscopie de fluorescence capables d'acquérir des séquences d'images multidimensionnelles *in vivo*. L'utilisation de ces nouvelles technologies a permis la découverte ou la redécouverte d'un grand nombre de processus biologiques et de processus dynamiques à l'échelle de la cellule, qui étaient étudiés par le passé uniquement sur du matériel fixé. L'analyse des protéines, des macro-molécules, des vésicules, ou d'autres structures intracellulaires comme les microtubules marquées le plus souvent par la GFP, nécessite l'étude d'un grand nombre de particules/spots qui se déplacent au cours du temps, dans des images bruitées. En raison de la quantité de données acquises en 3D+T, de la précision requise et de la volonté de reproduire des résultats comparables, le traitement manuel n'est plus envisageable. Le développement de méthodes automatiques est incontournable.

Les approches conventionnelles pour l'étude des dynamiques intracellulaires en vidéo-microscopie consistent habituellement à suivre individuellement chaque objet marqué dans une séquence d'images. Les approches *connexionistes* sont les plus nombreuses (Thomann, Dorn, Sorger & Danuser 2003, Sbalzarini & Koumoutsakos 2005, Racine, Hertzog, Jouaneau, Salamero, Kervrann & Sibarita 2006, Genovesio, Liedl, Emiliani, Parak, Coppey-Moisan & Olivo-Marin 2006, Jaqaman, Loerke, Mettlen, Grinstein, Schmid & Danuser 2008, Chenouard, Bloch & Olivo-Marin 2009) et opèrent selon deux étapes. Dans la première étape, les objets d'intérêt sont détectés séparément sur chaque image de la séquence. Un grand nombre de méthodes de détection ont ainsi été développées pour des applications de microscopie de fluorescence. Quelques-unes sont présentées au chapitre 4. Dans la seconde étape, il s'agit de mettre en correspondance les détections obtenues au cours du temps. Les objets détectés sont ainsi reliés entre eux afin d'établir des trajectoires complètes. Mis au point il y a une trentaine d'années, l'algorithme à hypothèses multiples (Reid 1979) reste l'un des plus efficace pour mener cette opération. Des méthodes s'appuyant sur l'équation de contrainte du flot optique (Bergsma, Streekstra, Smeulders & Manders 2001) (méthodes non statistiques) sont également envisagées pour estimer les déplacements des objets entre deux images. D'autres approches sont établies dans un cadre bayésien et estiment directement l'état caché du système dynamique observé, c'est-à-dire les trajectoires des objets en mouvement à chaque instant. Lorsque le système dynamique est hautement non linéaire (hypothèses non gaussiennes), des solutions numériques sont obtenues en utilisant les méthodes séquentielles de Monte Carlo (Metropolis & Ulam 1949). Ces méthodes ont ainsi été proposées pour suivre des objets intracellulaires en vidéo-microscopie (Wen, Gao, Kosaka, Iwaki, Luby-Phelps & Mundy 2005, Smal, Draegestein, Galjart, Niessen & Meijering 2008, Smal, Meijering, Draegestein, Galjart, Grigoriev, Akhmanova, van

Royen, Houtsmuller & Niessen 2008).

Les méthodes de suivi individuel des objets se sont révélées tout à fait performantes pour un grand nombre d'applications en microscopie de fluorescence. Cependant, dans le cas particulier de suivi de protéines de la famille des Rab, les images présentent un grand nombre d'objets en mouvement, décrivant un véritable trafic. La grande quantité d'objets, ainsi que les nombreuses interactions entre objets (croisement, fusion, division) mettent en difficulté les méthodes usuelles pour la caractérisation des différentes trajectoires. De plus, si l'échantillonnage temporel est faible (de l'ordre d'une image par seconde), ce qui permet d'observer le trafic sur un horizon temporel plus important, les déplacements des vésicules entre deux images deviennent élevés et ne facilitent pas la mise en correspondance. Néanmoins, il existe des méthodes d'estimation du trafic dans le contexte des réseaux de télécommunications (Vardi 1996, Tebaldi & West 1998, Cao, Davis, Vander Wiel & Yu 2000, Chen, Cao & Bu 2007). Ces méthodes très différentes sur le plan de la modélisation statistique, ont été développées pour caractériser le trafic de manière globale à partir de mesures locales. Elles ne permettent pas de caractériser les informations locales telles que la vitesse ou la directionnalité locale des objets. Cependant, elles permettent d'estimer le trafic moyen entre différentes régions au cours du temps. Elles présentent donc des propriétés intéressantes pour l'estimation du trafic intracellulaire.

Dans ce chapitre, nous commençons par présenter les méthodes de suivi individuel appliquées à des séquences de vidéo-microscopie. Nous abordons dans un premier temps les méthodes *connexionistes*, puis nous nous intéressons aux méthodes séquentielles de Monte Carlo. Ensuite, nous exposons les méthodes d'estimation du trafic appliquées aux réseaux de télécommunications. Celles-ci sont à l'origine des travaux menés au cours de cette thèse.

## 2.1 Approche locale : suivi individuel

En analyse d'images, l'étude du trafic au cours du temps est généralement effectuée en suivant individuellement chaque objet. Dans une seconde étape, le trafic global est établi à partir des trajectoires de chacun des objets. Pour suivre individuellement chaque objet, deux types de méthodes sont préconisés : la mise en correspondance et le filtrage temporel stochastique.

### 2.1.1 Mise en correspondance d'objets intracellulaires en vidéo-microscopie

Les méthodes de mise en correspondance nécessitent une détection préalable des objets d'intérêt dans la séquence d'images considérée. Ces objets sont caractérisés par un certain nombre d'attributs, qui diffèrent suivant l'application envisagée. Le but de la mise en correspondance est d'associer un objet à une séquence de mesures, permettant d'établir ainsi sa trajectoire au cours du temps.

Soit  $\mathbf{q}_t^i = (q_t^i(1), \dots, q_t^i(N_q))^T \in \mathbb{R}^{N_q}$  le vecteur des  $N_q$  attributs caractérisant l'objet  $i$  détecté à l'instant  $t$ . Par la suite, ce vecteur est appelé "mesure". Les attributs sont généralement de différentes nature. Dans (Racine 2006), pour un objet détecté et défini par une région connexe, les auteurs le caractérisent par son centre de gravité, par la somme des intensités à l'intérieur de la région correspondante et enfin par l'aire (en nombre de pixels) de la région. Ces caractéristiques sont choisies parce qu'elles ne varient que très peu au cours du temps. D'autres attributs peuvent également être considérés, comme le contour des objets (Fontaine, Barr & Burdick 2007). La méthode de mise en correspondance la plus simple est alors l'algorithme du plus proche voisin.

#### Algorithme du plus proche voisin

L'algorithme du plus proche voisin suppose que les mesures les plus proches au sens d'une certaine distance correspondent au même objet. Cet algorithme est séduisant car simple conceptuellement et

rapide lors de la mise en oeuvre (Deriche & Faugeras 1990, Pinho, Tavares & Correia 2007).

Soit  $N_q$  objets détectés aux instants  $t - 1$  et  $t$ . En principe, chaque objet peut être associé à n'importe quel autre objet, soit donc  $(N_q)^2$  combinaisons possibles d'associations. La distance entre deux mesures quantifie la vraisemblance pour ces deux mesures de représenter le même objet. Plus la distance est faible, plus la vraisemblance est grande. Si la différence entre vecteurs d'attributs suit une loi gaussienne multidimensionnelle, la mesure de distance appropriée est la distance de Mahalanobis (Duda & Hart 1973). La fonction de vraisemblance est alors donnée par :

$$P(\mathbf{q}_t^i, \mathbf{q}_*^j) = \frac{1}{(2\pi)^{\frac{N_q}{2}} |\Sigma_{\mathbf{q}}|^{\frac{1}{2}}} \exp \left( -\frac{1}{2} \underbrace{(\mathbf{q}_t^i - \mathbf{q}_*^j)^T \Sigma_{\mathbf{q}}^{-1} (\mathbf{q}_t^i - \mathbf{q}_*^j)}_{\text{distance de Mahalanobis}} \right), \quad (2.1)$$

où  $\Sigma_{\mathbf{q}}$  représente la matrice de variance/covariance de la différence  $(\mathbf{q}_t^i - \mathbf{q}_*^j)$ . Dans ce cas,  $\mathbf{q}_*^j$  désigne soit le vecteur d'attributs prédit à l'instant  $t$  pour l'objet  $i$  détecté à l'instant  $(t - 1)$  (en utilisant un filtre de Kalman par exemple (Fontaine et al. 2007)), soit la mesure correspondant à l'objet  $i$  détecté à l'instant  $(t - 1)$  (Racine 2006). En pratique, il est plus simple d'utiliser directement la distance de Mahalanobis :

$$d_M(\mathbf{q}_t^i, \mathbf{q}_*^j) = (\mathbf{q}_t^i - \mathbf{q}_*^j)^T \Sigma_{\mathbf{q}}^{-1} (\mathbf{q}_t^i - \mathbf{q}_*^j). \quad (2.2)$$

L'objet  $j$  à l'instant  $(t - 1)$  associé à l'objet  $i$  à l'instant  $t$  est celui qui minimise  $d_M(\mathbf{q}_t^i, \mathbf{q}_*^j)$ . Il arrive souvent que les distances de Mahalanobis entre un objet détecté à l'instant  $t$  et plusieurs objets détectés à l'instant  $(t - 1)$  soient proches, ce qui complique le problème d'association. Toutefois, d'autres informations sont disponibles dans les images suivantes. Une meilleure mise en correspondance peut être obtenue en retardant le processus de décision, avec l'espoir que les mesures suivantes permettent de lever certaines ambiguïtés. Cette idée est exploitée par l'algorithme de division des trajectoires (Smith & Buechler 1975).

### Algorithme de division des trajectoires

La figure 2.1 (a-b) illustre le principe de l'algorithme de division des trajectoires. Dans cet exemple, une seule caractéristique est prise en compte. À l'instant  $t = 4$ , deux objets détectés présentent une distance similaire avec l'objet suivi jusqu'alors. Plutôt que d'assigner arbitrairement l'objet le plus proche, l'arbre de suivi présenté sur la figure 2.1 (b) est construit. Les deux branches indiquent la possibilité de choisir un des deux objets détectés à l'instant  $t = 4$ . La décision n'est pas prise immédiatement, mais est différée pour prendre en compte les objets détectés aux instants suivants. Les arbres de suivi peuvent rapidement devenir très vastes. Il est par conséquent primordial de définir une nouvelle mesure de vraisemblance pour l'association de deux objets, afin d'écartier les hypothèses peu vraisemblables. Cette mesure de vraisemblance sert ensuite à élaguer l'arbre, étape indispensable pour la mise en oeuvre pratique de cette approche.

Une trajectoire est définie comme la séquence d'un ensemble de mesures supposées correspondre à l'évolution d'un objet dans le temps. Le problème de mise en correspondance revient à assigner les mesures aux trajectoires correspondantes. Soit  $\mathbf{Q}_t^l = (\mathbf{q}_1^l, \dots, \mathbf{q}_t^l)$  le vecteur de mesures associé à la trajectoire  $l$ , de l'instant 1 à l'instant  $t$ . On note  $\mathbf{q}_k^l$  le vecteur d'attributs détecté à l'instant  $k$ , associé à la trajectoire  $l$ . Soit  $E_t^l$  l'évènement " $\mathbf{Q}_t^l$  correspond à un seul et même objet". La vraisemblance de  $E_t^l$  est de la forme :

$$P(E_t^l) = \prod_{k=1}^t P(\mathbf{q}_k^l | \mathbf{Q}_{0:k}, E_t^l), \quad (2.3)$$

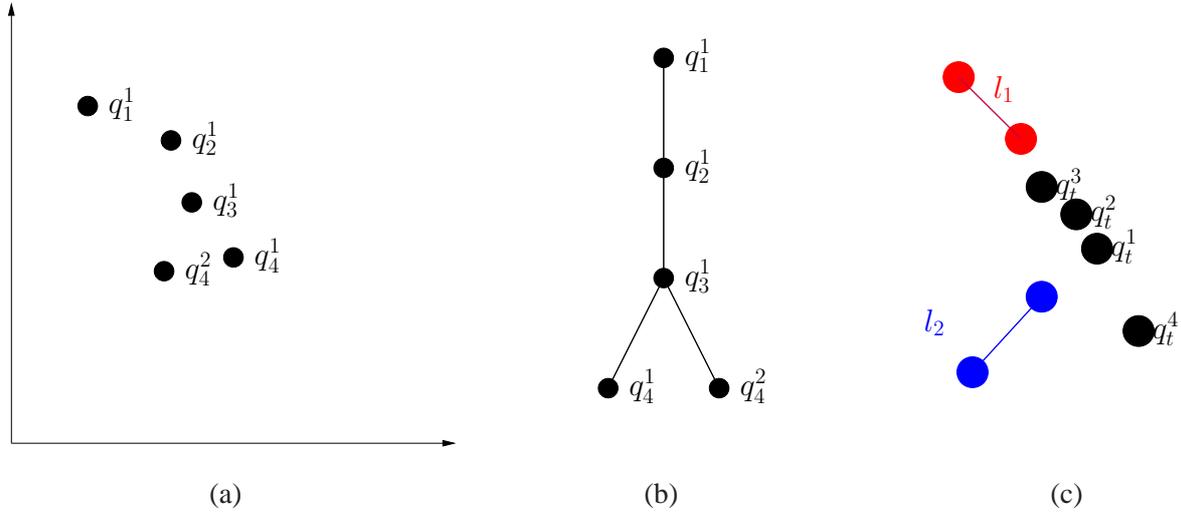


FIGURE 2.1: (a) Mesures correspondant à la détection de plusieurs objets entre les instants 1 et 4; (b) arbre de suivi correspondant aux mesures (a); (c) mesures  $q_t^1$ ,  $q_t^2$ ,  $q_t^3$  et  $q_t^4$  réalisées à l'instant  $t$ . À l'instant  $t-1$ , deux trajectoires  $l_1$  (rouge) et  $l_2$  (bleu) sont connues.

où  $\mathbf{Q}_{0:k}$  représente les mesures disponibles sur l'intervalle  $[0; k]$ . Si l'hypothèse gaussienne est toujours valable, alors l'équation (2.3) peut s'écrire :

$$P(E_t^l) = \prod_{k=1}^t \frac{1}{(2\pi)^{\frac{N_q}{2}} |\Sigma_{\mathbf{q}}^l|^{\frac{1}{2}}} \exp\left(-\frac{1}{2}(\mathbf{q}_k^l - \mathbf{q}_*^l)^T (\Sigma_{\mathbf{q}}^l)^{-1} (\mathbf{q}_k^l - \mathbf{q}_*^l)\right), \quad (2.4)$$

où  $\mathbf{q}_*^l$  désigne soit le vecteur d'attribut prédit à partir de  $\mathbf{q}_{k-1}^l$ , soit  $\mathbf{q}_{k-1}^l$ . La log-vraisemblance associée à l'équation (2.4) est définie comme :

$$\begin{aligned} L(E_t^l) &= \sum_{k=1}^t (\mathbf{q}_k^l - \mathbf{q}_*^l)^T (\Sigma_{\mathbf{q}}^l)^{-1} (\mathbf{q}_k^l - \mathbf{q}_*^l) \\ &= L(E_{t-1}^l) + (\mathbf{q}_t^l - \mathbf{q}_*^l)^T (\Sigma_{\mathbf{q}}^l)^{-1} (\mathbf{q}_t^l - \mathbf{q}_*^l). \end{aligned} \quad (2.5)$$

La deuxième expression de l'équation (2.5) permet le calcul de  $L(E_t^l)$  de manière récursive. Cette énergie est simplement la somme des distances de Mahalanobis entre les mesures associées à une même trajectoire. Finalement, au lieu de ne considérer que la distance minimale entre deux images consécutives, il est préférable d'extraire la séquence de mesures qui minimise la distance totale de Mahalanobis sur l'ensemble de la séquence.

Comme l'arbre de suivi peut devenir très vaste, il est nécessaire de l'élaguer au maximum afin d'être le plus efficace en terme de temps de calcul. Il existe différentes stratégies pour éliminer les noeuds ou branches peu probables de l'arbre :

- *enlever les trajectoires peu probables* : les trajectoires pour lesquelles  $L(E_t^l)$  est très faible peuvent être écartées,
- *fusionner des noeuds* : si  $E_t^{l_1}$  et  $E_t^{l_2}$  sont similaires, il est fort probable que ces deux évènements représentent la même trajectoire,
- *préserver les trajectoires les plus probables* : il est également possible de fixer la taille maximale de l'arbre.

Avec cet algorithme, il se peut qu'une même mesure soit malencontreusement associée à plusieurs trajectoires, même avec une étape de fusion des noeuds. L'algorithme de vraisemblance jointe (Morefield 1977) permet d'éviter ce défaut.

### Algorithme de vraisemblance jointe

Cet algorithme commence par regrouper les mesures en un ensemble de trajectoires  $\mathcal{T}_t^l$  (chaque trajectoire est constituée de plusieurs mesures consécutives). Cet ensemble n'est pas forcément disjoint, c'est-à-dire qu'une même mesure peut être associée simultanément à deux trajectoires ou plus. Un sous-ensemble de trajectoires disjointes doit ensuite être sélectionné. Une mesure de vraisemblance jointe est utilisée à cet effet. Un ensemble de trajectoires disjointes est noté  $\tilde{\mathcal{T}}_t^l$  et est défini par :

$$\tilde{\mathcal{T}}_t^l = \{\mathbf{Q}_t^{l_i}\}_{l_i=1,\dots,N_l}, \quad (2.6)$$

où  $\mathbf{Q}_t^{l_i}$  représente les mesures associées à la trajectoire  $l_i$ , et  $\{l_i\}_{i=0,\dots,N_l}$  désigne l'ensemble des trajectoires considérées.

Soit  $\mathcal{T}$  l'ensemble de toutes les partitions possibles de trajectoires. Dans ces conditions,  $\tilde{\mathcal{T}}_t^l$  vérifie la maximisation de la vraisemblance jointe :

$$\max_{\tilde{\mathcal{T}}_t^l \in \mathcal{T}} P(\mathbf{Q}_t | \tilde{\mathcal{T}}_t^l), \quad (2.7)$$

où  $\mathbf{Q}_t = \cup_{i=1}^{N_l} \mathbf{Q}_t^{l_i}$ . De plus, comme l'ensemble  $\mathbf{Q}_t$  est disjoint, on a :

$$\mathbf{Q}_t^{l_{i_1}} \cap \mathbf{Q}_t^{l_{i_2}} = \emptyset, \quad \forall l_{i_1} \neq l_{i_2}. \quad (2.8)$$

Dans cet algorithme, le début et la fin des trajectoires ne sont pas traités directement. Cet algorithme ne peut pas non plus traiter un nombre d'objets variable au cours du temps (apparition et disparition d'objets). En revanche, l'algorithme à hypothèses multiples (Reid 1979) permet de prendre en compte ces événements.

### Algorithme à hypothèses multiples

Il est rare que tous les objets mobiles dans une séquence d'images soient connus *a priori* et présents tout au long de la séquence. Un algorithme capable d'initialiser et d'établir des trajectoires est donc tout à fait utile, voire indispensable. Dans l'algorithme à hypothèses multiples, une itération commence par la considération de l'ensemble des hypothèses résultant de l'itération  $t - 1$ . L'ensemble des trajectoires  $\mathcal{T}_{t-1}^l$  déterminées à l'instant  $t - 1$  est considéré comme une hypothèse, correspondant à un ensemble de trajectoires définissant chacune le trajet d'un objet. Chaque hypothèse (ou trajectoire) déterminée à l'instant  $t - 1$  (feuille de l'arbre) devient un noeud père d'hypothèses à l'itération courante. Chaque mesure à l'instant  $t$  peut appartenir à une trajectoire déjà connue, coïncider avec le point de départ d'une nouvelle trajectoire, voire correspondre à une fausse alarme.

Soit  $\mathcal{T}_t^l$  une hypothèse à l'instant  $t$  et  $\mathcal{T}_{t-1}^{l+}$  l'hypothèse mère. Un ensemble d'événements courants peut être traité en construisant une matrice d'hypothèses dans laquelle les trajectoires connues correspondent aux colonnes, et les mesures courantes aux lignes. Si l'élément de coordonnées  $(i, j)$  dans cette matrice est non nul, alors la mesure  $q_t^i$  présente une forte vraisemblance d'appartenir à la trajectoire  $l_j$ . En plus des  $N_l$  trajectoires déjà connues, la matrice d'hypothèses présente une colonne pour les fausses alarmes et une colonne pour les nouvelles trajectoires. Dans la situation présentée sur la figure 2.1 (c), il est difficile de savoir si  $q_t^3$  ou  $q_t^2$  appartiennent à la trajectoire déjà connue  $l_1$ . De même, il est difficile de statuer sur le sort de  $q_t^1$  et de  $q_t^2$ . La matrice d'hypothèses correspondante est illustrée dans le tableau 2.1. Elle rend compte de cette ambiguïté.

La nouvelle hypothèse  $\mathcal{T}_t^l$  à l'instant  $t$  est émise à partir de l'ensemble des assignements  $E_t^l$ , et de l'hypothèse mère  $\mathcal{T}_{t-1}^{l+}$  suivant les objets détectés jusqu'à l'instant  $t - 1$  :

$$\mathcal{T}_t^l = \left\{ \mathcal{T}_{t-1}^{l+}, E_t^l \right\}. \quad (2.9)$$

	$l_{FA}$	$l_1$	$l_2$	$l_{NT}$
$q_t^1$	1	0	1	1
$q_t^2$	1	1	1	1
$q_t^3$	1	1	0	1
$q_t^4$	1	0	0	1

TABLE 2.1: Éléments de la matrice d'hypothèses correspondant à la situation présentée sur la figure 2.1 (c).  $l_{FA}$  correspond aux fausses alarmes,  $l_{NT}$  aux nouvelles trajectoires, et  $l_1$  et  $l_2$  aux trajectoires 1 et 2 déjà existantes à l'itération  $t - 1$ .

La probabilité  $P(\mathcal{T}_t^l | \mathbf{Q}_t)$  peut être calculée par l'intermédiaire de la règle de Bayes :

$$\begin{aligned} P(\mathcal{T}_t^l | \mathbf{Q}_t) &= P\left(\mathcal{T}_{t-1}^{l+}, E_t^l | \left\{ \mathbf{Q}_t^{l_i} \right\}_{l_i=1:N_l}, \mathbf{Q}_{t-1}\right), \\ &= \frac{1}{Z} P\left(\left\{ \mathbf{Q}_t^{l_i} \right\}_{l_i=1:N_l} | E_t^l, \mathcal{T}_{t-1}^{l+}, \mathbf{Q}_{t-1}\right) P\left(E_t^l | \mathcal{T}_{t-1}^{l+}, \mathbf{Q}_{t-1}\right) P\left(\mathcal{T}_{t-1}^{l+} | \mathbf{Q}_{t-1}\right), \end{aligned} \quad (2.10)$$

où  $Z$  est une constante de normalisation. Le dernier terme de cette équation  $P(\mathcal{T}_{t-1}^{l+} | \mathbf{Q}_{t-1})$  représente la probabilité de l'hypothèse mère. Elle a par conséquent déjà été calculée. Le second facteur de l'équation (2.10) est défini par :

$$\begin{aligned} P\left(E_t^l | \mathcal{T}_{t-1}^{l+}, \mathbf{Q}_{t-1}\right) &= \frac{N_{FA}! N_{NT}!}{N_l!} P_{FA}(N_{FA}) P_{NT}(N_{NT}) \times \\ &\prod_{i=1}^{N_E} \left(P_{NT}^{l_i}\right)^{1[l_i]} \left(1 - P_{NT}^{l_i}\right)^{1-1[l_i]} \left(P_{FT}^{l_i}\right)^{1-1[l_i]} \left(1 - P_{FT}^{l_i}\right)^{1[l_i]}, \end{aligned} \quad (2.11)$$

où  $N_{FA}$  désigne le nombre de fausses alarmes et  $N_{NT}$  le nombre de nouvelles trajectoires parmi les  $N_E$  mesures,  $P_F(a)$  et  $P_N(n)$  sont respectivement les probabilités *a priori* du nombre de fausses alarmes et du nombre de nouvelles trajectoires,  $P_{NT}^{l_i}$  et  $P_{FT}^{l_i}$  sont les probabilités de détection de nouvelle et de fin de trajectoire, et  $1[l_i]$  est défini comme :

$$1[l_i] = \begin{cases} 1 & \text{si la trajectoire } l_i \text{ appartenant à } \mathcal{T}_{t-1}^{l+} \text{ est détectée à l'instant } t, \\ 0 & \text{si la trajectoire } l_i \text{ appartenant à } \mathcal{T}_{t-1}^{l+} \text{ est supprimée à l'instant } t. \end{cases} \quad (2.12)$$

Pour déterminer le premier terme de l'équation (2.10), l'hypothèse gaussienne pour les vecteurs  $\mathbf{q}_t^{l_i}$  est retenue quand ils sont associés à une trajectoire  $l_i$ . Si une mesure correspond à une fausse alarme, alors la distribution de probabilité est la loi uniforme sur l'ensemble  $\Omega$  des observations dont le cardinal est  $|\Omega|$ . Les probabilités associées à une nouvelle trajectoire sont supposées identiques. Sous ces hypothèses, on obtient :

$$\begin{aligned} P\left(\left\{ \mathbf{Q}_t^{l_i} \right\}_{l_i=1:N_l} | E_t^l, \mathcal{T}_{t-1}^{l+}, \mathbf{Q}_{t-1}\right) &\propto \sum_{i=1}^{N_l} \left\{ \left( -\frac{1}{2} (\mathbf{q}_t^{l_i} - \mathbf{q}_*^{l_i})^T (\boldsymbol{\Sigma}_q^{l_i})^{-1} (\mathbf{q}_t^{l_i} - \mathbf{q}_*^{l_i}) \right) \right\}^{1[\mathbf{q}_t^{l_i}]} |\Omega|^{-(1-1[\mathbf{q}_t^{l_i}])}, \\ &\propto |\Omega|^{-(N_{FA}-N_{NT})} \sum_{i=1}^{N_l} \left\{ \left( -\frac{1}{2} (\mathbf{q}_t^{l_i} - \mathbf{q}_*^{l_i})^T (\boldsymbol{\Sigma}_q^{l_i})^{-1} (\mathbf{q}_t^{l_i} - \mathbf{q}_*^{l_i}) \right) \right\}^{1[\mathbf{q}_t^{l_i}]} \end{aligned}, \quad (2.13)$$

$$\text{où } 1[\mathbf{q}_t^{l_i}] = \begin{cases} 1 & \text{si } \mathbf{q}_t^{l_i} \text{ est issue d'une trajectoire déjà connue,} \\ 0 & \text{sinon.} \end{cases}$$

Bien que cet algorithme ait été élaboré il y a 30 ans (Reid 1979), il est toujours utilisé actuellement (Sbalzarini & Koumoutsakos 2005, Racine et al. 2006). Le fait de considérer l'initialisation et la fin

des trajectoires, de prendre en compte les fausses alarmes et de résoudre la mise en correspondance sur l'ensemble d'une séquence font de cet algorithme une approche efficace pour le suivi d'objets. Néanmoins, les probabilités de fausses alarmes ou de nouvelles trajectoires ne sont pas toujours accessibles. Afin de séparer et d'éviter de confondre les trajectoires d'objets marqués par différentes protéines fluorescentes, Thomann et al. (2003) proposent, après l'étape de mise en correspondance, d'apparier les objets à des "patrons" (templates). Cette étape permet une caractérisation plus fine des objets (une précision sous-pixellique pour leur localisation). Genovesio et al. (2006) proposent de calculer plusieurs prédictions pour chaque mesure réalisée en un instant donné. Ces prédictions résultent d'un algorithme mêlant plusieurs modèles dynamiques associés à différents types de mouvements biologiques connus. Chenouard et al. (2009) proposent un algorithme dont le temps de calcul est réduit pour suivre de nombreux objets dans des séquences d'images bruitées. Jaqaman et al. (2008) proposent par ailleurs de traiter le problème difficile du suivi : plusieurs dizaines d'objets, avec des mouvements hétérogènes, avec disparition momentanée d'objets, et fusion/division d'objets.

### Suivi par estimation du flot optique

Le flot optique permet d'exprimer les variations entre deux images successives en terme de déplacement des points dans l'image. Ce principe a été introduit par Horn et Schunck (Horn & Schunk 1981), et exploite la propriété de conservation de la luminance d'un point le long de sa trajectoire. L'algorithme de Kanade-Lucas-Tomasi (Lucas & T. 1981, Shi & Tomasi 1994) reprend ce principe pour le suivi de quelques dizaines de points. Pour cela, l'idée est de considérer une série d'images  $\{I_t\}_{t=1,\dots,T}$ , où  $N_I$  représente le nombre de pixels dans une image. Entre deux images successives, la variation de niveaux de gris est supposée ne dépendre que du mouvement de la caméra (nul en microscopie) et/ou du point  $s$  suivi. L'hypothèse de conservation de la luminance s'exprime alors comme :

$$I_t(s) = I_{t+1}(\varphi(s)), \quad (2.14)$$

où  $\varphi(s)$  représente le vecteur de déplacement. Cette hypothèse est très forte. Elle est rarement vérifiée pour tous les pixels de l'image, notamment lorsque la séquence subit des changements d'illumination. En pratique, pour résoudre le problème de l'estimation du champ de déplacement, on considère un voisinage autour du point et on cherche le vecteur de déplacement qui minimise la somme des erreurs au carré :

$$\sum_{r \in W_s} (I_{t+1}(\varphi(r)) - I_t(r))^2, \quad (2.15)$$

où  $W_s$  est une fenêtre spatiale locale centrée en  $s$ . Dans le cas de faibles déplacements,  $\varphi(s) = s + \delta(s)$ , où  $\delta(s) = (\delta_{s_x}, \delta_{s_y})^T$  est une simple translation. Un développement de Taylor à l'ordre 1 permet d'écrire :

$$I_{t+1}(s + \delta(s)) = I_t(s) + \nabla I_t(s)^T \delta(s) + \frac{\partial I_t(s)}{\partial t}, \quad (2.16)$$

où  $\nabla I_t(s)$  est le gradient spatial au point  $s$ . En supposant une unité de temps entre chaque image, l'expression du résidu (2.15) peut être réécrite comme :

$$\sum_{r \in W_s} (\nabla I_t(r)^T \delta(s) - (I_{t+1}(r) - I_t(r)))^2. \quad (2.17)$$

Afin de minimiser ce résidu, on recherche le vecteur de déplacement qui annule la dérivée de (2.17) par rapport à  $\delta(s)$ . On obtient alors le système linéaire suivant :

$$\sum_{r \in W_s} \begin{pmatrix} \left( \frac{\partial I_t(r)}{\partial s_x} \right)^2 & \frac{\partial I_t(r)}{\partial s_x} \frac{\partial I_t(r)}{\partial s_y} \\ \frac{\partial I_t(r)}{\partial s_x} \frac{\partial I_t(r)}{\partial s_y} & \left( \frac{\partial I_t(r)}{\partial s_y} \right)^2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \delta_{s_x} \\ \delta_{s_y} \end{pmatrix} = \sum_{r \in W_s} (I_{t+1}(r) - I_t(r)) \begin{pmatrix} \frac{\partial I_t(r)}{\partial s_x} \\ \frac{\partial I_t(r)}{\partial s_y} \end{pmatrix}. \quad (2.18)$$

Le modèle de translation ne peut pas prendre en compte certaines transformations du voisinage, comme les rotations ou les changements d'échelle. Un modèle affine est alors préconisé.

Cette méthode s'est avérée efficace pour le suivi de spots dans une séquence d'images de microscopie de fluorescence (Bergsma et al. 2001). Malheureusement, elle est fragile car l'hypothèse de conservation de la luminance au cours du temps n'est pas satisfaite à cause du phénomène de photoblanchiment. De plus, les objets suivis changent souvent de forme au cours du temps, et cette déformation n'est pas de nature affine.

### 2.1.2 Méthodes séquentielles de Monte Carlo et filtrage stochastique pour le suivi d'objets en microscopie de fluorescence

Depuis le début des années 2000, les Méthodes Séquentielles de Monte Carlo (MSMC) et de filtrage stochastique ont été expérimentées pour le suivi d'objets dans des séquences d'images. Elles ont été validées en robotique (Wolf, Burgard & Burkhardt 2005), en vidéo-surveillance (Pérez, Vermaak & Blake 2004) et pour l'estimation de mouvement humain (Wu, Lin & Huang 2005). En imagerie biologique, elles ont été exploitées pour le suivi de contours de cellules décrits par les ensembles de niveaux (Li, Miller, Weiss, Campbell & Kanade 2006) ou des contours actifs (Shen, Nelson, Kennedy, Nelson, Johnson, Spiller, White & Kell 2006). Des expériences ont été menées pour suivre des objets intracellulaires dans des séquences d'images de vidéo-microscopie (Wen et al. 2005, Smal, Draegestein, Galjart, Niessen & Meijering 2008, Smal, Meijering, Draegestein, Galjart, Grigoriev, Akhmanova, van Royen, Houtsmuller & Niessen 2008).

#### Suivi bayésien

Les MSMC font partie de la famille des méthodes de suivi bayésien. Le suivi bayésien cherche à inférer le système dynamique d'un état non observé, qui change au cours du temps, à partir d'une séquence d'images bruitées. Dans ce cadre, le vecteur d'état  $\mathbf{x}_t$  d'un système dynamique contient toutes les informations utiles. L'estimation bayésienne est utilisée pour estimer récursivement une distribution *a posteriori* (ou distribution de filtrage)  $P(\mathbf{x}_t | \mathbf{y}_{1:t})$  qui décrit le vecteur d'état  $\mathbf{x}_t$  connaissant les observations  $\mathbf{y}_{1:t} = \mathbf{y}_1, \dots, \mathbf{y}_t$ .

La solution exacte à ce problème est obtenue en spécifiant le modèle probabiliste markovien de l'évolution de l'état  $P(\mathbf{x}_t | \mathbf{x}_{t-1})$ , et la probabilité  $P(\mathbf{y}_t | \mathbf{x}_t)$  qui relie les observations à chaque état. La loi  $P(\mathbf{x}_t | \mathbf{y}_{1:t})$  est obtenue récursivement en deux étapes : *prédiction* et *correction*. Cette estimation récursive de la distribution de filtrage est applicable séquentiellement, ce qui permet de ne pas stocker l'ensemble des données ou de reproduire des données existantes quand une nouvelle mesure devient disponible. La distribution de filtrage englobe toutes les informations statistiques et une estimation optimale des états est théoriquement envisageable.

Lorsque le modèle décrivant le système dynamique à estimer est hautement non linéaire et/ou non gaussien, les méthodes non aléatoires ne permettent pas d'approcher la loi de filtrage. L'utilisation de simulations par Monte Carlo pour identifier cette loi est une alternative dont les performances se sont révélées encourageantes. Les Méthodes Séquentielles de Monte Carlo (MSMC) reposent sur ce principe.

## Méthodes séquentielles de Monte Carlo

Grâce à l'augmentation des capacités de calcul, les MSMC (Metropolis & Ulam 1949) ont connu un essor dans les années 90, ce qui a donné lieu à la génération d'algorithmes récurrents pour la résolution du problème de filtrage non linéaire. On peut citer plusieurs algorithmes nés à cette époque : l'algorithme de filtre *bootstrap* (Gordon, Salmond & Smith 1993), le filtre de Monte Carlo (Kitagawa 1996), l'algorithme "Condensation" (Isard & Blake 1998) et le filtrage particulaire avec interactions (Del Moral 2002). Pour résoudre le problème de filtrage non linéaire, ces filtres que nous appellerons *filtres particuliers* par la suite, approchent la densité *a posteriori* par un ensemble de points de l'espace d'états appelés particules. À chaque particule est associée un poids, et la distribution objectif est approchée par une somme pondérée discrète, dont le support correspond aux particules. Le nuage de particules est mis à jour récursivement à chaque pas de temps. Chaque particule évolue en utilisant le principe de l'échantillonnage pondéré séquentiel, et certaines sont sélectionnées par une étape de rééchantillonnage. La connaissance des particules et de leur poids permet d'accéder aux moments de la loi *a posteriori*.

**Principe du filtrage particulaire** Le principe du filtrage particulaire consiste à simuler un ensemble d'échantillons discrets pour approcher une distribution de probabilité, dont on ne connaît pas l'expression analytique. Soit  $\{\mathbf{x}(i)\}_{i=1,\dots,N_p}$  un ensemble de réalisations indépendantes et identiquement distribuées selon la densité  $P(\mathbf{x})$ . Cette densité est approchée par la loi discrète  $P_{N_p}(\mathbf{x})$  à partir des  $N_p$  échantillons :

$$P_{N_p}(\mathbf{x}) = \frac{1}{N_p} \sum_{i=1}^{N_p} 1[\mathbf{x}(i) = \mathbf{x}], \quad (2.19)$$

où  $1[\cdot]$  est la fonction indicatrice. Lorsque la loi objectif  $P(\mathbf{x})$  n'est pas connue, des solutions sont apportées par les méthodes de Monte Carlo.

**Échantillonnage pondéré** Lorsque l'on ne sait pas échantillonner la loi  $P(\mathbf{x})$ , mais qu'il est possible d'évaluer cette loi en tout point à une constante près, un ensemble de réalisations de  $P(\mathbf{x})$  peut être obtenu par l'algorithme d'échantillonnage pondéré. On suppose qu'il est possible de tirer des échantillons selon une fonction d'importance  $\pi(\mathbf{x})$  dont le support inclut le support de  $P(\mathbf{x})$ . Sous ces hypothèses, on peut écrire :

$$\int P(\mathbf{x})d\mathbf{x} = \int \frac{P(\mathbf{x})}{\pi(\mathbf{x})}\pi(\mathbf{x})d\mathbf{x}. \quad (2.20)$$

S'il est possible de tirer  $N_p$  échantillons indépendants et identiquement distribués  $\{\mathbf{x}(i)\}_{i=1,\dots,N_p}$  de la loi de proposition  $\pi(\mathbf{x})$ , et d'évaluer les poids d'importance associés  $\{w(i)\}_{i=1,\dots,N_p}$ ,  $w(i) = \frac{P(\mathbf{x}(i))}{\pi(\mathbf{x}(i))}$ , alors la densité objectif  $P(\mathbf{x})$  est approchée par :

$$P_{N_p}(\mathbf{x}) = \sum_{i=1}^{N_p} \tilde{w}(i)1[\mathbf{x}(i) = \mathbf{x}], \quad (2.21)$$

où  $\tilde{w}(i)$  désigne le poids d'importance normalisée :

$$\tilde{w}(i) = \frac{w(i)}{\sum_{j=1}^{N_p} w(j)}. \quad (2.22)$$

**Échantillonnage pondéré séquentiel** Pour inférer le système dynamique des objets en mouvement dans

une séquence d'images, on simule  $N_p$  échantillons appelés particules selon la fonction d'importance  $\pi(\mathbf{x}_{0:t}|\mathbf{y}_{1:t})$  correspondant à la distribution de filtrage. La loi objectif est donc définie par :

$$P_{N_p}(\mathbf{x}_{0:t}|\mathbf{y}_{1:t}) = \sum_{i=1}^{N_p} \tilde{w}_t(i) 1[\mathbf{x}_{0:t}(i) = \mathbf{x}_{0:t}]. \quad (2.23)$$

Le but est de construire une solution itérative, qui permet l'estimation de la loi *a posteriori*  $P(\mathbf{x}_{0:t}|\mathbf{y}_{1:t})$  à partir du nuage pondéré de particules approchant  $P(\mathbf{x}_{0:t-1}|\mathbf{y}_{1:t-1})$ , et de la nouvelle observation. Cela est rendu possible en supposant que l'expression de la fonction d'importance est de la forme réursive suivante :

$$\pi(\mathbf{x}_{0:t}|\mathbf{y}_{1:t}) = \pi(\mathbf{x}_0) \prod_{i=1}^t \pi(\mathbf{x}_i|\mathbf{x}_{0:i-1}, \mathbf{y}_{1:i}), \quad (2.24)$$

ce qui implique :

$$\pi(\mathbf{x}_{0:t}|\mathbf{y}_{1:t}) = \pi(\mathbf{x}_t|\mathbf{x}_{0:t-1}, \mathbf{y}_{1:t}) \pi(\mathbf{x}_{0:t-1}|\mathbf{y}_{1:t-1}). \quad (2.25)$$

Chaque nouvelle particule  $\mathbf{x}_{0:t}(i) \sim P(\mathbf{x}_{0:t}|\mathbf{y}_{1:t})$  est définie comme étant la particule à l'instant précédent augmentée d'un nouvel état  $\mathbf{x}_t(i) \sim P(\mathbf{x}_t|\mathbf{x}_{0:t-1}, \mathbf{y}_{1:t})$ . Afin d'obtenir une expression pour la mise à jour des poids, la loi  $P(\mathbf{x}_{0:t}|\mathbf{y}_{1:t})$  est exprimée en fonction de  $P(\mathbf{x}_t|\mathbf{x}_{t-1})$ ,  $P(\mathbf{y}_t|\mathbf{x}_t)$  et  $P(\mathbf{x}_{0:t-1}|\mathbf{y}_{1:t-1})$  en utilisant la règle de Bayes :

$$\begin{aligned} P(\mathbf{x}_{0:t}|\mathbf{y}_{1:t}) &= P(\mathbf{x}_{0:t}|\mathbf{y}_{1:t-1}, \mathbf{y}_t) = \frac{P(\mathbf{x}_{0:t}, \mathbf{y}_t|\mathbf{y}_{1:t-1})}{P(\mathbf{y}_t|\mathbf{y}_{1:t-1})}, \\ &\propto P(\mathbf{y}_t|\mathbf{x}_t) P(\mathbf{x}_t|\mathbf{x}_{t-1}) P(\mathbf{x}_{0:t-1}|\mathbf{y}_{0:t-1}). \end{aligned} \quad (2.26)$$

$P(\mathbf{x}_{0:t-1}|\mathbf{y}_{0:t-1})$  étant connue à l'instant  $t-1$ ,  $P(\mathbf{x}_{0:t}|\mathbf{y}_{1:t})$  n'a besoin que de  $P(\mathbf{y}_t|\mathbf{x}_t)$  et  $P(\mathbf{x}_t|\mathbf{x}_{t-1})$  pour être estimée. Ainsi, on obtient la formule suivante de récursivité des poids :

$$w_t(i) \propto P(\mathbf{y}_t|\mathbf{x}_t(i)) P(\mathbf{x}_t(i)|\mathbf{x}_{t-1}(i)) w_{t-1}(i). \quad (2.27)$$

**Problème de dégénérescence** Choisir des fonctions d'importance de la forme (2.25) conduit à une augmentation de la variance des poids dans le temps (Kong, Liu & Wong 1994). En pratique, cela a pour effet de faire décroître rapidement le nombre de particules significatives. L'effet de cette dégénérescence peut être réduit par l'utilisation d'une fonction d'importance optimale (Doucet, Godsill & Andrieu 2000) qui minimise la variance des poids conditionnellement à  $\mathbf{x}_{0:t-1}$  et  $\mathbf{y}_{1:t}$ . Il est également possible d'ajouter une étape de rééchantillonnage afin de supprimer les particules de faible poids, et d'ajouter des copies des particules de poids fort (Hue 2003).

### Application des MSMC au suivi d'objets intracellulaires en vidéo-microscopie

Le cadre de travail des MSMC étant présenté, nous présentons désormais le cadre applicatif lié au suivi d'objets intracellulaires.

**Espace d'état et modèle dynamique** Smal, Draegestein, Galjart, Niessen & Meijering (2008) décomposent le vecteur d'état  $\mathbf{x}_t$  en trois parties indépendantes :

- un ensemble de descripteurs spatiaux  $\mathbf{x}_t^{dyn}$  (position et vitesse des objets suivis),
- un ensemble de descripteurs morphologiques  $\mathbf{x}_t^{forme}$  (forme des objets suivis),
- l'intensité  $I_t$ .

Cette décomposition permet de factoriser la probabilité de l'évolution d'état en trois termes :

$$P(\mathbf{x}_t | \mathbf{x}_{t-1}) = P(\mathbf{x}_t^{dyn} | \mathbf{x}_{t-1}^{dyn}) P(\mathbf{x}_t^{forme} | \mathbf{x}_{t-1}^{forme}) P(I_t | I_{t-1}). \quad (2.28)$$

L'avantage de cette représentation est le traitement individuel de chacun de ces termes. Souvent, le terme  $P(\mathbf{x}_t^{dyn} | \mathbf{x}_{t-1}^{dyn})$  suit un modèle linéaire gaussien. Ce modèle présente l'avantage de n'avoir qu'une matrice de transition et une matrice de covariance à estimer. Si les objets suivis décrivent plusieurs types de mouvement connus, ces informations peuvent être incorporées directement dans la matrice de covariance. Le terme  $P(\mathbf{x}_t^{forme} | \mathbf{x}_{t-1}^{forme})$  dépend de l'application envisagée. Dans le cas du suivi de l'extrémité des microtubules (Smal, Draegestein, Galjart, Niessen & Meijering 2008), les objets ne se déforment pas. Une distribution gaussienne est alors tout à fait envisageable pour prendre en compte l'évolution de la forme des objets. Cependant, ce n'est pas le cas en général. Si l'évolution de la forme des objets est connue, alors  $P(\mathbf{x}_t^{forme} | \mathbf{x}_{t-1}^{forme})$  doit l'exprimer. Sinon, il est difficile de prendre en compte cette information dans le vecteur d'état. Enfin, dans des conditions idéales, l'intensité à l'intérieur d'un objet est supposée constante. Toutefois, ce n'est pas le cas en vidéo-microscopie à cause du phénomène de photoblanchiment. Smal, Draegestein, Galjart, Niessen & Meijering (2008) choisissent alors d'approcher le terme  $P(I_t | I_{t-1})$  par un modèle exponentiel pour prendre en compte la décroissance de l'intensité au cours du temps.

**Modèle d'observation** Le modèle d'observation  $P(\mathbf{y}_t | \mathbf{x}_t)$  exprime l'adéquation de l'observation par rapport aux objets observés. Si un modèle pour les objets est connu, alors le modèle d'observation peut se résumer à une mesure de distance avec ce modèle. Sinon, n'importe quelle mesure de détection de spots peut être utilisée dans le modèle d'observation. Dans la section 4.1, nous décrivons des méthodes de détection reposant sur le seuillage de l'intensité, des méthodes de décomposition fréquentielle de l'image, des méthodes reposant sur des caractéristiques locales, d'autres méthodes issues de la morphologie mathématique, ou encore des méthodes supervisées.

**Origine et fin des trajectoires** La distribution initiale  $P(\mathbf{x}_0)$  est précisée sur la première image de la séquence. Il est possible d'initialiser le vecteur d'état  $\mathbf{x}_0$  en détectant les objets d'intérêt présents sur la première image. Ensuite, si le nombre d'objets n'est pas constant (ce qui est généralement le cas) et que de nouveaux objets apparaissent au cours de la séquence, il est nécessaire de les prendre en compte à chaque instant. Pour ce faire, il est possible d'effectuer une détection à chaque instant, et de confronter cette détection aux trajectoires déjà calculées. Si de nouveaux objets apparaissent, une nouvelle trajectoire est associée à chacun de ces objets. D'autres approches sont envisageables si la probabilité d'apparition de nouveaux objets est connue (Smal, Draegestein, Galjart, Niessen & Meijering 2008).

Pour mettre un terme à une trajectoire en vidéo-surveillance (Hue, Le Cadre & Pérez 2002), une fois l'objet disparu, les méthodes tentent de le suivre à nouveau pendant plusieurs images, pour ne pas être trop sensible aux imperfections lors de l'acquisition ou aux occlusions. En vidéo-microscopie, si les objets à suivre sont nombreux, cette approche n'est pas envisageable. En effet, le grand nombre d'objets présents dans l'image entraîne le risque de prolonger une trajectoire donnée en se basant sur celle d'un autre objet que celui considéré depuis le début de cette trajectoire. Pour éviter ce problème, des caractéristiques extrêmes (taille maximale par exemple) sont définies pour chaque objet. Si un objet n'est pas conforme à des attributs définis, sa trajectoire est terminée.

**Interactions entre objets suivis** Un des problèmes majeurs lors du suivi d'objets est la confusion entre deux objets très proches spatialement l'un de l'autre. Pour éviter ce problème, Smal, Draegestein, Galjart, Niessen & Meijering (2008) utilisent une fonction pénalisante qui est grande quand deux objets coïncident spatialement. Cette fonction présente l'avantage de garder une prédiction pour chacun des objets. Évidemment, si les objets suivis sont autorisés à fusionner, cette fonction n'a plus de sens

puisqu'elle préserve à tort deux trajectoires. Toutefois, il est facile de considérer les différentes trajectoires une fois l'analyse terminée. Si deux trajectoires présentent une localisation spatiale identique à partir d'un instant défini, alors ces deux trajectoires témoignent de la fusion de deux objets à partir de cet instant.

### Réduction de variance par Rao-Blackwellisation

S'il est possible de séparer le vecteur d'état en deux composantes, dont l'une est indépendante de l'autre, alors la méthode de réduction de la variance par Rao-Blackwellisation peut être utilisée (Casella & Robert 1996). Si l'une de ces deux composantes est estimable de façon optimale, la réduction de variance par Rao-Blackwellisation permet de n'échantillonner que la seconde composante. On suppose que les vecteurs d'état  $\mathbf{x}_t$  sont décomposables en deux groupes  $\mathbf{x}_t^1$  et  $\mathbf{x}_t^2$  tels que :

$$P(\mathbf{x}_t^1 | \mathbf{x}_{t-1}^1, \mathbf{x}_{t-1}^2) = P(\mathbf{x}_t^1 | \mathbf{x}_{t-1}^1), \quad (2.29)$$

ce qui implique la forme suivante pour la densité de prédiction :

$$P(\mathbf{x}_t | \mathbf{x}_{t-1}) = P(\mathbf{x}_t^1, \mathbf{x}_t^2 | \mathbf{x}_{t-1}^1, \mathbf{x}_{t-1}^2) = P(\mathbf{x}_t^1 | \mathbf{x}_{t-1}^1) P(\mathbf{x}_t^2 | \mathbf{x}_{t-1}^1, \mathbf{x}_{t-1}^2). \quad (2.30)$$

Si on suppose également que la distribution *a posteriori* conditionnelle  $P(\mathbf{x}_{0:t}^2 | \mathbf{x}_{0:t}^1, \mathbf{y}_{1:t})$  peut être estimée de façon optimale (par un filtre de Kalman par exemple), comme la distribution objectif s'écrit  $P(\mathbf{x}_{0:t} | \mathbf{y}_{1:t}) = P(\mathbf{x}_{0:t}^2 | \mathbf{x}_{0:t}^1, \mathbf{y}_{1:t}) P(\mathbf{x}_{0:t}^1 | \mathbf{y}_{1:t})$ , le problème se limite à l'estimation de  $P(\mathbf{x}_{0:t}^1 | \mathbf{y}_{1:t})$ . Pour cela, un filtre particulière peut être utilisé. Cette densité étant située dans un espace restreint, la procédure de marginalisation permet de réduire l'effort de recherche. Si on dispose d'un nuage pondéré  $\{\mathbf{x}_{0:t}^1(i), w_t(i)\}_{i=1, \dots, N_1}$  permettant d'estimer la densité

$$P(\mathbf{x}_{0:t}^1 | \mathbf{y}_{1:t}) \propto \sum_{i=1}^{N_1} w_t(i) 1[\mathbf{x}_{0:t}^1(i) = \mathbf{x}_{0:t}^1], \quad (2.31)$$

alors la densité marginale de  $\mathbf{x}_{0:t}^2 | \mathbf{y}_{1:t}$  est approchée par un mélange de lois calculables de façon optimale :

$$P(\mathbf{x}_{0:t}^2 | \mathbf{y}_{1:t}) \approx \sum_{i=1}^{N_1} w_t(i) P(\mathbf{x}_{0:t}^2 | \mathbf{x}_{0:t}^1(i), \mathbf{y}_{1:t}). \quad (2.32)$$

De même, on a :

$$P(\mathbf{x}_t^2 | \mathbf{y}_{1:t}) \approx \sum_{i=1}^{N_1} w_t(i) P(\mathbf{x}_t^2 | \mathbf{x}_{0:t}^1(i), \mathbf{y}_{1:t}). \quad (2.33)$$

L'algorithme résultant de ce processus, appelé filtre particulière "Rao-Blackwellisé" se décompose en trois étapes. Tout d'abord, une étape d'échantillonnage pondéré est réalisée pour générer le nuage pondéré  $\{\mathbf{x}_{0:t}^1(i), w_t(i)\}_{i=1, \dots, N_1}$  permettant d'estimer  $P(\mathbf{x}_{0:t}^1 | \mathbf{y}_{1:t})$ . Puis pour chaque particule  $\mathbf{x}_{0:t}^1(i)$ ,  $P(\mathbf{x}_{0:t}^2 | \mathbf{x}_{0:t}^1(i), \mathbf{y}_{1:t})$  est estimée. Enfin, une étape de rééchantillonnage est effectuée.

Dans leurs travaux, Smal, Meijering, Draegestein, Galjart, Grigoriev, Akhmanova, van Royen, Houtsmuller & Niessen (2008) décomposent le vecteur d'état en trois parties : descripteurs spatiaux, descripteurs morphologiques et intensité, c'est-à-dire  $\mathbf{x}_t = (\mathbf{x}_t^{dyn}, \mathbf{x}_t^{forme}, I_t)^T$ . Ils choisissent de modéliser le photoblanchiment en précisant  $I_t$ . Or,  $I_t$  est indépendant de  $\mathbf{x}_t^{dyn}$  et  $\mathbf{x}_t^{forme}$ . Par ailleurs,  $\mathbf{x}_t^{dyn}$  et  $\mathbf{x}_t^{forme}$  suivent un modèle linéaire gaussien qui peut être traité par une méthode optimale. La méthode de réduction de la variance par Rao-Blackwellisation est donc applicable dans ce cas.

Le suivi individuel d'objets permet de caractériser la dynamique observée dans une séquence d'images. Néanmoins, si le nombre d'objets à suivre est grand, que ces objets se croisent, fusionnent, se

divisent, les méthodes de suivi ne sont pas toujours suffisantes. Si, de plus, l'échantillonnage temporel de la séquence est faible, alors l'application de ces méthodes n'est pas vraiment envisageable. Les approches globales pour l'estimation du trafic offrent alors une alternative possible.

## 2.2 Estimation du trafic par approche globale

Afin de caractériser le trafic global en ville à partir de comptages locaux de véhicules, des méthodes d'estimation de matrices de voyage ont vu le jour dans les années 70. Nous renvoyons le lecteur en annexe A pour une revue de ces méthodes. Des approches similaires pour estimer le trafic de paquets de données sur des réseaux de télécommunications ont été développées dans les années 90. Les travaux présentés aux chapitres 3 et 5 s'appuyant sur cette seconde approche, nous en décrivons le principe général dans la présente section.

### 2.2.1 Modélisation et estimation du trafic sur des réseaux de télécommunications

Afin d'améliorer la qualité de service tout en réduisant leurs coûts, les opérateurs de télécommunications cherchent à mesurer et à prédire le trafic sur leurs réseaux de télécommunications. Ils doivent par conséquent connaître le volume de trafic qui transite depuis un routeur origine vers un routeur destination dans un réseau. Malheureusement, ces informations ne sont pas disponibles directement. Seules des mesures portant sur le volume de données qui se déplace sur chaque lien entre deux routeurs sont faciles à obtenir, par l'intermédiaire du Protocole Simple de Gestion de Réseau (PSGR), ou Protocole Internet. Dès 1994, Vardi (Vardi 1994, Vardi 1996) propose d'estimer l'intensité du trafic entre routeurs considérés deux à deux sur un réseau de télécommunications à partir des mesures effectuées sur les liens du réseau, provenant du PSGR. Cette méthode est très proche de l'estimation des matrices OD sur des réseaux de trafic routier (annexe A). Vardi introduit le concept de "tomographie de réseaux" par mimétisme avec la tomographie, bien établie en imagerie médicale.

L'estimation du trafic sur des réseaux de télécommunications exploite une modélisation sous forme de graphe : les routeurs par lesquels les paquets de données circulent sont associés à des sommets, et les liens dirigés entre ces routeurs sont associés à des arêtes. Deux réseaux de télécommunications simples sont présentés sur la figure 2.2. Soit  $\mathcal{G}_{trafic} = (\mathcal{V}, \mathcal{E})$  le graphe associé au réseau de télécommunications considéré, où  $\mathcal{V} = \{\vartheta_i\}_{i=1, \dots, n}$  représente l'ensemble des  $n$  sommets et  $\mathcal{E} = \{\varphi_e\}_{e=1, \dots, r}$  l'ensemble des  $r$  arêtes. Soit  $y_{t,e}^{arête} \in \mathbb{N}$  le volume de trafic mesuré sur l'arête  $\varphi_e$  à l'instant  $t$ . Les données correspondent au volume de trafic mesuré sur chacun des liens du réseau aux  $T$  instants, formalisés par les vecteurs  $\mathbf{y}_t^{arête} = (y_{t,1}^{arête}, \dots, y_{t,r}^{arête})^T, t = 1, \dots, T$ . Dans ce cadre, les trajectoires complètes des paquets de données sont caractérisées par leur sommet origine et leur sommet destination sur le graphe  $\mathcal{G}_{trafic}$ , en utilisant le concept de *paires origine-destination*.

**Définition 2.1.** On appelle *paire Origine-Destination (OD)* un couple de sommets extraits de l'ensemble  $\mathcal{V}$  décrivant le trajet d'un paquet de données par son sommet origine et son sommet destination sur le graphe  $\mathcal{G}_{trafic}$ .

En considérant toutes les paires possibles de sommets dans  $\mathcal{V}$ , on obtient  $c = n(n-1)$  paires origine-destination possibles. Soit  $\{\mathcal{z}_j\}_{j=1, \dots, c}$  l'ensemble des paires OD définies sur le graphe  $\mathcal{G}_{trafic}$ . Soit  $v_{t,j}^{OD} \in \mathbb{R}_+$  le nombre de messages transmis sur la paire origine-destination  $\mathcal{z}_j$  à l'instant  $t$ . On définit  $\mathbf{v}_t^{OD} = (v_{t,1}^{OD}, \dots, v_{t,c}^{OD})^T$  comme le vecteur OD à l'instant  $t, t = 1, \dots, T$ , caractérisant le trafic global sur le graphe  $\mathcal{G}_{trafic}$ . Soit  $\mathbf{A}$  la matrice de routage de dimension  $r \times c$ . Cette matrice précise clairement les liens utilisés par les données pour connecter un sommet origine à un sommet destination. On considère

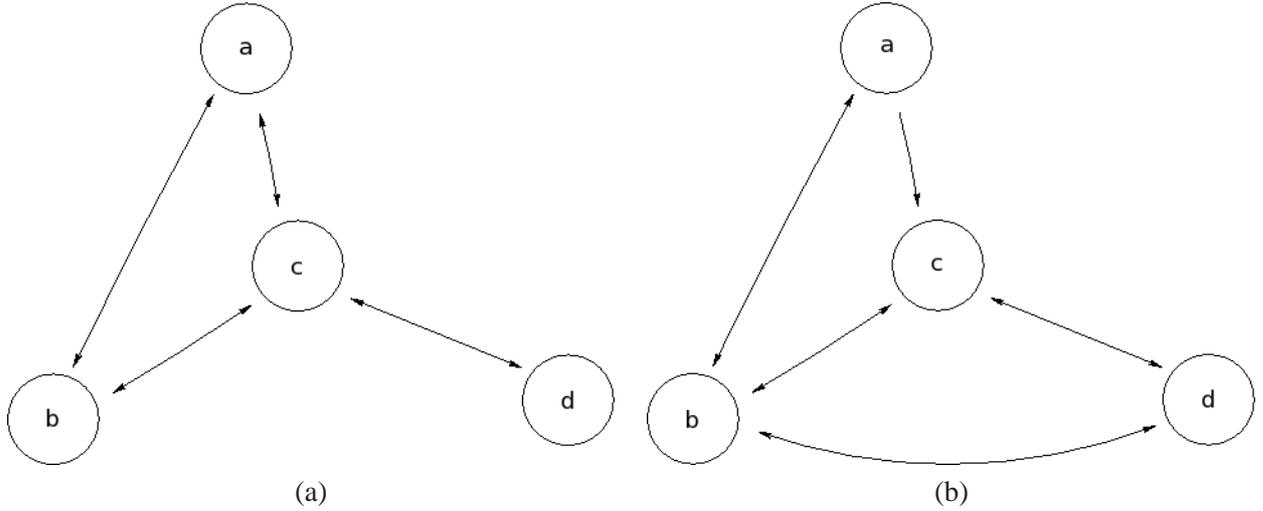


FIGURE 2.2: (a) Réseau de télécommunications constitué de 4 sommets et de 8 liens ; (b) réseau de télécommunications constitué de 4 sommets et de 9 liens.

		Paires OD											
		ab	ac	ad	ba	bc	bd	ca	cb	cd	da	db	dc
Arêtes	$a \rightarrow b$	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	$a \rightarrow c$	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	$b \rightarrow a$	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	$b \rightarrow c$	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	$c \rightarrow a$	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
	$c \rightarrow b$	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
	$c \rightarrow d$	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
	$d \rightarrow c$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1

TABLE 2.2: Éléments de la matrice de routage pour le réseau de la figure 2.2 (a).

le modèle suivant :

$$\mathbf{y}_t^{\text{arête}} = \mathbf{A}\mathbf{v}_t^{\text{OD}}, \quad t = 1, \dots, T. \quad (2.34)$$

Dans certains cas, les utilisateurs ne souhaitent pas estimer le trafic à chaque instant, mais sur l'ensemble de la période pendant laquelle les données sont collectées. Les données considérées correspondent alors à la moyenne sur l'ensemble de cette période :

$$\mathbf{y}^{\text{arête}} = \frac{1}{T} \sum_{t=1}^T \mathbf{y}_t^{\text{arête}}, \quad (2.35)$$

et le modèle devient :

$$\mathbf{y}^{\text{arête}} = \mathbf{A}\mathbf{v}^{\text{OD}}. \quad (2.36)$$

Il existe deux catégories de routage possibles. La première suppose un routage unique par paire OD. Dans ce cas, la matrice de routage est binaire et les éléments  $a_e^j$  de cette matrice sont égaux à 0 ou à 1 suivant que le lien  $\varphi_e$  appartient ou non au chemin associé à la paire OD  $\mathcal{Z}_j$ . La matrice de routage définie pour le réseau simple illustré sur la figure 2.2 (a) est présentée dans le tableau 2.2. Il faut noter

que le chemin le plus court n'est pas forcément choisi pour chaque paire OD. En effet, la paire OD  $bd$  emprunte les liaisons  $b \rightarrow a$ ,  $a \rightarrow c$  et  $c \rightarrow d$ .

La deuxième catégorie de routage considère plusieurs chemins possibles pour chaque paire OD. Vardi (1996) propose une matrice de routage de type markovien. Les éléments  $\alpha_e^j \in \mathbb{R}$  de la matrice de routage gardent la même dimension, mais expriment la probabilité conditionnelle qu'un paquet de données ayant pour paire OD  $z_j$  transite par le lien  $\varphi_e$ , conditionnellement au sommet par lequel il vient de passer. En d'autres termes, le routage des données ne dépend pas du chemin par lequel ces données sont arrivées en ce sommet, mais de la position actuelle des données. Par conséquent, chaque colonne de la matrice de routage  $\mathbf{A}$  correspond à un réseau dirigé composé de  $n$  sommets et de  $r$  liens, avec des probabilités associées à chaque lien. Si la probabilité de transiter sur un lien est nulle, alors ce lien est exclu du diagramme associé au réseau. De plus, la matrice de routage est supposée telle qu'un paquet ne peut passer qu'une seule fois par un sommet. Pour chaque paire OD  $z_j$  entre les sommets  $\vartheta_{n_1}$  et  $\vartheta_{n_2}$ , la colonne correspondante de la matrice  $\mathbf{A}$  est un ensemble de chemins reliant le sommet  $\vartheta_{n_1}$  au sommet  $\vartheta_{n_2}$ . La matrice de routage markovienne associée au graphe présenté sur la figure 2.2 (b) est présentée dans le tableau 2.3. Les 12 colonnes de cette matrice correspondent aux 12 diagrammes markoviens présentés sur la figure 2.3. Il est aussi envisageable de considérer une matrice de routage qui évolue au cours du temps.

In fine, le but est d'estimer  $\mathbf{v}_t^{OD}$  (dimension  $c$ ) à partir de  $\mathbf{y}_t^{arête}$  (dimension  $r$ ) et  $\mathbf{A}$  (dimension  $r \times c$ ), ou  $\mathbf{v}^{OD}$  à partir des moyennes temporelles  $\mathbf{y}^{arête}$  et  $\mathbf{A}$ . Le nombre  $c$  de paires OD étant largement supérieur à  $r$ , le problème est sous-déterminé. Par conséquent, il faut introduire des contraintes d'optimisation. Il y a deux catégories de méthodes possibles : les méthodes statistiques et les méthodes pénalisantes.

### Méthodes pénalisantes pour l'estimation du trafic sur les paires OD

Le nombre de solutions du système d'équations (2.34) est infini. Pour déterminer une solution convenable, différentes pénalisations ont été envisagées.

**Inverse généralisée** Une méthode classique dans le cas de systèmes linéaires sous-déterminés est de choisir la solution de norme  $L_2$  minimale, soit encore :

$$\min_{\mathbf{v}^{OD}} \|\mathbf{v}^{OD}\|^2 \quad \text{sous la contrainte } \mathbf{y}^{arête} = \mathbf{A}\mathbf{v}^{OD}. \quad (2.37)$$

La solution de ce problème d'optimisation convexe avec des contraintes linéaires est de la forme :

$$\hat{\mathbf{v}}^{OD} = \mathbf{A}^T(\mathbf{A}\mathbf{A}^T)^{-1}\mathbf{y}^{arête}. \quad (2.38)$$

Cette solution permet d'estimer le trafic sur les paires OD à chaque instant  $t = \{1, \dots, T\}$ , ou d'estimer le trafic moyen  $\mathbf{v}^{OD}$  au cours du temps en considérant la moyenne temporelle  $\mathbf{y}^{arête}$  des comptages. Cependant, minimiser la norme  $L_2$  pénalise les configurations où les volumes de trafic sont distribués de manière hétérogène sur les paires OD. Sur des réseaux de télécommunications, il est fréquent d'observer 1000 fois plus de trafic sur certaines paires OD que sur d'autres. La minimisation de la norme  $L_2$  va, dans ce cas, négliger les paires OD pour lesquelles il y a peu de trafic. De plus, la non négativité des composantes de  $\mathbf{v}_t^{OD}$  ou de  $\mathbf{v}^{OD}$  n'est plus assurée.

**Modèles gravitationnels** Les modèles gravitationnels sont bien connus en réseaux de télécommunications puisqu'ils ont été utilisés pour concevoir l'architecture des réseaux téléphoniques. Ils sont aussi bien adaptés pour estimer le trafic sur des paires OD dans un réseau de télécommunications, ou dans un réseau de transport routier (Erlander, Nguyen & Stewart 1979). Les modèles gravitationnels supposent que les origines et les destinations sont indépendantes. Par conséquent, le volume  $v_j^{OD}$  de trafic sur la

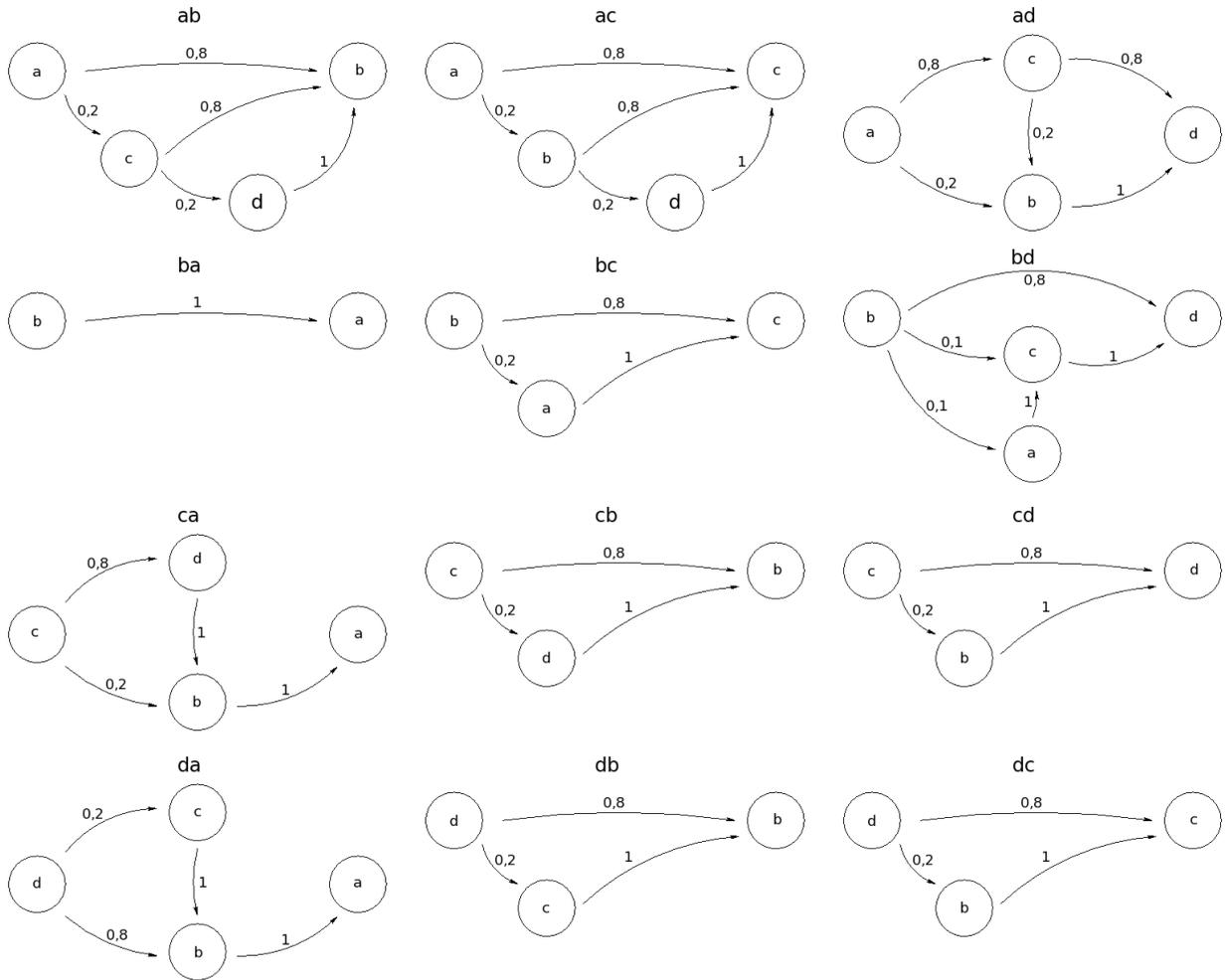


FIGURE 2.3: Diagrammes markoviens correspondant aux paires OD pour le réseau de télécommunications présenté sur la figure 2.2 (b), pour lequel le routage markovien est spécifié par la matrice présentée dans le tableau 2.3.

		Paires OD											
		ab	ac	ad	ba	bc	bd	ca	cb	cd	da	db	dc
Arêtes	$a \rightarrow b$	0,8	0,2	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	$a \rightarrow c$	0,2	0,8	0,8	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	$b \rightarrow a$	0	0	0	1	0,2	0,1	1	0	0	1	0	0
	$b \rightarrow c$	0	0,8	0	0	0,8	0,1	0	0	0	0	0	1
	$b \rightarrow d$	0	0,2	1	0	0	0,8	0	0	1	0	0	0
	$c \rightarrow b$	0,8	0	0,2	0	0	0	0,8	0,8	0,2	1	1	0
	$c \rightarrow d$	0,2	0	0,8	0	0	1	0,2	0,2	0,8	0	0	0
	$d \rightarrow b$	1	0	0	0	0	0	1	0,1	0	0,8	0,8	0,2
	$d \rightarrow c$	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0,2	0,8

TABLE 2.3: Éléments de la matrice de routage markovienne pour le réseau de la figure 2.2 (b).

paire OD  $z_j$  d'origine  $\vartheta_{n_1}$  et de destination  $\vartheta_{n_2}$  est proportionnel au produit du volume total  $\mathcal{O}_{\vartheta_{n_1}}$  de trafic ayant pour origine le sommet  $\vartheta_{n_1}$ , et du volume total  $\mathcal{D}_{\vartheta_{n_2}}$  de trafic ayant pour destination le sommet  $\vartheta_{n_2}$  :

$$v_j^{OD} \propto \mathcal{O}_{\vartheta_{n_1}} \times \mathcal{D}_{\vartheta_{n_2}}. \quad (2.39)$$

Dans le cas d'un réseau téléphonique, le trafic total ayant  $\vartheta_{n_1}$  pour origine, est proportionnel à la population dans cette zone. Dans le cas d'un réseau de télécommunications,  $\mathcal{O}_{\vartheta_{n_1}}$  et  $\mathcal{D}_{\vartheta_{n_2}}$  sont obtenus facilement à partir des mesures SNMP. Les modèles gravitationnels sont donc des modèles relativement simples pour estimer les volumes OD dans un réseau. Ils présentent l'avantage de ne reposer sur aucune connaissance *a priori*. De plus, l'information de routage n'est pas nécessaire lors de leur mise en oeuvre. Leur point faible est lié à l'hypothèse d'indépendance entre origines et destinations. Toutefois, ces modèles permettent d'estimer en première approximation le vecteur  $\mathbf{v}^{OD}$ , qui peut ensuite être utilisé pour initialiser une autre méthode d'estimation plus sophistiquée (Vaton, Bedo & Gravey 2005).

**Généralisation des modèles gravitationnels** Une autre modélisation, toujours sous les mêmes hypothèses d'indépendance entre origines et destinations, a été formulée dans un cadre plus général par Zhang, Roughan, Lund & Donoho (2003). Dans ce cas, les auteurs proposent d'analyser l'information mutuelle  $\mathcal{I}(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2})$  entre origines et destinations. Soit  $P(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2})$  la probabilité qu'une unité de trafic (en général, un octet) se déplace de l'origine  $\vartheta_{n_1}$  vers la destination  $\vartheta_{n_2}$ . L'information mutuelle  $\mathcal{I}(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2})$  est définie comme :

$$\mathcal{I}(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2}) = \sum_{\vartheta_{n_1}=1}^n \sum_{\vartheta_{n_2}=1}^n P(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2}) \log \left( \frac{P(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2})}{P(\vartheta_{n_1})P(\vartheta_{n_2})} \right), \quad (2.40)$$

$P(\vartheta_{n_1}) = \sum_{\vartheta_{n_2}=1}^n P(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2})$  (respectivement  $P(\vartheta_{n_2}) = \sum_{\vartheta_{n_1}=1}^n P(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2})$ ) est la probabilité qu'une unité de trafic ait pour origine  $\vartheta_{n_1}$  (respectivement la destination  $\vartheta_{n_2}$ ). L'information mutuelle est liée à la divergence de Kullback-Leibler entre la distribution jointe  $P(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2})$  et le produit des deux distributions  $P(\vartheta_{n_1})$  et  $P(\vartheta_{n_2})$ . Par exemple, si les origines et les destinations sont complètement indépendantes, alors  $\mathcal{I}(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2}) = 0$ . Minimiser la dépendance entre origines et destinations revient donc à minimiser l'information mutuelle  $\mathcal{I}(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2})$ .

D'autre part, soit  $V_{trafic}$  le volume total de trafic sur le réseau (somme du trafic sur les liens du réseau de télécommunications). Le volume de trafic moyen  $\bar{V}_e$  sur le lien  $\varphi_e$  est égal à :

$$\bar{V}_e = V_{trafic} \sum_{\vartheta_{n_1}=1}^n \sum_{\vartheta_{n_2}=1}^n P(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2} | \varphi_e) P(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2}), \quad (2.41)$$

où  $P(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2} | \varphi_e)$  désigne la probabilité qu'une unité de trafic se déplaçant de  $\vartheta_{n_1}$  vers  $\vartheta_{n_2}$  passe par le lien  $\varphi_e$ . La divergence entre les comptages SNMP  $y_e^{arête}$  et la valeur moyenne  $\bar{V}_e$  est mesurée par la distance quadratique définie comme :

$$\sum_{e=1}^r \left( y_e^{arête} - V_{trafic} \sum_{\vartheta_{n_1}=1}^n \sum_{\vartheta_{n_2}=1}^n P(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2} | \varphi_e) P(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2}) \right)^2. \quad (2.42)$$

Finalement, l'estimation des probabilités OD  $P(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2})$  revient à minimiser les deux critères :

$$\min_{P(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2})} \sum_{e=1}^r \left( y_e^{arête} - V_{trafic} \sum_{\vartheta_{n_1}=1}^n \sum_{\vartheta_{n_2}=1}^n P(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2} | \varphi_e) P(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2}) \right)^2 + \alpha_{gravité} \mathcal{I}(\vartheta_{n_1}, \vartheta_{n_2}) \quad (2.43)$$

où  $\alpha_{gravité}$  est un coefficient qui pondère l'importance donnée au deuxième critère par rapport au premier. Le premier critère du système d'équations (2.43) peut être vu comme un terme d'attache aux données mesurant la divergence entre les mesures SNMP  $y_e^{arête}$  et leur valeur moyenne. Le second critère de ce système d'équations mesure la dépendance entre origines et destinations. Il s'apparente à une contrainte *a priori* sur le trafic estimé sur les paires OD. Cette méthode donne des résultats plus précis que l'utilisation simple des modèles gravitationnels, qui peuvent être vus comme un cas particulier de cette modélisation. Néanmoins, les informations de routage sur le réseau sont indispensables, et pas toujours accessibles.

### Méthodes statistiques pour l'estimation du trafic sur les paires OD

Il est possible d'adopter un point de vue bayésien en assimilant le trafic sur les paires OD à des variables aléatoires. On peut ainsi considérer des lois *a priori* (Poisson (Vardi 1996), Gaussienne (Cao, Davis, Vander Wiel & Yu 2000, Gunnar, Johansson & Telkamp 2004), Pareto (Gustavo, De Veciana & Evans 2004), mélange de distributions (Chen et al. 2007), ...) sur ces variables. L'estimation du trafic sur les paires OD revient alors à estimer les paramètres de ces lois à partir des contraintes  $\mathbf{y}_t^{arête} = \mathbf{A}\mathbf{v}_t^{OD}$ . La méthode des moments (d'ordre 1 et 2) et la méthode du maximum de vraisemblance permettent d'estimer ces paramètres.

**Estimation à partir des moments d'ordre 1 et 2** Afin d'accroître le nombre de relations entre les volumes de trafic moyens  $\mathbf{y}^{arête}$  et la moyenne temporelle  $\mathbf{v}^{OD}$  du trafic sur les paires OD, il est possible de prendre en compte non seulement les moyennes des volumes (équation fondamentale de la tomographie de réseaux), mais aussi leurs variances et covariances. Soit  $\Sigma_{\mathbf{y}^{arête}}$  la matrice de variance/covariance des volumes de trafic et  $\Sigma_{\mathbf{v}^{OD}}$  la matrice de variance/covariance du trafic sur les paires OD. D'après l'équation (2.34), on a :

$$\mathbf{y}_t^{arête} = \mathbf{A}\mathbf{v}_t^{OD}. \quad (2.44)$$

On en déduit que :

$$\Sigma_{\mathbf{y}^{arête}} = \mathbf{A}\Sigma_{\mathbf{v}^{OD}}\mathbf{A}^T, \quad (2.45)$$

sachant que  $\Sigma_{\mathbf{v}^{OD}}$  n'est pas calculable, puisque  $\{\mathbf{v}_t^{OD}\}_{t=1,\dots,T}$  et  $\mathbf{v}^{OD}$  sont inconnus. En revanche, si les volumes de trafic sur les paires OD sont supposés indépendants et leur distribution est supposée connue, alors une seule valeur de  $\mathbf{v}^{OD}$  peut être obtenue à partir des moyennes, variances et covariances des volumes de trafic. Habituellement, on considère un modèle de covariance qui s'appuie sur une loi puissance de paramètre  $\gamma$  (Cao, Davis, Vander Wiel & Yu 2000) :

$$\Sigma_{\mathbf{v}^{OD}} = \zeta \text{diag}((v_1^{OD})^\gamma, \dots, (v_c^{OD})^\gamma), \quad (2.46)$$

où  $\zeta$  désigne une constante positive et  $1 \leq \gamma \leq 2$  ( $\gamma = 1$  si l'hypothèse de Poisson est émise pour le trafic sur les paires OD (Vardi 1996)). À partir de ces hypothèses, les valeurs moyennes  $\mathbf{v}^{OD}$  du trafic sur les paires OD sont solutions du système non linéaire d'équations suivant :

$$\begin{cases} \mathbf{y}^{arête} &= \mathbf{A}\mathbf{v}^{OD}, \\ \Sigma_{\mathbf{y}^{arête}} &= \zeta \mathbf{A} \text{diag}((v_1^{OD})^\gamma, \dots, (v_c^{OD})^\gamma) \mathbf{A}^T. \end{cases} \quad (2.47)$$

Les relations de variance/covariance sur les volumes de trafic permettent d'établir  $\frac{n(n+1)}{2}$  équations. Notons que cette approche est malgré tout limitée. Tout d'abord, nous supposons l'existence d'une relation entre moyennes et variances, une hypothèse relativement forte, pas toujours garantie. Par ailleurs,

on exige une stationnarité au sens large du trafic sur les paires OD. En fait, pour les échelles de temps considérées (mesures SNMP toutes les 5 ou 10 minutes), le trafic n'est pas vraiment stationnaire mais plutôt cyclostationnaire (Soule, Nucci, Cruz, Leonardi & Taft 2004). En d'autres termes, les moyennes et variances/covariances sont périodiques dans le temps, et il y a peu de chances que la période du trafic soit égale à la période des mesures.

**Estimation par algorithme EM** Dans ce contexte, l'estimation du trafic sur les paires OD est analogue à un problème de données manquantes, puisque les observations  $\mathbf{y}_t^{arête}$  dépendent des données  $\mathbf{v}^{OD}$  que l'on souhaite estimer. Dans ce type de problème, les données manquantes sont considérées comme des variables aléatoires, et les observations sont généralement une fonction aléatoire des données manquantes. Souvent, la distribution de probabilité des données manquantes appartient à une famille paramétrique (Poisson, gaussienne, ...).

L'estimation par maximum de vraisemblance dans le cas de données manquantes est efficacement obtenue par l'algorithme Espérance-Maximisation (EM) (Dempster, Laird & Rubin 1977). Cao, Davis, Vander Wiel & Yu (2000) proposent d'estimer le trafic sur les paires OD dans le cas gaussien par un algorithme EM, tandis que Vardi (1996) propose une estimation du même type dans le cas d'une distribution de Poisson.

Soit  $\mathbf{v}_{1:T}^{OD} = \{\mathbf{v}_t^{OD}\}_{t=1,\dots,T}$  les variables cachées,  $\mathbf{y}_{1:T}^{arête} = \{\mathbf{y}_t^{arête}\}_{t=1,\dots,T}$  les observations et  $\Theta$  les paramètres de la loi supposée pour le trafic sur les paires OD. Dans le cas d'une loi de Poisson,  $\Theta$  désigne le vecteur moyen  $\lambda_{v,od}$ . Dans le cas d'une loi gaussienne,  $\Theta$  est le vecteur moyen  $\mu_{v,od}$  et la matrice de covariance  $\Sigma_{v,od}$ . La vraisemblance des observations  $P(\mathbf{y}_{1:T}^{arête}, \Theta)$  définie comme

$$P(\mathbf{y}_{1:T}^{arête}, \Theta) = \sum_{\mathbf{v}_{1:T}^{OD}} P(\mathbf{v}_{1:T}^{OD}, \mathbf{y}_{1:T}^{arête}; \Theta) \quad (2.48)$$

n'est pas calculable, puisqu'il faut considérer toutes les valeurs possibles de  $\mathbf{v}_{1:T}^{OD}$ . Pour cela, il faudrait identifier la vraisemblance jointe  $P(\mathbf{v}_{1:T}^{OD}, \mathbf{y}_{1:T}^{arête}; \Theta)$  de  $\mathbf{v}_{1:T}^{OD}$  et  $\mathbf{y}_{1:T}^{arête}$  par rapport à toutes les valeurs possibles de  $\mathbf{v}_{1:T}^{OD}$ . Plutôt que de maximiser directement la vraisemblance des observations, l'algorithme EM permet d'atteindre un maximum local de la fonction de vraisemblance de manière itérative. La mise en oeuvre nécessite l'introduction d'une fonction intermédiaire  $Q$  pour représenter l'espérance de la probabilité jointe connaissant les observations :

$$Q(\Theta, \Theta') = \mathbb{E}(\log(P(\mathbf{v}_{1:T}^{OD}, \mathbf{y}_{1:T}^{arête}, \Theta | \mathbf{y}_{1:T}^{arête}; \Theta'))), \quad (2.49)$$

où  $\Theta$  désigne le paramètre de la log-vraisemblance jointe  $\log(P(\mathbf{v}_{1:T}^{OD}, \mathbf{y}_{1:T}^{arête}, \Theta))$ , et  $\Theta'$  désigne le paramètre de la distribution de  $\mathbf{v}_{1:T}^{OD}$  sachant  $\mathbf{y}_{1:T}^{arête}$ . L'algorithme EM consiste ensuite à maximiser itérativement  $Q(\Theta, \Theta')$  par rapport au paramètre  $\Theta$ . Plus précisément, si  $\Theta^{(k)}$  est le paramètre estimé à l'itération précédente, alors la nouvelle estimée  $\Theta^{(k+1)}$  est donnée par :

$$\Theta^{(k+1)} = \max_{\Theta} Q(\Theta, \Theta^{(k)}). \quad (2.50)$$

Chaque itération de l'algorithme est décomposée en deux étapes, l'étape *Espérance* (E) et l'étape *Maximisation* (M). L'étape E consiste à calculer la distribution de  $\mathbf{v}_{1:T}^{OD}$  étant donnés  $\mathbf{y}_{1:T}^{arête}$  et  $\Theta^{(k)}$ . Cette étape dépend du modèle statistique choisi. L'étape M consiste à maximiser la nouvelle expression de  $Q(\Theta, \Theta^{(k)})$  par rapport à  $\Theta$ . Dans certains cas, cette étape est menée de manière analytique. Dans d'autres cas, il est nécessaire d'utiliser des méthodes numériques. Une fois les deux étapes E et M réalisées, une nouvelle valeur  $\Theta^{(k+1)}$  est obtenue, et le processus est mené itérativement jusqu'à convergence.

**Estimation par l'algorithme des Projections Convexes (PC)** Boyd, Meloche & Vardi (1999) proposent d'utiliser la méthode des projections convexes (Bregman 1965) pour estimer le trafic sur les paires OD à partir des moments d'ordre 1 et 2, en supposant qu'il suit une loi de Poisson. Cette hypothèse se traduit par l'énoncé des contraintes :

$$\text{cov}(y_e^{\text{arête}}, y_{e'}^{\text{arête}}) = \sum_{j=1}^c a_e^j a_{e'}^j v_j^{\text{arête}}, \quad 1 \leq e \leq e' \leq r, \quad (2.51)$$

où  $\text{cov}(y_e^{\text{arête}}, y_{e'}^{\text{arête}})$  désigne la covariance entre les éléments  $e$  et  $e'$  de la matrice  $\mathbf{y}^{\text{arête}}$ . En combinant les équations (2.51) au système (2.34), nous disposons de  $\frac{r(r+3)}{2}$  équations linéaires auxquelles il convient d'ajouter la contrainte de positivité sur les éléments de  $\mathbf{v}^{\text{OD}}$ . D'une manière plus compacte, nous avons :

$$\begin{pmatrix} \mathbf{y}^{\text{arête}} \\ \mathbf{s}_{\text{cov}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \mathbf{A} \\ \mathbf{B} \end{pmatrix} \mathbf{v}^{\text{OD}}, \quad \text{sous la contrainte } v_j^{\text{OD}} \geq 0, \quad \forall j = 1, \dots, c, \quad (2.52)$$

où  $\mathbf{s}_{\text{cov}}$  est la matrice de covariance réécrite comme un vecteur de longueur  $\frac{r(r+1)}{2}$ , et  $\mathbf{B}$  est une matrice de dimension  $\frac{r(r+1)}{2} \times c$  où la colonne  $n^\circ(er + e' + 1 - \frac{i(e+1)}{2})$  est définie comme le produit, élément par élément, des lignes  $e$  et  $e'$  de la matrice  $\mathbf{A}$ .

La méthode PC suppose qu'il existe un nombre  $N_\chi$  d'ensembles convexes  $\{\chi_i\}_{i=1, \dots, N_\chi}$ , tels que  $\mathbf{v}^{\text{OD}}$  est situé dans chacun de ces ensembles, c'est-à-dire  $\mathbf{v}^{\text{OD}} \in \chi_i, 1 \leq i \leq N_\chi$ , et tel que :

$$\mathbf{v}^{\text{OD}} \in \chi_0 = \bigcap_{i=1}^{N_\chi} \chi_i, \quad (2.53)$$

en supposant que  $\chi_0$  n'est pas un ensemble vide. Chaque ensemble convexe  $\chi_i$  est associé à un opérateur de projection  $\Pi_i$  tel que :

$$\Pi_i(\mathbf{x}) = \begin{cases} \text{vecteur de } \chi_i \text{ le plus proche de } \mathbf{x} & \text{si } \mathbf{x} \notin \chi_i, \\ \mathbf{x} & \text{sinon.} \end{cases} \quad (2.54)$$

La méthode PC calcule la séquence  $\{\mathbf{v}^{\text{OD}(n)}\} = \{\Pi^{(n)} \widehat{\mathbf{v}}^{\text{OD}(0)}\}$ , où  $\Pi^{(n)} = \Pi_n \circ \Pi_{n-1} \circ \dots \circ \Pi_1$ , et  $\widehat{\mathbf{v}}^{\text{OD}(0)}$  est un point de départ arbitraire qui converge vers un point dans  $\chi_0$ . Pour adapter cette méthode à la tomographie de réseaux, trois groupes de contraintes sont identifiés : un groupe portant sur les volumes de trafic moyen, un autre groupe portant sur la covariance des volumes de trafic, et un dernier groupe portant sur la non négativité des volumes de trafic. On sait que la contrainte sur les volumes de trafic moyen est vraie (équation fondamentale de la tomographie de réseaux), tandis que la contrainte sur la covariance des volumes de trafic dépend de la distribution supposée des volumes de trafic. Avec cette connaissance, séparer les contraintes portant sur la moyenne et la covariance permet de privilégier les équations relatives à la moyenne des volumes de trafic, plutôt que celles exprimées par la covariance. Les ensembles de contraintes pour des équations linéaires sont des hyper-plaques (hyper-plans très fins) formées par deux sous-espaces qui s'intersectent. Si  $\varepsilon_p$  représente la moitié de l'épaisseur de l'hyper-plaque centrée au plan  $\mathbf{a}_e \mathbf{v} = y_e^{\text{arête}}$ , où  $\mathbf{a}_e$  désigne la  $e^{\text{ième}}$  ligne de la matrice  $\mathbf{A}$ , alors l'hyper-plaque est l'intersection des deux ensembles suivants :

$$\begin{aligned} \chi_a &= \{\mathbf{v}^{\text{OD}} \mid (\mathbf{a}_e \mathbf{v}^{\text{OD}} - y_e^{\text{arête}}) \leq \varepsilon_p\}, \\ \chi_b &= \{\mathbf{v}^{\text{OD}} \mid (y_e^{\text{arête}} - \mathbf{a}_e \mathbf{v}^{\text{OD}}) \leq \varepsilon_p\}. \end{aligned} \quad (2.55)$$

Les opérateurs de projection correspondants sont :

$$\begin{aligned} \Pi_a(\mathbf{x}) &= \begin{cases} \mathbf{x} + \frac{y_e^{\text{arête}} + \varepsilon_p - \mathbf{a}_e \mathbf{x}}{\mathbf{a}_e \mathbf{a}_e} & \text{si } \mathbf{a}_e \mathbf{x} - y_e^{\text{arête}} > \varepsilon_p, \\ \mathbf{x} & \text{sinon,} \end{cases} \\ \Pi_b(\mathbf{x}) &= \begin{cases} \mathbf{x} + \frac{y_e^{\text{arête}} + \varepsilon_p - \mathbf{a}_e \mathbf{x}}{\mathbf{a}_e \mathbf{a}_e} & \text{si } y_e^{\text{arête}} - \mathbf{a}_e \mathbf{x} > \varepsilon_p, \\ \mathbf{x} & \text{sinon.} \end{cases} \end{aligned} \quad (2.56)$$

La projection sur l'hyper-plaque est donc  $\Pi_a \Pi_b$ . L'opérateur de projection pour l'ensemble des nombres non négatifs remplace simplement toute valeur négative par 0. Pour résoudre l'équation (2.47), on attribue  $\varepsilon_{moy}$  et  $\varepsilon_{cov}$  comme épaisseur de plaque aux deux équations suivantes :

$$\begin{aligned} \mathbf{A}\hat{\mathbf{v}}^{OD} &= \mathbf{y}^{arête}, \\ \mathbf{B}\hat{\mathbf{v}}^{OD} &= \mathbf{s}_{cov}. \end{aligned} \quad (2.57)$$

Les équations relatives aux moyennes des volumes de trafic sont exactes par rapport à  $\mathbf{v}^{OD}$  ( $\mathbf{A}\hat{\mathbf{v}}^{OD} = \mathbf{y}^{arête}$  est vrai). En revanche, les équations relatives à la covariance ( $\mathbf{B}\hat{\mathbf{v}}^{OD} = \mathbf{s}_{cov}$ ) dépendent de l'hypothèse qui est faite pour le trafic sur les paires OD (dans ce cas, loi de Poisson). Or, bien qu'elle soit adaptée dans certains cas, cette hypothèse n'est jamais vraie. C'est pourquoi  $\varepsilon_{moy} > \varepsilon_{cov}$ .

**Estimation par méthodes séquentielles de Monte Carlo (MSMC)** Les MSMC permettent aussi de traiter un problème de données manquantes. À la différence de l'algorithme EM qui permet d'estimer les paramètres statistiques du trafic sur les paires OD, les MSMC sont capables, par simulation, de générer un ensemble de vecteurs suivant la distribution de  $\mathbf{v}^{OD}$  (Tebaldi & West 1998). L'autre intérêt des MSMC est leur flexibilité et la possibilité de considérer en grand nombre des paires OD.

Le but est de simuler la loi conditionnelle  $P(\mathbf{v}^{OD} | \mathbf{y}^{arête})$  avec la contrainte  $\mathbf{y}^{arête} = \mathbf{A}\mathbf{v}^{OD}$ , où  $\mathbf{A}$  désigne la matrice de routage. Les observations sont les vecteurs de volume de trafic  $\mathbf{y}^{arête}$ . La distribution *a priori* du trafic sur les paires OD est de la forme :

$$P(\mathbf{v}^{OD}) = \prod_{j=1}^c P(v_j^{OD}). \quad (2.58)$$

La matrice de routage  $\mathbf{A}$  est de rang plein sur les lignes  $r$ . Après quelques combinaisons linéaires effectuées sur les lignes de  $\mathbf{A}$  et quelques permutations sur les colonnes de  $\mathbf{A}$ , il est possible d'exprimer  $\mathbf{A}$  de la manière suivante :

$$\mathbf{A} = [\mathbf{A}_1 | \mathbf{A}_2], \quad (2.59)$$

où  $\mathbf{A}_1$  désigne une matrice inversible de dimension  $r \times r$  et  $\mathbf{A}_2$  désigne une matrice de dimension  $r \times (c - r)$ . Naturellement, les mêmes combinaisons linéaires doivent être appliquées aux composantes de  $\mathbf{y}^{arête}$ , et un réordonnancement des paires OD doit également être effectué :  $\mathbf{v}^{OD} = ((\mathbf{v}_1^{OD})^T, (\mathbf{v}_2^{OD})^T)^T$ . On en déduit la relation :

$$\mathbf{v}_1^{OD} = \mathbf{A}_1^{-1} (\mathbf{y}^{arête} - \mathbf{A}_2 \mathbf{v}_2^{OD}), \quad (2.60)$$

où  $\mathbf{v}_2^{OD}$  est un ensemble de variables libres. Simuler des réalisations de la loi de  $P(\mathbf{v}^{OD} | \mathbf{y}^{arête})$  est équivalent à simuler  $\mathbf{v}_2^{OD}$  sous la distribution *a posteriori*  $P(\mathbf{v}_2^{OD} | \mathbf{y}^{arête})$  ( $\mathbf{v}_1^{OD}$  étant obtenu par l'intermédiaire de l'équation (2.60)). La simulation de  $\mathbf{v}_2^{OD}$  connaissant  $\mathbf{y}^{arête}$  est envisageable par l'intermédiaire d'un algorithme de Metropolis ou échantillonneur de Gibbs (Geman & Geman 1984). L'algorithme de l'échantillonneur de Gibbs consiste à mettre à jour une seule composante  $v_{2,j}^{OD}$  à la fois. Chaque composante  $v_{2,j}^{OD}$  est tirée selon la distribution  $P(v_{2,j}^{OD} | \mathbf{v}_{2,-j}^{OD}, \mathbf{y}^{arête})$ , connaissant toutes les autres composantes  $\mathbf{v}_{2,-j}^{OD} = (v_{2,1}^{OD}, \dots, v_{2,j-1}^{OD}, v_{2,j+1}^{OD}, \dots, v_{2,c-r}^{OD})^T$  et  $\mathbf{y}^{arête}$ . Il devient alors nécessaire de calculer les  $P(v_{2,j}^{OD} | \mathbf{v}_{2,-j}^{OD}, \mathbf{y}^{arête})$ . Après quelques calculs, il est montré (Tebaldi & West 1998) que :

$$P(v_{2,j}^{OD} | \mathbf{v}_{2,-j}^{OD}, \mathbf{y}^{arête}) \propto P(v_{2,j}^{OD}) \prod_{e=1}^r P(v_{1,e}^{OD}), \quad (2.61)$$

où  $v_{1,e}^{OD}$  dépend implicitement de  $v_{2,j}^{OD}$  puisque  $\mathbf{v}_1^{OD} = \mathbf{A}_1^{-1} (\mathbf{y}^{arête} - \mathbf{A}_2 \mathbf{v}_2^{OD})$ ,  $v_{1,e}^{OD}$ ,  $e \neq j$ . Les éléments de  $\mathbf{y}^{arête}$  sont inchangés si  $v_{2,j}^{OD}$  varie.

### Estimation par approche hiérarchique

Cao, Scott, Wiel, Yu & Zhu (2000) proposent une approche hiérarchique pour estimer le trafic sur un réseau de télécommunications à partir des mesures effectuées sur les liens de ce réseau. Cette méthode repose sur la stratégie *diviser et conquérir* qui permet de diminuer le temps de calcul sans perdre de précision lors de l'estimation.

L'idée directrice consiste à décomposer le réseau en plusieurs sous-réseaux. La complexité algorithmique associée à chaque sous-réseau devient ainsi indépendante de la taille initiale du réseau. Trois étapes sont nécessaires pour la mise en oeuvre :

- partitionner l'ensemble des paires OD en un nombre fini  $N_{OD}$  d'ensembles disjoints  $OD = \{OD_1, \dots, OD_{N_{OD}}\}$ ,
- pour chaque ensemble  $OD_i$ , sélectionner les mesures de trafic nécessaires à l'estimation du trafic sur les paires OD du sous-ensemble,
- estimer le trafic sur les paires OD dans  $OD_i$  en utilisant une version réduite du modèle de trafic qui agrège le plus grand nombre de paires OD avec un faible nombre de paramètres.

Une analyse de la topologie du réseau permet de répartir les paires OD en différents sous-réseaux (Bu, Duffield, Lo Presti & Towsley 2002). À titre d'exemple, Cao, Scott, Wiel, Yu & Zhu (2000) définissent une distance entre paires OD afin de grouper hiérarchiquement les paires OD dans un arbre selon leur proximité. Plusieurs distances sont envisageables. Par exemple, la distance entre les paires OD  $z_i$  et  $z_j$  peut prendre en compte le nombre de liens utilisés par l'une ou l'autre sans être utilisés par les deux. Les différents sous-réseaux sont construits sur la base de cet arbre et regroupent des paires OD pour lesquelles la distance est faible. Un réseau de télécommunications composé de 3 routeurs est illustré sur la figure 2.4 (a), et l'arbre associé à ce réseau est illustré sur la figure 2.4 (c).

Une fois les sous-réseaux de paires OD établis, il faut sélectionner les liens utiles à chaque sous-réseau. Deux facteurs difficilement conciliables sont à considérer : la précision de l'estimation et le temps de calcul. Plus il y aura de liens utilisés, meilleure sera la précision, plus le temps de calcul sera élevé. Pour ne perdre aucune information, il faut sélectionner les liens entrants, les liens sortants et les liens entre sommets du sous-réseau. Par exemple, le sous-réseau focalisé sur le routeur R1 issu du réseau présenté sur la figure 2.4 (a) est présenté sur la figure 2.4 (b).

Si l'ensemble  $\mathcal{Y}_{(i)}^{arête}$  représente l'ensemble des liens du sous-ensemble  $OD_i$ , et  $\mathcal{V}_{(i)}^{OD}$  représente le trafic sur l'ensemble des paires OD de  $OD_i$ , alors on observe :

$$\mathcal{Y}_{(i)}^{arête} = \mathcal{A}_{(i)} \mathcal{V}_{(i)}^{OD}, \quad (2.62)$$

où  $\mathcal{A}_{(i)}$  désigne la matrice de routage dans  $OD_i$ . Ainsi, l'équation (2.62) est similaire au problème complet (2.34). Néanmoins, le partitionnement permet ici de ne considérer que les équations pertinentes. Par la suite, les équations correspondant à chaque sous-réseau sont résolues avec une des méthodes d'estimation précédemment décrites. Un regroupement de ces équations permet d'estimer le trafic sur l'ensemble des paires OD du réseau.

Castro, Coates, Liang, Nowak & Yu (2004) utilisent une approche semblable et divisent le réseau Internet en un ensemble de sous-réseaux. Ils estiment le trafic sur les paires OD dans chaque réseau, ce qui leur permet d'obtenir une expression du trafic sur l'ensemble des paires OD du réseau.

### 2.3 Conclusion

L'état de l'art dressé dans ce chapitre nous a permis d'aborder dans un premier temps les méthodes de suivi dans des séquences de microscopie de fluorescence. Les méthodes de mise en correspondance ou de filtrage stochastique ont donné des résultats tangibles. Toutefois, le suivi individuel est parfois

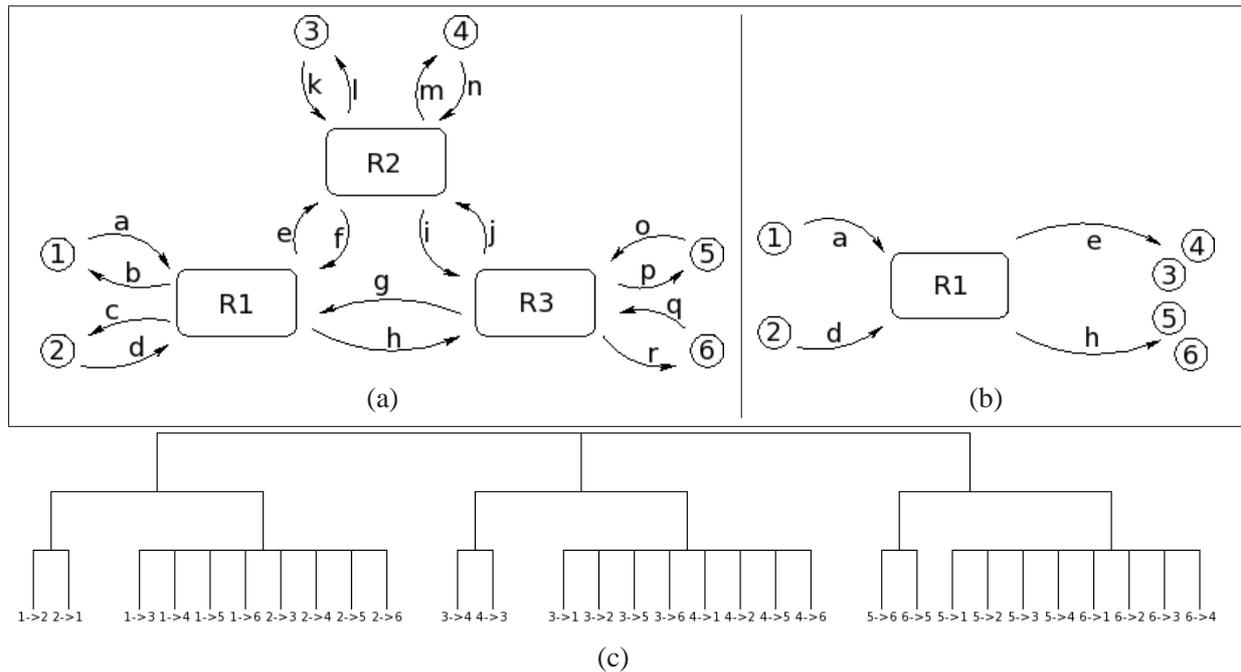


FIGURE 2.4: (a) Réseau de télécommunications composé de trois routeurs. R1-R3 sont les routeurs, 1-6 sont les sommets origine et destination, a-r sont les liens dirigés du graphe ; (b) arbre associé au réseau (a).

difficile quand le nombre d'objets d'intérêt devient trop grand, ou que les interactions sont trop nombreuses. Force est de constater que l'étude du trafic est plus pertinente lorsqu'elle est réalisée sur une longue période, ce qui peut impliquer un échantillonnage temporel plus faible, mais aussi de nouvelles difficultés lors du suivi.

Dans ce chapitre, nous nous sommes également intéressés aux méthodes d'estimation du trafic global à partir de comptages locaux. Ces méthodes ont été conçues pour étudier le trafic dans le contexte du transport routier et celui des réseaux de télécommunications. Ces méthodes nous ont semblé également appropriées pour caractériser le trafic de protéines telles que celles la famille des Rab. Les données d'observation doivent être calculées à partir des séquences d'images. Il s'agit d'effectuer des comptages locaux, ce qui peut sembler plus simple à réaliser que le suivi des vésicules sur toute la séquence. Notons que le comptage est envisageable même pour un faible échantillonnage temporel. Enfin, les informations extraites (trafic sur les paires OD) permettent d'identifier les flux de vésicules caractérisés par leur origine, leur destination et leur volume. Ce sont des éléments précieux pour caractériser le trafic vésiculaire à l'échelle de la cellule.

Dans la suite de ce manuscrit, nous proposons d'exploiter la tomographie de réseaux pour la simulation et l'analyse du trafic vésiculaire des protéines Rab6.



---

### Simulation du trafic intracellulaire par tomographie de réseaux

---

L'analyse de phénomènes dynamiques complexes à partir de séquences d'images est une opération difficile à réaliser d'une manière générale. Dans notre cas, la caractérisation du trafic intracellulaire à partir de séquences d'images de microscopie de fluorescence est également problématique. Notre objectif est donc de proposer des méthodes adaptées à cette analyse. L'évaluation et la validation sont aussi des tâches délicates à réaliser du fait qu'il n'existe aucune vérité-terrain, c'est-à-dire un ensemble de séquences pour lesquelles les caractéristiques dynamiques des objets en mouvement sont parfaitement connues. L'extraction manuelle des trajectoires des vésicules dans des séquences d'images réelles est une tâche très longue et fastidieuse, et une grande incertitude demeure en raison de la complexité des images. En revanche, dans une séquence d'images simulée, les descripteurs dynamiques sont par définition connus, et permettent d'évaluer les méthodes d'analyse. Une simulation, bien choisie et adaptée, facilite l'évaluation et permet d'identifier les points forts et les points faibles des méthodes d'analyse d'images.

Une simulation réaliste des événements dynamiques observés dans des séquences d'images réelles doit permettre une bonne représentation des phénomènes biologiques observés. Cette simulation peut devenir un outil d'investigation facilitant la compréhension du fonctionnement interne d'une cellule. Un expert-biologiste est alors en mesure d'interagir avec les paramètres de la simulation pour générer des processus dont les caractéristiques dynamiques sont proches de ceux observés dans la réalité. Cette démarche a été préconisée notamment pour comprendre la dynamique des microtubules (Gibbons, Chauwin, Desposito & José 2001, Nédélec 2001). Avec quelques connaissances en biophysique et biologie, il devient possible de mimer une séquence d'images réelle puis d'extraire un ensemble de descripteurs par analyse d'images. L'étape suivante consiste à modifier les paramètres de la simulation et d'en mesurer les effets. Si les opérations d'analyse et de simulation sont bien réalisées, l'expert est capable de produire une séquence d'images assez fidèle, et par conséquent de représenter les processus biologiques sous-jacents, voire de venir perturber ce modèle et de prédire des événements.

Il existe deux manières d'aborder la simulation :

- on peut chercher à approcher la réalité en s'appuyant sur des propriétés physiques et sur les caractéristiques optiques du système d'acquisition (Dinh, Pangarkar, Theofanus & Mitragotri 2007) ;
- on peut aussi chercher à mimer ce qui est observé d'un point de vue pictural dans une séquence d'images réelle à partir de données statistiques issues d'exemples (Wang & Zhu 2003).

Les paramètres de la première approche sont motivés par la physique et sont donc peu contestables. Ils sont directement interprétables, puisque liés au monde réel. En revanche, ces modèles sont bien souvent

très complexes, et ne sont pas forcément connus. Si on considère le trafic des protéines de la famille des Rab (Rab6), il reste à déterminer un grand nombre de paramètres et le cycle complet est loin d'être clairement établi. Le deuxième type de méthode permet de mimer les processus observés mais n'est pas en mesure de décrire les phénomènes physiques sous-jacents. Toutefois, il est possible de faire coopérer ces deux types de méthodes. En particulier, il est envisageable d'utiliser un modèle dynamique statistique et d'exploiter au mieux les propriétés physiques connues des objets imagés. Dans la continuité de précédents travaux (Boulanger, Kervrann & Bouthemy 2006, Boulanger, Pécot, Bouthemy, Salamero, Sibarita & Kervrann 2008, Boulanger, Kervrann & Bouthemy 2009), nous adoptons cette démarche assez pragmatique en exploitant le concept initial de tomographie de réseaux pour modéliser le trafic vésiculaire. Dans un second temps, nous prenons en considération le comportement cyclique des protéines Rab6 articulé autour de trois phases : le trafic vésiculaire, la diffusion cytosolique et l'ancrage à l'appareil de Golgi. Les propriétés biophysiques sont exploitées au mieux pour mimer les mécanismes biologiques. Quand ces connaissances sont trop pauvres, nous privilégions les observations réelles pour affiner la description.

Dans ce chapitre, nous commençons par décrire le concept de tomographie de réseaux pour simuler le trafic vésiculaire de la protéine Rab6. Nous prenons également en compte un certain nombre de comportements dynamiques singuliers afin d'affiner la simulation et par conséquent de générer des séquences davantage fidèles à la réalité. Les deux autres phases sont traitées par la suite. Nous prenons en compte les connaissances de base sur Rab6 pour simuler son cycle complet. Enfin, nous comparons les séquences d'images obtenues aux séquences d'images réelles et évaluons de manière qualitative la performance de notre simulateur.

### 3.1 Simulation du trafic vésiculaire de la protéine Rab6

Dans cette section, nous proposons de traiter uniquement le comportement vésiculaire de la protéine Rab6.

#### 3.1.1 Approches existantes pour la simulation du trafic vésiculaire

Pour simuler cette phase, nous nous sommes intéressés à deux domaines différents : la modélisation biophysique d'éléments biologiques, et la génération de texture en mouvement en synthèse d'images.

#### Modélisation biophysique du trafic vésiculaire

La simulation d'objets biologiques doit s'appuyer sur des données biophysiques. Dans ce cas, chaque élément de la simulation est généré de manière indépendante, se déplace de manière stochastique, et interagit avec les autres éléments de la cellule. C'est la démarche préconisée par Lagache & Holcman (2008) pour simuler le transport dans le cytosol, à l'intérieur de la cellule. L'idée est de simuler des vésicules qui se déplacent sur le réseau de microtubules par l'intermédiaire de moteurs moléculaires, ou qui diffusent dans le cytosol. Pour cela, il faut considérer le cytosol, le réseau de microtubules, les moteurs moléculaires et les vésicules, et leurs interactions.

Une vésicule est généralement représentée par une particule  $p(t) \in \mathbb{R}^2 \times [1, \dots, T]$  dont la dynamique suit une règle stochastique :

$$dp = \begin{cases} \sqrt{2K_d} dw & \text{si } p(t) \text{ est libre dans le cytosol,} \\ V_0 & \text{si } p(t) \text{ est lié à un microtubule,} \end{cases} \quad (3.1)$$

où  $w$  est un mouvement brownien,  $K_d \in \mathbb{R}$  est la constante de diffusion de la vésicule dans le cytosol, et  $V_0$  est la vitesse du mouvement dirigé le long des microtubules. Ainsi, chaque vésicule alterne une phase

de diffusion dans le cytosol (mouvement brownien) et une phase de déplacement (mouvement dirigé) jusqu'à atteindre sa destination. Le moteur moléculaire permet de propulser la vésicule selon une vitesse connue.

Le cytosol est représenté par un anneau de rayon maximum (membrane externe de la cellule) et de rayon minimum (enveloppe nucléaire). Les microtubules, au nombre de  $N_m$ , sont distribués uniformément radialement : issus du noyau en direction de la membrane externe, deux microtubules voisins sont séparés d'un angle égal à  $\frac{2\pi}{N_m}$ . L'approximation 2D de la cellule est valide pour des cellules plates (Dinh, Theofanus & Mitragotri 2005), une hypothèse raisonnable en raison de l'adhésion de la cellule au substrat. Dans ce cas, l'épaisseur de la cellule est négligée dans les calculs.

Dans le cas de la simulation du transport vésiculaire des protéines Rab6, les paramètres contrôlant l'équation (3.1) ne sont pas connus précisément. De plus, d'autres comportements comme la *fusion* de plusieurs vésicules ou le *rebroussement* de chemin observés sur des données réelles sont également des processus difficiles à prédire. Une simulation reposant uniquement sur des modèles biophysiques n'est donc pas envisageable.

### Simulation de texture en mouvement

De nombreuses approches de simulation d'objets en mouvement ont été proposées pour la synthèse d'images. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux travaux de Wang *et al.* (Wang & Zhu 2002, Wang & Zhu 2003). Dans ces travaux, les auteurs simulent des mouvements texturés dynamiques tels que la neige, la pluie, le vol d'oiseaux, les feux d'artifice ou les chutes d'eau. L'approche est dite générative et combine des modèles stochastiques et des modèles cinétiques de mouvement. Dans ce contexte, un objet élémentaire est caractérisé :

- *selon un niveau photométrique* : l'objet est décrit par la superposition de fonctions de base issues d'un dictionnaire (Gabor, Laplace, ...). Ces fonctions de base coïncident avec des spots, des lignes et des contours contrastés, et sont relativement génériques pour représenter les images naturelles (Olshausen & Field 1997),
- *selon un niveau géométrique* : chaque objet élémentaire est décrit par un contour déformable paramétré par les coefficients de base d'un dictionnaire,
- *selon un niveau dynamique* : les trajectoires des objets sont des réalisations d'un modèle stochastique dynamique. Les sources et destinations de ces objets sont modélisées par des cartes de naissance/mort.

L'utilisation d'un dictionnaire n'est pas cruciale pour simuler des vésicules dans notre étude. En effet, une vésicule est assimilable à un spot, dont l'intensité est maximale en son centre. Un spot gaussien anisotrope semble donc tout à fait adapté à la simulation géométrique et photométrique d'une vésicule. Sur le plan de la dynamique, les vésicules se déplacent de leur origine vers leur destination. Pour cet aspect, les cartes de naissance/mort sont tout à fait appropriées. En revanche, elles ont la particularité de se déplacer sur le réseau de microtubules, connu ou calculé dans notre contexte.

### 3.1.2 Modèle dynamique

Les protéines Rab6 durant leur phase de trafic sont ancrées à la membrane des vésicules et se déplacent sur le réseau de microtubules sous l'action de moteurs moléculaires (dynéine, kinésine) (Hirokawa 1998). Ce trafic est semblable au déplacement de véhicules qui transitent sur un réseau routier. Cette analogie est également retenue en biophysique et en biologie. Ceci a motivé l'introduction de la toмоgraphie de réseaux pour simuler ainsi un trafic vésiculaire (Boulangier, Kervrann & Bouthemy 2009).

Sur le modèle Rab6, les vésicules circulent depuis une origine localisée au niveau de l'appareil de Golgi vers une destination correspondant à un point d'entrée dans le reticulum endoplasmique. Le réseau

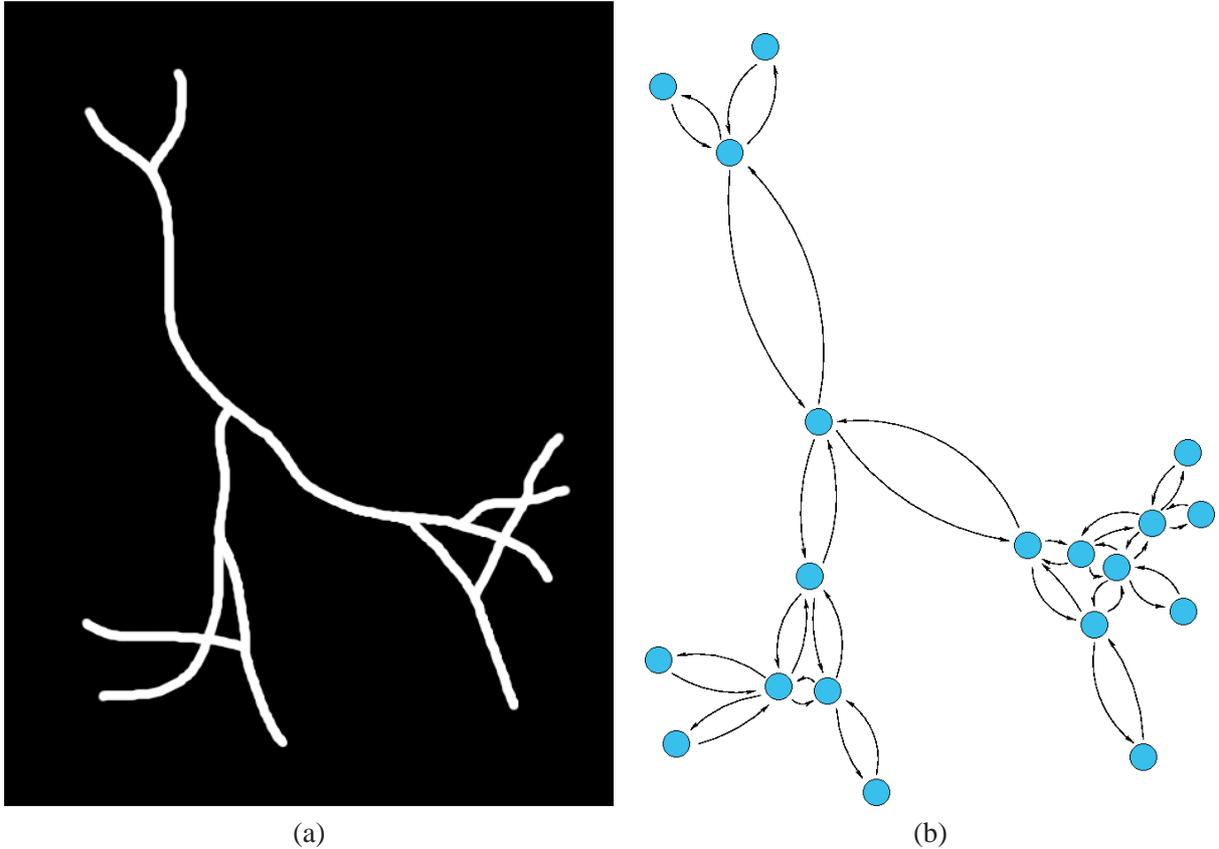


FIGURE 3.1: (a) Réseau de microtubules simpliste; (b) graphe associé au réseau de la figure (a).

de microtubules, support du transport, est représenté aussi par un graphe. La trajectoire d'une vésicule, définie par son origine et sa destination (cartes de naissance/mort dans (Wang & Zhu 2002, Wang & Zhu 2003)) et le graphe associé au réseau de microtubules, dépend d'un routage. La première étape de la modélisation consiste donc à établir un graphe à partir du réseau de microtubules. En pratique, le réseau de microtubules est extrait automatiquement d'une séquence d'images réelle, ou défini manuellement. Chaque carrefour et chaque extrémité est identifié à un sommet sur le graphe  $\mathcal{G}_{trafic}$ . Les  $n$  sommets forment l'ensemble  $\mathcal{V} = \{\vartheta_1, \dots, \vartheta_n\}$  et chaque connexion entre deux sommets est associée à deux arêtes permettant d'établir les échanges de vésicules dans les deux sens. Les  $r$  arêtes constituent l'ensemble  $\mathcal{E} = \{\varphi_1, \dots, \varphi_r\}$ . Un réseau de microtubules relativement simple et le graphe noté désormais  $\mathcal{G}_{trafic} = (\mathcal{V}, \mathcal{E})$  sont présentés sur la figure 3.1.

Si on adopte le concept de tomographie de réseaux, une paire Origine-Destination (OD) est caractérisée par un sommet origine et un sommet destination dans le graphe  $\mathcal{G}_{trafic}$  (définition 2.1). Le trafic global calculé dépendra des paires OD choisies par l'utilisateur. Celui-ci en spécifie un certain nombre parmi les  $c = n(n - 1)$  paires OD possibles dans le graphe, et attribue à chacune d'entre elles une proportion de trafic. Soit  $\{z_j\}_{j=1, \dots, c}$  l'ensemble des paires OD sur le graphe  $\mathcal{G}_{trafic}$  et  $\mathbf{v}^{OD} \in \mathbb{R}^c$  le vecteur de dimension  $c$  indiquant la proportion de trafic sur chaque paire OD. Les vésicules générées au cours de la simulation sont associées à une des paires OD déterminées par l'utilisateur. La proportion de vésicules affectées à chaque paire OD respecte les proportions de trafic fixés également par l'utilisateur. Cependant, une paire OD identifie l'origine et la destination d'une vésicule, mais pas le chemin reliant ces deux extrémités. Le routage permet justement de compléter cette description. Le routage vise à établir une liste d'arêtes successives dans le graphe pour une paire OD, correspondant à un ou plusieurs chemins

possibles pour relier une origine à une destination. Le choix le plus simple est de ne considérer qu'un seul chemin par paire OD, mais s'avère peu pertinent par la suite. En effet, dans les séquences d'images réelles, l'ensemble des vésicules couvrent l'ensemble du domaine de la cellule et n'empruntent pas un nombre faible de chemins. Il faut donc prévoir un scénario permettant de prendre en compte plusieurs chemins pour une même paire OD. Un premier choix serait d'extraire tous les chemins possibles dans le graphe pour chaque paire OD. Ceci n'est pas envisageable pour des graphes complexes, où le nombre de chemins possibles tend vers l'infini. L'algorithme de Yen (Yen 1971) permet de traiter cette situation et extrait les  $k$  plus courts chemins dans un graphe valué. Pour comparer des chemins entre eux, il est nécessaire d'associer un coût  $C(\varphi_e) \in \mathbb{R}$ ,  $e = 1 \dots, r$  à chaque arête du graphe. Ici, un coût égal à la longueur du segment associé à l'arête semble approprié. Le coût associé à un chemin est donc égal à la somme des coûts des arêtes servant à sa construction. Par exemple, le chemin  $\Gamma$  de longueur  $L(\Gamma)$  exploite la suite d'arêtes  $\{\Gamma(1), \dots, \Gamma(L(\Gamma))\}$ . Au chemin  $\Gamma$ , on associe un coût :

$$C(\Gamma) = C(\Gamma(1)) + \dots + C(\Gamma(L(\Gamma))) \quad (3.2)$$

qui revient à mesurer l'effort nécessaire pour relier deux noeuds dans le graphe. Cet effort coïncide avec la longueur du chemin dans le plan de l'image. Afin d'établir un chemin pour une vésicule donnée, il est plus pertinent de manipuler des probabilités de la forme :

$$P(\Gamma) \propto \exp - \left( \frac{C(\Gamma)}{K_0} \right), \quad (3.3)$$

où  $P(\Gamma)$  représente la probabilité associée au chemin  $\Gamma$ . Si l'expert souhaite privilégier les chemins les plus courts, alors  $K_0$  doit être faible (de l'ordre du coût du chemin le plus court). En revanche, si on souhaite que les chemins soient distribués uniformément parmi les  $k$  chemins extraits, il faut donner une valeur élevée à  $K_0$ . Ces probabilités permettent par la suite d'établir la matrice de routage  $\mathbf{A}$  de dimension  $r \times c$ . Cette matrice met en relation le vecteur  $\mathbf{v}^{OD}$  et le vecteur  $\mathbf{y}^{arête}$  de dimension  $r$  qui correspond aux échanges observés sur l'ensemble de la séquence d'images sur chaque arête du graphe. La matrice de routage a ainsi pour but de recenser les arêtes du graphe empruntées pour chaque paire OD. Si le routage est unique (un seul chemin pour chaque paire OD), la matrice de routage est binaire, ce qui est le cas pour les réseaux de télécommunications. À une ligne de cette matrice est associée une paire OD donnée. Chaque élément à '1' sur cette ligne désigne les arêtes du graphe utilisées pour composer le chemin. Néanmoins, nous avons privilégié la solution qui consiste à considérer plusieurs chemins pour chaque paire OD. Ce choix conduit à une matrice de routage probabilisée qui collecte les différents chemins que peuvent emprunter les vésicules pour une paire OD donnée. Soit  $\{\Gamma_{i,e}^j\}_{i=1, \dots, N_e^j}$  l'ensemble des  $N_e^j$  chemins pour la paire origine-destination  $\mathcal{Z}_j$  utilisant l'arête  $\varphi_e$ . Soit  $P(\Gamma_{i,e}^j)$  la probabilité associée (voir (3.3)). Chaque élément  $a_e^j$  de la matrice de routage  $\mathbf{A}$  est défini tel que :

$$a_e^j = \frac{\sum_{i=1}^{N_e^j} P(\Gamma_{i,e}^j)}{\sum_{\tilde{e}=1}^r \sum_{i=1}^{N_{\tilde{e}}^j} P(\Gamma_{i,\tilde{e}}^j)}. \quad (3.4)$$

Avec cette définition, le nombre de vésicules qui utilisent une arête du graphe vérifie l'équation fondamentale de la tomographie de réseaux :

$$\mathbf{y}^{arête} = \mathbf{A} \mathbf{v}^{OD}. \quad (3.5)$$

En pratique, cette équation n'est pas utilisée directement pour simuler les vésicules. La stratégie adoptée pour la simulation est plutôt la suivante : à chaque vésicule générée est associée une paire OD parmi celles spécifiées par l'utilisateur. Puis, un chemin parmi les  $k$  chemins les plus courts obtenus avec l'algorithme de Yen (Yen 1971) lui est associé, suivant les probabilités définies dans (3.2).

Le comportement dynamique des vésicules est complètement établi grâce à la tomographie de réseaux. Pour afficher les vésicules sur une image, il suffit de leur associer une photométrie.

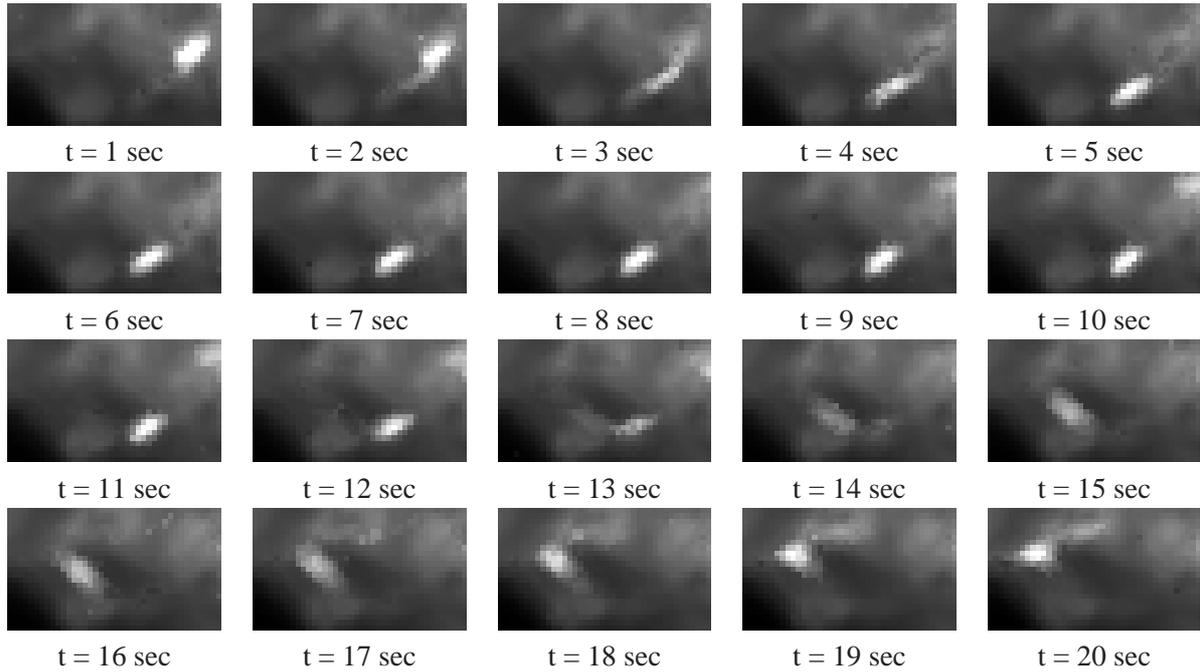


FIGURE 3.2: 20 portions d'images consécutives extraites d'une séquence d'images réelle sur lesquelles une vésicule se déplace de la droite vers la gauche (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation).

### 3.1.3 Modèle photométrique

Dans les séquences de vidéo-microscopie, les vésicules sont semblables à de petites tâches d'intensité supérieure à celle observée sur le fond. On peut en première approximation les représenter par des particules gaussiennes anisotropes (Bergsma, Streekstra, Smeulders & Manders 2000, Genovesio et al. 2006, Boulanger, Kervrann & Bouthemy 2009). La taille et l'orientation de ces particules sont contrôlées par la matrice de variance-covariance.

Sur de nombreuses séquences d'images réelles, un étirement des vésicules est visible le long de leur axe de déplacement. Cet étirement semble également être corrélé avec la vitesse de déplacement des vésicules. Les vésicules se déforment vraisemblablement sous l'action des moteurs moléculaires, phénomène accentué par la viscosité importante du cytosol (environ 10 fois supérieure à celle de l'eau (Nédélec & Surrey 2000)). Pour illustrer ce phénomène, 20 portions d'images réelles consécutives sont présentées sur la figure 3.2. Sur ces images, une vésicule se déplace de la droite vers la gauche selon une trajectoire courbe. Il paraît évident que l'axe principal de la vésicule est orienté suivant le déplacement de cette dernière. L'étirement semble d'autant plus flagrant que la vésicule se déplace rapidement. C'est pourquoi nous avons choisi d'orienter l'axe majeur de l'ellipse définie par la matrice de variance-covariance dans le sens de déplacement des vésicules, et de définir l'élongation de l'ellipse en fonction de la vitesse des vésicules. La figure 3.3 illustre le modèle de particules ainsi proposé. Il reste à déterminer le diamètre des vésicules  $D_{ves} \in \mathbb{R}$  contrôlant la matrice de variance-covariance. Le diamètre théorique des vésicules est estimé entre 60 et 150 nm quand la résolution des images observées en microscopie "spinning disk" est d'environ  $64,5 \times 64,5 \times 300 \text{ nm}^3$ . Le diamètre des vésicules est donc de l'ordre de la résolution mais la fonction de transfert optique du microscope (PSF, se reporter à la section 1.1.1) a pour effet de donner une impression de taille plus grande des structures, et ce même après une étape de déconvolution (Sibarita et al. 2002). Les caractéristiques de la particule gaussienne

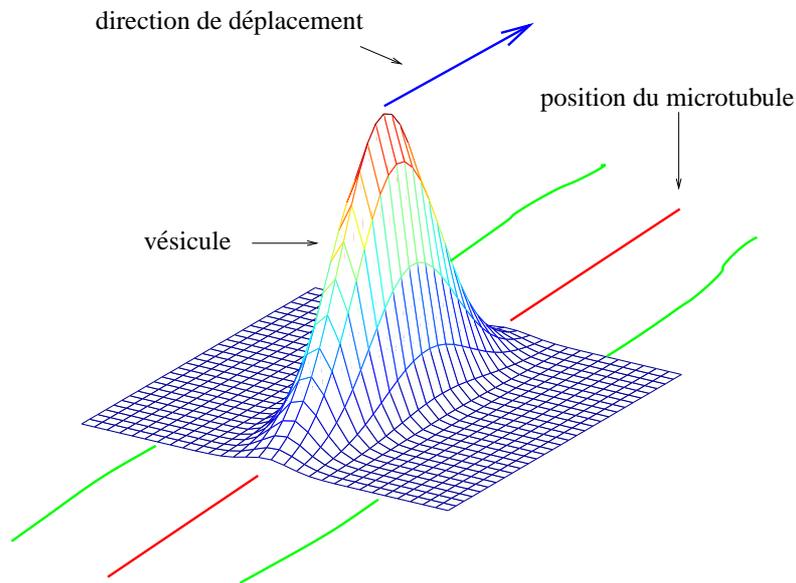


FIGURE 3.3: Particule gaussienne présentant la même orientation que celle du microtubule, utilisée pour représenter une vésicule. L'élongation des particules est proportionnelle à la vitesse de déplacement des vésicules.

utilisée pour décrire une vésicule seront donc établies à partir de séquences réelles. Les spots gaussiens générés présentent ainsi une longueur moyenne de 180 nm, et une variance de 900 nm.

La représentation des vésicules ne se limite pas à leur forme mais aussi à l'intensité maximale moyenne observée en leur sein. Cette intensité dépend de la méthode d'acquisition et de l'expression de la fluorescence de la GFP. Comme nous souhaitons simuler des séquences d'images proches de celles acquises avec un microscope "spinning disk", nous avons mesuré l'intensité maximale d'un grand nombre de vésicules sur des séquences réelles. L'intensité varie d'une vésicule à une autre. Après analyse, nous notons que les intensités dans une vésicule suivent une loi gaussienne de moyenne 25 et d'écart-type 10  $I_{ves} \sim \mathcal{N}(25, 100)$ .

L'approche par tomographie de réseaux permet de générer une trajectoire pour les vésicules sur un réseau et le modèle photométrique ainsi obtenu permet de les afficher. Il reste cependant à définir les caractéristiques dynamiques des vésicules, c'est-à-dire leur vitesse et un certain nombre de comportements dynamiques singuliers, tels que le *rebroussement* de chemin, la *fusion* de vésicules, ...

### 3.1.4 Caractéristiques dynamiques

La vitesse de déplacement des vésicules dépend des moteurs moléculaires qui transforment l'ATP en énergie motrice qui les propulsent. Or, la simulation proposée ne va pas jusqu'à modéliser les moteurs moléculaires. Cependant, il n'est pas impossible d'attribuer à chaque vésicule générée, une vitesse de déplacement propre. Racine (2006) a notamment étudié au cours de sa thèse la dynamique des protéines Rab6. Il a pu mesurer la vitesse instantanée d'un grand nombre de vésicules pour des séquences où l'échantillonnage temporel est grand. Il résulte que le module  $v_{ves} \in \mathbb{R}$  des vitesses des vésicules présente une moyenne de 650 nm/sec et un écart-type de 250 nm/sec :  $v_{ves} \sim \mathcal{N}(650, 250^2)$ . Ces valeurs sont proches de l'estimation théorique décrite en biophysique.

Lors de la génération de la vésicule  $p$ , une paire  $OD_p$  et un chemin  $\Gamma_p$  parmi les  $k$  chemins les

plus courts lui sont attribués. Une courbe  $\gamma_p$  sur le support de l'image est associée au chemin  $\Gamma_p$ , défini par un ensemble d'arêtes sur le graphe. La vésicule est positionnée à l'origine de la courbe  $\gamma_p$ . Elle se déplace le long de cette courbe jusqu'à atteindre sa destination, et disparaître (les protéines associées à la face externe de la membrane lipidique de la vésicule s'en dissocient par une extraction à partir de cette membrane). Dans des séquences d'images réelles, pour lesquelles l'échantillonnage temporel est suffisamment élevé, on vérifie que les vésicules n'ont pas un comportement dynamique stable et continu, mais qu'elles avancent en alternant des phases d'"arrêt" et de "mouvement". Ce comportement bien identifié et nommé "stop-and-go" (Brown, Wang & Jung 2005) implique la définition d'états dynamiques. Soit une variable  $E(p, t) = \{A, M, PS\}$  qui désigne l'état de la vésicule  $p$  à l'instant  $t$ . La vésicule peut être en "mouvement" ( $M$ ) ou à l'"arrêt" ( $A$ ). D'autre part, avant d'atteindre leur destination, certaines vésicules sont dans un état "pseudo-stable" ( $PS$ ). Cet état est fréquent et est mesurable dans une région non loin de la destination de la vésicule. La vésicule effectue alors un arrêt complet pendant un certain temps  $T_{PS}(p)$ . Comme toutes les vésicules ne passent pas par cet état "pseudo-stable", on décide à l'avance si la vésicule en question connaîtra cet état ou non au cours de sa trajectoire. La proportion de vésicules "pseudo-stables" est définie par la proportion  $P_{N_{PS}}$  et la variable binaire  $b_{PS}(p)$  indique si la vésicule  $p$  connaît un état "pseudo-stable" au cours de son trajet. La trajectoire de la vésicule  $p$  est donc décrite par l'équation dynamique suivante :

$$s(p, t + \Delta t) = \begin{cases} s(p, t) + \Gamma_p(v_{ves}(p))(T_M(p) + \Delta t) & \text{si } E(p, t + \Delta t) = M, \\ s(p, t) & \text{si } E(p, t + \Delta t) = A, \\ s(p, t) & \text{si } E(p, t + \Delta t) = PS, \end{cases} \quad (3.6)$$

où  $s(p, t)$  est la position occupée par la vésicule  $p$  à l'instant  $t$  et  $T_M(p)$  correspond à la durée totale pendant laquelle la vésicule  $p$  a été en "mouvement" depuis sa naissance. Afin de simuler ce comportement dynamique, il est nécessaire de préciser les quatre probabilités suivantes :

- la probabilité pour qu'une vésicule  $p$  en "mouvement" s'arrête à  $t + \Delta t$  :

$$P_A = P(E(p, t + \Delta t) = A | E(p, t) = M), \quad (3.7)$$

- la probabilité pour qu'une vésicule  $p$  à l'"arrêt" reparte à  $t + \Delta t$  :

$$P_M = P(E(p, t + \Delta t) = M | E(p, t) = A), \quad (3.8)$$

- la probabilité pour qu'une vésicule  $p$  passe à l'état "pseudo-stable" à  $t + \Delta t$  :

$$P_{PS} = P\left(E(p, t + \Delta t) = PS | E(p, t) = M, b_{PS}(p) = 1, \int_0^t \gamma_p(\ell) d\ell > \frac{3}{5} \int_0^{T_F} \gamma_p(\ell) d\ell\right), \quad (3.9)$$

- la probabilité pour qu'une vésicule  $p$  passe de l'état *pseudo-stable* à l'état en "mouvement" à  $t + \Delta t$  :

$$P(E(p, t + \Delta t) = M | E(p, t) = PS, E(p, t - T_{PS}(p)) = M) = 1, \quad (3.10)$$

où  $\gamma_p(T_F)$  désigne la destination finale de la vésicule  $p$ , et  $T_{PS}(p)$  représente la durée pendant laquelle la vésicule  $p$  reste "pseudo-stable". La variable  $T_{PS}(p)$  est tirée uniformément sur l'intervalle  $[T_{PS}^{min}, T_{PS}^{max}]$ . La probabilité de passer dans l'état "pseudo-stable" dépend de la variable  $b_{PS}(p)$ , mais aussi de la position spatiale  $s(p, t)$ . En effet, l'état "pseudo-stable" d'une vésicule intervient non loin de sa destination. Nous définissons donc une distance minimale à parcourir égale à  $\frac{3}{5}$  de la trajectoire totale avant de passer dans un état "pseudo-stable".

Il n'existe aucune théorie pour préciser  $P_A$ ,  $P_M$ ,  $P_{PS}$  et  $P_{N_{PS}}$ . Par conséquent, nous devons exploiter des séquences réelles pour calibrer ces paramètres. En ce qui concerne les "départs" et les "arrêts", il s'avère que les vésicules sont plus souvent à l'"arrêt" qu'en "mouvement" :  $P_A > P_M$ . Après

la confrontation de plusieurs simulations et séquences réelles, nous avons fixé  $P_A = 0,7$  et  $P_M = 0,1$ . Ce déplacement réalisé par à-coups “départs/arrêts” (“stop-and-go”) est illustré sur la figure 3.4 (a). (Racine 2006) a développé une méthode de suivi sur des séquences d’images acquises avec un microscope à champ large. Ces séquences présentent un échantillonnage temporel très fin, ce qui permet de suivre les vésicules avec une bonne précision. Ses travaux ont permis d’extraire les proportions de vésicules qui restent immobiles et le temps passé dans cet état. L’analyse automatique de ces résultats n’est pas aisée car il faut classer les vésicules “pseudo-stables” et les vésicules qui observent un temps d’arrêt long, sans pour autant être déclarées *pseudo-stables*. On définit ainsi une période d’immobilité de l’ordre de 30 sec, à partir de laquelle la vésicule est considérée comme *pseudo-stable*. D’après des statistiques effectuées sur des données réelles, la proportion de vésicules “pseudo-stables” au cours des trajectoires est égale à 50%, soit  $P_{NPS} = 0,5$ . Par ailleurs, une vésicule qui transite par un état “pseudo-stable” et qui a déjà parcouru les  $\frac{3}{5}$  de son chemin connaîtra un état “pseudo-stable” avec une probabilité  $P_{PS}$ . Cette dernière ne doit pas être trop élevée afin que les vésicules ne soient pas toutes stockées à distance égale de leur point d’origine. Après quelques expérimentations, nous avons fixé :  $P_{PS} = 0,004 \Delta T_{simulation}$ . Enfin, les bornes  $T_{PS}^{min}$  et  $T_{PS}^{max}$  sont estimées à partir des proportions de vésicules immobiles dans une séquence d’images et fixées à  $T_{PS}^{min} = 30$  sec et  $T_{PS}^{max} = 100$  sec.

Par ailleurs, il est également nécessaire de prendre en compte les comportements *accidentels* et qui se limitent à une fraction résiduelle des vésicules simulées. On considère la *fusion de vésicules*, un évènement qui n’a pas été prouvé de manière biochimique, mais qui nous semble assez probable. Cet évènement se produit lors du croisement de deux vésicules. Pour simuler cet évènement, il est nécessaire que deux vésicules soient localisées au même endroit, au même instant. On établit ensuite la probabilité  $P_{fusion}$  que les deux vésicules  $p_1$  et  $p_2$  fusionnent à l’instant  $t$  pour donner une nouvelle vésicule  $p$  :

$$P_{fusion} = P(p_1 + p_2 = p | s(p_1, t) = s(p_2, t)). \quad (3.11)$$

Si les vésicules  $p_1$  et  $p_2$  fusionnent, alors la nouvelle vésicule  $p$  est associée soit à la paire  $OD_{p_1}$ , soit à la paire  $OD_{p_2}$ , et ce de manière équiprobable. La probabilité  $P_{fusion}$  n’est pas connue en théorie et est très difficile à estimer sur la base de séquences d’images réelles. Elle est fixée empiriquement dans nos expériences à une valeur de 0,4. Cette valeur est relativement élevée mais la situation où deux vésicules sont localisées au même endroit au même instant est assez rare. Une illustration est proposée sur la figure 3.4 (b).

Enfin, les vésicules effectuent aussi des mouvements arrière. Dans ce cas-là, elles s’arrêtent, rebrousse chemin et suivent un nouveau chemin. Nous définissons la probabilité  $P_{retour}$  pour qu’une vésicule change de chemin :

$$P_{retour} = P(\Gamma_p \rightarrow \Gamma'_p). \quad (3.12)$$

Cette probabilité est également inconnue. Nous avons décidé de lui attribuer une faible valeur ( $P_{retour} = 0,001$ ) étant donné que ce tirage a lieu à chaque instant de la simulation et que le comportement associé est marginal et peu fréquent. Une étude plus approfondie de cet évènement serait intéressante pour préciser cette probabilité. Si une vésicule rebrousse chemin, elle commence par s’arrêter. Ensuite, un nouveau chemin  $\Gamma'_p$  pour la même paire  $OD_p$  issu du sommet précédent (impliquant un retour en arrière) lui est attribué. La paire  $OD_p$  est conservée afin de préserver les proportions de trafic définies par l’expert. Un exemple de rebroussement de chemin est illustré sur la figure 3.4 (c).

### 3.1.5 Simulation du trafic vésiculaire

Avant de générer les premières vésicules, il reste encore à préciser quelques caractéristiques de simulation. Tout d’abord, il faut fixer la résolution spatiale des images. Celles que nous traitons sont acquises avec un microscope “spinning disk” et ont une résolution spatiale égale à  $64,5 \times 64,5 \times 300$  nm<sup>3</sup>.

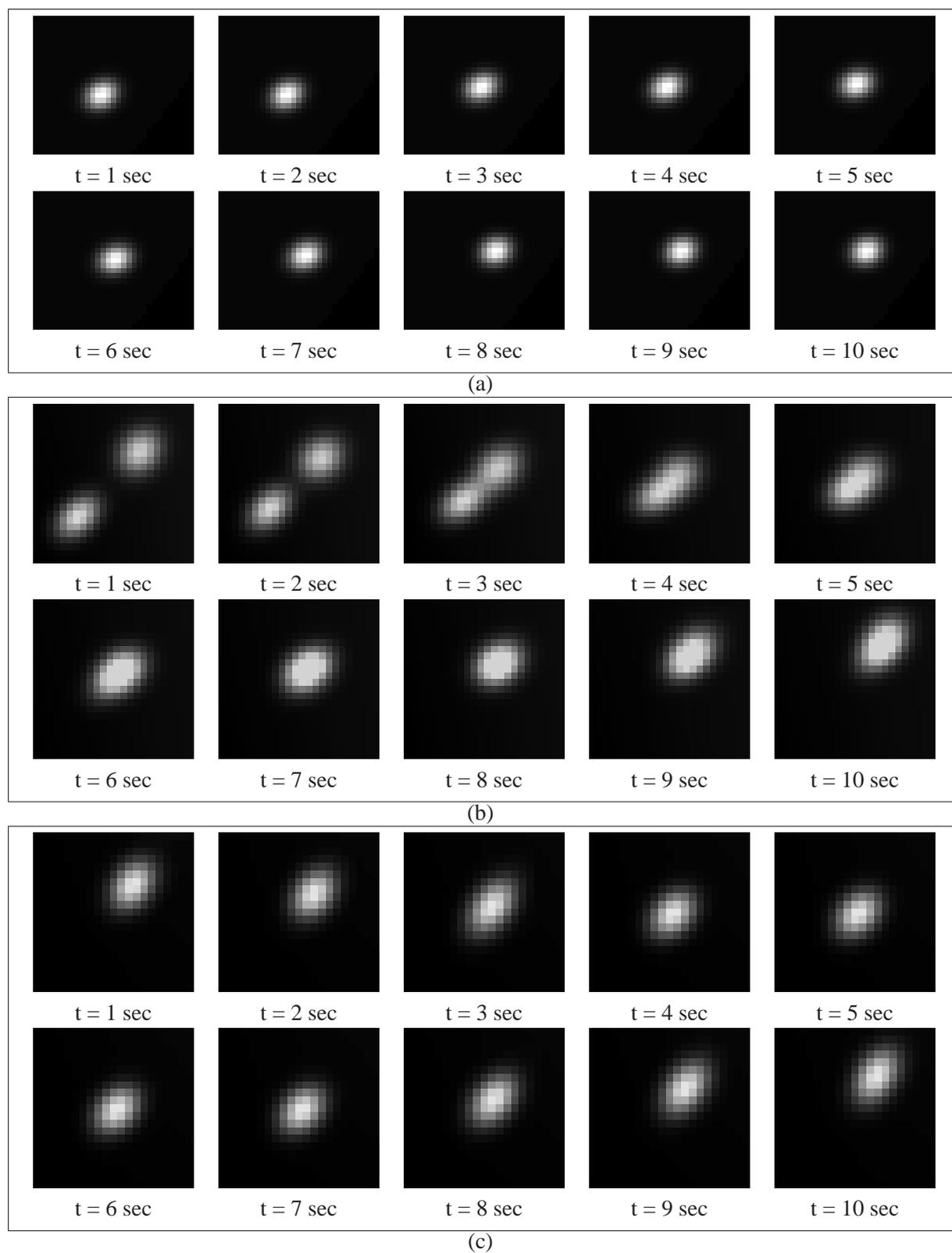


FIGURE 3.4: Trois exemples de comportements dynamiques différents de vésicules; (a) séquence d'images illustrant la trajectoire par à-coups observée par une vésicule; (b) fusion de deux vésicules; (c) rebroussement de chemin simulé par une vésicule.

$RS = 64,5 \times 64,5 \text{ nm}^2$	résolution spatiale des pixels de la séquence d'images simulée.
$\Delta T_{\text{séquence}} = 1 \text{ sec}$	pas de temps utilisé pour la séquence d'images générée.
$\Delta T_{\text{simulation}} = 0,1 \text{ sec}$	pas de temps utilisé pour la simulation.
<b>RM</b>	réseau de microtubules (support du trafic) défini par l'utilisateur.
$v^{OD}$	paires OD déterminées par l'utilisateur.
<b>A</b>	matrice de routage définissant les différents chemins $\Gamma$ associés à chaque paire OD.
$D_{ves} \sim \mathcal{N}(180, 900)$	diamètre du spot gaussien généré pour représenter une vésicule.
$I_{ves} \sim \mathcal{N}(25, 100)$	intensité maximale moyenne observée pour les vésicules.
$v_{ves} \sim \mathcal{N}(650, 250^2)$	vitesse de déplacement des vésicules.
$P_A = 0,7$	probabilité pour qu'une vésicule en "mouvement" s'arrête.
$P_M = 0,1$	probabilité pour qu'une vésicule à l'"arrêt" se mette en "mouvement".
$P_{NPS} = 0,5$	proportion de vésicules passant par un état "pseudo-stable".
$P_{PS} = 0,004 \times \Delta T_{\text{simulation}}$	probabilité pour qu'une vésicule entre dans un état "pseudo-stable".
$P_{fusion} = 0,4$	probabilité pour que deux vésicules situées au même endroit fusionnent.
$P_{retour} = 0,001$	probabilité pour qu'une vésicule change de chemin.
$T_{PS} \in [T_{PS}^{min}, T_{PS}^{max}]$	intervalle de temps pendant lequel une vésicule est "pseudo-stable".
$T_{PS}^{min} = 30 \text{ sec}$	borne inférieure pour $T_{PS}$ .
$T_{PS}^{max} = 100 \text{ sec}$	borne supérieure pour $T_{PS}$ .

TABLE 3.1: Ensemble des variables nécessaires à la simulation du trafic vésiculaire et leurs valeurs par défaut.

Nous souhaitons générer des images présentant une résolution spatiale analogue. Les simulations que nous proposons sont uniquement générées en dimension 2, et nous choisissons une résolution spatiale  $RS = 64,5 \times 64,5 \text{ nm}^2$ . Par ailleurs, la résolution temporelle des séquences d'images traitées est en général de 1 image/sec, soit  $\Delta T_{\text{séquence}} = 1 \text{ sec}$  pour l'affichage des séquences d'images simulées. En revanche, le pas de temps utilisé pour la simulation est plus fin pour mieux restituer les caractéristiques dynamiques des vésicules. Le comportement "stop-and-go" des vésicules provoque des effets différents suivant le pas de discrétisation temporelle utilisé. Si l'intervalle de temps est grand, les vésicules restent immobiles pendant un long moment, puis effectuent de grands déplacements lorsqu'elles sont mobiles. Cette situation est peu désirable, c'est pourquoi le pas de temps choisi pour la simulation est assez faible :  $\Delta T_{\text{simulation}} = 0,1 \text{ s}$ .

Les paramètres nécessaires de la simulation dynamique de vésicules sont finalement répertoriés dans le tableau 3.1. Une séquence d'images est obtenue avec ces paramètres en utilisant le réseau de microtubules illustré sur la figure 3.5 (a) et les paires OD présentées sur la même figure. Au cours de la simulation, le trafic est distribué uniformément sur chaque paire OD. Le réseau de microtubules est complexe (157 sommets dans le graphe associé, ce qui correspond à 24492 paires OD possibles). Trois images extraites d'une séquence simulée sont présentées sur la figure 3.5 (b-d). Sur ces images, on observe des vésicules qui se déplacent sur le réseau défini sur la figure 3.5 (a).

Le fait de recourir à la tomographie de réseaux pour simuler la dynamique de vésicules s'est avéré assez pertinent. L'ajout de caractéristiques physiques et dynamiques pour les vésicules (qu'elles soient connues ou inférées à partir de séquences d'images réelles) permet de générer des séquences d'images synthétiques qui miment le trafic vésiculaire. Cependant, le processus biologique complet des protéines Rab6 n'est pas simulé puisque l'appareil de Golgi ainsi que le cytosol ne sont pas encore pris en compte. C'est l'objet de la section suivante.

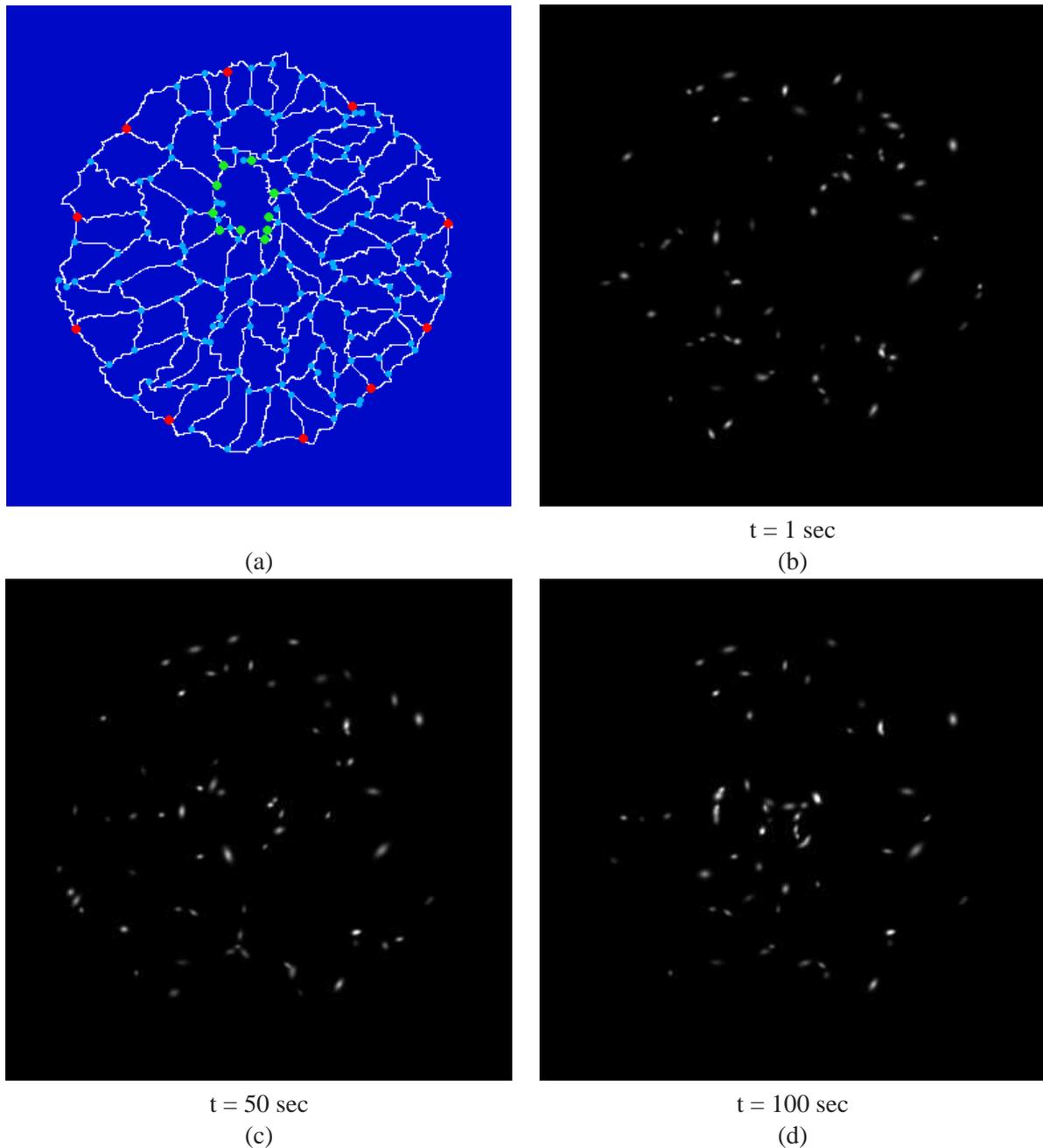


FIGURE 3.5: (a) Réseau de microtubules (blanc) et paires OD sur le réseau caractérisées par des disques verts pour les origines et des disques rouges pour les destinations; (b-d) 3 images extraites de la séquence d'images simulée avec le réseau et les paires OD de la figure (a), et les paramètres de simulation indiqués dans le tableau 3.1.

### 3.2 Cycle de la protéine Rab6

Les protéines Rab6 existent sous trois formes dans la cellule :

- embarquées dans des vésicules,
- en diffusion dans le cytosol,
- ancrées à l'appareil de Golgi.

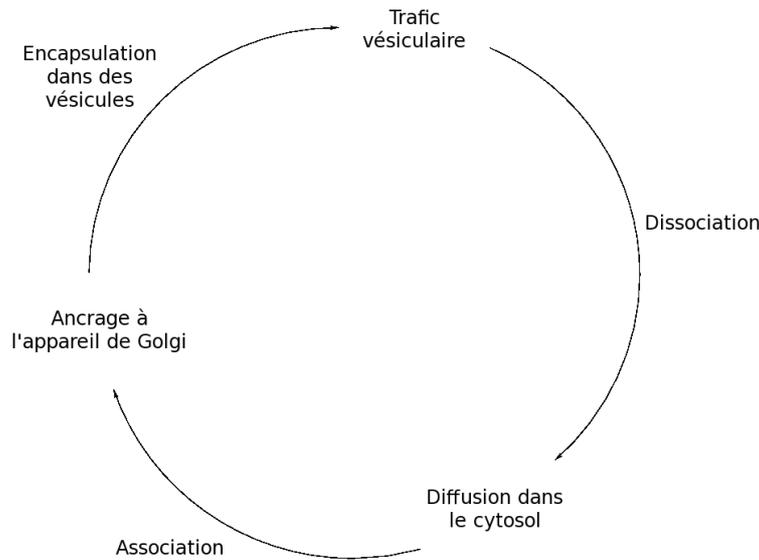


FIGURE 3.6: Succession d'états de la protéine Rab6 dans la cellule.

Ces trois phases font partie d'un cycle en circuit fermé illustré sur la figure 3.6 (section 1.3.4). La simulation du trafic vésiculaire a déjà été traitée dans la section précédente. Il reste par conséquent à simuler le comportement de l'appareil de Golgi et la diffusion dans le cytosol, puis à relier les trois phases entre elles.

### 3.2.1 Diffusion dans le cytosol

La diffusion est un phénomène de transport irréversible qui se traduit par la migration d'espèces chimiques dans un milieu. Sous l'effet de l'agitation thermique, on observe un déplacement des zones de forte concentration (*sources*) vers celles de faible concentration (*puits*) afin d'arriver à une concentration homogène. Lors de leur phase de diffusion cytosolique, les protéines Rab6 se déplacent de la périphérie de la cellule qui est le lieu de dissociation des vésicules (vraisemblablement des points d'entrée dans le reticulum endoplasmique) vers l'appareil de Golgi, auquel elles s'accrochent ensuite. Les *sources* sont ainsi formées par les protéines qui se dissocient des vésicules, et le *puits* est constitué par l'appareil de Golgi, destination des protéines en diffusion. L'équation de la chaleur introduite en 1811 par Fourier pour décrire la conduction thermique permet également de caractériser ce phénomène de diffusion. Par conséquent, nous reprenons cette équation aux dérivées partielles pour simuler la diffusion cytosolique.

Soit  $u_t$  l'image 2D simulée à l'instant  $t$ ,  $\Omega_{cell} \subset \mathcal{S} \subset \mathbb{R}^2$  le support borné de la cellule et  $\mathcal{S}$  le support (rectangulaire) de l'image  $u$ . L'équation de la chaleur au point  $s$  est de la forme :

$$\frac{\partial u(s, t)}{\partial t} = K_d \Delta u(s, t), \quad \forall s \in \mathcal{S}, \quad (3.13)$$

où  $\Delta$  est l'opérateur laplacien et  $K_d \in \mathbb{R}$  est le coefficient de diffusion des protéines Rab6 marquées par la GFP. Ce coefficient dépend aussi du coefficient de diffusion connu de la GFP (White & Stelzer 1999) et de la taille des protéines. Il est estimé à  $100 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ , soit une diffusion très rapide. À l'échelle de la cellule, cette diffusion est imperceptible si l'échantillonnage temporel est trop grand. De plus, pour simuler l'équation de la chaleur sans diverger en recourant à un schéma aux différences finies explicite en temps, il faut que l'échantillonnage temporel  $\delta t$  soit suffisamment faible (Morton & Mayers 2005).

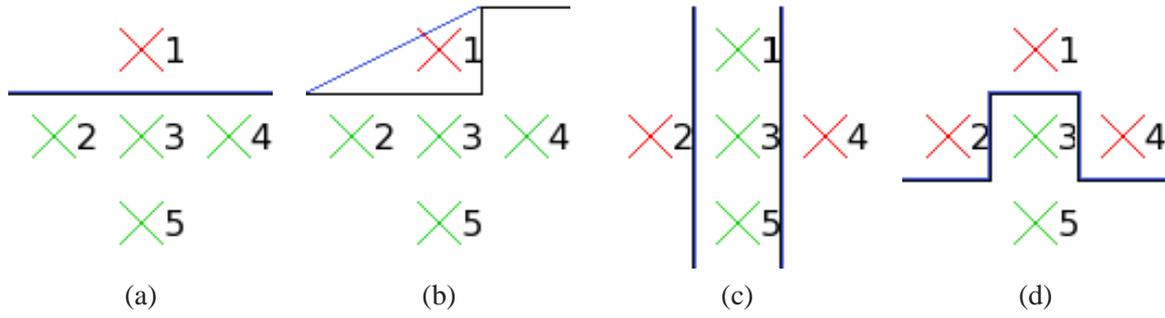


FIGURE 3.7: Exemples simples de zones locales situées sur le bord de la cellule. Le bord de la cellule résultant de la discrétisation sur la grille de pixels est représenté par des lignes noires tandis que le bord réel local est illustré par des lignes bleues. Les pixels sont illustrés par des croix vertes pour ceux qui sont à l'intérieur de la cellule et par des croix rouges pour ceux qui sont à l'extérieur de la cellule.

Ainsi, si  $\delta t = 0,1$ , un échantillonnage temporel d'une image par seconde et une résolution spatiale de  $64,5 \text{ nm} \times 64,5 \text{ nm}$  pour les pixels nécessite 24000 itérations. Comme le phénomène de diffusion dans ce cas est négligeable, un simple moyennage de l'intensité dans la cellule peut suffire pour prendre en compte la phase cytosolique des protéines Rab6 lors de la simulation. En revanche, si le but est d'observer finement l'évolution de la diffusion dans la cellule avec un échantillonnage temporel plus faible, en particulier pour des mesures de quantification, alors il est recommandé de simuler l'équation de la chaleur, avec une surcharge calculatoire.

Pour simuler une diffusion, il faut d'abord préciser les conditions initiales. Dans notre cas, cela revient à fixer une concentration initiale de fluorescence  $C_0$  à l'intérieur de la cellule :

$$u(s, 0) = C_0, \quad \forall s \in \Omega_{cell}. \quad (3.14)$$

Puisque la cellule est un réservoir fermé, il faut aussi préciser les conditions aux bords de la cellule. Il n'y a pas d'échanges entre le cytosol et le milieu extérieur de la cellule en ce qui concerne Rab6. Cette contrainte s'exprime par la condition aux limites de Neumann :

$$n(s) \cdot \nabla u(s, t) = 0, \quad \forall s \in \partial \Omega_{cell}, \quad (3.15)$$

où  $n(s)$  représente le vecteur normal unitaire au point  $s$ ,  $\partial \Omega_{cell}$  décrit le bord de la cellule et  $\nabla u(s, t)$  est le gradient spatial de l'image au point  $s$  et à l'instant  $t$ . La simulation étant réalisée sur un support discret (grille de l'image), ces conditions aux bords ne sont pas simples à vérifier sur le plan numérique. La méthode des éléments finis (Bathe & Khoshgoftaar 1979) permet de le faire de manière exacte, mais elle s'avère lourde à mettre en oeuvre. En pratique, nous préconisons quelques approximations (différences finies) pour simuler cette diffusion.

La contrainte aux bords (3.15) est équivalente à imposer un gradient spatial nul aux frontières de la cellule. L'opérateur laplacien calculé en un point fait intervenir ses quatre voisins. Si ces voisins sont localisés en dehors du support  $\Omega_{cell}$  de la cellule, il faut leur attribuer une valeur telle que le gradient spatial soit nul au bord. Quand le bord de la cellule coïncide avec la grille des pixels comme sur l'exemple (a) de la figure 3.7, il est facile d'attribuer une valeur d'intensité pour le pixel situé à l'extérieur de la cellule (pixel n°1) afin d'imposer un gradient local nul. En effet, une intensité égale à celle observée au pixel n°5 annule la contribution du gradient spatial projeté le long de la normale au contour. En revanche, sur l'exemple (b), le bord réel de la cellule illustré en bleu, ne coïncide pas avec la grille des pixels. Par conséquent, l'intensité à attribuer au pixel n°1 doit être interpolée en considérant les pixels n°2, n°4 et n°5. Souvent en analyse d'images, seul le voisin symétrique par rapport au pixel considéré est pris en compte (effet miroir). Dans cet exemple, l'intensité observée au pixel n°5 serait attribuée à

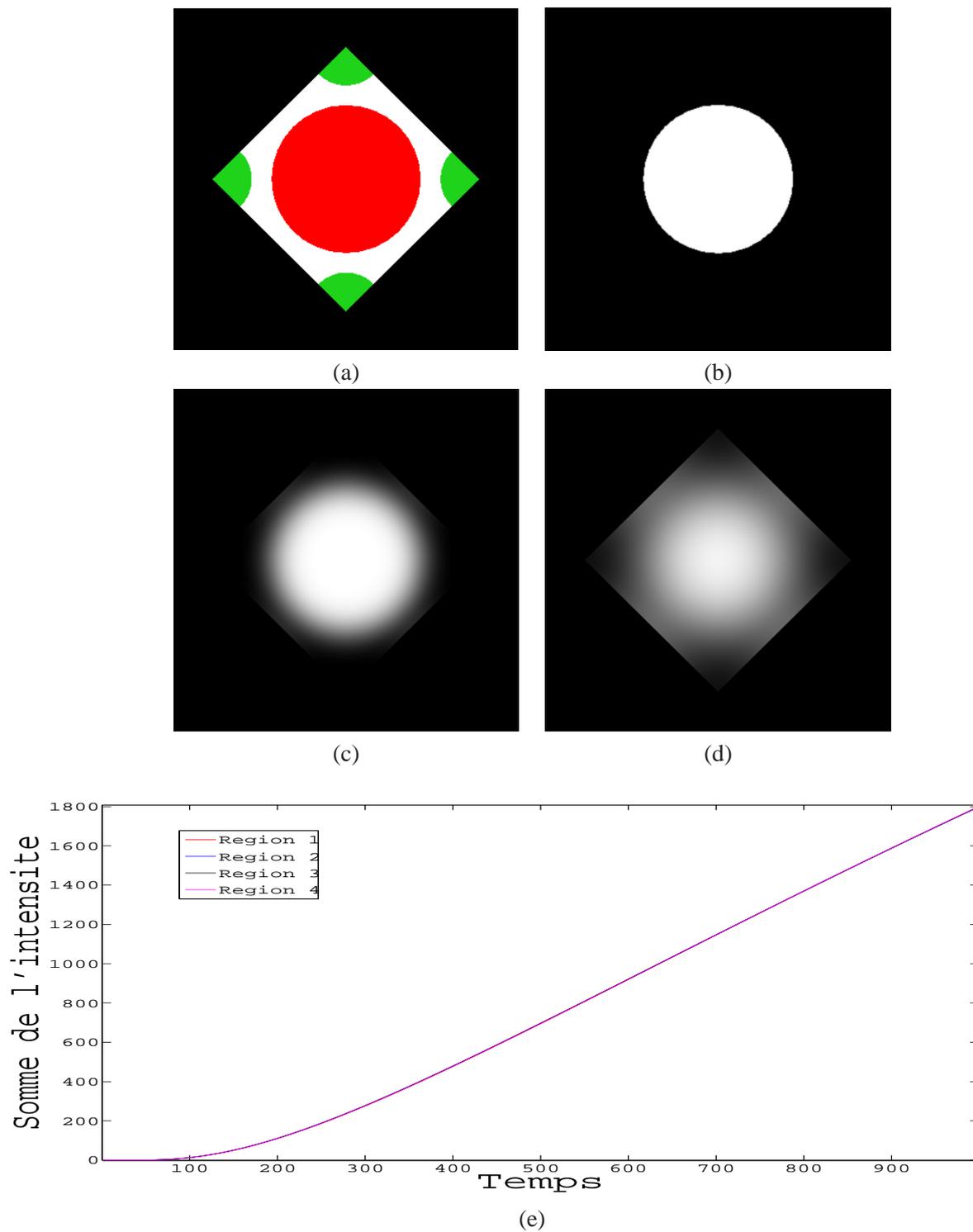


FIGURE 3.8: (a) Domaines de diffusion représenté en blanc et source de diffusion illustrée en rouge; (b-d) trois images simulant la diffusion du disque à l'intérieur du carré; (e) mesure de l'intensité présente dans chaque région labellisée en vert sur la figure (a).

celle du pixel n°1. Cependant, le gradient spatial projeté suivant la normale au bord vue du pixel n°3 (contour noir) est nul, mais il ne l'est pas suivant la normale à la frontière locale (contour bleu). Pour éviter ces effets, nous utilisons directement l'équation (3.15). Les composantes du gradient spatial sont définies de la manière suivante :

$$\nabla u(s) = (u(s_x + 1, s_y) - u(s_x - 1, s_y), u(s_x, s_y + 1) - u(s_x, s_y - 1))^T. \quad (3.16)$$

Soit le masque qui définit le support  $\Omega_{cell}$  de la cellule défini au pixel  $s$  comme :

$$a_{cell}(s) = \begin{cases} 1 & \text{si } s \in \Omega_{cell}, \\ 0 & \text{sinon.} \end{cases} \quad (3.17)$$

Le vecteur normal au bord de la cellule est calculé sur un voisinage  $3 \times 3$  autour du pixel central :

$$n(s) = \begin{pmatrix} a_{cell}(s_x - 1, s_y - 1) + a_{cell}(s_x - 1, s_y) + a_{cell}(s_x - 1, s_y + 1) \\ \quad - (a_{cell}(s_x + 1, s_y - 1) + a_{cell}(s_x + 1, s_y) + a_{cell}(s_x + 1, s_y + 1)) \\ a_{cell}(s_x - 1, s_y - 1) + a_{cell}(s_x, s_y - 1) + a_{cell}(s_x + 1, s_y - 1) \\ \quad - (a_{cell}(s_x - 1, s_y + 1) + a_{cell}(s_x, s_y + 1) + a_{cell}(s_x + 1, s_y + 1)) \end{pmatrix}. \quad (3.18)$$

L'équation (3.15) peut donc s'écrire de la manière suivante :

$$n(s) \cdot \begin{pmatrix} u(s_x + 1, s_y) - u(s_x - 1, s_y) \\ u(s_x, s_y + 1) - u(s_x, s_y - 1) \end{pmatrix} = 0. \quad (3.19)$$

Tant qu'il n'y a pas plus d'une inconnue, la résolution de (3.19) est triviale. S'il y a deux inconnues, une selon chaque direction, alors l'une des deux inconnues est initialisée avec l'intensité observée au point de coordonnées  $(s_x, s_y)$ . Les deux variables à déterminer sont estimées de manière croisée dans un processus itératif. Enfin, il reste deux situations pour lesquelles (3.19) n'est pas suffisante. Ces deux situations sont illustrées sur la figure 3.7 (c) et (d) où l'intensité des pixels n°2 et n°4 coïncide avec celle observée au pixel n°3. Dans le cas (d), l'intensité du pixel n°5 est attribuée à celle du pixel n°1. Ainsi, le gradient spatial projeté dans la direction normale au bord est nul. Toutefois, la normale n'est calculée que sur un voisinage local, ce qui entraîne encore quelques approximations. Afin d'évaluer si ces approximations sont négligeables, nous proposons de mesurer l'effet de la diffusion sur un domaine carré. La figure 3.8 (b) décrit l'initialisation et les figures (c) et (d) sont des images calculées après un certain temps. Afin de vérifier si la diffusion est identique quelle que soit l'orientation des contours, la somme de l'intensité à l'intérieur de chaque zone verte dans la figure (a) est calculée et reportée dans le graphe (e). On constate que la diffusion est la même dans chacune de ces régions. Cette quantité est sensée rester constante puisqu'il n'y a pas de fuite en dehors du carré (condition aux limites de Neumann). Il s'avère que cette quantité ne demeure pas constante. Les variations maximales observées par rapport à la quantité initiale sont de l'ordre de 0,1%, ce qui semble légitimer cette approximation.

La dernière phase du cycle de Rab6 (ancrage à l'appareil de Golgi) est décrite dans la section suivante.

### 3.2.2 Représentation de l'appareil de Golgi

L'appareil de Golgi apparaît comme la région la plus lumineuse dans les séquences d'images réelles car un très grand nombre de protéines y sont stockées. Les informations au niveau de l'appareil de Golgi sont assez limitées pour permettre une simulation. En conséquence, nous exploitons surtout les séquences d'images réelles pour simuler un comportement dynamique dans cette région. On remarque d'emblée la manifestation d'un comportement dynamique aléatoire de la fluorescence, ou tout du moins

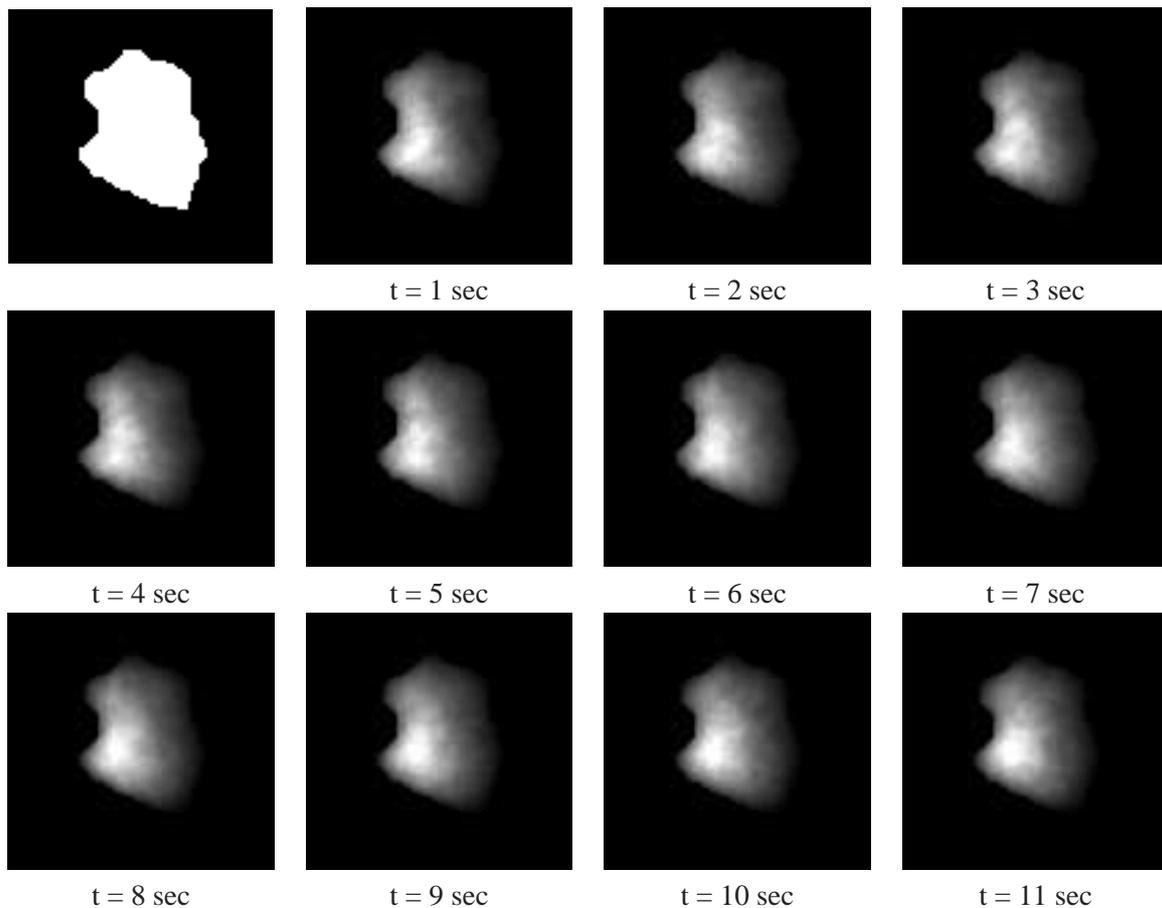


FIGURE 3.9: Image en haut à gauche : masque définissant le domaine occupé par l'appareil de Golgi ; les images suivantes illustrent le processus de simulation de l'appareil de Golgi à différents instants.

sans règle apparente. En pratique, l'utilisateur sélectionne une région d'intérêt à l'intérieur de la cellule coïncidant avec l'appareil de Golgi. Cette région est soit extraite d'une séquence d'images réelle, soit définie manuellement. Ensuite, l'intensité dans cette région est initialisée de manière aléatoire (loi uniforme sur  $[0, 255]$ ), puis filtrée par un noyau gaussien. À chaque instant de la simulation, cette région est perturbée et filtrée (filtre passe-bas) afin de mimer une zone active. Même si cette modélisation est tout à fait empirique et ne repose sur aucune hypothèse biologique précise, elle a le mérite de rendre la simulation plus réaliste, au moins visuellement. Surtout, il est possible de modéliser les échanges entre les trois états de la protéine Rab6. En effet, bien que l'appareil de Golgi soit simulé sans motivation biophysique bien précise, la somme des intensités à l'intérieur de celui-ci est contrôlée au cours de la simulation. Les protéines qui transitent du cytosol à l'appareil de Golgi, mais aussi celles qui sont décrochées de l'appareil de Golgi. Sur la figure 3.9, plusieurs images consécutives (1 image/sec) représentant un appareil de Golgi simulé sont présentées. L'appareil de Golgi simulé reproduit un comportement dynamique cohérent si on analyse les séquences d'images réelles.

### 3.2.3 Cohérence entre les différentes phases du cycle de la protéine Rab6

Nous avons décrit une méthodologie pour simuler la protéine Rab6 sous ses trois états : trafic vésiculaire, diffusion cytosolique et ancrage à l'appareil de Golgi. Avant de simuler le cycle biologique complet, il nous reste à étudier les équilibres et les échanges entre ces différentes phases. Tout d'abord, il

$\Omega_{cell}$		masque de la cellule définie par l'utilisateur.
$\mathbf{m}_{AG}$		région occupée par l'appareil de Golgi déterminée par l'utilisateur.
RG	= 33%	proportion de l'intensité observée dans l'appareil de Golgi.
RC	= 65%	proportion de l'intensité observée dans le cytosol.
RV	= 2%	proportion de l'intensité observée dans les vésicules.
$\bar{I}_c$	= 30	intensité moyenne observée dans le cytosol.
$K_d$	= $100 \mu\text{m}^2/\text{s}$	constante de diffusion des protéines Rab6 dans le cytosol.

TABLE 3.2: Ensemble des variables nécessaires à la simulation de la diffusion cytosolique et de l'ancrage à l'appareil de Golgi des protéines Rab6, ainsi qu'à l'équilibre et aux échanges entre les trois formes de la protéine Rab6 à l'intérieur de la cellule.

est important de connaître les relations d'équilibre d'intensité entre les trois formes de la protéine Rab6. Si les vésicules, et surtout l'appareil de Golgi, présentent une forte intensité lumineuse, le cytosol, plus sombre, est plus diffus dans toute la cellule. Ces écarts de forme et de niveaux d'intensité ne facilitent pas la caractérisation de chaque phase. Par la combinaison d'expériences de vidéo-microscopie et de FRAP sur un nombre significatif de cellules isolées, l'équipe PICT-IBIsA (UMR 144) de l'Institut Curie a estimé les rapports de fluorescence entre appareil de Golgi (RG), cytosol (RC) et vésicules (RV) :  $RG = 33\%$ ,  $RC = 65\%$  et  $RV = 2\%$ . Calculés empiriquement, ces résultats sont néanmoins suffisamment fiables pour être exploités. Notons cependant que ces proportions ne permettent pas encore de simuler les interactions. En effet, il est nécessaire de connaître l'intensité moyenne dans le cytosol, dans l'appareil de Golgi ou le nombre moyen de vésicules présentes dans une image pour générer le cycle. L'appareil de Golgi présente une quantité de fluorescence qui sature parfois lors de l'acquisition ; le nombre moyen de vésicules n'est pas aisé non plus à évaluer. C'est pourquoi nous avons mesuré l'intensité de fluorescence moyenne observée dans le cytosol, sur plusieurs séquences d'images. À cette intensité moyenne  $\bar{I}_c = 30$  dans le cytosol correspond une intensité moyenne dans l'appareil de Golgi, ainsi qu'une quantité de vésicules en trafic grâce aux rapports de fluorescence définis précédemment entre les trois formes de la protéine Rab6.

L'étape suivante consiste à gérer les échanges entre les différentes phases du cycle. Tout d'abord, le nombre de vésicules générées dans lesquelles sont confinées les molécules issues de l'appareil de Golgi vérifie les relations d'équilibre d'intensité. À chaque instant de la simulation, l'intensité observée dans les vésicules représente donc 2% de l'intensité totale à l'intérieur de la cellule. Une fois les vésicules arrivées à destination, la fluorescence totale qui réside est *transmise* au cytosol. La fluorescence au niveau de l'appareil de Golgi augmente aussi en respectant les conditions d'équilibre, de l'ordre de 33%.

Finalement, nous reportons dans le tableau 3.2 les paramètres nécessaires pour compléter la description du trafic (tableau 3.1). En raison de la propriété d'addition de la fluorescence (section 1.4.4), les trois formes simulées de la protéine Rab6 sont additionnées. Dans la section suivante, nous évaluons cette simulation en la comparant avec des séquences d'images réelles.

### 3.3 Simulation de la protéine Rab6

Pour évaluer la simulation, nous générons des séquences d'images pour une cellule de forme circulaire d'une part, et de forme arbalète d'autre part. Nous comparons les images, mais aussi des projections d'intensité selon l'axe temporel avec des séquences d'images réelles. Les projections pertinentes sont la carte de Projection d'Intensité Maximale (PIM) et la carte de Projection d'Intensité en Écart-type (PIE). En effet, elles permettent d'extraire les lieux de la cellule où l'intensité ou les différences d'intensité sont maximales, ce qui correspond majoritairement aux trajectoires des vésicules. Or, nous souhaitons simuler plus particulièrement le trafic vésiculaire. La carte PIM est définie au point  $s$  de la manière

suivante :

$$\text{pim}(u)(s) = \max_{t \in \{1, \dots, T\}} u(s, t), \quad (3.20)$$

où  $T$  désigne le nombre d'images dans la séquence, et la carte PIE est définie comme :

$$\text{pie}(u)(s) = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t=1}^T (u(s, t) - \bar{u}(s))^2}, \quad (3.21)$$

où  $\bar{u}(s)$  représente l'intensité moyenne mesurée au point  $s$  au cours de la séquence d'images. Afin d'obtenir un réseau de microtubules réaliste, nous exploitons deux volumes d'images réels (une cellule contrainte par un *micro-patron* de forme circulaire et une cellule contrainte par un *micro-patron* de forme arbalète) volumes pour lesquels la cellule est fixée et le réseau de microtubules est marqué par fluorescence. Cette acquisition est réalisée en trois dimensions. Afin d'extraire un réseau en deux dimensions, le volume 3D est projeté sur un plan. Ensuite, l'algorithme de Steger (Steger 1996) appliqué à cette image permet d'obtenir des fragments de microtubules qui sont ensuite complétés manuellement. La projection 2D d'un réseau de microtubules marqué pour une cellule contrainte par un *micro-patron* circulaire (respectivement en forme d'arbalète) est illustré sur la figure 3.10 (a) (respectivement 3.10 (b)). Le réseau de microtubules résultant est illustré sur la figure 3.10 (c) (respectivement 3.10 (d)). Des images consécutives (1 image/sec) tirées d'une séquence simulée et d'une séquence réelle sont présentées sur les figures 3.11 et 3.12 pour des cellules de forme circulaire et de forme arbalète. L'utilisation de formes contraintes pour les cellules facilite la comparaison de séquences d'images simulées à des séquences d'images réelles car le support de l'activité est le même. Pour les deux types de contraintes appliquées à la cellule, le trafic vésiculaire et l'appareil de Golgi générés semblent cohérents avec ceux observés dans les images réelles. Le cytosol simulé est moins réaliste. Cela est dû à un amoncellement d'objets indéterminés présents dans le fond et qui ne sont pas pris en compte par notre simulation. Afin de générer des séquences plus réalistes, il serait intéressant d'extraire cet amoncellement d'objets indéterminés sur une séquence d'images réelles et de l'ajouter à la simulation. Les cartes PIM et PIE sont conformes avec cette première analyse. L'appareil de Golgi est en effet caractérisé par une tâche très lumineuse sur les cartes de projection issues de la séquence réelle et de la séquence artificielle. Le trafic vésiculaire est représenté par un certain nombre de segments correspondant à des fractions de trajectoires de vésicules. En revanche, le fond diffère sur les cartes de projection.

Enfin, on simule une expérience de FRAP (voir section 1.2.2) sur une séquence d'images simulée. Cette manipulation est illustrée sur la figure 3.13 pour un pas de temps  $\Delta T_{\text{séquence}} = 0,05$  sec. Dans ce cas, la région définie par l'expert est un disque. Sur les images suivantes, on constate une augmentation progressive de fluorescence à l'intérieur de cette région, qui est à nouveau emplie de fluorescence (quasiment au même niveau que le reste du cytosol) après 0,35 sec. En revanche, les vésicules localisées en-dehors de cette région avant extinction de la fluorescence n'ont pas eu le temps de se déplacer jusque dans cette zone, ce qui explique leur absence dans cette région. Il faut bien noter que les échelles dynamiques de diffusion du cytosol et de déplacement des vésicules sont tout à fait différentes. Ce type de simulation peut servir à estimer les paramètres de retour de fluorescence dans une vraie expérience de FRAP. Il suffit alors d'extraire la forme de la cellule, puis de simuler l'extinction de la fluorescence dans la même région que celle effectuée dans l'expérience. La comparaison entre la séquence d'images réelle et la simulation permet ensuite d'estimer les paramètres de retour de fluorescence.

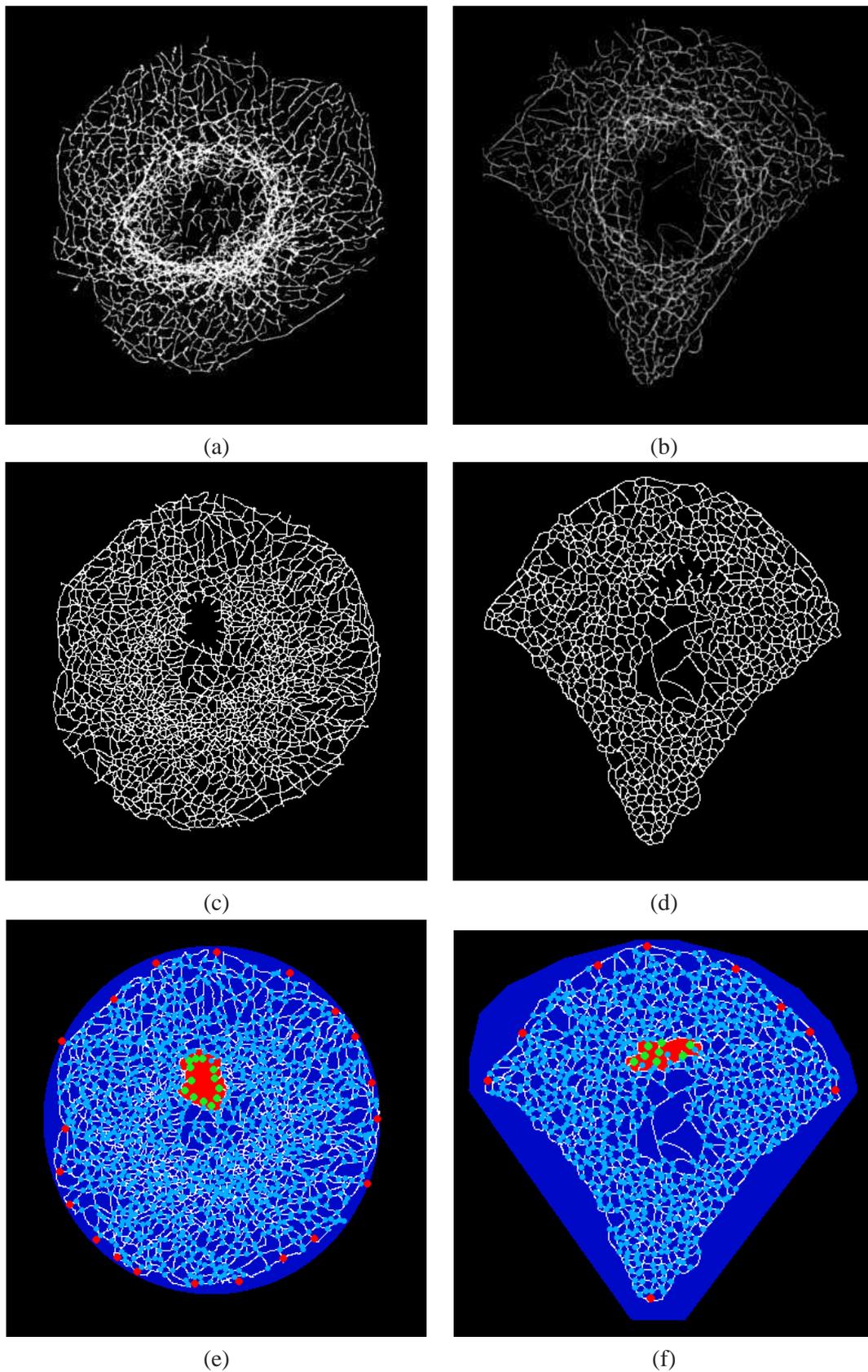


FIGURE 3.10: (a-b) Projection 2D de l'acquisition en 3D du réseau de microtubules marqué par la GFP pour une cellule contrainte par un micro-patron circulaire (a) et en forme d'arbalète (b) (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation); (c-d) réseaux de microtubules obtenus à partir des acquisitions (a-b) en appliquant l'algorithme de Steger amélioré manuellement; (e-f) cellule (bleu foncé) et appareil de Golgi (rouge) utilisés pour générer une séquence d'images synthétique. Le réseau de microtubules est représenté en blanc et les sommets du graphe associés sont en bleu clair. Les paires OD simulées dans les figures 3.11 et 3.12 sont définies par les disques verts (origines) et rouges (destinations).

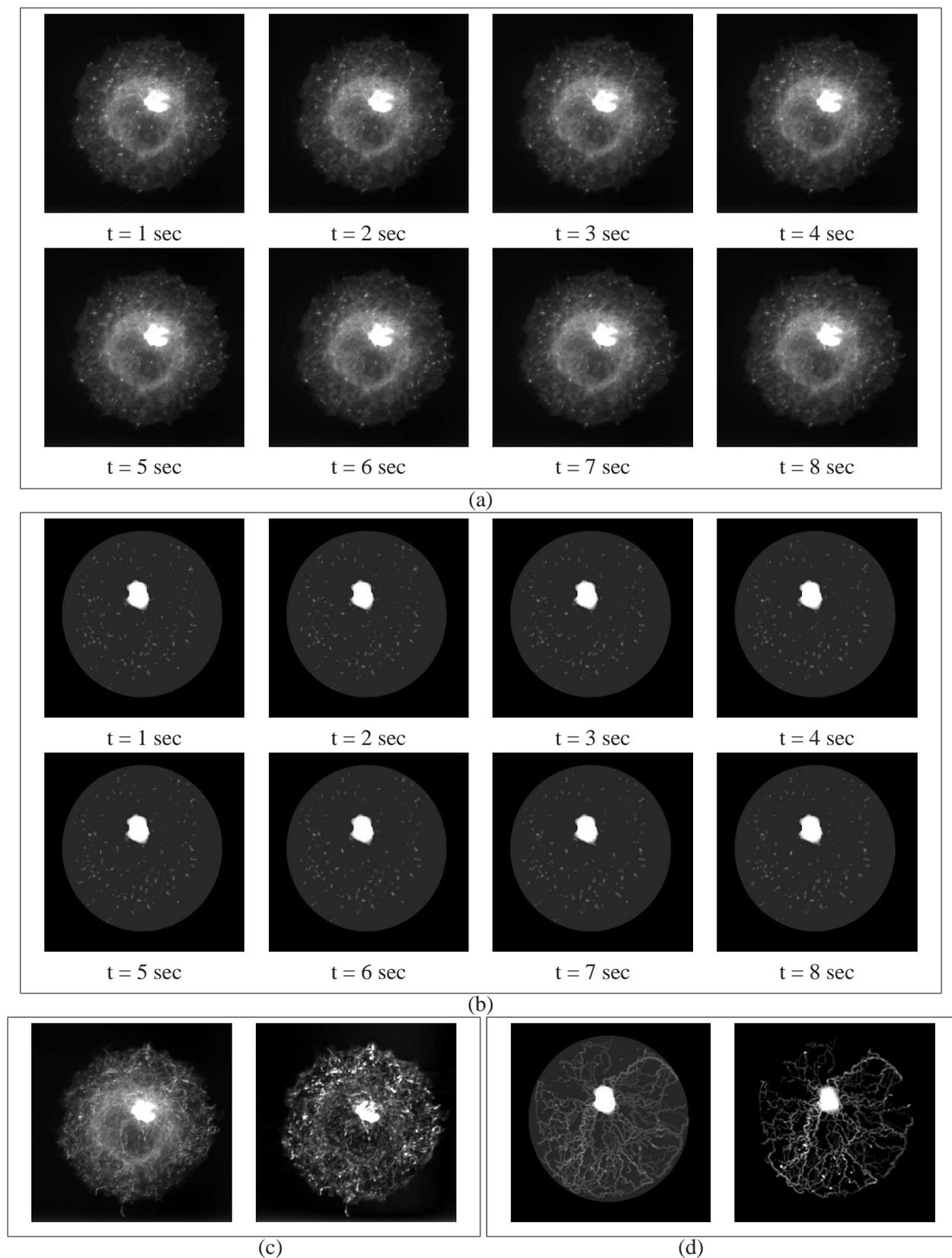


FIGURE 3.11: (a) Images consécutives extraites d'une séquence d'images réelle avec une cellule contrainte par un micro-patron de forme circulaire; (b) images consécutives extraites d'une simulation avec une cellule de forme circulaire; (c) carte PIM et carte PIE calculées à partir de la séquence d'images réelle (a); (d) carte PIM et carte PIE calculées à partir de la séquence artificielle (b).

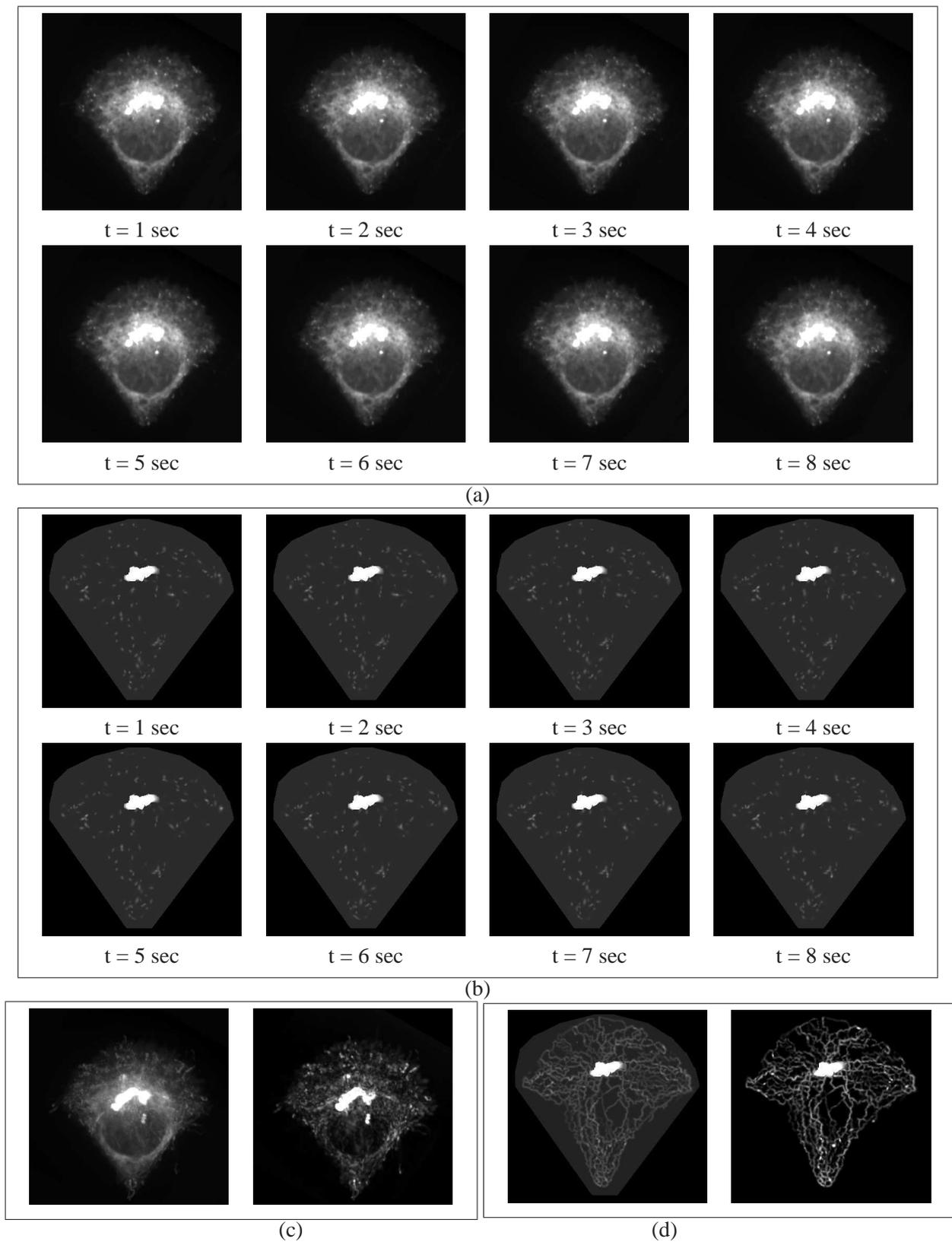


FIGURE 3.12: (a) Images consécutives extraites d'une séquence d'images réelle avec une cellule contrainte par un micro-patron en forme d'arbalète; (b) images consécutives extraites d'une simulation avec une cellule en forme d'arbalète; (c) carte PIM et carte PIE calculées à partir de la séquence d'images réelle (a); (d) carte PIM et carte PIE calculées à partir de la séquence artificielle (b).

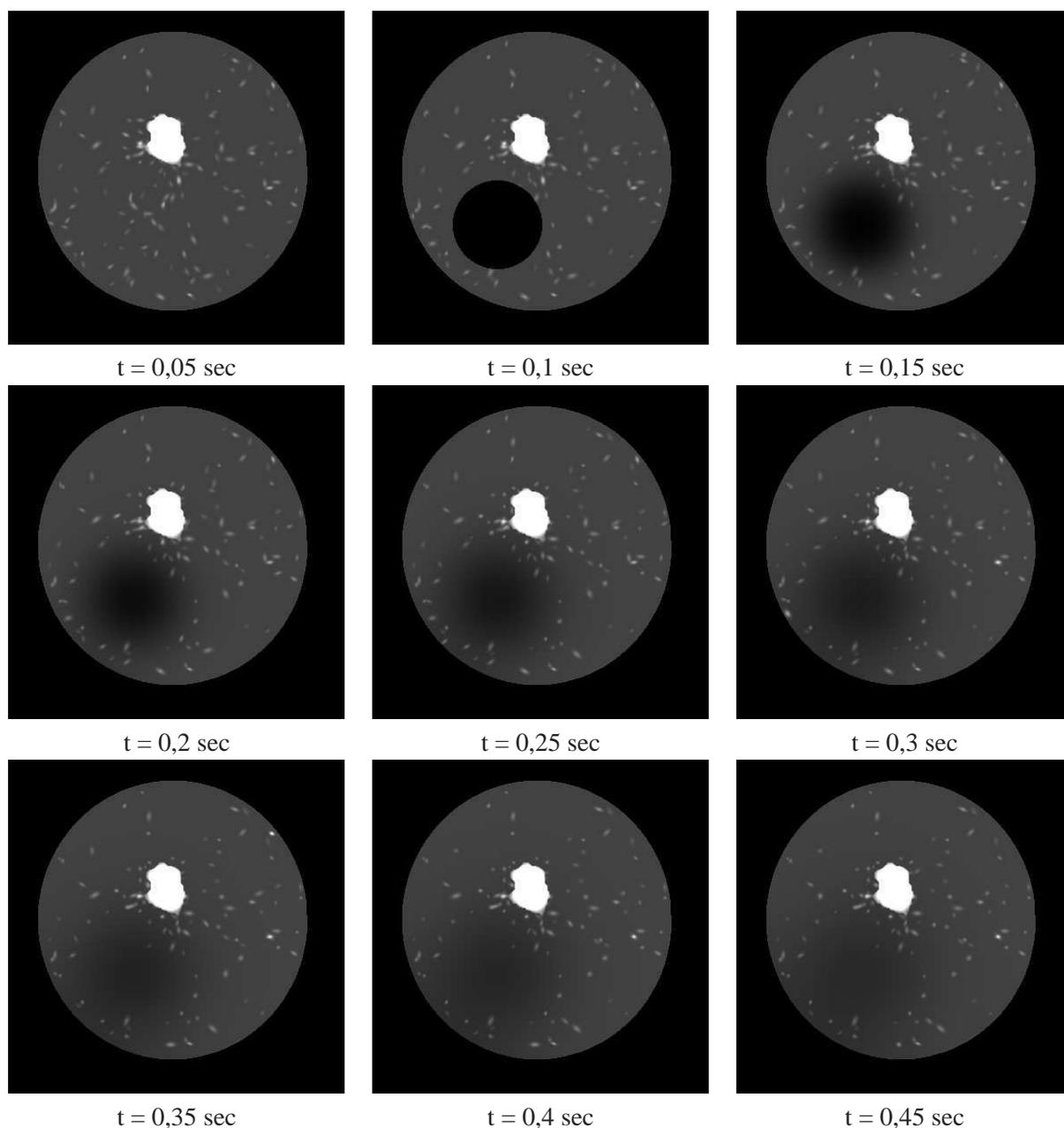


FIGURE 3.13: Images consécutives extraites d'une simulation pour une cellule de forme circulaire. Une simulation de FRAP est opérée sur la deuxième image dans un domaine rond.

### 3.4 Bilan

Dans ce chapitre, nous avons développé un générateur de séquences d'images mimant le cycle de la protéine Rab6 à l'intérieur de la cellule. Ce générateur peut servir potentiellement à la simulation de trafics vésiculaires à l'intérieur de la cellule. Son utilisation est simple : il suffit à l'utilisateur de fournir en entrée de l'algorithme un support pour la cellule dans l'image, un réseau de microtubules, et ensuite de définir les paires origine-destination des vésicules sur ce réseau de manière interactive. L'ensemble des paramètres de la simulation peut être modifié avant, ou pendant la simulation. Si l'utilisateur souhaite

simuler l'ensemble du trafic de la protéine Rab6, il doit également fournir le support de l'appareil de Golgi dans la cellule. Deux possibilités s'offrent à lui : soit la diffusion est simulée à partir de l'équation de la chaleur (3.13), soit l'intensité observée est la même dans tout le cytosol. Si l'échantillonnage temporel de la séquence est suffisamment faible (inférieur à 20 images/sec), il n'est pas nécessaire de simuler la diffusion du cytosol à partir de l'équation de la chaleur car le coefficient de diffusion de la protéine Rab6 dans le cytosol est très grand, et la diffusion est très rapide. De plus, cela permet de gagner beaucoup de temps de calcul. La simulation de séquences artificielles est rapide (1 image/sec pour les séquences présentées sur les figures 3.11 et 3.12) si la diffusion du cytosol n'est pas considérée. Avant le lancement de la simulation, il faut prévoir une période de recherche des  $k$  plus courts chemins dans le graphe pour définir les différents chemins empruntés par les vésicules pour chaque paire origine-destination (2 min 12 sec pour calculer les 100 chemins les plus courts pour les 20 paires origine-destination définies sur le réseau présenté sur la figure 3.11). Nous avons développé ce générateur sous C++.

### 3.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons proposé une méthode de simulation du trafic vésiculaire adaptée au cas très particulier des protéines Rab exploitant le concept de tomographie de réseaux. Cette approche permet de définir les origines et les destinations des vésicules sur un réseau de microtubules. Nous nous sommes appuyés sur des caractéristiques physiques connues des vésicules, mais aussi sur l'observation fine de séquences d'images réelles pour reproduire un trafic réaliste. Nous avons également exploité des connaissances théoriques pour simuler l'étape de diffusion des protéines dans le cytosol. Nous nous sommes contentés d'une représentation de l'appareil de Golgi cohérente avec l'observation de séquences réelles. Enfin, les trois phases du cycle de la protéine Rab6 sont connectées sur la base d'informations issues d'expérimentations réelles.

Le simulateur développé est adapté à la protéine Rab6, mais il peut être utilisé pour simuler plusieurs trafics vésiculaires à l'intérieur de la cellule. C'est un outil de modélisation pour les biologistes. Il leur permet de générer des comportements dynamiques fidèles aux données réelles. Il est par ailleurs possible d'identifier des paramètres sur une séquence réelle et de les introduire dans une simulation. La comparaison avec des séquences réelles permet d'évaluer le niveau de réalisme de la simulation. À notre niveau, il semble possible de comparer les séquences simulées ou leurs résumés (cartes de projection) à l'aide de modélisations statistiques, telles que celles proposées par Zhu, Wu & Mumford (1998).

La simulation de séquences d'images permet de générer des vérités-terrain pour évaluer les algorithmes de traitement d'images (segmentation, détection, suivi, ...). Cet outil est aussi indispensable pour évaluer la méthode d'estimation de trafic par tomographie de réseaux.

---

### Séparation des composantes “objet” et “fond” en vidéo-microscopie

---

En microscopie de fluorescence et biologie cellulaire, des structures de formes diverses et d'intensité variable évoluent au cours du temps sur un fond dynamique et non uniforme. Si la localisation et la morphologie des structures observées dans l'image ainsi que leur évolution au cours du temps sont essentielles, l'évolution du fond de la séquence peut également apporter des informations pertinentes. Dans notre étude portant sur la protéine Rab6, les objets observés sont les vésicules et l'appareil de Golgi (composante membranaire) tandis que le fond correspond à la composante cytosolique. Une séparation des composantes “objet” et “fond” permet donc potentiellement d'isoler les composantes membranaire et cytosolique.

L'analyse automatique d'images permet de quantifier le contenu de séquences d'images de manière reproductible, rapide et non subjective. La collecte de ces informations est en effet longue et fastidieuse, et de ce fait est effectuée en général par plusieurs experts-biologistes. Un protocole de mesure précis est aussi nécessaire. Or, dans des conditions difficiles (une détection sur une image présentant un faible rapport signal sur bruit par exemple), un expert éprouve parfois des difficultés pour analyser deux images au contenu similaire. Les informations extraites grâce aux méthodes d'analyse d'images permettent avantagement de tester des hypothèses sur un grand nombre d'expérimentations.

Dans ce chapitre, nous proposons de traiter le cas de la séparation des composantes “objet” et “fond” dans des séquences d'images de microscopie de fluorescence selon deux points de vue : i) une détection des objets d'intérêt puis une estimation de la composante “fond”, ii) une séparation directe des deux composantes. La détection est une problématique majeure en analyse d'images et a suscité un grand intérêt ces dernières années. Certaines méthodes ont été validées en vidéo-microscopie (Olivo-Marin 2002, Jiang, Zhou, Kirchhausen & Wong 2007), d'autres ont été spécifiquement conçues pour cette modalité d'imagerie. Les méthodes de séparation des composantes “objet” et “fond” ont été appliquées dans le cadre général de la vidéo-surveillance ; une scène de référence, remise à jour (Crivelli, Piriou, Cernuschi-Frias, Bouthemy & Yao 2008) ou non (Odoñez & Bouthemy 1997) au cours du temps, est bien souvent utilisée afin de détecter les objets d'intérêt en avant plan.

Dans ce chapitre, nous présentons dans une première partie quelques méthodes de détection et de séparation préconisées en microscopie de fluorescence. Ensuite, nous proposons une nouvelle méthode de séparation formulée dans le cadre des champs aléatoires conditionnels. L'approche proposée exploite notamment la comparaison entre motifs voisins de l'image. Un schéma alterné est également proposé pour améliorer la détection, et par conséquent la séparation. Les performances de cette méthode sont évaluées et comparées à d'autres méthodes compétitives de détection. Enfin, dans une dernière partie,

nous comparons différentes méthodes de séparation sur des séquences d'images réelles et synthétiques.

## 4.1 État de l'art

Dans cette section, nous décrivons quelques méthodes assez usuelles, permettant de séparer les composantes "objet" et "fond" en microscopie de fluorescence. Cette revue n'est pas exhaustive mais relate les méthodes les plus conventionnelles.

### 4.1.1 Détection d'objets d'intérêt en vidéo-microscopie

#### Seuillage d'images

Les méthodes les plus simples de détection d'objets d'intérêt en vidéo-microscopie sont les méthodes de seuillage de l'intensité (Work & Warshaw 1992). On suppose que les objets d'intérêt, qui coïncident avec les molécules marquées et lumineuses présentent une intensité plus élevée que les structures liées au "fond". La question centrale est de déterminer le "bon" seuil au-dessus duquel l'intensité correspond aux objets désirés. Plusieurs techniques de seuillage sont alors envisageables.

**Seuillage automatique par maximum d'entropie** L'entropie d'un signal correspond intuitivement à la quantité d'information portée par ce signal. En considérant un signal  $S$  comportant  $N_S$  symboles, l'entropie  $H(S)$  du signal est donné par :

$$H(S) = - \sum_{j=1}^{N_S} P(j) \log_2 P(j), \quad (4.1)$$

où  $P(j)$  représente la probabilité pour le symbole  $j$  d'apparaître dans le signal  $S$ .

Soit une image  $\mathbf{I} = \{I(s)\}_{s=1, \dots, N_I}$  telle que  $I_{min} \leq I(s) \leq I_{max}$  et  $N_I$  est le nombre de pixels de l'image  $\mathbf{I}$ . L'histogramme de  $\mathbf{I}$  permet d'approcher empiriquement la distribution des intensités observées dans l'image si bien que  $P(j)$  est définie comme la proportion de pixels dans l'image dont l'intensité est égale à  $j$ . L'introduction d'un seuil  $\varsigma$  permet de séparer l'histogramme en deux parties, dont l'entropie est donnée par :

$$\begin{aligned} H^-(\mathbf{I}) &= - \sum_{j=I_{min}}^{\varsigma} P(j|j < \varsigma) \log_2 P(j|j < \varsigma), \\ H^+(\mathbf{I}) &= - \sum_{j=\varsigma}^{I_{max}} P(j|j \geq \varsigma) \log_2 P(j|j \geq \varsigma), \end{aligned} \quad (4.2)$$

où  $P(j|j < \varsigma)$  (respectivement  $P(j|j \geq \varsigma)$ ) est la proportion de pixels dans l'image dont l'intensité est inférieure ou égale (respectivement supérieure) à  $\varsigma$ . Le seuil  $\hat{\varsigma}$  choisi est celui qui maximise la somme des entropies  $H^-(\mathbf{I})$  et  $H^+(\mathbf{I})$  (Kapur, Sahoo, & Wong 1985, Sahoo, Slaaf & Albert 1997) :

$$\hat{\varsigma} = \arg \max_{I_{min} \leq \varsigma \leq I_{max}} H^-(\mathbf{I}) + H^+(\mathbf{I}). \quad (4.3)$$

**Maximum de vraisemblance et algorithme EM** Dans certains contextes, les composantes "objet" et "fond" sont identifiées par une intensité différente. On peut supposer que chacune de ces classes de pixels obéit à une densité de probabilité approchée par une loi gaussienne. L'histogramme de l'image est

alors modélisé par un mélange de deux gaussiennes. Chacune des composantes peut être estimée par l'algorithme Espérance-Maximisation (EM) (Dempster et al. 1977, Tsai, Wells, Warfield & Willsky 2005) décrit à la section 2.2.1.

On considère que l'ensemble des intensités observées  $\mathbf{I} = \{I(s)\}_{s=1, \dots, N_I}$  suit une loi  $f(I(s), \Theta)$  paramétrée par  $\Theta$ . On suppose que les intensités observées sont indépendantes. Sous cette hypothèse, on cherche à déterminer le paramètre  $\Theta$  qui maximise la log-vraisemblance

$$L(\mathbf{I}; \Theta) = \sum_{s=1}^{N_I} \log(f(I(s), \Theta)). \quad (4.4)$$

On s'appuie sur des données complétées par un vecteur  $\phi = \{\phi(1), \dots, \phi(N_I)\}$ . La log-vraisemblance complétée est définie comme :

$$L((\mathbf{I}, \phi); \Theta) = \sum_{s=1}^{N_I} (\log f(\phi(s)|I(s), \Theta) + \log f(I(s); \Theta)), \quad (4.5)$$

ce qui donne :

$$L(\mathbf{I}; \Theta) = L((\mathbf{I}, \phi); \Theta) - \sum_{s=1}^{N_I} \log f(\phi(s)|I(s), \Theta). \quad (4.6)$$

L'algorithme EM est une procédure itérative qui permet de maximiser la vraisemblance. En notant  $\Theta^{(k)}$  ce paramètre, on peut écrire :

$$\mathbb{E} \left( L(\mathbf{I}; \Theta) | \Theta^{(k)} \right) = \mathbb{E} \left( L((\mathbf{I}, \phi); \Theta) | \Theta^{(k)} \right) - \mathbb{E} \left( \sum_{s=1}^{N_I} \log(f(\phi(s)|I(s), \Theta) | \Theta^{(k)}) \right). \quad (4.7)$$

En notant  $Q(\Theta; \Theta^{(k)}) = \mathbb{E} \left( L((\mathbf{I}, \phi); \Theta) | \Theta^{(k)} \right)$ , on montre que la suite  $\Theta^{(k+1)} = \arg \max_{\Theta} Q(\Theta; \Theta^{(k)})$  permet d'atteindre un maximum local de  $L(\mathbf{I}; \Theta^{(k+1)})$ .

On suppose que l'ensemble des intensités de l'image  $\mathbf{I}$  est issu de deux groupes  $G_1$  et  $G_2$  qui suivent une loi  $f$  identique de paramètres  $\theta_1$  et  $\theta_2$ , et dont les proportions sont données par  $\pi_1$  et  $\pi_2 = (1 - \pi_1)$ . En notant  $\Theta = (\pi_1, \pi_2, \theta_1, \theta_2)$ , la densité de probabilité au pixel  $s$  est alors de la forme :

$$P(I(s); \Theta) = \pi_1 f(I(s), \theta_1) + \pi_2 f(I(s), \theta_2). \quad (4.8)$$

Soit également le vecteur des variables indicatrices  $\phi_j = \{\phi_j(1), \dots, \phi_j(N_I)\}$  où  $j \in \{1, 2\}$  est défini comme :

$$\phi_j(s) = \begin{cases} 1 & \text{si } s \in G_j, \\ 0 & \text{sinon.} \end{cases} \quad (4.9)$$

L'algorithme EM, une fois mis en oeuvre, alterne deux étapes jusqu'à convergence :

- étape E (mise à jour des labels  $\phi_j, j \in \{1, 2\}$ ) :

$$\begin{aligned} \mathbb{E}(\phi_1(s) | \mathbf{I}, \Theta^{(k)}) &= \frac{\pi_1 f(I(s), \theta_1)}{\pi_1 f(I(s), \theta_1) + \pi_2 f(I(s), \theta_2)}, \\ \mathbb{E}(\phi_2(s) | \mathbf{I}, \Theta^{(k)}) &= \frac{\pi_2 f(I(s), \theta_2)}{\pi_1 f(I(s), \theta_1) + \pi_2 f(I(s), \theta_2)}, \end{aligned} \quad (4.10)$$

- étape M :

$$Q(\Theta; \Theta^{(k)}) = \sum_{s=1}^{N_I} \left( \mathbb{E}(\phi_1(s) | \mathbf{I}, \Theta^{(k)}) \log(\pi_1 f(I(s), \theta_1)) + \mathbb{E}(\phi_2(s) | \mathbf{I}, \Theta^{(k)}) \log(\pi_2 f(I(s), \theta_2)) \right). \quad (4.11)$$

Les proportions optimales sont simplement obtenues :

$$\pi_1 = \frac{1}{N_I} \sum_{s=1}^{N_I} \mathbb{E}(\phi_1(s)|\mathbf{I}, \Theta^{(k)}), \quad \pi_2 = \frac{1}{N_I} \sum_{s=1}^{N_I} \mathbb{E}(\phi_2(s)|\mathbf{I}, \Theta^{(k)}), \quad (4.12)$$

et les estimateurs optimaux des moyennes et variances sont donnés par :

$$\begin{aligned} \mu_1 &= \frac{\sum_{s=1}^{N_I} \mathbb{E}(\phi_1(s)|\mathbf{I}, \Theta^{(k)})I(s)}{\sum_{s=1}^{N_I} \mathbb{E}(\phi_1(s)|\mathbf{I}, \Theta^{(k)})}, & \mu_2 &= \frac{\sum_{s=1}^{N_I} \mathbb{E}(\phi_2(s)|\mathbf{I}, \Theta^{(k)})I(s)}{\sum_{s=1}^{N_I} \mathbb{E}(\phi_2(s)|\mathbf{I}, \Theta^{(k)})}, \\ \sigma_1^2 &= \frac{\sum_{s=1}^{N_I} \mathbb{E}(\phi_1(s)|\mathbf{I}, \Theta^{(k)})(I(s) - \mu_1)^2}{\sum_{s=1}^{N_I} \mathbb{E}(\phi_1(s)|\mathbf{I}, \Theta^{(k)})}, & \sigma_2^2 &= \frac{\sum_{s=1}^{N_I} \mathbb{E}(\phi_2(s)|\mathbf{I}, \Theta^{(k)})(I(s) - \mu_2)^2}{\sum_{s=1}^{N_I} \mathbb{E}(\phi_2(s)|\mathbf{I}, \Theta^{(k)})}. \end{aligned} \quad (4.13)$$

Pour obtenir des performances satisfaisantes avec les méthodes de seuillage, aussi sophistiquées soient-elles, il est requis que les images traitées présentent un bon rapport signal sur bruit et que la composante “fond” soit relativement uniforme. Ces méthodes ne sont donc pas bien adaptées aux séquences que nous traitons dans le cadre de cette thèse.

### Décomposition de l’image en plans d’ondelettes “à trous”

La méthode de détection dite “ondelettes à trous” (Holschneider, Kronland-Martinet, Morlet & Tchamitchian 1989) est très utilisée par les biologistes pour détecter et suivre des objets d’intérêt en vidéo-microscopie (Olivo-Marin 2002, Chenouard et al. 2009). Cette approche repose sur une décomposition de l’image en plans d’ondelettes. À chaque plan d’ondelettes est associé une échelle, relative à la taille des objets d’intérêt. Ainsi, si les objets recherchés sont tous de même taille, un simple seuillage du plan en question permet de les extraire. En pratique, l’image originale  $\mathbf{I}^{(0)}$  est convoluée par un noyau séparable, selon les deux directions canoniques de l’image. Le noyau  $\varrho_{B3}$  est une version B3-spline de la transformée isotropique en ondelettes (Starck, Fadili & Murtagh 2007) :

$$\varrho_{B3} = \left[ \frac{1}{16}, \frac{1}{4}, \frac{3}{8}, \frac{1}{4}, \frac{1}{16} \right]. \quad (4.14)$$

Le résultat de cette convolution est noté  $\mathbf{I}^{(1)} = \mathbf{I}^{(0)} * \varrho_{B3}$ . Si l’utilisateur souhaite analyser  $K$  plans d’ondelettes, cette opération est itérée  $K$  fois et les plans d’ondelettes  $\Upsilon^{(i)}$  s’expriment comme :

$$\Upsilon^{(i)} = \mathbf{I}^{(i-1)} - \mathbf{I}^{(i)}, \quad 1 < i \leq K. \quad (4.15)$$

Le plan d’ondelettes correspondant à l’échelle des objets à détecter est ensuite seuillé. Cette approche multi-échelles donne de bons résultats et requiert un faible temps de calcul. Néanmoins, la cohérence temporelle des images successives n’est pas explicitement prise en compte. Chaque image est analysée de manière indépendante. On observe ainsi un effet de “vacillement” au cours du temps, menant à l’apparition ou disparition spontanée des objets. De plus, certaines structures du “fond” sont parfois de la même taille que celle des objets à détecter.

### Courbure locale et intensité

Comme l’ont montré Thomann, Rines, Sorger & Danuser (2002), la notion de courbure locale permet d’élaborer un bon détecteur de spots si le rapport signal sur bruit est suffisant. Les spots sont assimilables à des tâches lumineuses de forme elliptique ou circulaire. Si on s’intéresse aux maxima locaux d’intensité introduits par le bruit, la courbure locale (déterminant  $\kappa$  de la matrice hessienne, matrice composée

des dérivées partielles du second ordre de l'intensité) est très faible (Thomann et al. 2002). Celle-ci est plus élevée pour les spots à détecter. Afin de prendre en compte l'intensité tout en atténuant les effets du bruit, l'image initiale est convoluée (\* désigne l'opération de convolution) avec un noyau gaussien  $G_a$ . On définit en chaque point  $s$  une mesure de détection :

$$CI(s) = (G_a * I)(s)\kappa(s). \quad (4.16)$$

Les objets d'intérêt sont extraits par seuillage de la carte  $CI$ . Cette méthode de détection fait intervenir deux paramètres : la taille du noyau gaussien  $G_a$  et un seuil.

### Approximation du signal-image par modèle paramétrique

Lorsque les objets à détecter peuvent être représentés par un profil d'intensité connu (ou estimé), la recherche exhaustive de ce profil dans l'image par mesure de similarité permet de détecter les objets recherchés. Il s'agit tout d'abord de générer un modèle photométrique et géométrique de l'objet, puis de définir une mesure de mise en correspondance pour isoler les structures d'intérêt.

**Définition d'un modèle** Une connaissance *a priori* des objets désirés permet d'établir un profil type. Des caractéristiques physiques telles que la taille, la forme ou le volume (pour des acquisitions 3D) des objets sont généralement utilisées (Kachouie, Fieguth, Ramunas & Jervis 2006). On peut aussi prendre en compte des informations relatives à la dynamique ou la déformation des objets.

**Mesure de similarité et mise en correspondance** En traitement du signal, la corrélation est l'opération usuelle permettant de comparer statistiquement deux variables aléatoires. En analyse d'images, on privilégie la corrélation (Yao & Odobez 2008) entre le modèle d'apparence  $\mathcal{M}$  et l'image  $I$ . En dimension 2, une mesure possible de corrélation (Cheezum, Walker & Guilford 2001) au point de coordonnées  $(s_x, s_y)$  est de la forme :

$$COV(s_x, s_y) = \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M (I(s_x + i - \frac{N-1}{2}, s_y + j - \frac{M-1}{2}) - \mu_I(s_x, s_y)) (\mathcal{M}(i, j) - \overline{\mathcal{M}})}{\sigma_I(s_x, s_y) \sigma_{\mathcal{M}}}, \quad (4.17)$$

où  $\mathcal{M}(i, j)$  est l'intensité observée au point de coordonnées  $(i, j)$  dans le modèle d'apparence  $\mathcal{M}$  estimé empiriquement de dimension  $(N \times M)$ , et  $\overline{\mathcal{M}}$  et  $\sigma_{\mathcal{M}}^2$  désignent l'intensité moyenne et la variance mesurées sur le support de ce modèle. On note  $\mu_I(s_x, s_y)$  et  $\sigma_{I(s_x, s_y)}^2$  la moyenne et la variance de l'intensité calculées sur une région locale qui coïncide avec le support du modèle  $\mathcal{M}$ . Les maxima locaux de la carte des mesures de corrélation permettent de localiser les régions de l'image similaires en apparence au modèle par simple seuillage. La corrélation peut être appliquée aux images ne présentant pas une composante "fond" uniforme.

La Somme des Différences Absolues (SDA) est l'autre mesure usuelle de similarité qui évalue la correspondance entre le modèle d'apparence  $\mathcal{M}$  des objets et les intensités de l'image. La carte des différences absolues est calculée pour tous les différents décalages spatiaux possibles de  $\mathcal{M}$  dans l'image :

$$SDA(s_x, s_y) = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N |I(s_x + i + \frac{M-1}{2}, s_y + j + \frac{N-1}{2}) - \mathcal{M}(i, j)|. \quad (4.18)$$

Les minima locaux coïncident avec les lieux de l'image où le modèle est pertinent. Comparé à la méthode précédente, le critère SDA est très sensible aux variations d'intensité entre l'image observée et le modèle. Cette mesure de similarité n'est pas adaptée à la microscopie de fluorescence en toute circonstance, notamment si le photoblanchiment ne peut être corrigé.

**Modèle de mélange de gaussiennes** Un modèle de mélange de gaussiennes permet de détecter des spots relativement proches spatialement. Les méthodes d'appariement précédemment exposées ont une précision spatiale de l'ordre du pixel puisque les décalages du modèle se font sur la grille régulière de pixels. La précision de la localisation spatiale des objets peut être améliorée en recourant à une représentation continue de l'apparence. Comme les objets considérés sont plus petits que la résolution optique des microscopes, un modèle de la PSF (une approximation gaussienne) est préconisé afin de modéliser l'apparence des objets. Pour une détection multi-objets dans des images 2D, on privilégie la Somme des Différences au Carré (SDC) :

$$SDC(s_x, s_y) = \sum_i \sum_j \left( I(s_x, s_y) - a_G e^{-\frac{(i-s_x)^2 + (j-s_y)^2}{2\sigma_G^2}} - b_G \right)^2, \quad (4.19)$$

où  $a_G$  et  $b_G$  et  $\sigma_G^2$  désignent les paramètres du modèle permettant de représenter la PSF. Cette approche, plus coûteuse en temps de calcul que les précédentes présente l'avantage de détecter assez précisément les objets d'intérêt (Cheezum et al. 2001, Thomann et al. 2002).

### Méthodes d'apprentissage supervisé

Ces méthodes visent à apprendre une “signature” des objets d'intérêt pour les détecter ensuite.

**Méthode AdaBoost** L'approche “AdaBoost” (Viola & Jones 2001) est souvent utilisée pour la détection d'objets en analyse d'images, et a récemment été évaluée en imagerie biologique moléculaire (Jiang et al. 2007) pour la détection de spots. L'algorithme “AdaBoost” repose sur une détection par maximum de vraisemblance. De petits motifs d'image sont classés comme positifs (présence d'un objet) ou négatifs (absence d'objet) suivant la réponse combinée de plusieurs classifieurs faibles. Dans leurs travaux, Jiang et al. (2007) préconisent l'utilisation de caractéristiques de Haar. Chaque caractéristique est décrite par une forme d'apparence géométrique, des coordonnées relatives à l'origine de la fenêtre de recherche et un facteur d'échelle. Muni de cet ensemble et d'une base d'apprentissage composée d'autant de motifs étiquetés “positifs” que “négatifs”, le classifieur est entraîné. L'algorithme “AdaBoost” sélectionne alors un nombre restreint de caractéristiques visuelles. La séparation entre motifs étiquetés “positifs” et “négatifs” est obtenue en déterminant un seuil adapté à chaque caractéristique pour chaque passe de la phase d'apprentissage. La classification finale résulte d'une combinaison linéaire pondérée de l'ensemble des caractéristiques utilisées.

#### 4.1.2 Méthodes de séparation des composantes “objet” et “fond” en vidéo-microscopie

Des méthodes permettant de séparer directement les composantes “objet” et “fond” sans passer par une étape préliminaire de détection ont aussi fait l'objet de travaux que nous évoquons dans cette section.

### Morphologie mathématique

La morphologie mathématique est apparue dans les années 60 suite aux travaux menés par G. Matheron et J. Serra (Serra 1967). Issue de la théorie des ensembles, elle s'intéresse aux caractéristiques morphologiques des objets présents dans une image, via des transformations non linéaires requérant la définition d'un “élément structurant”. Les différents filtres que nous décrivons se déclinent notamment en fonction du choix de cet élément.

**Top-hat** La méthode “top-hat” (Meyer 1977) est une méthode d'érosion et de dilatation pour laquelle un

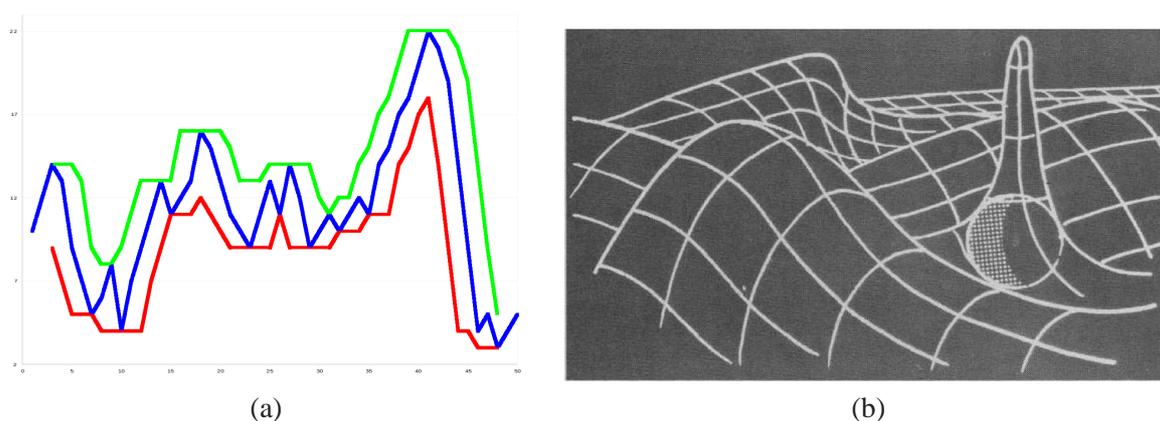


FIGURE 4.1: (a) Érosion (courbe rouge) et dilatation (courbe verte) appliquées à la courbe bleue en considérant un segment de longueur 5 comme "élément structurant"; (b) Illustration de l'effet de l'algorithme "rolling ball". Sur cette figure, la boule ne peut pas entrer en contact avec la surface interne du pic, les pixels en question appartiendront donc à la composante "objet".

"élément structurant" a la forme d'un disque. En dimension 1, l'érosion (respectivement la dilatation) appliquée à un signal 1D consiste à isoler en chaque point du signal la valeur minimale (respectivement maximale) observée sur un support de longueur donnée constituant l'élément structurant centré au point considéré. Les opérations d'érosion et de dilatation appliquées à un signal 1D sont illustrées sur la figure 4.1 (a). La généralisation de ces opérations aux surfaces 2D est possible et l'élément structurant est donc une surface carrée, un disque, ... Dans ce cas, l'érosion (respectivement la dilatation) en un point donné revient à détecter l'intensité minimale (respectivement maximale) observée sur le support de l'élément structurant centré en ce point. L'opération d'*ouverture* est définie par une *érosion* suivie d'une *dilatation*.

La méthode "top-hat" identifie la composante "fond" comme le résultat d'une opération d'*ouverture* en considérant un "élément structurant" de la forme d'un disque, ce qui revient à extraire les moyennes locales (sur le support de l'élément structurant) de l'image. La composante "objet" est simplement obtenue comme la différence entre la séquence d'images initiale et la composante "fond".

**Transformation H-Dome** La transformation "H-Dome" (Vincent 1993) est une autre opération en morphologie mathématique. Elle nécessite deux étapes. La première étape consiste à réaliser un filtrage de l'image par un "Laplacien de Gaussienne" pour réhausser le signal. Ensuite, une reconstruction en niveaux de gris (Vincent 1993) est appliquée à l'image filtrée, en utilisant un masque défini comme l'image filtrée à laquelle est soustrait la constante  $h_d$ . Cette opération a pour effet d'extraire les régions situées dans le voisinage des maxima locaux de l'image filtrée, pour lesquelles la différence d'intensité avec celle observée au maximum local le plus proche est inférieure à  $h_d$ . Cette transformation produit une composante "objet" dont l'intensité est comprise dans l'intervalle  $[0, h_d]$ . Les régions rattachées à cette composante sont localisées dans le voisinage des maxima d'intensité locaux, ayant pour effet de générer des structures en forme de dômes. Contrairement à la méthode "top-hat", aucun critère de forme ou de taille n'est imposé dans le processus de détection.

**Rolling ball** La méthode "rolling ball" (Sternberg 1983) est largement utilisée par les biologistes et disponible sous ImageJ sous le nom "subtract background". C'est une extension de la méthode "top-hat" en 3D, l'intensité étant considérée comme la troisième dimension. L'"élément structurant" coïncide avec une boule. L'érosion (respectivement la dilatation) ne consiste plus à extraire le minimum (respectivement maximum) sur le support associé à l'"élément structurant". Cette fois-ci, il s'agit d'extraire

la valeur minimale (respectivement maximale) résultant de l’intensité observée sur ce même support, pondérée par la distance du pixel considéré au centre de l’“élément structurant”. La méthode “rolling ball” traite l’image comme une surface dont l’altitude dépend de l’intensité observée. De manière figurative, l’idée est de faire rouler une boule sous la surface. Toutes les régions où la boule est en contact avec l’image appartiendront à la composante “fond” tandis que les régions qui ne peuvent être en contact avec la boule sont supprimées (figure 4.1 (b)).

### Séparation des composantes “objet” et “fond” en chaque pixel de l’image

En analyse de séquences d’images, l’approche unidimensionnelle traite chaque signal indépendamment du contexte spatial. Pour séparer le fond et les objets, l’idée clé est de tirer profit du photoblanchiment inhérent lors de l’acquisition des séquences d’images. Le photoblanchiment se caractérise par un déclin de l’intensité au cours du temps. La présence de vésicules est associée à des sauts d’intensité pour lesquels il est difficile d’exhiber un modèle paramétrique. À titre d’exemple, l’évolution de l’intensité observée au cours du temps en trois pixels extraits d’une séquence d’images de vidéo-microscopie est illustrée dans la figure 4.2.

**Méthode paramétrique pour la soustraction de fond** Boulanger, Kervrann & Bouthemey (2009) identifient trois composantes pour représenter un signal temporel de microscopie de fluorescence :

$$\mathbf{I} = \mathbf{I}_{fond} + \mathbf{I}_{objet} + \boldsymbol{\xi}, \quad (4.20)$$

où  $[\mathbf{I}_1 | \mathbf{I}_2 | \dots | \mathbf{I}_T]$  est une matrice de dimension  $N_I \times T$  et désigne la composante “fond”,  $\mathbf{I}_{objet}$  est une matrice de dimension  $N_I \times T$  et représente la composante “objet”,  $\boldsymbol{\xi}$  est le bruit supposé blanc et gaussien de dimension  $N_I \times T$ ,  $N_I$  représente le nombre de pixels dans l’image et  $T$  est le nombre d’images de la séquence. L’idée est d’estimer la composante “fond”, puis de déduire la composante “objet”. Le photoblanchiment observé dans la composante “fond” peut être estimé en considérant un modèle décrivant le phénomène de photoblanchiment. Un modèle exponentiel permet notamment de décrire le phénomène de photoblanchiment (Benson, Bryan, Plant, Gotto Jr & Smith 1985). Cependant Boulanger, Kervrann & Bouthemey (2009) ont adopté un modèle linéaire, plus simple. L’approximation linéaire du déclin est suffisante si on ne prend pas en compte les premières images de la séquence. Au pixel  $s$  et à l’instant  $t$ , on a :

$$I_t^{fond}(s) = a_{fond}(s) + b_{fond}(s) t. \quad (4.21)$$

La problématique centrale vise à estimer les cartes  $\mathbf{a}_{fond}$  et  $\mathbf{b}_{fond}$  afin de récupérer la composante “fond”. Par différence avec la séquence d’origine, la composante “objet” sera déduite. Boulanger, Kervrann & Bouthemey (2009) proposent d’utiliser un M-estimateur asymétrique pour estimer ces deux cartes. On cherche les paramètres  $a_{fond}(s)$  et  $b_{fond}(s)$ , en chaque point de l’image 2D, qui minimisent le critère suivant :

$$J_{BKB}(a_{fond}(s), b_{fond}(s)) = \sum_{t=1}^T \rho(I_t(s) - (a_{fond}(s) + b_{fond}(s) t)), \quad (4.22)$$

où  $\rho$  est une fonction d’influence robuste. D’après les courbes (2-4) de la figure 4.2, la composante “fond” coïncide avec l’enveloppe convexe inférieure du signal. Par ailleurs,  $\mathbf{I}_{fond}$  est positive, ce qui se traduit par une densité de probabilité du bruit fortement asymétrique. Boulanger, Kervrann & Bouthemey (2009) préconisent la fonction de Leclerc asymétrique :

$$\rho(z) = \begin{cases} 1 - \exp\left(-\frac{z^2}{\sigma_1^2}\right) & \text{si } z \geq 0, \\ 1 - \exp\left(-\frac{z^2}{\sigma_2^2}\right) & \text{sinon,} \end{cases} \quad (4.23)$$

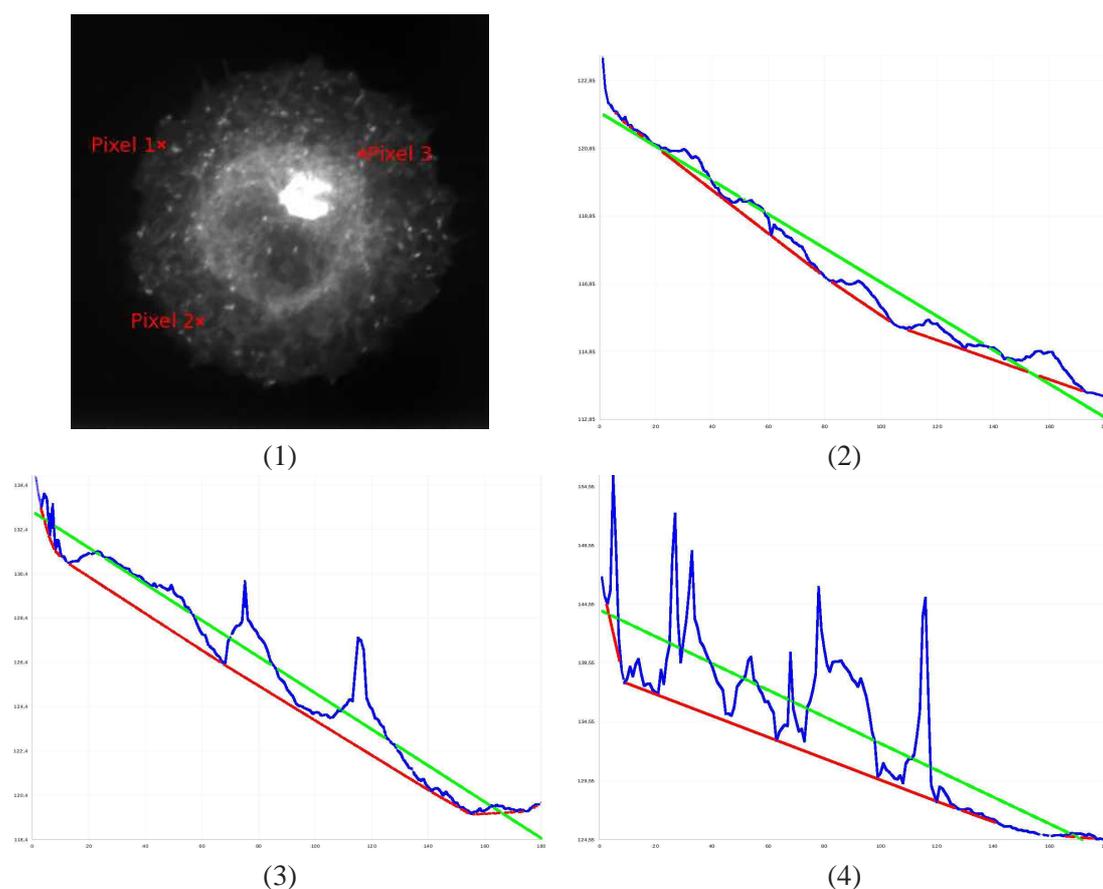


FIGURE 4.2: (1) Image de vidéo-microscopie ; (2-4) évolution de l'intensité au cours du temps (courbe bleue) observée aux pixels 1, 2 et 3 labellisés dans l'image (1). La courbe verte est la composante "fond" obtenue avec la méthode paramétrique, la courbe rouge est la composante "fond" identifiée par la méthode "Hullkground".

où  $\sigma_1$  et  $\sigma_2$  désignent deux paramètres d'échelle. Les résultats de cette approche sont présentés sur la figure 4.2.

**Méthode Hullkground** Chessel, Cinquin, Bardin, Kervrann & J. (2009) caractérisent de manière non paramétrique la composante "fond" directement par l'enveloppe convexe inférieure du signal. On suppose alors que les variations du signal de type "pics" ou "bosses" doivent appartenir à la composante "objet" (figure 4.3). L'enveloppe convexe inférieure est extraite selon le principe des " $\alpha$ -shapes" tels que définis en géométrie algorithmique. L'idée repose sur un sous-échantillonnage adaptatif du signal original 1D. Les points pour lesquels la surface de concavité est inférieure à  $\sqrt{\alpha}$  appartiennent à la composante "fond". On atteint l'enveloppe convexe du signal si  $\alpha \rightarrow \infty$ . Un signal continu est reconstruit par interpolation linéaire du signal, pour lequel les points de concavité supérieure à  $\sqrt{\alpha}$  ont été supprimés. L'extraction des composantes pseudo-convexes est effectuée indépendamment en chaque pixel, et le résultat est de manière étonnante spatialement régulier sur des images de vidéo-microscopie sans qu'aucune régularité ne soit imposée lors du calcul de la composante convexe. La différence entre la séquence d'images originale et les composantes convexes extraites en chaque pixel permet d'identifier la composante "objet" de la séquence. Les résultats obtenus avec cet algorithme sont présentés sur la figure 4.2.

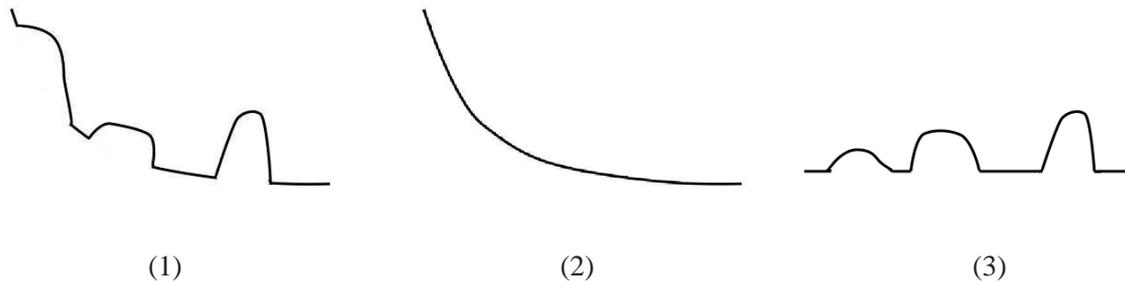


FIGURE 4.3: Illustration de la décomposition d'un signal par la méthode “Hullkground”. (1) Signal synthétique observé en un pixel d'une image de microscopie de fluorescence ; (2) enveloppe convexe du signal (1) représentative de la composante “fond”; (3) soustraction de la composante “fond” (2) au signal original (1) permettant d'identifier la composante “objet”. Trois objets sont ainsi mis en évidence.

## 4.2 Une nouvelle approche : champs aléatoires conditionnels pour la séparation des composantes “objet” et “fond”

Dans cette section, nous présentons la méthode de séparation des composantes “objet” et “fond” que nous avons développée. En effet, les méthodes précédemment évoquées ne sont pas toujours satisfaisantes pour traiter l'ensemble des signaux temporels aux profils assez variés. Elles ne prennent pas non plus en compte les cohérences spatiale et temporelle conjointement. La méthode que nous proposons utilise le formalisme des champs aléatoires conditionnels et une représentation des images par motifs locaux. Les champs aléatoires conditionnels sont issus de travaux sur les champs de Markov, une modélisation statistique des images dont nous rappelons ici les principaux éléments.

### 4.2.1 Modélisation markovienne et analyse d'images

#### Champs aléatoires markoviens

Les champs aléatoires markoviens sont des outils connus depuis longtemps par les physiciens (Baxter 1992) et les statisticiens (Besag 1974, Chalmond 2000). Ils ont été introduits en analyse d'images en 1984 par les frères Geman (Geman & Geman 1984, Pérez 2003). Depuis, ils ont été largement étudiés et adaptés à la modélisation d'images (synthèse (Ghozi & Levy 1994), codage (Reyes, Zhao, Neuhoff & Pappas 2007)) et résolution de problèmes inverses (restauration (Chang, Kadaba, Doerschuk & Gelfand 2001), reconstruction (Murino 1996), classification (Nishii & Eguchi 2006), segmentation (Kato & Pong 2006), fusion de données (Wright 1989), estimation du flot optique (Heitz & Bouthemy 1993), ...). On s'intéresse donc à la loi des images généralement décrites par des lois de Gibbs. L'équivalence entre champs de Markov et lois de Gibbs permet d'exprimer la loi jointe  $P(x(1), \dots, x(|S|))$  où  $|S|$  désigne le nombre de variables dans l'image dont le support est noté  $S$  sous la forme d'un produit de fonctions d'intérêt locales.

#### Distribution de Gibbs

Les variables aléatoires  $X(s)$  associées aux pixels prennent leur valeur dans un espace d'états  $\Lambda$ . Cet espace d'états dépend du domaine d'application :

$\Lambda = \{0, 1, \dots, 255\}$  en restauration d'images (images codées sur 8 bits),

$\Lambda = \{0, 1, \dots, M\}$  en classification ( $M$  classes),

$\Lambda = \{-d_{max}, \dots, d_{max}\} \times \{-d_{max}, \dots, d_{max}\}$  en analyse du mouvement (vecteurs de déplacement).

Le vecteur aléatoire  $X = \{x(s)\}_{s=1, \dots, |\mathcal{S}|}$  prend ses valeurs dans l’espace des configurations  $\Omega = \Lambda^{|\mathcal{S}|}$ , et la loi de  $X$  se factorise sous la forme suivante :

$$P(x) \propto \prod_{c \in \mathcal{C}} f_c(x(c)), \quad (4.24)$$

où  $\mathcal{C}$  représente un ensemble de “petits paquets” de sites  $c$  ( $1 \leq |c| \ll |\mathcal{S}|$ ) et  $c \in \mathcal{C}$ ,  $f_c$  ne dépend que de la variable  $x(c) = \{x(i), i \in c\}$ , et  $\prod_{c \in \mathcal{C}} f_c$  est sommable sur  $\Omega$ . Si de plus ce produit est positif, alors il peut être écrit sous forme exponentielle :

$$P(x) = \frac{1}{Z} \exp \left( - \sum_{c \in \mathcal{C}} V_c(x(c)) \right). \quad (4.25)$$

Cette expression coïncide avec une distribution de Gibbs et fait intervenir un potentiel d’interaction  $\{V_c, c \in \mathcal{C}\}$ . On note  $U = \sum_c V_c$  l’énergie, et  $Z = \sum_{x \in \Omega} \exp(-U(x))$  la constante de normalisation. Dans cette expression, les configurations d’énergie faible sont les plus probables tandis que les énergies fortes sont associées aux configurations les plus rares. Les interactions induites par la forme factorisée sont également capturées par un graphe appelé *graphe d’indépendance* (Pérez 2003).

### Graphe d’indépendance

Le graphe d’indépendance associé à la factorisation  $\prod_{c \in \mathcal{C}} f_c$  est le graphe non orienté  $\mathcal{G} = [\mathcal{S}, \mathcal{A}]$ , où  $\mathcal{S} = \{1, \dots, |\mathcal{S}|\}$  désigne l’ensemble des sommets du graphe et  $\mathcal{A}$  l’ensemble des arêtes reliant les sommets. Sur ce graphe, les sites  $s$  et  $r$  sont voisins si et seulement si  $\exists c \in \mathcal{C} : \{s, r\} \subset c$ . Par conséquent, chaque site  $s$  possède un ensemble de voisins  $\mathcal{N}_s$  tel que  $s \notin \mathcal{N}_s$ , et  $r \in \mathcal{N}_s \Leftrightarrow s \in \mathcal{N}_r$ . Enfin,  $c \in \mathcal{C}$  est une clique du graphe  $\mathcal{G}$  si  $c$  est un singleton (ensemble ne contenant qu’un unique élément) ou si les éléments de  $c$  sont deux à deux voisins sur le graphe :

$$\exists s \in \mathcal{S} : c = \{s\} \text{ ou } \forall \{s, r\} \subset c, r \in \mathcal{N}_s. \quad (4.26)$$

En analyse d’images, la grille régulière de pixels est généralement choisie comme graphe. Le système de voisinage correspond aux 4 ou 8 plus proches voisins. Dans le premier cas, les cliques sont constituées du singleton et des doublets horizontal et vertical. Dans le deuxième cas, il faut y ajouter les triplets ainsi que les quadruplets. Ces différents types de cliques sont illustrés sur la figure 4.4.

### Équivalence entre distribution de Gibbs et champ aléatoire markovien

Si  $s$  et  $r$  ne sont pas voisins dans le graphe  $\mathcal{G}$ ,  $P(x)$  est factorisable en deux expressions indépendantes :

$$P(x) \propto \underbrace{\prod_{s \in c} f_c(x(c))}_{\text{indépendant de } x(s)} \times \underbrace{\prod_{s \notin c} f_c(x(c))}_{\text{indépendant de } x(r)}. \quad (4.27)$$

Cela suffit pour affirmer que les variables aléatoires  $x(s)$  et  $x(r)$  sont indépendantes conditionnellement aux autres variables aléatoires, ce qui constitue la propriété markovienne de paire à paire. De la même manière, étant donné un ensemble de sommets  $a \subset \mathcal{S}$ ,  $P(x)$  se décompose comme le produit  $\prod_{c: c \cap a \neq \emptyset} f_c \times \prod_{c: c \cap a = \emptyset} f_c$  où le second facteur ne dépend pas de  $x(a)$ . Ainsi, on a :

$$P(x(a)|x(\mathcal{S} \setminus a)) = P(x(a)|x(\mathcal{N}_a)) = \frac{1}{Z_a(x_{\mathcal{N}_a})} \prod_{c: c \cap a \neq \emptyset} \exp \left( - \sum_{c: c \cap a \neq \emptyset} V_c(x(c)) \right), \quad (4.28)$$

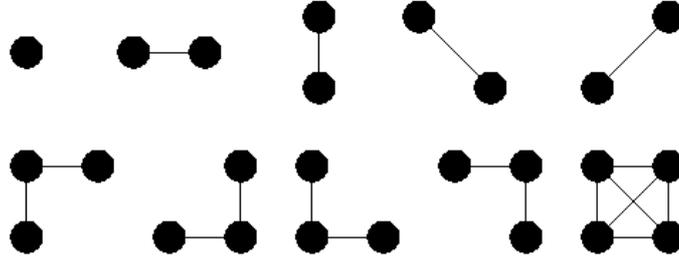


FIGURE 4.4: Les dix types de cliques pour un système de voisinage des 8 plus proches voisins.

avec  $Z_a(x_{\mathcal{N}_a})$  la constante de normalisation. Cette expression permet de définir la propriété markovienne locale. Par ailleurs, si un sous-ensemble de sommets  $A_1$  sépare deux autres sous-ensembles disjoints  $A_2$  et  $A_3$  dans  $\mathcal{G}$ , alors les vecteurs aléatoires  $X_{A_2}$  et  $X_{A_3}$  sont indépendants conditionnellement au vecteur  $X_{A_1}$ . On parle alors de propriété markovienne globale.

On peut également démontrer que ces trois propriétés markoviennes sont équivalentes pour des distributions strictement positives. Réciproquement, si une distribution positive présente une de ces propriétés markoviennes sur le graphe  $\mathcal{G}$ , alors il s'agit d'une distribution de Gibbs de la forme (4.25) sur ce même graphe. L'équivalence entre propriétés markoviennes locale et globale et distribution de Gibbs a été démontrée par Hammersley-Clifford (Besag 1974).

### Problèmes inverses et estimation bayésienne

Certaines tâches en analyse d'images (restauration, classification, ...) ont pour but d'estimer des variables cachées à partir de variables observées, par exemple une image. La classification en différentes régions d'une image est équivalente à identifier une partition cachée de l'image en différentes classes à partir de l'image elle-même. Plus formellement, soit un ensemble de variables observées  $\mathbf{y} = \{y(s)\}_{s=1,\dots,|\mathcal{S}|}$  et un ensemble de variables cachées  $\mathbf{x} = \{x(s)\}_{s=1,\dots,|\mathcal{S}|}$ . Les vecteurs  $\mathbf{y}$  et  $\mathbf{x}$  peuvent être de même nature (deux images en restauration) ou non (une partition étiquetée et une image en classification). De plus, les composantes d'un même vecteur peuvent être de nature différente. Par exemple, dans le cadre d'une restauration avec préservation des discontinuités, le vecteur  $\mathbf{x}$  est composé à la fois des niveaux de gris restaurés et d'indicateurs binaires de présence de contours. Soit  $\Lambda_{\mathbf{x}}$  (respectivement  $\Lambda_{\mathbf{y}}$ ) l'espace d'état de tous les  $x(s)$  (respectivement  $y(s)$ ). Le problème revient à estimer la "meilleure" occurrence  $\mathbf{x}$  du vecteur aléatoire  $X$  dans  $\Omega = (\Lambda_{\mathbf{x}})^{|\mathcal{S}|}$  connaissant une réalisation  $\mathbf{y} \in (\Lambda_{\mathbf{y}})^{|\mathcal{S}|}$  du vecteur aléatoire  $Y$ . La distribution conditionnelle  $P(\mathbf{x}|\mathbf{y})$  (distribution *a posteriori*) devient alors un élément clé de l'estimation bayésienne. La règle de Bayes permet d'exprimer cette distribution conditionnelle sous la forme d'un produit entre la distribution  $P(\mathbf{y}|\mathbf{x})$  ou fonction de vraisemblance des observations et la distribution *a priori*  $P(\mathbf{x})$  qui modélise les caractéristiques statistiques attendues des variables cachées :

$$P(\mathbf{x}|\mathbf{y}) = \frac{P(\mathbf{y}|\mathbf{x})P(\mathbf{x})}{P(\mathbf{y})} \propto P(\mathbf{y}|\mathbf{x})P(\mathbf{x}). \quad (4.29)$$

De manière générale, une distribution de Gibbs spécifiée sur un graphe d'indépendance permet de car-

actériser la loi *a priori* :

$$P(\mathbf{x}) = \frac{1}{Z} \exp \left( - \sum_{c \in \mathcal{C}} V_c(x(c)) \right). \quad (4.30)$$

Le modèle d'observation est souvent spécifié par une distribution factorisable (indépendance conditionnelle) :

$$P(\mathbf{y}|\mathbf{x}) = \exp \left( - \sum_{r \in \mathcal{R}} V_r(x(d_r), y_r) \right), \quad (4.31)$$

où  $\mathcal{R} = \{1, \dots, |\mathcal{R}|\}$  désigne l'ensemble des sites de la grille des données,  $\{d_r, r \in \mathcal{R}\}$  un ensemble de petites parties de  $\mathcal{R}$ . La distribution *a posteriori* résultante est une distribution de Gibbs :

$$P(\mathbf{x}|\mathbf{y}) = \frac{1}{Z'} \exp - \underbrace{\left( \sum_{c \in \mathcal{C}} V_c(x(c)) + \sum_{r \in \mathcal{R}} V_r(x(d_r), y(r)) \right)}_{U(\mathbf{x}, \mathbf{y})}. \quad (4.32)$$

### Champs aléatoires conditionnels

Comme cela a été exposé précédemment, l'inférence bayésienne nécessite bien souvent de spécifier la distribution *a posteriori* (équation (4.32)). Il suffit donc de spécifier la loi *a priori* et de modéliser la fonction de vraisemblance. Néanmoins, la modélisation d'interactions multiples ou de mesures non locales est très complexe, voire impossible à élaborer. C'est pourquoi de nouveaux modèles, les Champs Aléatoires Conditionnels (CAC) (Lafferty, McCallum & Pereira 2001), ont vu le jour afin de modéliser directement la distribution *a posteriori* sans passer par une modélisation de la fonction de vraisemblance. Formellement, un CAC est défini de la manière suivante :

**Définition 1.**  $(Y, X)$  définit un champ aléatoire conditionnel si les variables aléatoires  $X(s)$  conditionnellement à  $Y$  vérifient la propriété markovienne sur le graphe d'indépendance  $\mathcal{G}$  tel que :

$$P(x(s)|\mathbf{y}, x(r), \forall r \neq s) = P(x(s)|\mathbf{y}, x(r), r \in \mathcal{N}_s). \quad (4.33)$$

Ainsi, un CAC est un champ aléatoire globalement conditionné à l'observation  $\mathbf{y}$ . Dans ce cadre,  $\mathbf{y}$  et  $\mathbf{x}$  ne sont pas forcément associés au même graphe, même si ce sera le cas par la suite. D'après le théorème d'Hammersley-Clifford (Besag 1974), la distribution de probabilité conditionnelle est de la forme :

$$P(\mathbf{x}|\mathbf{y}) \propto \exp - \left( \sum_{s \in \mathcal{S}} V_1(x(s), \mathbf{y}) + \alpha \sum_{\langle s, r \rangle} V_2(x(s), x(r), \mathbf{y}) \right), \quad (4.34)$$

où  $V_1$  et  $V_2$  sont des potentiels unaire et paire-à-paire,  $\alpha$  est une constante positive qui pondère le terme paire-à-paire et  $\langle s, r \rangle$  est l'ensemble des cliques pour le système de voisinage  $\mathcal{N}_s$ . Il est important de noter que les deux potentiels dépendent explicitement de toutes les observations  $\mathbf{y}$ . Notons aussi que si nous disposons de variables observées pour lesquelles une vérité-terrain est disponible, il est possible de calibrer le paramètre  $\alpha$  (Younes 2000), (Chalmond 2000 §2.4 et §8.2.3). Par la suite, on cherche les variables cachées qui maximisent  $P(\mathbf{x}|\mathbf{y})$ , ou de manière équivalente l'énergie sous-jacente. Les algorithmes de coupe minimale-flot maximal permettent notamment de résoudre ce problème d'optimisation en un temps d'exécution rapide, dans des cas binaires la plupart du temps. Nous avons privilégié ce type d'algorithme par la suite.

### Algorithme de coupe minimale-flot maximal

Les premiers algorithmes de coupe minimale-flot maximal en analyse d’images sont apparus en 1989 (Greig, Porteous & Seheult 1989). Oubliés pendant quelques années, ils ont connu une nette recrudescence depuis une dizaine d’années pour résoudre des problèmes d’optimisation pour un grand nombre d’applications telles que la synthèse d’images (Kwatra, Schödl, Essa, Turk & Bobick 2003), la segmentation d’images (Boykov & Joly 2001), ou la classification (El-Zehiry & Elmaghraby 2007). En effet, ces algorithmes sont capables de trouver le minimum global d’une fonctionnelle d’énergie relativement générale, établie bien souvent dans un cadre markovien, avec une complexité polynomiale. Une description de cet algorithme est présentée en annexe B.

### Coupe minimale-flot maximal pour la minimisation d’une énergie de Gibbs

Les algorithmes de coupe minimale-flot maximal sont tout à fait appropriés pour minimiser une énergie de Gibbs, notamment si l’application visée est la segmentation d’une image en deux composantes (Kolmogorov & Wainwright 2005). Les algorithmes de coupe minimale-flot maximal sont bâtis sur une représentation graphique des observations cachées. L’ensemble des sommets  $\mathcal{S}$  est l’ensemble des pixels de l’image, auxquels sont ajoutés deux sommets terminaux  $T_{source}$  et  $T_{puits}$  qui représentent les deux classes. Comme nous le verrons par la suite, ces deux classes permettent de séparer les composantes “objet” et “fond”. L’ensemble  $\mathcal{A}$  des arêtes définit les relations entre sommets voisins de  $\mathcal{S}$ . Les capacités de ces arêtes sont égales aux potentiels paire-à-paire de l’énergie (4.34). De manière analogue, les relations entre les sommets  $\mathcal{S}$  et les terminaux  $T_{source}$  et  $T_{puits}$  sont définies par les potentiels unaires de l’énergie définie dans l’équation (4.34). La minimisation par coupe minimale-flot maximal sur ce graphe conduit à la “meilleure” segmentation au sens du maximum *a posteriori*.

#### 4.2.2 Champs aléatoires conditionnels pour la détection en vidéo-microscopie

Les champs markoviens modélisent l’information contextuelle, très locale et sont bien adaptés en vision par ordinateur. La modélisation directe de la distribution *a posteriori* dans le cadre des champs aléatoires conditionnels (Lafferty et al. 2001, Kumar & Hebert 2006) permet une prise en compte du caractère non local des interactions et une certaine flexibilité pour mêler variables observables et variables cachées.

#### Fonctionnelle d’énergie

Soit  $\mathbf{y}_t = \{y_t(s)\}_{s \in \mathcal{S}}$  les données observées, où  $y_t(s) \in \mathbb{R}$  est l’observation au site  $s$  à l’instant  $t$  et  $\mathcal{S}$  représente l’ensemble des sites de l’image, c’est-à-dire la grille régulière des pixels. Soit  $\mathcal{G} = [\mathcal{S}, \mathcal{A}]$  un graphe où  $\mathcal{A}$  désigne l’ensemble des arêtes reliant les sites de  $\mathcal{S}$ . Soit  $\mathbf{d}_t = \{d_t(s)\}_{s \in \mathcal{S}}$  le champ d’étiquettes binaires indiquant la présence ( $d_t(s) = 1$ ) ou l’absence ( $d_t(s) = -1$ ) d’une vésicule au site  $s$  à l’instant  $t$ . Le couple  $(\mathbf{y}_t, \mathbf{d}_t)$  définit un Champ Aléatoire Conditionnel (CAC) si, conditionnellement à  $\mathbf{y}_t$ , la propriété markovienne sur le graphe  $\mathcal{G}$  est vérifiée :

$$P(d_t(s)|\mathbf{y}_t, \mathbf{d}_t(r), \forall r \neq s) = P(d_t(s)|\mathbf{y}_t, \mathbf{d}_t(r), r \in \mathcal{N}_s), \quad (4.35)$$

où  $\mathcal{N}_s$  est l’ensemble des voisins du sommet  $s$  dans  $\mathcal{G}$ .

D’après la définition 1, soit  $U_1(\mathbf{d}_t|\mathbf{y}_t, \hat{\mathbf{d}}_{t-1})$  la fonctionnelle d’énergie associée au CAC conditionnellement aux observations à l’instant  $t$  et aux étiquettes estimées à l’instant  $(t - 1)$ . Cette énergie est

définie comme la somme des trois termes suivants :

$$U_1(\mathbf{d}_t | \mathbf{y}_t, \hat{\mathbf{d}}_{t-1}) = \sum_{s \in \mathcal{S}} V_D(d_t(s), \mathbf{y}_t) + \alpha_S \sum_{\langle s, r \rangle} V_S(d_t(s), d_t(r)) + \alpha_T \sum_{\langle s, r \rangle} V_T(d_t(s), \hat{d}_{t-1}(r)), \quad (4.36)$$

où  $V_D(d_t(s), \mathbf{y})$  est le potentiel discriminant pour la détection des vésicules,  $V_S(d_t(s), d_t(r))$  est un potentiel de régularisation spatiale,  $V_T(d_t(s), d_{t-1}(r))$  est un potentiel de régularisation temporelle,  $\langle s, r \rangle$  est l'ensemble des cliques pour une structure de voisinage, et  $\alpha_S$  et  $\alpha_T$  sont des constantes positives qui pondèrent les termes d'énergie.

### Mesure discriminante

Dans les séquences de vidéo-microscopie où les protéines Rab6 sont marquées par la GFP, les vésicules se déplacent sur un “fond” qui varie lentement. L'intensité moyenne locale observée varie également dans l'image. Par exemple, l'intensité moyenne mesurée dans la région encadrée en rouge sur la figure 4.5 est beaucoup plus élevée que celle mesurée dans la région encadrée en bleu. Pourtant, il n'y a aucun objet visible dans la région encadrée en rouge, alors que cinq vésicules sont présentes dans la région encadrée en bleu. La composante “fond” peut aussi présenter des variations relativement importantes, qui ne correspondent pas toujours à des objets. Par exemple, le profil d'intensité présenté sur la figure 4.5 (en bas à droite) semble indiquer la présence de plusieurs objets, mais de manière erronée. Enfin, la différence entre le niveau d'intensité des composantes “fond” et “objet” est faible dans certaines régions de l'image. Dans la région encadrée en bleu sur la figure 4.5, trois vésicules se détachent nettement du fond, mais deux autres sont plus difficiles à repérer. Malgré ces difficultés, la régularité de l'intensité semble être un bon indicateur de présence de vésicule. L'amplitude du gradient spatial est assez conventionnelle pour mesurer la régularité de l'image. Cependant, il est très sensible au bruit et peu pertinent dans des zones du “fond”. Par ailleurs, de nombreuses structures appartenant à la composante “fond” présentent une grande amplitude du gradient spatial (figure 4.6 (c)). En conséquence, d'autres indicateurs sont requis pour repérer les vésicules dans chaque image.

Nous adoptons ici un cadre markovien (Besag 1974) pour capturer l'irrégularité de l'intensité dans les images. Contrairement aux modèles d'interaction entre pixels, des approches récentes privilégient les interactions entre motifs d'image. Dans (Roth & Black 2005, Awate & Whitaker 2006), la propriété de redondance captée par des motifs d'image est exploitée pour détecter des objets dans une image. Dans notre étude, cette propriété de redondance est également valide et nous proposons une modélisation markovienne originale qui capture les interactions entre motifs voisins dans l'image. Le contexte local de chaque pixel est ainsi mieux pris en compte.

Soit une image de niveaux de gris  $\mathbf{I}_t = \{I_t(s)\}_{s \in \mathcal{S}}$  où  $\mathcal{S} \in \mathbb{R}^2$  est une grille bidimensionnelle et  $s$  désigne un site de  $\mathcal{S}$ . À l'instant  $t$ , on pose :

$$I_t(s) = I_t^0(s) + \xi_t(s), \quad (4.37)$$

où  $I_t^0(s)$  est l'image inconnue au pixel  $s$ , et les erreurs  $\xi_t(s)$  sont supposées gaussiennes et indépendantes, de moyenne nulle et de variance  $\sigma_\xi^2$ . On suppose ici que le nombre de photons collectés en chaque pixel est suffisamment élevé pour admettre cette modélisation.

Afin de mesurer la redondance dans une image, nous proposons de comparer deux à deux des motifs  $\mathbf{z}_t(s)$  de dimension  $N_z$  dans un voisinage semi-local fixe. Par simplicité, un motif d'image vectorisé  $\mathbf{z}_t(s)$  est l'ensemble des intensités (ordonné lexicographiquement) des pixels appartenant à la fenêtre carrée, centré au point  $s$ . On suppose que ce motif est un vecteur de dimension  $\sqrt{N_z} \times \sqrt{N_z}$ . Il a été confirmé dans (Buades, Coll & Morel 2005) que la distance  $\|\mathbf{z}_t(s) - \mathbf{z}_t(r)\|^2$  permet d'exprimer

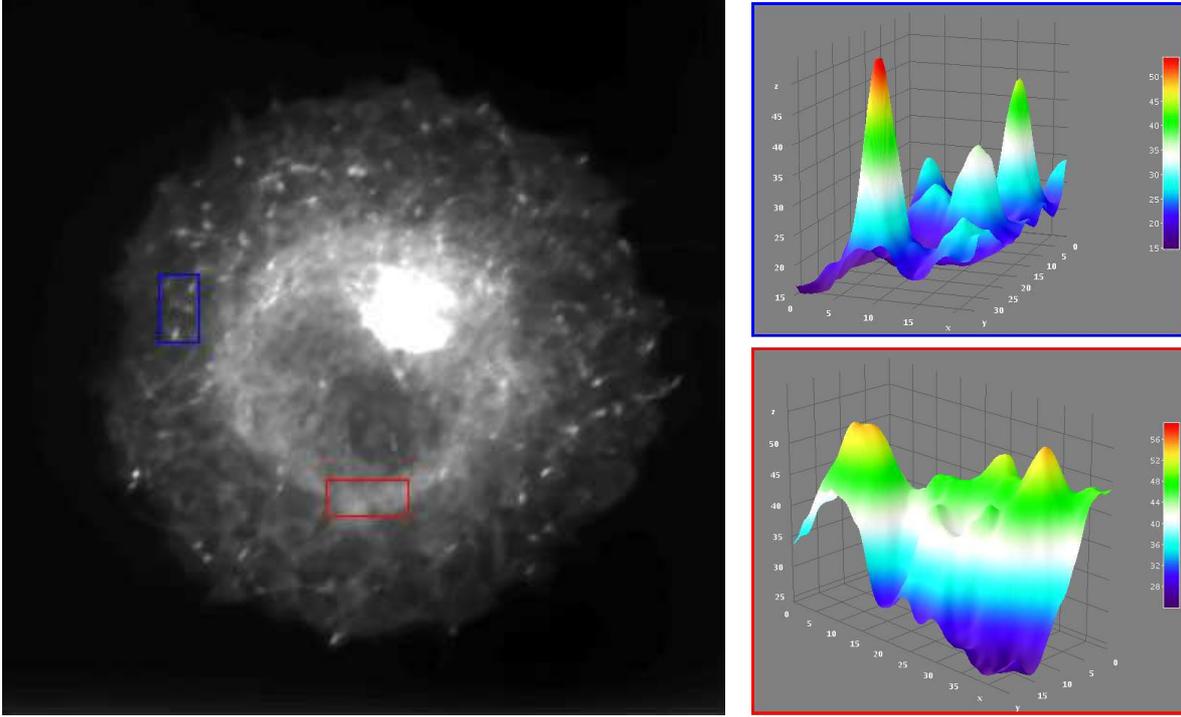


FIGURE 4.5: À gauche : image de vidéo-microscopie où les protéines Rab6 sont marquées par la GFP (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation). En haut à droite : carte topographique représentant l'intensité observée dans la région encadrée en bleu dans l'image de gauche ; en bas à droite : carte topographique représentant l'intensité observée dans la région encadrée en rouge dans l'image de gauche.

assez efficacement la similarité entre les motifs  $\mathbf{z}_t(s)$  et  $\mathbf{z}_t(r)$  ; intuitivement, si la distance est grande, on conclut que les pixels  $s$  et  $r$  appartiennent à des contextes spatiaux différents. Dans les régions homogènes, le bruit étant supposé gaussien, la mesure de similarité

$$\text{dist}(\mathbf{z}_t(s), \mathbf{z}_t(r)) = \frac{\|\mathbf{z}_t(s) - \mathbf{z}_t(r)\|^2}{2\sigma_\xi^2} \quad (4.38)$$

suit la distribution du chi-2 avec  $N_z$  degrés de liberté :  $\text{dist}(\mathbf{z}_t(s), \mathbf{z}_t(r)) \sim \chi_{N_z}^2$ . On peut donc écrire :

$$P(\text{dist}(\mathbf{z}_t(s), \mathbf{z}_t(r))) \propto \exp \left[ \left( \frac{N_z}{2} - 1 \right) \log(\text{dist}(\mathbf{z}_t(s), \mathbf{z}_t(r))) - \frac{\text{dist}(\mathbf{z}_t(s), \mathbf{z}_t(r))}{2\sigma_\xi^2} \right]. \quad (4.39)$$

À présent, nous proposons de construire des champs de variables observables  $\mathbf{y}_t = (y_t(s)) \in \Omega_y$  à chaque instant  $t$  de la séquence d'images  $\mathbf{I}_t$ . Nous exploitons ici les statistiques de comptage issues d'une analyse de l'image avec des mesures de similarité de la forme (4.38). Une manière assez efficace de mettre en évidence la présence de vésicules dans l'image tout en demeurant robuste au bruit consiste à calculer, en chaque site  $s \in \mathcal{S}$ , une observation de la forme :

$$y_t(s) = \sum_{r \in \mathcal{N}_s} (N_z - 2) \log(\|\mathbf{z}_t(s) - \mathbf{z}_t(r)\|) - \frac{\|\mathbf{z}_t(s) - \mathbf{z}_t(r)\|^2}{4\sigma_\xi^2}, \quad (4.40)$$

où  $\mathcal{N}_s$  désigne un voisinage spatial autour du site  $s$  et  $\sigma_\xi^2$  est estimée de manière robuste selon l'approche décrite dans (Kervrann & Boulanger 2006). Étant donnée la petite taille des objets recherchés

dans l’image, la taille des motifs sera faible :  $N_z = 9$ . Les séquences d’images étant restaurées selon la méthode décrite dans (Boulanger, Kervrann & Bouthemy 2007), le rapport signal sur bruit est suffisamment faible pour considérer un petit voisinage spatial :  $|\mathfrak{N}_s| = 9, \forall s \in S$ . Il faut noter que la distribution du chi-2 est valable pour modéliser la distance entre deux vecteurs gaussiens indépendants. Dans notre cas, le caractère gaussien des vecteurs est valide puisque le bruit résiduel est un bruit blanc gaussien en première approximation et que les images étudiées présentent de faibles contrastes d’intensité. En revanche, les vecteurs comparés ne sont pas tout à fait indépendants puisqu’ils se recouvrent. Cependant, une approximation de la distribution par une loi du chi-2 semble donner satisfaction en pratique.

Pour illustrer l’intérêt de cette modélisation, la figure 4.6 permet de comparer les mesures entre motifs (figure 4.6 (e)), l’amplitude du gradient spatial (figure 4.6 (c)), et le contraste local défini comme  $y_t^c(s) = \sum_{r \in \mathfrak{N}_s} \|y_t(s) - y_t(r)\|^2$ , où  $\mathfrak{N}_s$  est un voisinage du site  $s$  (figure 4.6 (d)). Pour obtenir les cartes d’observation, nous avons considéré une petite région d’une image extraite d’une séquence de vidéo-microscopie (figure 4.6 (a)). Sur cet exemple concret, cinq vésicules sont présentes dans la région encadrée en rouge sur la figure 4.6 (a). Si on ne considère que le profil d’intensité observé dans cette région (figure 4.6 (b)), il est très difficile d’extraire ces vésicules à cause des variations d’intensité observées en arrière plan. L’amplitude du gradient spatial (figure 4.6 (c)) est sensible au bruit et aux irrégularités observées dans la composante “fond”. Il ne permet donc pas d’extraire les vésicules. En revanche, les cartes de potentiels sur les interactions entre pixels (figure 4.6 (d)) et entre motifs (figure 4.6 (e)) sont plus robustes sur ce point. Toutefois, la carte des interactions entre pixels est un peu plus sensible aux irrégularités. En particulier, il est difficile de statuer sur la nature du pic aligné avec celui du fond à gauche dans la figure 4.6 (d). Au contraire, les interactions entre motifs permettent d’identifier très nettement cinq pics davantage contrastés que les lieux homogènes de l’image.

Pour repérer les objets d’intérêt, nous adoptons (4.40) pour définir les variables observables. Il reste néanmoins à fixer un seuil pour séparer l’ensemble des points de l’image en deux classes correspondant d’une part aux vésicules et d’autre part à la composante “fond”.

### Estimation automatique du seuil de détection

Afin de définir les potentiels du modèle markovien, nous considérons désormais l’histogramme  $h_t$  du champ observé  $y_t$ . Nous avons privilégié une méthode simple pour identifier les pixels des deux composantes recherchées (“objet” et “fond”). En première approximation, l’histogramme  $h_t = (h_t(i))_{i=1, \dots, y_t^{max}}$ , où  $y_t^{max} = \max_{s \in S} y_t(s)$ , est approché par deux boîtes englobantes. Le seuil optimal à l’instant  $t$  minimise la métrique de Matusita (Hager, Dewan & Stewart 2004) (connue comme étant équivalente à la distance de Bhattacharyya) entre l’histogramme mesuré et les deux boîtes englobantes (figure 4.7) :

$$\hat{\tau}_t = \min_{\tau_t} \left( \sum_{i=0}^{\tau_t} (\sqrt{h_t(i)} - \sqrt{h_t^-})^2 + \sum_{i=\tau_t}^{y_t^{max}} (\sqrt{h_t(i)} - \sqrt{h_t^+})^2 \right), \quad (4.41)$$

où  $h_t^- = \sup_{i \in ]0, \tau_t[} h_t(i)$  et  $h_t^+ = \sup_{i \in [\tau_t, y_t^{max}]} h_t(i)$ . La mesure  $y_t$  est nulle pour les points situés en dehors de la cellule. Ces points ne sont pas pris en compte pour l’estimation du seuil et seuls les pixels de l’image pour lesquels  $y_t(s) > 0$  sont utiles. Un seuil  $\hat{\tau}_t$  est donc estimé à chaque instant  $t$ . Afin d’obtenir une détection cohérente temporellement sur toute la séquence, nous proposons un seuil unique défini comme le minimum sur tous les seuils :

$$\hat{\tau} = \inf \{ \hat{\tau}_0, \dots, \hat{\tau}_T \}, \quad (4.42)$$

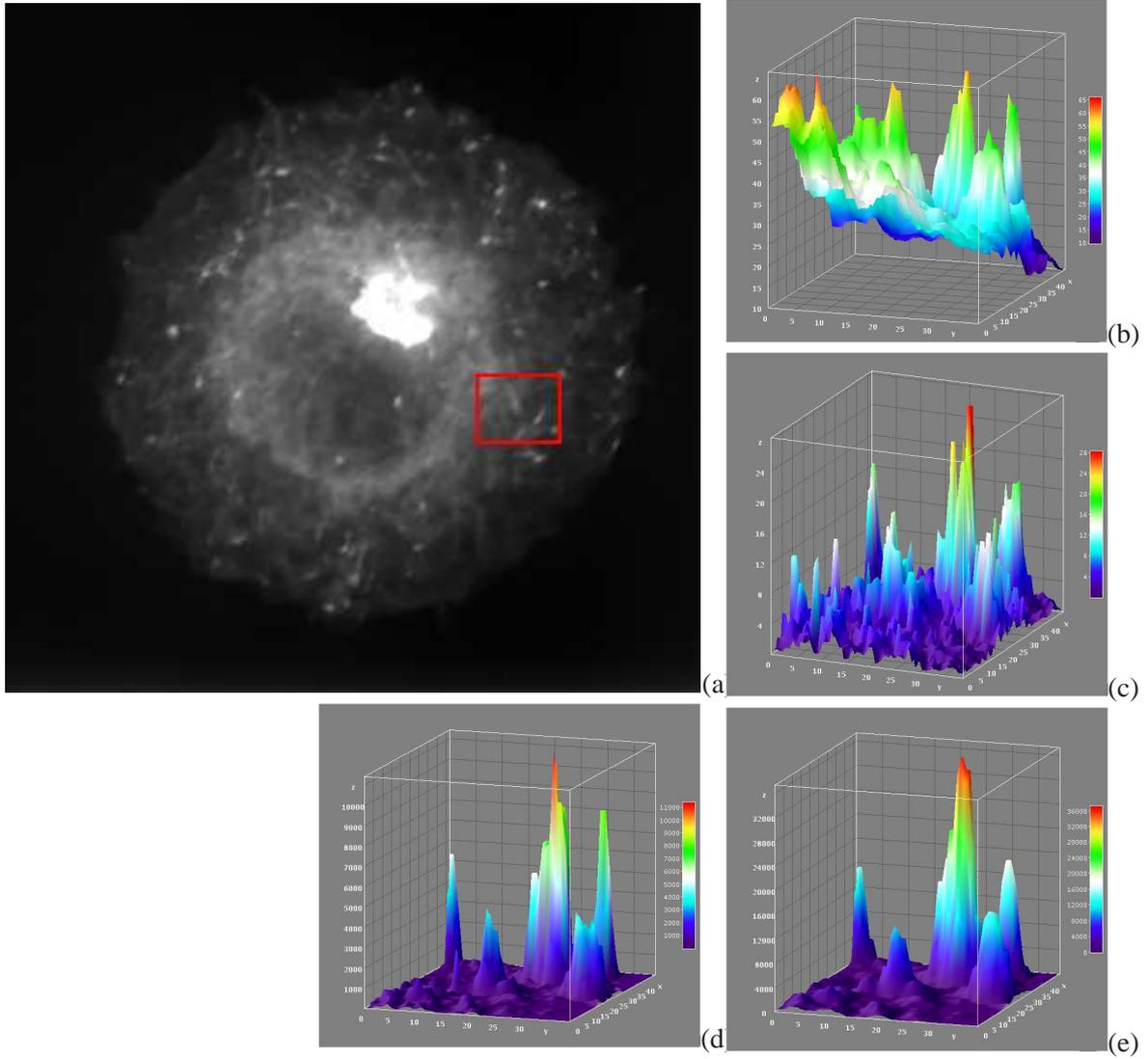


FIGURE 4.6: (a) Image de vidéo-microscopie où les protéines Rab6 sont marquées par la GFP (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation); (b) carte topographique représentant l'intensité observée dans la région encadrée en rouge dans l'image (a); (c) carte topographique représentant le gradient spatial de la région encadrée en rouge dans l'image (a); (d) carte topographique représentant les potentiels d'interaction entre pixels dans la région encadrée en bleu dans l'image (a); (e) carte topographique représentant les potentiels d'interaction entre motifs dans la région encadrée en bleu dans l'image (a).

où  $T$  est le nombre total d'images dans la séquence. Finalement, le terme discriminant dans (4.36) est simplement défini pour les deux classes possibles comme :

$$V_D(d_t(s), \mathbf{y}_t) = 1[d_t(s) = -1] \text{ sigmoïde} \left( \frac{y_t(s) - \hat{\tau}}{\hat{\tau}} \right) + 1[d_t(s) = 1] \text{ sigmoïde} \left( \frac{\hat{\tau} - y_t(s)}{\hat{\tau}} \right), \quad (4.43)$$

où  $\text{sigmoïde}(\cdot)$  est la fonction sigmoïde, impliquant que  $V_D(d_t(s) = \cdot, \mathbf{y}_t)$  appartient à l'intervalle  $[-1, 1]$ .

Afin de spécifier complètement la fonctionnelle d'énergie (4.36), il ne reste plus qu'à définir les deux termes de régularisation.

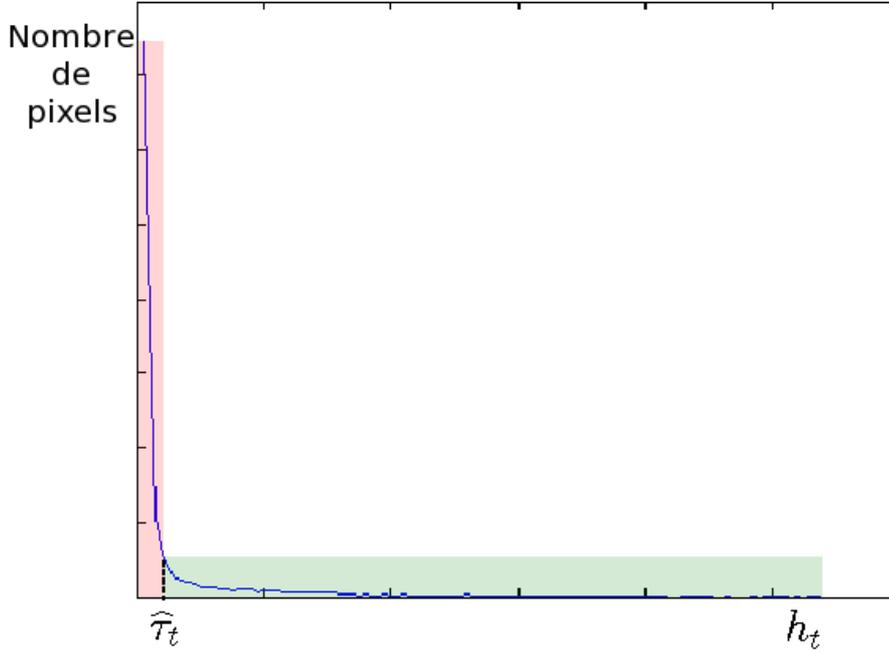


FIGURE 4.7: Histogramme de  $y_t$  en bleu, et boîtes englobantes permettant d'estimer  $\hat{\tau}_t$ .

### Régularisation spatiale et temporelle

Les termes de régularisation spatiale et temporelle que nous avons retenus sont des modèles d'Ising dans le cas le plus simple :

$$V_S(d_t(s), d_t(r)) = -\frac{1}{|\mathcal{N}_s|} d_t(s) d_t(r), \quad V_T(d_t(s), d_{t-1}(r)) = -\frac{1}{|\mathcal{N}_r|} d_t(s) d_{t-1}(r). \quad (4.44)$$

Nous avons également considéré des potentiels plus complexes (Boykov & Joly 2001, Rother, Kolmogorov & Blake 2004) de la forme suivante :

$$\begin{aligned} V_S(d_t(s), d_t(r)) &= 1[d_t(s) \neq d_t(r)] \left( \frac{e^{-\beta_S(y_t(s)-y_t(r))^2}}{\|r-s\|^2} \right), \\ V_T(d_t(s), d_{t-1}(r)) &= 1[d_t(s) \neq d_{t-1}(r)] \left( \frac{e^{-\beta_T(y_t(s)-y_{t-1}(r))^2}}{\|r-s\|^2} \right), \end{aligned} \quad (4.45)$$

où les paramètres de contraste sont définis comme  $\beta_S = \frac{1}{2\langle (y_t(s)-y_t(r))^2 \rangle}$  et  $\beta_T = \frac{1}{2\langle (y_t(s)-y_{t-1}(r))^2 \rangle}$  ; on note  $\langle \cdot \rangle$  l'espérance sur toutes les paires de voisins calculée sur une image d'apprentissage. Ces termes de potentiels (4.45) mêlent variables observées et variables cachées. Nous avons testé ces potentiels relativement plus généraux et plus flexibles que ceux usuellement préconisés. Toutefois, ces derniers n'ont guère amélioré les résultats obtenus avec des potentiels d'Ising (4.44) relativement simples d'emploi. Dans ce document, nous ne présentons donc que ces derniers, ce qui permet de considérer une formulation markovienne assez traditionnelle (Chalmond 2000, Pérez 2003).

Enfin, la fonctionnelle d'énergie (4.36) est minimisée par un algorithme de coupe minimale-flot maximal (Boykov & Kolmogorov 2004), assurant le minimum global de l'énergie très rapidement.

### Évaluation des champs conditionnels pour la détection

Afin d'évaluer la performance de notre méthode de détection, nous avons simulé plusieurs séquences d'images bidimensionnelles. Chaque simulation est composée de 170 images (ou instants) ( $380 \times 380$  pixels). Dans ces simulations, des vésicules sont générées suivant la méthode décrite au chapitre 3, et se déplacent sur une composante “fond” extraite d'une séquence réelle. Le but ici n'est pas de reproduire le modèle cyclique de la protéine Rab6 mais plutôt de générer des séquences pour lesquelles la détection est difficile, afin d'éprouver notre méthode. Deux images extraites d'une de ces séquences sont présentées sur la figure 4.8 (première ligne). Si on ne considère que le trafic des protéines Rab6, l'appareil de Golgi et les vésicules appartiennent à la composante membranaire et sont, de ce fait, considérés comme des objets. Cependant, puisque leurs fonctions biologiques sont différentes, nous avons décidé d'évaluer séparément les détections dans la région du Golgi et les détections de vésicules dans le reste de la cellule.

Pour définir complètement la fonctionnelle d'énergie (4.36), il reste à attribuer une valeur aux constantes  $\alpha_S$  et  $\alpha_T$ . Le champ des variables observables  $y_t$  est relativement régulier puisqu'il repose sur la différence entre motifs d'image. Par conséquent, de faibles valeurs  $\alpha_S = 0,15$  et  $\alpha_T = 0,05$  permettent d'obtenir des détections stables. Nous avons comparé de manière quantitative ces résultats avec ceux obtenus avec la méthode de détection dite “ondelettes à trous” (OAT) (Olivo-Marin 2002). Trois critères classiques sont considérés pour cette évaluation :

i) *Probabilité de Bonnes Détections* :

$$\text{PBD} = \frac{\text{nombre de vésicules bien détectées}}{\text{nombre total de vésicules simulées}},$$

ii) *Probabilité de Faux Négatifs* :

$$\text{PFN} = \frac{\text{nombre de vésicules non détectées}}{\text{nombre total de vésicules simulées}},$$

iii) *Probabilité de Fausses Alarmes* :

$$\text{PFA} = \frac{\text{fausses détections}}{\text{nombre total de vésicules simulées}}.$$

Ces trois critères sont calculés pour chacune des méthodes testées sur la séquence d'images simulée (figure 4.8) et reportés dans le tableau 4.1 (gauche). La PBD la plus élevée (respectivement la PFA la plus faible) est obtenue avec la méthode CAC. Les régions détectées sont plus larges que celles détectées par la méthode OAT. Les potentiels de régularisation d'une part, et la régularité spatiale naturelle de la carte d'observation  $y_t$  (4.40) d'autre part en sont responsables. En fait, comme cela apparaît sur la figure 4.8 (deuxième ligne), le nombre de pixels blancs (respectivement pixels verts) est plus élevé (respectivement moins élevé) avec la méthode CAC qu'avec la méthode OAT. Pour les mêmes raisons, la PFA est plus élevée avec la méthode CAC qu'avec la méthode OAT. Les objets mal détectés (pixels rouges dans la figure 4.8 (deuxième ligne)) ont une aire plus importante. Dans la région de l'appareil de Golgi, la méthode CAC extrait une seule et même grande région compacte tandis que la méthode OAT détecte plusieurs régions fragmentées. Ainsi, les résultats obtenus avec la méthode CAC semblent plus satisfaisants que ceux obtenus avec la méthode OAT.

#### 4.2.3 Estimation conjointe des composantes “fond” et “objet”

La détection de mouvement par soustraction de fond est un problème classique en vidéo-surveillance (Criminisi, Cross, Blake & Kolmogorov 2006, Crivelli et al. 2008). Le principe consiste à détecter les objets mobiles en analysant les différences entre l'ensemble des images et une image de référence correspondant au fond statique. Dans notre cas, la composante “fond” n'est pas statique mais varie lentement

	OAT	CAC
PBD	0,24	0,67
PFN	0,76	0,33
PFA	0,01	0,06

	OAT	CACEF
PBD	0,23	0,49
PFN	0,77	0,51
PFA	0,28	0,08

TABLE 4.1: Gauche : évaluation comparative des méthodes CAC et OAT sur la séquence d’images simulée et présentée sur la figure 4.8; droite : évaluation comparative des méthodes CACEF et OAT sur la séquence d’images simulée (figure 4.11).

au cours du temps. Cependant, si on dispose d’une estimation de la composante “fond”, la différence entre l’image courante et cette composante de référence permet de calculer une nouvelle mesure de contraste pour détecter les vésicules. En effet, les lieux de l’image où ce contraste est élevé coïncident avec les vésicules. Par la suite, nous avons décidé d’estimer cette composante “fond” à chaque instant, afin d’améliorer la détection. Un nouveau terme discriminant est introduit dans la fonction d’énergie (4.36).

### Modélisation de la composante “fond”

Dans notre problématique, l’intensité de la composante “fond” et celle de la composante “objet” s’additionnent. Il paraît donc naturel d’estimer la composante “fond” dans les zones où des objets sont repérables.

Soit  $\mathbf{f}_t = \{f_t(s)\}_{s \in \mathcal{S}}$  l’expression de l’estimation de la composante “fond” telle que :

$$f_t(s) = \begin{cases} \sum_{r \in \mathcal{B}_s} \omega(s, r) y_t(r) & \text{si } d_t(s) = 1, \\ y_t(s) & \text{sinon,} \end{cases} \quad (4.46)$$

où  $\omega(s, r) \in [0, 1]$  est un poids de forme exponentielle évaluant la variation d’intensité entre les sites  $s$  et les sites  $r \in \mathcal{B}_s$ , et  $\mathcal{B}_s$  désigne l’ensemble des sites de la composante “fond” (vérifiant  $d_t(r) = -1, r \in \mathcal{B}_s$ , région labellisée en orange sur la figure 4.9) formant une couronne autour de la zone détectée à laquelle le site  $s$  appartient (région labellisée en blanc sur la figure 4.9). Sur la figure 4.10 (a), la composante “fond” de l’image dans les régions détectées comme des vésicules (régions labellisées en blanc dans la figure 4.10 (b)) est interpolée en exploitant les observations des régions connexes appartenant à la composante “fond” (labellisées en orange dans la figure 4.10 (b)). Le résultat de cette interpolation est présentée sur la figure 4.10 (c). Une composante “fond”  $f_t(s)$  est ainsi disponible en chaque point de l’image. Il est donc possible de l’utiliser pour améliorer la détection.

### Nouvelle fonctionnelle d’énergie

La nouvelle fonctionnelle d’énergie que l’on peut désormais considérer est de la forme :

$$U_2(\mathbf{d}_t, \mathbf{f}_t | \mathbf{y}_t, \hat{\mathbf{d}}_{t-1}) = \sum_{s \in \mathcal{S}} (V_D(d_t(s), \mathbf{y}_t) + \beta V_F(f_t(s), d_t(s), y_t(s))) + \sum_{\langle s, r \rangle} (\alpha_S V_S(d_t(s), d_t(r)) + \alpha_T V_T(d_t(s), \hat{d}_{t-1}(r))), \quad (4.47)$$

où  $V_F(f_t(s), d_t(s), y_t(s)) = 2 (\text{sigmoïde}((y_t(s) - f_t(s))^2) - 0, 5)$ ,  $\beta$  est une constante positive. La première estimation à l’instant  $t$  de  $\mathbf{d}_t$  est obtenue avec la composante “fond” estimée à l’instant  $(t - 1)$ ,

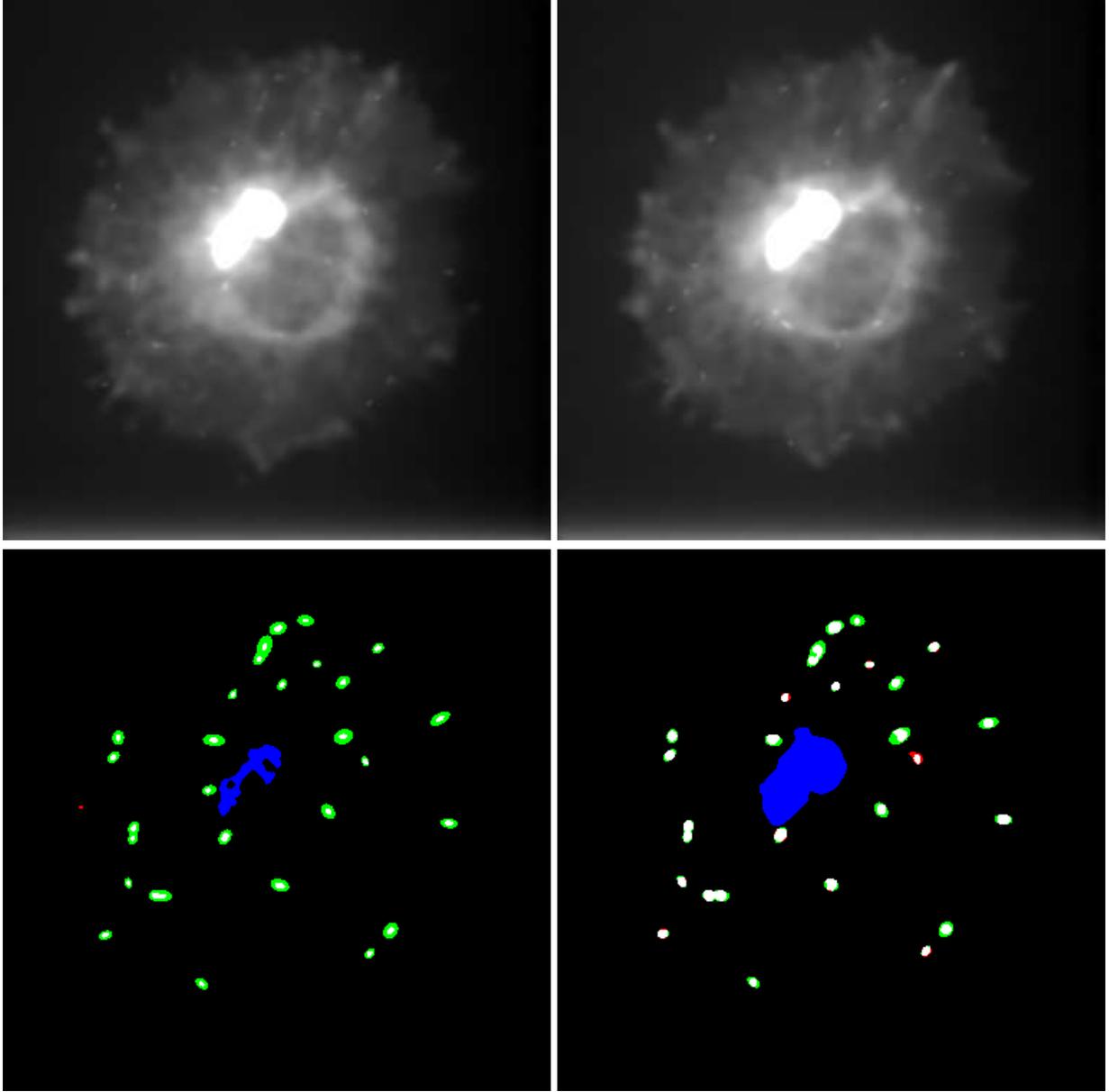


FIGURE 4.8: Première ligne : images n° 50 et n° 100 extraites d'une séquence d'images simulée (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation) ; deuxième ligne : résultats produits par la méthode OAT (gauche) et CAC (droite) appliquées à l'image n° 50 de la séquence d'images simulée. Les pixels bleus correspondent au Golgi, les pixels blancs aux bonnes détections, les pixels verts aux faux négatifs, et les pixels rouges aux fausses alarmes.

notée  $\hat{\mathbf{f}}_{t-1}$ . Ensuite, l'estimation jointe de  $\mathbf{f}_t$  et  $\mathbf{d}_t$  est obtenue en minimisant alternativement  $U_2$  (algorithme de coupe minimale-flot maximal) par rapport aux deux variables, jusqu'à convergence. À l'itération  $k$ , nous avons :

$$\begin{cases} \mathbf{d}_t^{(k+1)} &= \arg \min_{\mathbf{d}_t} U_2(\mathbf{d}_t, \mathbf{f}_t^{(k)} | \mathbf{y}_t, \hat{\mathbf{d}}_{t-1}), \\ \mathbf{f}_t^{(k+1)} &= \arg \min_{\mathbf{f}_t} U_2(\mathbf{d}_t^{(k+1)}, \mathbf{f}_t | \mathbf{y}_t, \hat{\mathbf{d}}_{t-1}). \end{cases} \quad (4.48)$$

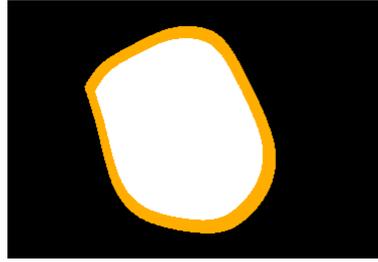


FIGURE 4.9: Ensemble des sites (en orange) de la composante “fond” utilisés pour interpoler l’intensité de la région détectée (en blanc).

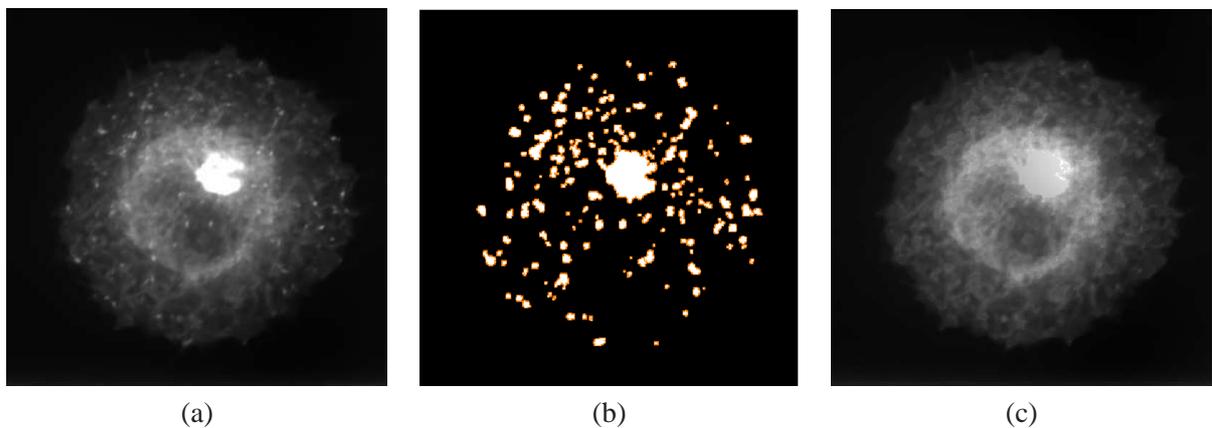


FIGURE 4.10: (a) Image réelle de microscopie de fluorescence où les protéines Rab6 sont marquées par la GFP ; (b) les régions détectées dans l’image (a) sont labellisées en blanc, et les régions connexes appartenant à la composante “fond” et utilisées pour interpoler la composante “fond” dans les régions détectées sont labellisées en orange ; (c) composante “fond” estimée.

### Évaluation de l’estimation conjointe des composantes “objet” et “fond”

Nous avons simulé une nouvelle séquence d’images (figure 4.11, première ligne) pour comparer les performances de la méthode OAT et de la méthode CACEF qui permet d’estimer la composante “fond”. La séquence est composée de 170 images ( $380 \times 380$  pixels) et est générée comme la précédente ; dans cette expérience les vésicules sont moins bien contrastées par rapport au fond. Comme dans l’expérience précédente, nous avons évalué séparément la région de l’appareil de Golgi et les vésicules. Enfin, comme dans la section 4.2.2,  $\alpha_S = 0,15$  et  $\alpha_T = 0,05$ . Nous fixons aussi  $\beta = 0,45$ . Expérimentalement, nous avons noté que les résultats obtenus en fixant  $\beta \in [0,3; 0,6]$  sont similaires. Notons que si  $\beta < 0,3$ , le potentiel d’énergie  $V_F$  n’a que peu d’influence. En revanche,  $\beta > 0,6$  produit une sur-détection. Dans la zone de l’appareil de Golgi, les résultats sont consistants avec ceux obtenus précédemment, c’est-à-dire que la méthode CACEF détecte une seule région tandis que la méthode OAT extrait plusieurs petites régions. Les probabilités PBD, PFN et PFA calculées pour la méthode OAT et la méthode CACEF testées sur la séquence d’images simulée de la figure 4.11 (première ligne) sont reportées dans le tableau 4.1 (droite). Les valeurs PBD et PFN sont proches pour les deux méthodes. Cependant, sur la figure 4.11 (deuxième ligne), on remarque que les spots détectés par la méthode CACEF sont plus larges que ceux détectés par la méthode OAT. Par ailleurs, toutes les vésicules ne sont pas détectées avec la méthode OAT (en bas à droite de la cellule) contrairement à la méthode CACEF qui détecte quelques pixels attestant la présence de vésicules. Enfin, de nombreuses régions ne corre-

spondant pas aux vésicules sont détectées par la méthode OAT, ce qui augmente la valeur de PFA. Au contraire, la méthode CACEF détecte peu de pixels qui n'appartiennent pas à des vésicules, ce qui se traduit par une faible PFA.

Afin de compléter cette évaluation, nous proposons de comparer les performances obtenues avec les méthodes OAT et CACEF sur une séquence réelle d'images. Celle-ci correspond à une séquence d'images de vidéo-microscopie acquise avec un microscope "spinning disk" sur une cellule contrainte par un *micro-patron* circulaire. Cette séquence est tout d'abord restaurée (Boulanger, Sibarita, Kervrann & Bouthemy 2008) puis convertie en une séquence 2D+t en moyennant l'intensité le long de l'axe du microscope (figure 4.12 (a)). Les images sont codées sur 2 octets et la taille des voxels est égale à  $64,5 \times 64,5 \times 300 \text{ nm}^3$ . La fréquence d'échantillonnage est d'1 image/sec. Les basses fréquences de chacune des images sont ensuite soustraites : l'image originale est convoluée par un noyau gaussien avec une forte variance, et le résultat de cette convolution est ensuite soustrait à l'image originale. Cette opération est suivie d'un filtrage médian pour faciliter la détection des objets d'intérêt. L'obtention d'une vérité-terrain pour tester la détection de vésicules est une tâche laborieuse et difficile à réaliser puisque de nombreux objets sont en mouvement en même temps sur un fond non stationnaire. On se contentera donc d'une évaluation qualitative. Les résultats obtenus avec les deux méthodes sont illustrés sur la figure 4.12 (b). On fixe toujours  $\alpha_S = 0,15$ ,  $\alpha_T = 0,05$  et  $\beta = 0,45$ . L'appareil de Golgi est à nouveau détecté de manière compacte par la méthode CACEF, tandis que la méthode OAT détecte plusieurs régions fragmentées. Les différences entre les méthodes sont évidentes si on examine plusieurs images consécutives. Si on considère la région encadrée en bleu sur la figure 4.12 (b) sur vingt-quatre instants consécutifs (figure 4.13), la vésicule qui se déplace du coin en haut à droite vers le coin en bas à gauche de la région est correctement détectée avec la méthode CACEF. Avec la méthode OAT, cette même vésicule n'est pas détectée sur les images n°9, n°12 et n°17, et est partiellement détectée sur les images n°8, n°10-11, n°16 et n°22 (phénomène appelé "vacillement" temporel de la détection). Ainsi, la régularisation temporelle et surtout le potentiel d'énergie  $V_F$  permettent à la méthode CACEF de produire des résultats stables et cohérents au cours du temps. Enfin, la méthode CACEF prédit la composante "fond" en tout point et à chaque instant (figure 4.12 (c)) ; la composante "objet" (figure 4.12 (d)) résulte de la différence entre la séquence d'images originale et la composante "fond" estimée.

#### 4.2.4 Évaluation en vidéo-microscopie de différentes approches de détection

Smal, Loog, Niessen & Meijering (2009) proposent de comparer quantitativement plusieurs méthodes de détection de spots en vidéo-microscopie. Pour cela, ils génèrent, pour différentes conditions, des images de fluorescence présentant des spots, ou des structures allongées. Les performances obtenues avec différentes méthodes de détection en vidéo-microscopie sont ensuite comparées. Le simulateur de spots utilisé dans (Smal et al. 2009) est disponible sur Internet ([http://www.smal.ws/imagej\\_syndata.html](http://www.smal.ws/imagej_syndata.html)), ce qui nous a permis de comparer nos résultats.

##### Simulateur de spots

Les séquences générées sont composées de 16 images 2D de dimension  $512 \times 512$  pixels, avec une discrétisation spatiale égale à 50 nm. Deux types d'objets sont simulés :

- des objets circulaires simulés par des gaussiennes 2D d'écart-type  $\sigma_{sim} = 100 \text{ nm}$  (figure 4.14 (a)),
- des objets allongés simulés par des gaussiennes anisotropes d'écart-type  $\sigma_{sim}^+ = 250 \text{ nm}$  et  $\sigma_{sim}^- = 100 \text{ nm}$  (figure 4.14 (b)).

Sur chaque image simulée, 256 spots gaussiens sont positionnés aux coordonnées :

$$(16 + 30s'_x + \text{rand}([-10, 10]), 16 + 30s'_y + \text{rand}([-10, 10])) , \quad (4.49)$$

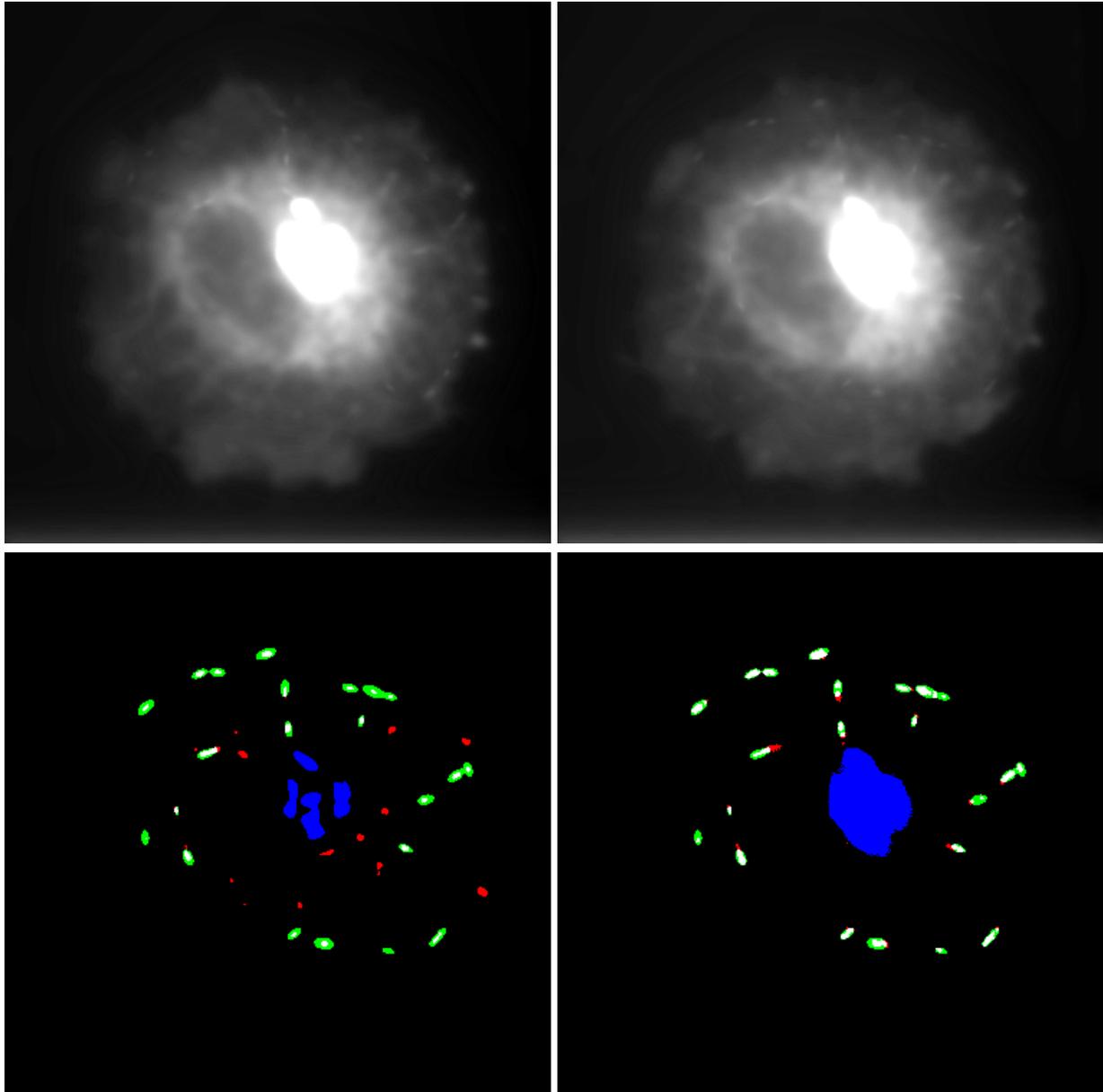


FIGURE 4.11: Première ligne : images n° 50 et n° 100 extraites d'une séquence d'images simulée (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation) ; deuxième ligne : résultats obtenus avec les méthodes OAT (gauche) et CACEF (droite) sur l'image n° 100 de la séquence d'images simulée. Les pixels bleus correspondent à la région du Golgi, les pixels blancs aux bonnes détections, les pixels verts aux faux négatifs, et les pixels rouges aux fausses alarmes.

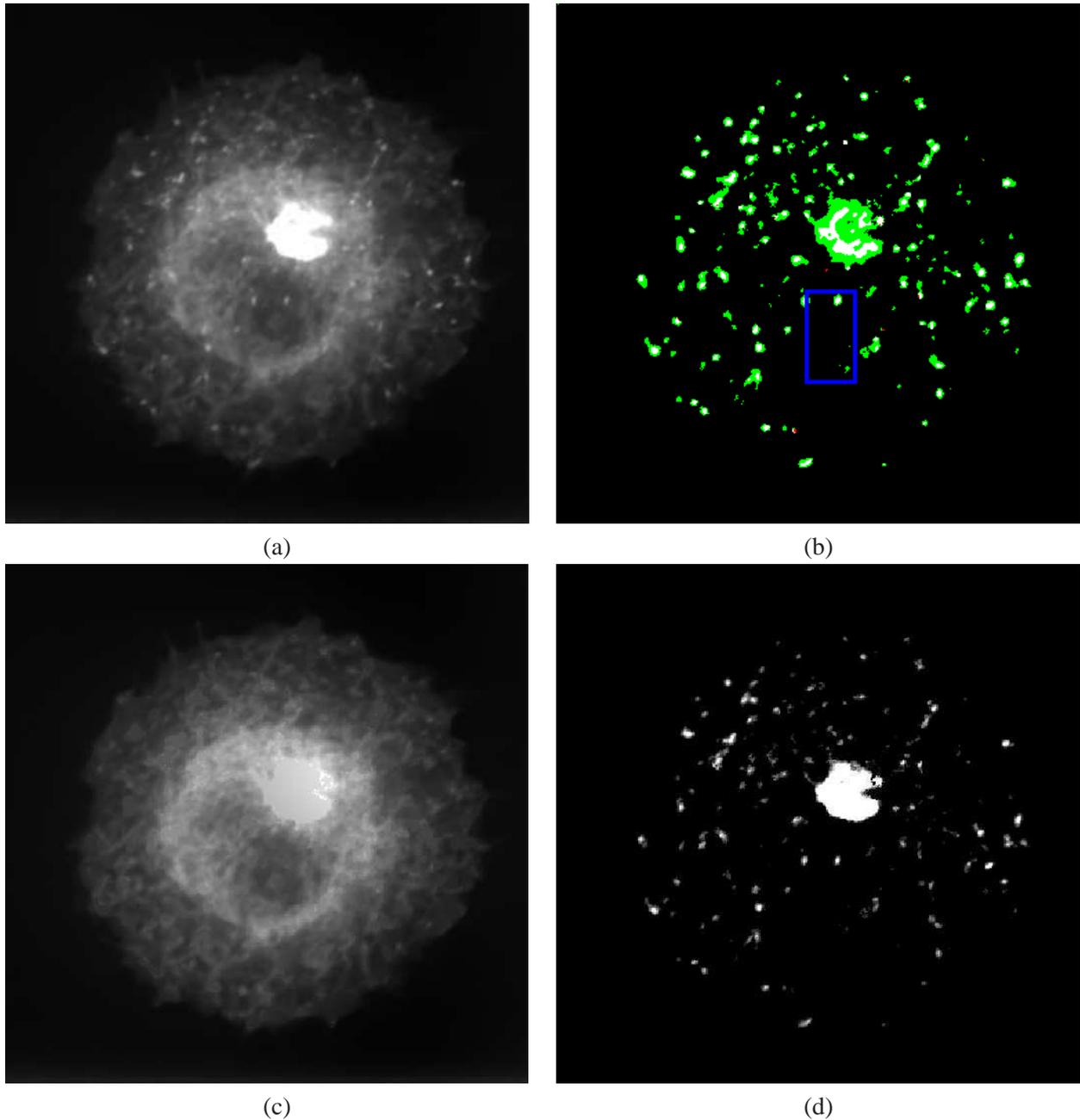


FIGURE 4.12: (a) Image n° 1 extraite d'une séquence d'images réelle ; (b) résultats obtenus avec les méthodes OAT et CACEF sur l'image (a). Les pixels blancs correspondent aux pixels détectés par les deux méthodes, les pixels verts aux pixels détectés uniquement par la méthode CACEF, et les pixels rouges à ceux détectés uniquement par la méthode OAT ; (c) composante "fond" estimée avec la méthode CACEF pour l'image (a) ; (d) composante "objet" résultant de la différence entre l'image (a) et la composante "fond" (c) (une correction gamma est appliquée sur les images (a), (c) et (d) pour une meilleure visualisation).

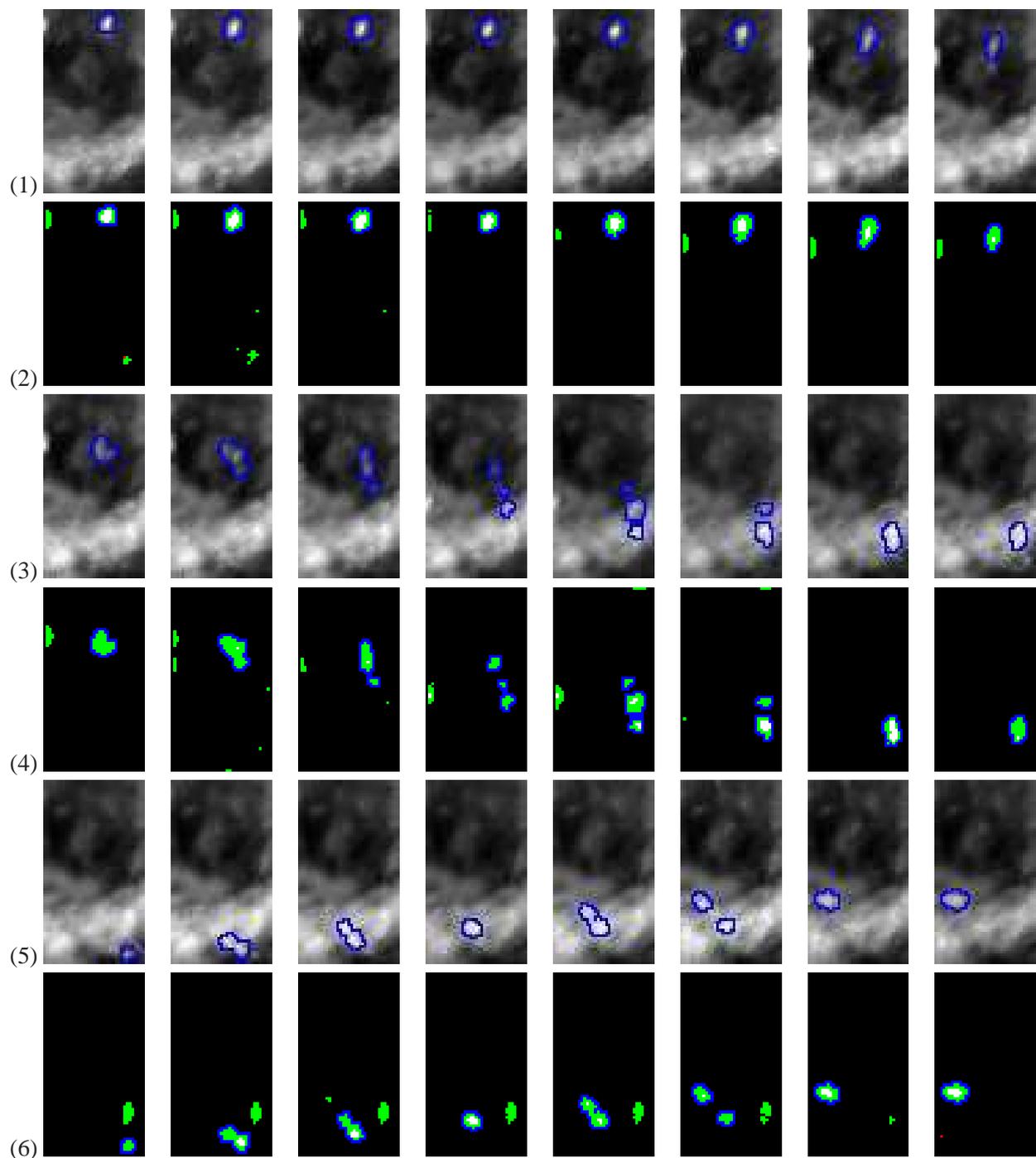


FIGURE 4.13: Lignes impaires : images n° 1 à n° 24 correspondant à la région encadrée en bleu sur la figure 4.12 (b) (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation); lignes paires : résultats obtenus avec les méthodes OAT et CACEF calculés sur les images des lignes impaires. Les pixels blancs correspondent aux pixels détectés par les deux méthodes, les pixels verts aux pixels détectés uniquement par la méthode CACEF, et les pixels rouges à ceux détectés uniquement par la méthode OAT. Sur toutes les images, les pixels bleus correspondent aux contours des détections obtenus avec la méthode CACEF.

où  $\text{rand}([-i, i])$  est la réalisation d'une loi uniforme sur l'intervalle  $[-i, i]$ ,  $s'_x = \{0, \dots, 15\}$ , et  $s'_y = \{0, \dots, 15\}$ . Les objets sont donc positionnés aléatoirement autour d'un point de référence, mais deux spots voisins ne se chevauchent pas. Il n'y a aucune dépendance temporelle pour positionner les objets d'une image à l'autre. Afin d'estimer les performances des algorithmes pour différents fonds, 3 types d'images (A, B et C) sont générés. Les images de type A sont obtenues en ajoutant une constante égale à 10 (figure 4.14 (a) et (b)). Sur les images de type B, l'intensité du fond augmente linéairement selon la direction horizontale (figure 4.14 (c)) : depuis une valeur égale à 10 sur le bord gauche de l'image jusqu'à une valeur égale à 50 sur le bord droit. Le fond calculé sur les images de type C est plus complexe puisque des structures uniformes sont simulées (figure 4.14 (d)). Dans ce cas, l'intensité au pixel  $s$  est la réalisation d'une loi gaussienne de moyenne nulle et d'écart-type 150. Ensuite, l'image est convoluée par un noyau gaussien et seuillée au niveau zéro, ce qui produit des zones homogènes dans le fond. Pour les trois types de fond, on génère une variable aléatoire selon une loi de Poisson en chaque pixel pour obtenir des images bruitées. Le Rapport Signal sur Bruit (RSB) est défini par la différence d'intensité entre les composantes "objet" et "fond" divisée par l'écart-type du bruit  $\sigma_{\text{bruit}}$  (Cheezum et al. 2001) :

$$\frac{\bar{I}^{\text{objet}} - \bar{I}^{\text{fond}}}{\sigma_{\text{bruit}}},$$

où  $\bar{I}^{\text{objet}}$  désigne l'intensité moyenne mesurée sur les objets,  $\bar{I}^{\text{fond}}$  l'intensité moyenne mesurée sur le fond. D'après (Carter, Shubeita & Gross 2005), les méthodes de détection sont mises à mal pour des RSB compris entre 4 et 5. Les images sont donc simulées pour un RSB inférieur à 4 pour éprouver la fiabilité des méthodes de détection.

### Critères d'évaluation

Afin de localiser précisément les objets détectés avec une méthode donnée, la carte binaire de détection obtenue pour un seuil  $\zeta$  est calculée. Les différentes composantes connexes de cette carte sont extraites. Soit  $\{c_1, \dots, c_{N_d}\}$  l'ensemble des composantes connexes des  $N_d$  objets détectés. Les positions des centres de gravité  $\mathcal{G} = \{g_1, \dots, g_{N_d}\}$  des objets sont comparées aux 256 centres de gravité  $\mathcal{G}^0 = \{g_1^0, \dots, g_{256}^0\}$  issus de la simulation. Si  $\|g_i^0 - g_i\| < \Delta g$ , où  $\Delta g$  est une tolérance spatiale, l'objet  $n^\circ i$  est déclaré comme Vrai Positif (VP), sinon l'objet est déclaré comme Faux Positif (FP). Le nombre de Faux Négatifs (FN) est égal à  $N_0 - N_{VP}$ , où  $N_0$  est le nombre exact d'objets présents de la simulation et  $N_{VP}$  le nombre de vrais positifs. Les performances sont établies sur la base des deux critères suivants :

- *Probabilité de Bonnes Détections* :

$$\text{PBD} = \frac{N_{VP}}{N_{VP} + N_{FN}} = \frac{N_{VP}}{N_0},$$

- *Probabilité de Fausses Alarmes* :

$$\text{PFA} = \frac{N_{FP}}{N_0}.$$

Pour pouvoir objectivement comparer les méthodes, la mesure de performance PBD\* est calculée pour le seuil optimal  $\zeta^*$  qui correspond à la PFA = 0,01.

Les séquences simulées pour évaluer les performances des détecteurs sont générées pour les 2 types d'objets et les 3 types de fond, avec un RSB égal à 2. L'évaluation est effectuée en cumulant les vrais positifs et vrais négatifs sur toute la séquence, et en moyennant les résultats sur la totalité des 4096 objets générés (256 objets sur chacune des 16 images). La tolérance spatiale  $\Delta g$  est égale à 200 nm.

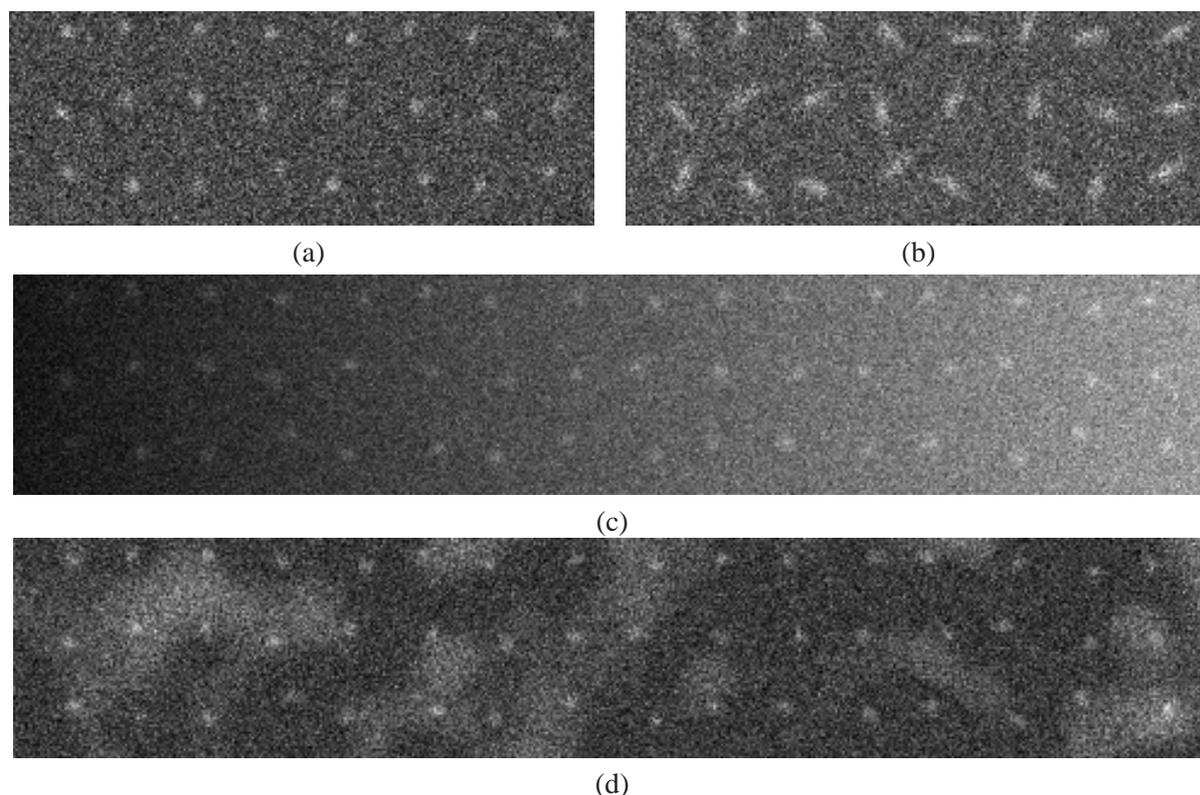


FIGURE 4.14: Images synthétiques générées pour évaluer les méthodes de détection avec un RSB égal à 2. (a) Image de type A présentant des spots gaussiens isotropes; (b) image de type A présentant des spots gaussiens anisotropes; (c) image de type B présentant des spots gaussiens isotropes; (d) image de type C présentant des spots gaussiens isotropes.

### Présentation des différentes méthodes de détection

Plusieurs méthodes sont évaluées dans (Smal et al. 2009) : méthode OAT ; méthode “top-hat” (TH) ; méthode Laplacien de Gaussienne (LoG) ; méthode reposant sur la Courbure locale et l’Intensité (CI) ; méthode “H-Dome” (HD) ; méthodes supervisées “AdaBoost” (AdaB) et Analyse Discriminante de Fisher (ADF). Après seuillage, certains objets binaires ne sont pas toujours de forme convexe (eg. méthodes OAT et TH). Une ouverture morphologique est nécessaire pour y remédier. Les meilleurs résultats obtenus avec la méthode OAT nécessitent trois plans d’ondelettes. Les meilleurs résultats obtenus avec la méthode TH correspondent à un élément structurant de forme circulaire et de rayon 3. La méthode LoG (Marr & Hildreth 1980, Sage, Neumann, Hediger, Gasser & Unser 2005) exploite les dérivées secondes spatiales de l’image pour détecter les spots. L’image est préalablement filtrée à un noyau gaussien, choisi afin d’obtenir la plus grande valeur de PBD\* pour les images de type C. Pour la méthode CI, le noyau du filtre gaussien est fixé à 2. Pour les méthodes supervisées, une base d’apprentissage pour chaque type d’objets est constituée. Précisément, 962 (respectivement 2366) ondelettes de type Haar sur des sous-fenêtres de taille  $10 \times 10$  (respectivement  $13 \times 13$ ) sont utilisées pour les spots gaussiens isotropes (respectivement spots gaussiens anisotropes). Pour la phase d’apprentissage, des ensembles synthétiques sont simulés, soit encore 4096 motifs positifs et 4096 motifs négatifs ( $10 \times 10$ ) pour chaque type de fond et chaque type d’objet.

Pour la méthode CACEF, quelques ajustements sont nécessaires pour traiter les situations synthétiques. Le RSB est faible si on se compare aux séquences d’images analysées dans la section précédente,

Méthodes	PBD*							
	Spots gaussiens isotropes				Spots gaussiens anisotropes			
	Type A	Type B	Type C	Moyenne	Type A	Type B	Type C	Moyenne
OAT	0,81	0,37	0,30	0,49	0,31	0,17	0,18	0,22
TH	0,99	0,88	0,48	0,78	<b>0,99</b>	0,96	0,56	0,84
HD	0,99	0,97	0,90	0,95	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	0,97	0,98
LoG	0,99	0,91	0,95	0,95	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	0,95	0,98
CI	0,98	0,67	0,89	0,85	0,53	0,31	0,31	0,38
AdaB	0,99	0,94	0,94	0,96	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>
ADF	0,99	<b>0,99</b>	<b>0,96</b>	0,98	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>
CACEF	<b>1,00</b>	0,93	<b>0,96</b>	0,96	0,98	0,92	0,94	0,95

TABLE 4.2: Mesures de performance  $PBD_{0,02}$  obtenues avec les différentes méthodes de détection considérées, pour les 2 types d’objets et les 3 types de fond dans des séquences présentant un RSB égal à 2.

puisqu’elles ont été préalablement restaurées. Pour comparer les méthodes objectivement, nous n’avons pas cherché à restaurer les séquences d’images synthétiques générées, auquel cas notre méthode serait largement avantagée. Pour être moins dépendant du bruit, les images sont néanmoins convoluées par un filtre gaussien de noyau unitaire, et le voisinage  $\mathcal{N}_s$  nécessaire pour comparer les motifs voisins (voir (4.40)) est élargi (fenêtre  $13 \times 13$  pixels). Pour les séquences de type C, on convolue les images avec un noyau gaussien de variance élevée. Cette séquence est ensuite soustraite à la séquence originale (section 4.2.3). Pour toutes ces évaluations, le terme de régularisation temporel est ignoré puisque les séquences générées ne prennent pas en compte la cohérence temporelle (séquences composées de 16 images générées indépendamment les unes des autres). L’étape de seuillage n’est pas celle présentée section 4.2.2. Le seuil  $\zeta^*$  est celui qui vérifie  $PFA = 0,01$ . Les coordonnées des objets détectés sont obtenues en calculant le centre de gravité des différentes composantes connexes de la carte binaire de détection.

### Évaluation des différents détecteurs

Les valeurs de  $PBD^*$  obtenues pour chaque méthode de détection mentionnée dans la section précédente sont reportées dans le tableau 4.2. Les détecteurs OAT, TH et CI sont assez décevants, alors que les détecteurs HD et LoG sont finalement assez satisfaisants. Enfin, les méthodes supervisées AdaB et ADF permettent d’obtenir les meilleurs résultats. Ces méthodes sont en effet les plus élaborées et davantage dédiées aux images traitées (la base d’apprentissage est constituée de spots gaussiens isotropes et anisotropes, présentant les mêmes caractéristiques que les objets simulés). En revanche, si aucune vérité-terrain n’est disponible, ces méthodes ne pourront pas vraiment être utiles. La méthode CACEF obtient de très bons résultats pour les séquences présentant des spots gaussiens isotropes. Seule la méthode ADF la surpasse. Pour les séquences présentant des spots gaussiens anisotropes, les méthodes HD et LoG obtiennent des résultats légèrement supérieurs. Il faut noter que la méthode CACEF n’a pas été développée pour le type de séquences sur lesquelles ces tests sont effectués. Le fait que les images d’une séquence soient générées de manière indépendante ne permet pas la prise en compte du terme de régularisation temporelle. De plus, les trois types de fond utilisés sur ces séquences ne permettent pas de tirer parti du terme prenant en compte l’estimation du fond. Les images de type A et de type B ne sont composées que de vésicules (pas de composante “fond”). La composante “fond” sur les images de type C est constituée de régions constantes qui sont indépendantes d’un instant à l’instant suivant. Par conséquent, le fait d’obtenir de bons résultats sur ce type de séquences d’images est très encourageant, et laisse présager ainsi de très bons résultats sur des séquences d’images où les termes de régularisation

temporelle et de fond seront précieux.

### 4.3 Comparaison des méthodes de séparation des composantes “objet” et “fond”

Dans cette partie, nous comparons quatre méthodes de séparation, certaines d’entre elles étant relativement standard dans la littérature :

- méthode “Hullkground” (Chessel et al. 2009),
- méthode “rolling ball” (Sternberg 1983),
- méthode CACEF,
- méthode OAT (Olivo-Marin 2002) avec Interpolation du Fond (OATIF).

La méthode OAT n’est pas capable de séparer les objets et le fond, et permet seulement de détecter les objets d’intérêt. La composante “fond” peut ensuite être interpolée à partir de la carte de détection. Les régions détectées sont remplacées par des “trous” dans la séquence d’images de départ, puis ces zones manquantes sont interpolées selon le même principe que celui adopté par la méthode CACEF. La composante “objet” résulte de la différence entre la séquence d’images initiale et la composante “fond”.

Nous commençons par évaluer les différentes méthodes de séparation de manière quantitative sur des séquences d’images synthétiques.

#### 4.3.1 Évaluation quantitative des différentes méthodes de séparation

Dans les séquences d’images de microscopie où les protéines Rab6 sont marquées par fluorescence, la séparation des composantes “objet” et “fond” permet d’identifier les composantes cytosolique et membranaire des protéines. L’évaluation des performances des différentes méthodes de séparation n’est pas aisée, car il faut définir des critères objectifs capables à la fois de quantifier une “bonne” localisation des objets d’intérêt, et la reconstruction de la composante “fond”. Notons qu’une séparation manuelle de ces composantes, même si elle est réalisée par des experts-biologistes, n’est pas une tâche aisée. Nous avons donc choisi de comparer dans un premier temps les différentes méthodes sur des séquences synthétiques pour lesquelles les deux composantes sont connues. Pour tenter de comparer au mieux les résultats obtenus, nous proposons à nouveau deux types de scores de performance.

#### Définition des scores d’évaluation

Nous comparons les différentes méthodes de séparation sur la séquence d’images générée et décrite dans la section 4.2.3 (illustrée sur la figure 4.11). La connaissance des composantes ne suffisant pas en soi pour mesurer les performances des différentes méthodes de reconstruction, nous définissons les deux scores suivants :

$$SC_1(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet}) = \frac{\sum_{s \in \mathcal{S}} |\hat{\mathbf{I}}_{objet}(s) - \mathbf{I}_{objet}(s)| 1[\hat{\mathbf{I}}_{objet}(s) > \mathbf{I}_{objet}(s)]}{\sum_{s \in \mathcal{S}} |\hat{\mathbf{I}}_{objet}(s) - \mathbf{I}_{objet}(s)|}, \quad (4.50)$$

$$SC_2(\mathbf{I}_1, \mathbf{I}_2) = \frac{\sum_{s \in \mathcal{S}} \mathbf{I}_1(s) 1[\mathbf{I}_1(s) > \varsigma_1] 1[\mathbf{I}_2(s) > \varsigma_2]}{\sum_{s \in \mathcal{S}} \mathbf{I}_1(s) 1[\mathbf{I}_1(s) > \varsigma_1]}, \quad (4.51)$$

où  $\mathbf{I}_{objet}$  est la composante “objet” simulée,  $\hat{\mathbf{I}}_{objet}$  est la composante “objet” estimée,  $\mathbf{I}_1$  et  $\mathbf{I}_2$  sont deux séquences d’images à comparer et  $\varsigma_1$  et  $\varsigma_2$  sont deux seuils.

Le rapport  $SC_1(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet}) \in [0, 1]$  mesure l’aire positive de la différence  $\hat{\mathbf{I}}_{objet} - \mathbf{I}_{objet}$ . Ce score mesure la sous/sur-estimation de la composante “objet”, c’est-à-dire le fait que l’intensité estimée pour cette composante est inférieure ou supérieure à l’intensité simulée. Une valeur de  $SC_1(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$  élevée (respectivement faible) indique une sur-(respectivement sous-)estimation des composantes.

	$SC_1(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$	$SC_2(\hat{\mathbf{I}}_{objet}, \mathbf{I}_{objet})$	$SC_2(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$	$\frac{SC_2(\hat{\mathbf{I}}_{objet}, \mathbf{I}_{objet}) + SC_2(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})}{2}$
CACEF	<b>0,07</b>	<b>0,9</b>	0,5	<b>0,7</b>
OATIF	0,23	0,51	0,39	0,45
“rolling ball”	0,55	0,41	0,67	0,54
“Hullkground”	0,99	0,03	<b>0,98</b>	0,51

TABLE 4.3: Mesures de comparaison des méthodes de séparation pour la séquence d’images de la figure 4.11.

Le rapport  $SC_2(\mathbf{I}_1, \mathbf{I}_2) \in [0, 1]$  dépend des deux seuils  $\varsigma_1$  et  $\varsigma_2$ . Ce score prend en compte à la fois l’intensité estimée et les régions détectées (grâce aux seuils). Les rapports  $SC_2(\hat{\mathbf{I}}_{objet}, \mathbf{I}_{objet})$  (partie de la composante membranaire estimée dans la vérité-terrain) et  $SC_2(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$  (partie de la vérité-terrain coïncidant avec l’estimée) sont tous les deux calculés. Une estimation parfaite obtient deux scores  $SC_2(\hat{\mathbf{I}}_{objet}, \mathbf{I}_{objet})$  et  $SC_2(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$  très élevés. Par conséquent, la moyenne des deux scores  $SC_2(\hat{\mathbf{I}}_{objet}, \mathbf{I}_{objet})$  et  $SC_2(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$  rend mieux compte de la similarité entre  $\mathbf{I}_{objet}$  et  $\hat{\mathbf{I}}_{objet}$ .

### Évaluation des différentes méthodes de séparation

Les scores définis précédemment pour les quatre méthodes évaluées sur la séquence synthétique de la figure 4.11 sont reportés dans le tableau 4.3. Le résultat de l’estimation de la composante “objet” pour chacune des méthodes est illustré sur la figure 4.15 (c-f). La vérité-terrain pour la composante “objet” est présentée sur la figure 4.15 (b). Notons que les points correspondant à la région de l’appareil de Golgi n’ont pas été pris en compte pour les mêmes raisons que dans la section précédente. Nous fixons  $\varsigma_1 = 2$  et  $\varsigma_2 = 2$ .

Le score  $SC_1(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$  indique une sur-estimation de la méthode “Hullkground”. En effet, sur la figure 4.15 (f), il est clair qu’une grande partie des points étiquetés en rouge ne correspondent à aucune des vésicules présentes dans (b). En revanche, toutes les vésicules sont bien extraites, et aucun point bleu n’est visible dans (f). La faible valeur du rapport  $SC_1(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$  obtenue avec la méthode CACEF traduit clairement une sous-estimation des vésicules, effectivement visible dans l’image (c). Cependant, on constate sur la figure 4.11 que les vésicules sont bien détectées. La faible valeur du rapport  $SC_1(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$  correspond donc à une sous-estimation de l’intensité à l’intérieur des vésicules, mais pas à une non-détection. Par ailleurs, il est important de noter que la sur-estimation avec cette méthode est notable aux endroits vierges de toute vésicule (zones rouges). Elle correspond à une réminiscence de la séparation, à l’instant précédent, puisqu’elles sont localisées dans le voisinage des vésicules. Cet effet est certainement dû au terme  $V_F$  de l’énergie (4.47). Le rapport  $SC_1(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$  obtenu avec la méthode OATIF est plus élevé que celui obtenu avec la méthode CACEF, signifiant une moindre sous-estimation. Or, l’image (c) de la figure 4.15 semble indiquer une sous-estimation voisine pour les deux méthodes. D’autre part, un certain nombre de régions ne coïncidant pas avec des vésicules (en rouge dans (d)) sont détectées avec la méthode OATIF. Ces lieux sur-estimentent et contre-balaçent la sous-estimation ; ils tendent à faire augmenter  $SC_1(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$ . Le rapport  $SC_1(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$  obtenu avec la méthode “rolling ball” est égal à 0,55, signifiant une sous-estimation et une sur-estimation relativement équilibrées ; sur la figure 4.15 (e), les régions rouges et bleues occupent, à peu de choses près, la même surface.

Les scores  $SC_2(\hat{\mathbf{I}}_{objet}, \mathbf{I}_{objet})$  faibles et  $SC_2(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$  forts obtenus avec la méthode “Hullkground” confirment les résultats précédents (score  $SC_1(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$ ), c’est-à-dire une tendance à sur-estimer les objets d’intérêt, mais aussi à exhiber d’autres structures indésirables. Les résultats de la méthode OATIF sont satisfaisants ; un score  $SC_2(\hat{\mathbf{I}}_{objet}, \mathbf{I}_{objet})$  équilibré est obtenu, confirmant qu’un certain nombre de structures appartenant à la composante “fond” sont extraites. Le score  $SC_2(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$

faible obtenu est typique d’une sous-estimation également observée sur la figure 4.15 (c). Le score  $SC_2(\hat{\mathbf{I}}_{objet}, \mathbf{I}_{objet})$  obtenu avec la méthode “rolling ball” est peu élevé, signifiant l’extraction d’un nombre conséquent de structures appartenant à la composante “fond”. Par contre, le score  $SC_2(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$  est relativement élevé, lié au fait que la plupart des vésicules sont bien extraites. Le score  $SC_2(\hat{\mathbf{I}}_{objet}, \mathbf{I}_{objet})$  élevé met en évidence les propriétés de la méthode CACEF qui n’extrait pas de structure indésirable. En revanche, le score  $SC_2(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$  est peu élevé ; cela s’explique par le fait que l’intensité estimée pour les objets extraits est inférieure à l’intensité réelle de ces objets, ce qui est assez cohérent avec la valeur neutre du score  $SC_1(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$ . Tous ces chiffres soulèvent par ailleurs une autre question récurrente en détection : peut-on fiablement délimiter les contours d’une vésicule ? Supposons que les vésicules suivent un profil gaussien (ce qui est faux en pratique), le signal traduit-il la présence d’un objet lorsque l’intensité est supérieure à la moitié de la moyenne ? au tiers ? Ces interrogations mettent en évidence la difficulté d’interpréter un rapport  $SC_2(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$  faible. Il est important de noter que la méthode CACEF présente les meilleurs résultats pour le score moyen des deux scores  $SC_2(\hat{\mathbf{I}}_{objet}, \mathbf{I}_{objet})$  et  $SC_2(\mathbf{I}_{objet}, \hat{\mathbf{I}}_{objet})$ .

### 4.3.2 Évaluation qualitative des différentes méthodes de séparation

Les figures 4.16 et 4.17 présentent les composantes “objet” et “fond” obtenues avec les différentes méthodes de séparation calculées pour l’image n°100 de la séquence 4.12.

L’appareil de Golgi est extrait de manière satisfaisante avec la méthode CACEF, mais pas avec les autres méthodes mises en compétition. Cette remarque rejoint celles évoquées dans la section 4.2.3. Par ailleurs, les vésicules ne sont pas toutes extraites avec la méthode OATIF, contrairement aux autres approches. De plus, comme il en a été question dans la section 4.2.3, la méthode OATIF est sensible aux effets de “vacillement” lors de la séparation : des vésicules apparaissent et disparaissent sur des images consécutives de la séquence. Si les méthodes “rolling ball” et “Hullkground” identifient correctement les vésicules, elles segmentent aussi un grand nombre de structures non souhaitées. La méthode “rolling ball” isole les *maxima* d’intensité dans un voisinage local égal à la surface projetée de la boule qui sert d’élément structurant. Par conséquent, d’autres objets tels que les structures tubulaires présentes dans la composante “fond”, sont aussi segmentés. La méthode “Hullkground” analyse les signaux temporels indépendants. En reconstruisant l’enveloppe convexe du signal, l’algorithme identifie la composante qui décroît au cours du temps, typique du phénomène de photoblanchiment. Clairement, la composante “objet” calculée sur la base de cette enveloppe convexe récupère toutes les perturbations observées au cours du temps. Finalement, la méthode “Hullkground” revient à extraire une composante immobile (enveloppe convexe du signal) pour la composante “fond” et une enveloppe mobile pour la composante “objet”. En plus des vésicules, d’autres structures se déplacent au cours du temps. Il serait donc surprenant d’identifier uniquement des vésicules dans la composante “objet”. Notons que la méthode CACEF n’extrait que les objets d’intérêt.

La composante “fond” obtenue avec la méthode CACEF est très uniforme dans la région de l’appareil de Golgi. Cette région étant relativement grande, le processus d’interpolation ne peut conduire qu’à de mauvais résultats. Cependant, sur le reste de l’image, l’impression visuelle est assez bonne, surtout comparée à la composante “fond” obtenue avec la méthode OATIF qui repose également sur un processus d’interpolation. Avec la méthode OATIF, un grand nombre de vésicules (entières ou partielles) sont présentes dans la composante “fond”, du fait de la petite taille des régions détectées par rapport à la taille des vésicules ou tout simplement de leur non détection. Ce n’est pas le cas sur la composante “fond” extraite avec la méthode “rolling ball”, mais le résultat n’est pas non plus satisfaisant ; l’élément structurant semble flouter localement l’image. La composante “fond” obtenue avec la méthode “Hullkground” est la plus satisfaisante visuellement ; il n’y a aucune vésicule détectée. Cette impression visuelle s’explique par le fait que toutes les structures mobiles sont récupérées par la composante “objet”.

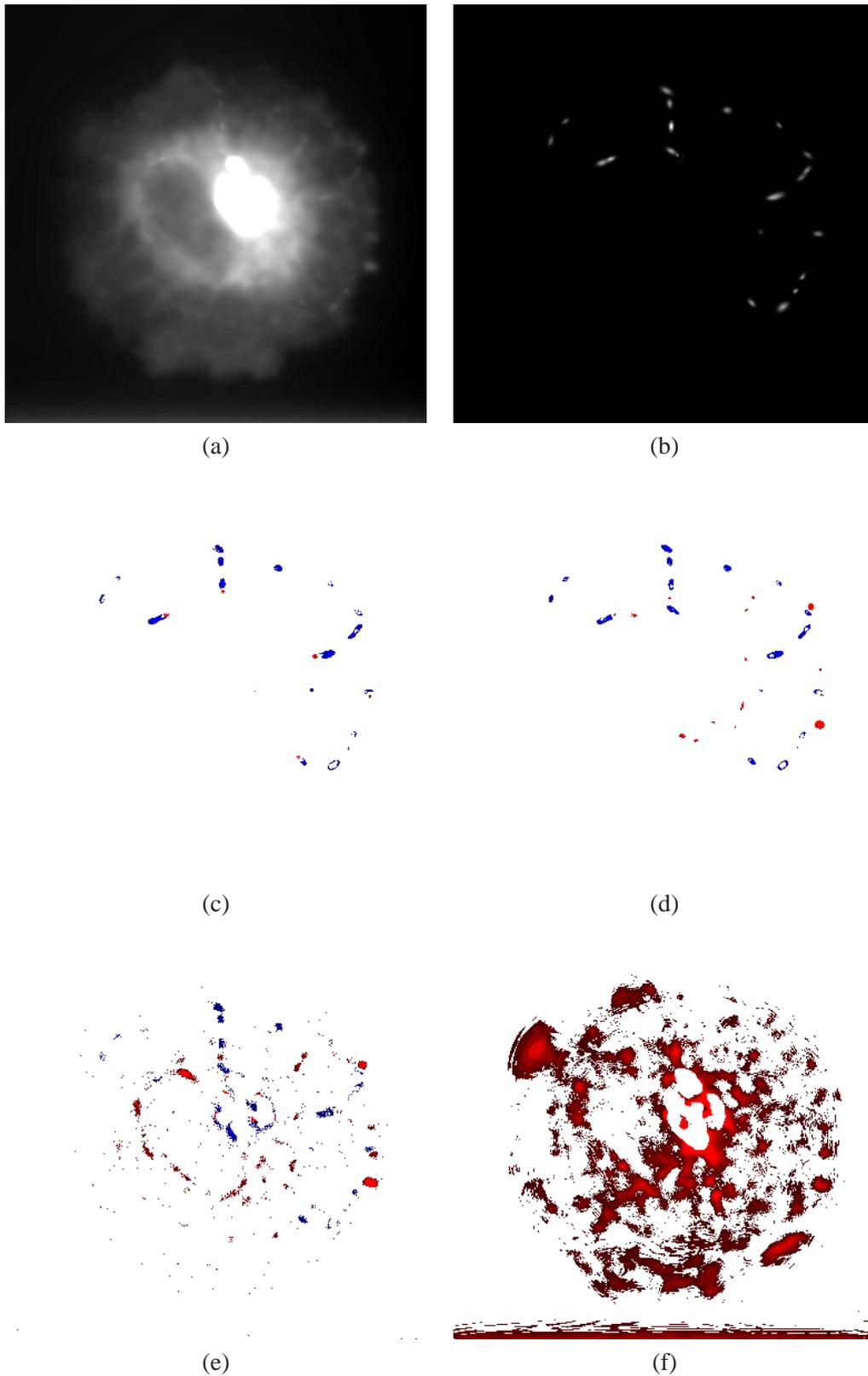


FIGURE 4.15: (a) Image n° 50 extraite de la séquence d'images synthétique de la figure 4.11 (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation); (b) composante vésiculaire de l'image (a); (c-f) différence d'intensité observée entre la vérité-terrain et les résultats obtenus avec les méthodes CACEF (c), OATIF (d), "rolling ball" (e) et "Hullkground" (f) pour la composante "objet", sans prendre en compte la région de l'appareil de Golgi sur l'image (a). Les résultats en rouge correspondent à une sur-estimation tandis que ceux en bleu correspondent à une sous-estimation.

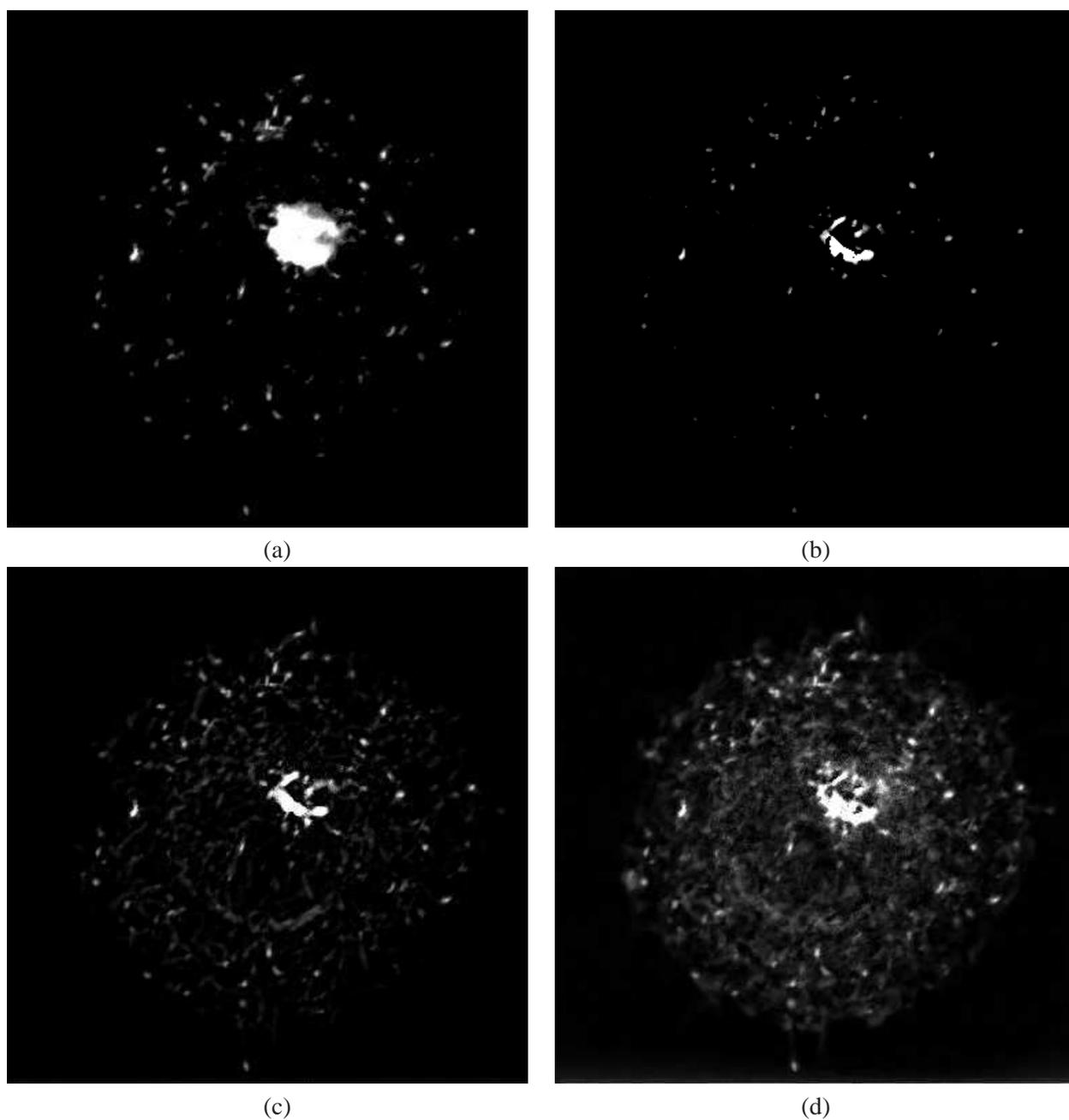


FIGURE 4.16: Comparaison des résultats obtenus pour l'estimation de la composante "objet" avec les méthodes CACEF (a), OATIF (b), "rolling ball" (c) et "Hullkground" (d) sur l'image n° 100 de la séquence d'images présentée sur la figure 4.12 (une correction gamma est appliquée sur les images (a), (c) et (d) pour une meilleure visualisation).

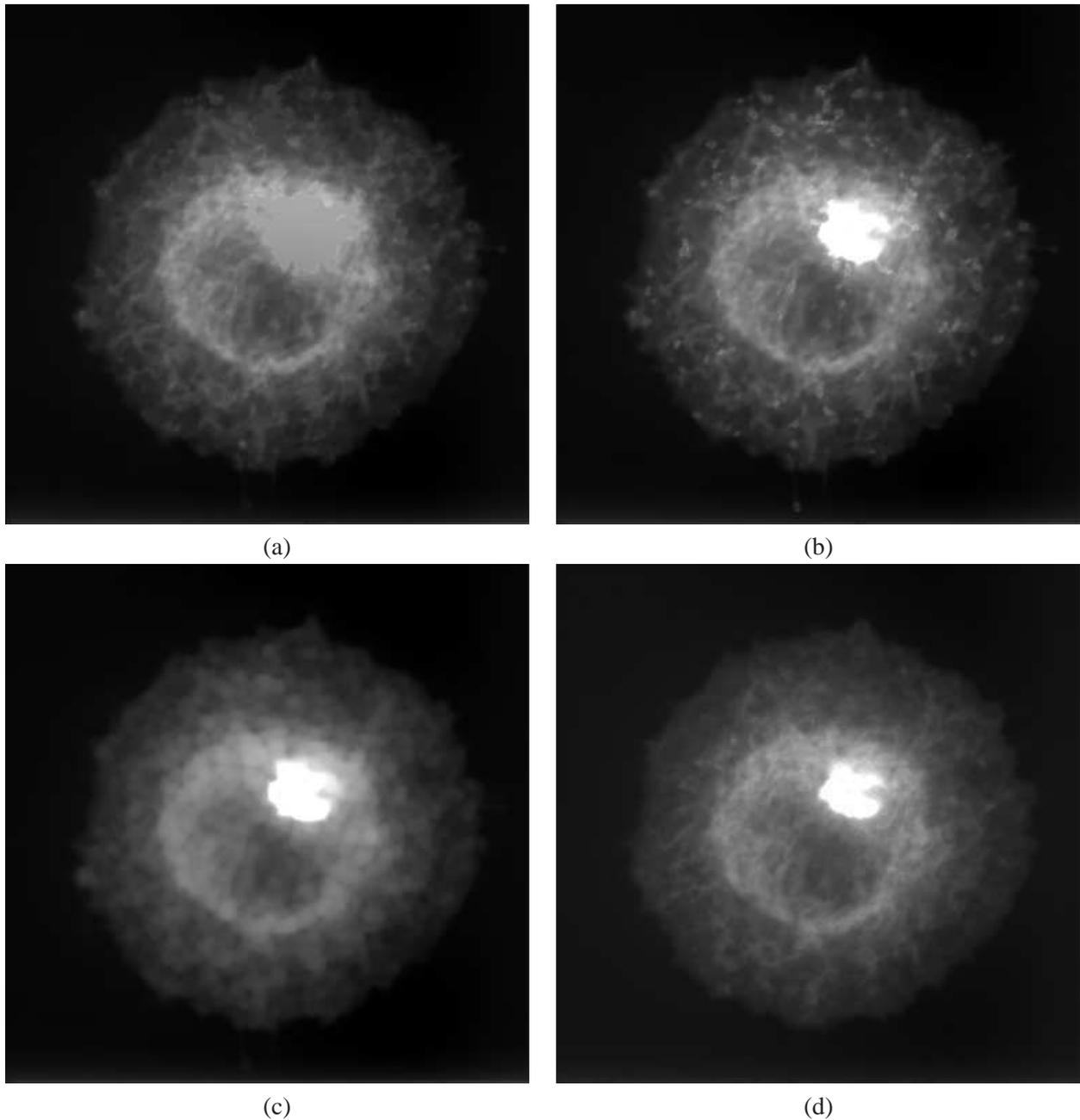


FIGURE 4.17: Comparaison des résultats obtenus pour l'estimation de la composante "fond" avec les méthodes CACEF (a), OATIF (b), "rolling ball" (c) et "Hullkground" (d) sur l'image n° 100 de la séquence d'images présentée sur la figure 4.12 (une correction gamma est appliquée sur les images (a), (c) et (d) pour une meilleure visualisation).

### 4.3.3 Synthèse

La méthode “Hullkground” n’est sans doute pas très appropriée pour analyser des séquences d’images de protéines Rab6. Cependant, sa capacité à séparer ce qui est mobile de ce qui ne l’est pas peut s’avérer très intéressante dans de nombreuses applications biologiques. Pour le suivi de microtubules, cette méthode permet ainsi de localiser les extrémités des microtubules en déplacement, et de colocaliser la protéine CLIP170. Cette méthode a le bon goût d’être non paramétrique et rapide lors de l’exécution, ce qui facilite son usage par les biologistes.

La méthode “rolling ball” permet d’obtenir rapidement une composante “objet” facile à interpréter. Cet algorithme facilite la “lecture” rapide juste après l’acquisition d’une séquence d’images. En revanche, il n’est pas assez précis pour analyser quantitativement les vésicules. Il ne fait intervenir qu’un seul paramètre (rayon de la boule utilisée comme “élément structurant”).

La méthode OATIF est une méthode relativement rapide, donnant de bons résultats en détection, mais n’est pas réellement adaptée à la séparation des composantes “objet” et “fond”. Son principal inconvénient est l’effet de “vacillement” lié au traitement indépendant de chaque image. Il faut choisir les plans d’ondelettes et fixer un seuil pour chaque image.

Enfin, la méthode CACEF est la méthode qui donne les résultats les plus satisfaisants. Elle est capable d’isoler les vésicules sans détecter d’autres structures. La composante “fond” n’est pas parfaite (surtout dans la région de l’appareil de Golgi) mais permet d’analyser le cytosol. Bien que les paramètres préconisés par cette méthode ( $\beta$ ,  $\alpha_S$  et  $\alpha_T$ ) soient peu intuitifs, ils demeurent stables pour le type d’acquisition que nous avons envisagé. Les temps d’exécution sont plus longs à cause de l’interpolation des zones manquantes, mais ils restent raisonnables (4sec par image pour la séquence de la figure 4.12 avec un processeur 2.66GHz). Le temps d’exécution dépend évidemment de l’aire des zones manquantes.

## 4.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons abordé les questions de détection et de séparation des composantes “objet” et “fond” dans des séquences d’images de vidéo-microscopie. Les méthodes existantes sont déjà nombreuses mais n’offrent pas toujours les performances escomptées dès qu’on s’intéresse à un problème ciblé. Dans notre cas, nous nous sommes intéressés à la protéine Rab6 existant sous les formes membranaire et cytosolique.

Nous avons proposé une méthode de détection utilisant le formalisme des champs aléatoires conditionnels et des champs markoviens. Dans ce contexte, nous avons défini une nouvelle mesure de contraste qui nécessite la comparaison de motifs voisins dans une image. Cette mesure de contraste est moins locale que celles exploitant la comparaison d’intensité entre pixels voisins et permet de mieux discriminer les structures intéressantes dans une image de vidéo-microscopie. Afin d’améliorer la détection, nous avons proposé d’estimer conjointement la composante “fond” et la composante “objet” en révisant l’énergie globale.

Enfin, nous avons comparé les résultats obtenus avec d’autres méthodes existantes, soit en détection, soit pour séparer les composantes “objet” et “fond”. Ces comparaisons ont permis de mettre en évidence de meilleures performances pour notre méthode sur les séquences d’images de vidéo-microscopie présentant des protéines Rab6. Par la suite, nous utilisons cette méthode afin de séparer les composantes “objet” et “fond” pour estimer le trafic par tomographie de réseaux.

Une limite de notre méthode est le manque d’automatisation pour fixer les paramètres équilibrant les termes de la fonctionnelle globale d’énergie. L’apprentissage de ces paramètres sur des séquences d’images réelles n’est pas envisageable pour l’instant, principalement en raison de la difficulté et du temps nécessaire à l’élaboration d’une vérité-terrain. En revanche, il serait très intéressant par la suite de générer des séquences d’images selon le procédé exposé au chapitre 3, surtout si les simulations miment

convenablement les séquences réelles. Pour cela, il faudrait ajouter des structures dans la composante "fond" semblables à celles que nous observons dans les séquences réelles.

---

## Analyse du trafic intracellulaire par tomographie de réseaux

---

Il est devenu essentiel de caractériser les relations spatiales et temporelles liées aux mécanismes responsables des dynamiques observées en biologie cellulaire. À cet égard, les méthodes de suivi en analyse d'images sont devenues indispensables en biologie cellulaire. Elles ont pour objectif de reconstruire les trajectoires individuelles des objets d'intérêt. La majorité des méthodes de suivi sont dites *connexionnistes* (Thomann et al. 2003, Sbalzarini & Koumoutsakos 2005, Genovesio et al. 2006, Jaqaman et al. 2008, Chenouard et al. 2009) : dans une première étape, les objets sont isolés (détection) et indexés par des attributs morphométriques ; dans une seconde étape, dite de mise en correspondance, les objets détectés dans deux images consécutives sont associés afin d'établir un élément de la trajectoire complète des objets dans la séquence d'images. Cette seconde étape est critique, surtout quand de nombreux objets sont en mouvement simultanément. Bien souvent, les trajectoires se croisent et/ou les objets fusionnent/se séparent, mettant à mal les approches de suivi dans les séquences d'images de microscopie (e.g. les protéines Rab6). Selon une autre philosophie, les méthodes de filtrage temporel stochastique (Smal, Meijering, Draegestein, Galjart, Grigoriev, Akhmanova, van Royen, Houtsmuller & Niessen 2008) estiment les trajectoires progressivement (les étapes de détection et de mise en correspondance sont effectuées conjointement). Ces méthodes, bien établies sur le plan théorique, rencontrent néanmoins des difficultés lorsque le nombre d'objets augmente et/ou que les objets sont trop proches les uns des autres, une situation très fréquente en imagerie intracellulaire. Une autre approche décrite dans (Racine, Saschse, Salamero, Fraissier, Trubuil & Sibarita 2007) exploite le fait que les vésicules se déplacent sur le réseau de microtubules et suivent par conséquent les mêmes chemins. Ces chemins sont calculés à partir de la carte de projection maximale de l'intensité selon l'axe temporel. L'analyse du profil d'intensité au cours du temps est obtenue par l'intermédiaire de kymogrammes. Le principal inconvénient de cette méthode est qu'elle ne peut suivre qu'un nombre restreint de vésicules. Les trois approches que nous venons d'évoquer visent à suivre individuellement des vésicules. Cependant, l'information individuelle n'est pas toujours souhaitée ou nécessaire, et l'estimation globale du trafic, c'est-à-dire l'analyse statistique globale des trajectoires des objets s'avère, dans de nombreux cas, tout à fait suffisante. C'est justement l'idée de la tomographie de réseaux (Vardi 1996) qui estime à partir de comptages locaux les trajectoires globales de paquets de données sur des réseaux de télécommunications. Une présentation de cette méthode est proposée à la section 2.2. Avant de discuter des adaptations à réaliser afin d'exploiter cette approche pour l'estimation du trafic vésiculaire, nous commençons par exposer un rappel de cette méthode.

## 5.1 Présentation générale de l'estimation du trafic par tomographie de réseaux

Le support du trafic est décrit par un graphe  $\mathcal{G}_{trafic} = (\mathcal{E}, \mathcal{V})$  composé de  $n$  sommets et de  $r$  arêtes, où  $\mathcal{E}$  représente l'ensemble des sommets et  $\mathcal{V}$  l'ensemble des arêtes. Dans cette modélisation graphique, les mesures correspondent au nombre d'objets qui franchissent chaque arête du graphe. Sur la base de ces mesures, le but est d'estimer combien d'objets transitent depuis un sommet *origine* vers un sommet *destination*.

**Définition 5.1.** On appelle *paire origine-destination* une paire de sommets extraits de  $\mathcal{V}$  qui caractérise la trajectoire d'une vésicule par son sommet origine et son sommet destination sur le graphe  $\mathcal{G}_{trafic}$ .

Le nombre total de paires origine-destination sur un graphe est égal au nombre de sommets pris deux à deux, c'est-à-dire  $c = n(n-1)$ . Soit  $v_{t,j}^{OD} \in \mathbb{R}_+$ ,  $j = \{1, \dots, c\}$  le nombre de vésicules transmises sur la paire origine-destination  $j$  à l'instant  $t$ . Les mesures  $y_{t,e}^{arête} \in \mathbb{N}$ ,  $e = \{1, \dots, r\}$  représentent le nombre de vésicules qui franchissent chaque arête du graphe à l'instant  $t$ . La tomographie de réseaux nécessite la définition d'une matrice de routage  $\mathbf{A} \in \mathbb{R}^r \times \{1, \dots, c\}$  de dimension  $r \times c$  qui recense les arêtes empruntées par les objets pour chaque paire OD. Si on reprend le modèle de tomographie de réseaux, on a :

$$\mathbf{Y}^{arête} = \mathbf{A}\mathbf{V}^{OD}, \quad (5.1)$$

où  $\mathbf{V}^{OD}$  est une matrice de dimension  $c \times T$ ,  $\mathbf{Y}^{arête}$  est une matrice de dimension  $r \times T$  et  $T$  est égal au nombre total d'images dans la séquence. Le système d'équations (5.1) décrit donc le trafic observé à un instant donné. Cependant, le parcours d'une vésicule n'est pas instantané. Pour y remédier, nous considérons la séquence entière d'images et nous proposons le modèle de trafic :

$$\mathbf{y}^{arête} = \mathbf{A}\mathbf{v}^{OD}, \quad (5.2)$$

où  $\mathbf{y}^{arête} \in \mathbb{R}^r$  désigne le nombre moyen de vésicules transitant sur chaque arête du graphe au cours du temps :

$$y_e^{arête} = \frac{1}{T} \sum_{k=1}^T y_{k,e}^{arête}, \quad \forall e \in \{1, \dots, r\}. \quad (5.3)$$

Pour adapter cette approche, il faut définir un graphe qui soit le support du trafic, estimer ensuite le nombre de vésicules qui franchissent chacune des arêtes du graphe, définir une matrice de routage et enfin estimer  $\mathbf{v}^{OD} \in \mathbb{R}^c$  à partir de l'équation (5.3). À la fin des années 1990, en vidéo-surveillance, Boyd et al. (1999) ont proposé de partitionner l'image en cellules de Voronoï et d'attribuer un sommet à chaque région de la partition et une arête à chaque frontière entre deux régions. Dans cette étude, le partitionnement est assez arbitraire. Il nous paraît plus intéressant de prendre en compte l'activité observée dans la séquence d'images afin de le déterminer. L'extraction préalable des zones origine et destination présente un intérêt indéniable pour partitionner l'image. Dans un second temps, compter les vésicules transitant d'un sommet à un sommet voisin est équivalent à estimer le nombre de vésicules qui franchissent les frontières de la partition. La méthode la plus directe consiste à détecter les vésicules et à les suivre au niveau des frontières. Celles qui changent de région entre deux instants consécutifs permettront d'établir les données  $\mathbf{y}^{arête}$ . Enfin, la matrice de routage doit être établie. Le plus simple est de ne considérer que les chemins les plus courts joignant une origine à une destination. Dans ce cas, la matrice de routage est binaire. Seulement, il est peu probable que les vésicules empruntent un seul chemin pour aller de leur origine à leur destination. Il s'avère vite nécessaire d'envisager un routage multiple pour chaque paire OD. Ce routage peut dépendre de la topologie du partitionnement, des chemins les plus empruntés ou directement du trafic observé.

Dans ce chapitre, nous commençons par présenter une méthode de détection des zones de stockage, permettant de spécifier de manière automatique les zones origine et destination des vésicules. Ensuite, nous proposons de partitionner l'image afin d'établir le graphe  $\mathcal{G}_{trafic}$ , que les cellules soient contraintes par un *micro-patron* (They et al. 2005), ou qu'elles soient de forme quelconque. Puis nous exposons une méthode d'estimation du nombre de vésicules se déplaçant d'une région à une autre en exploitant une méthode de comptage des vésicules mené au niveau des frontières. Nous proposons également plusieurs méthodes pour identifier les matrices de routage, binaires ou non, contraintes par la topologie du réseau, la liste des chemins pour lesquels le trafic est le plus dense ou par le trafic observé au niveau des frontières. Enfin, nous estimons le trafic sur les paires OD et nous évaluons toutes les étapes de cette approche sur des séquences d'images synthétiques et réelles.

## 5.2 Détection des zones origine-destination

L'estimation du trafic intracellulaire par tomographie de réseaux nécessite la définition d'un graphe qui résulte du partitionnement de la cellule. Si toutes les cellules présentent la même forme (cellules contraintes par un *micro-patron*), alors une seule partition est utilisée pour chacune d'entre elles. Cela facilite la comparaison du trafic intracellulaire estimé potentiellement pour différentes cellules. En revanche, si les cellules sont de forme quelconque (figure 5.1 (a)), il faut à chaque fois définir une partition adaptée à la cellule. Dans le contexte biologique où nous nous plaçons, les protéines Rab6 se déplacent de l'appareil de Golgi vers la périphérie de la cellule, en des lieux précis qui semblent correspondre aux points d'entrée du Reticulum Endoplasmique. Avant d'atteindre ces points d'entrée, les protéines connaissent généralement une phase appelée *pseudo-stable* durant laquelle elles sont stockées (section 3.1.4). Ces zones de stockage sont localisées à proximité des destinations finales des protéines. Si nous arrivons à les repérer, elles seront donc pertinentes pour construire une partition de l'image. Notons qu'un nombre important de protéines sont ancrées à l'appareil de Golgi ; il s'agit donc aussi d'une aire de stockage. En définitive, la détection des zones de stockage dans une séquence d'images doit nous aider à préciser les régions origine et destination des protéines Rab6 dans la cellule.

### 5.2.1 Détection des zones de stockage

**Définition 5.2.** On appelle zone de stockage un lieu d'accumulation de la fluorescence.

Comme nous l'avons remarqué et exploité dans la section 4.2.2, les vésicules présentent de fortes variations d'intensité. L'accumulation de vésicules se traduit *a fortiori* par une forte inhomogénéité dans l'image. La mesure la plus utilisée en analyse d'images pour mesurer l'inhomogénéité est le module du gradient spatial (figure 5.1 (b)). Mais comme nous l'avons vu dans la section 4.2.2, la mesure exploitant les motifs voisins (voir(4.40) et notée désormais  $\Phi_t$  (figure 5.1 (c)) s'avère plus efficace dans notre cas. Par seuillage, les régions inhomogènes sont extraites à chaque instant. Les zones de stockage présentent aussi un niveau d'intensité et des variations d'intensité plus significatives que celles liées à la présence de vésicules ; elles coïncident avec les valeurs de  $\Phi_t$  les plus élevées et situées dans la queue de la distribution de  $\Phi_t$ . Les vésicules sont identifiées par des valeurs de  $\Phi_t$  plus faibles mais non nulles. Le seuil global permettant de détecter les lieux d'inhomogénéité typiques des zones de stockage est par conséquent plus élevé que celui utilisé pour détecter les vésicules dans la section 4.2.2. Il est donc nécessaire de réviser la méthode d'estimation du seuil et proposée dans le chapitre précédent. Dans un second temps, les différentes cartes binaires obtenues après seuillage de chaque image 2D de la séquence sont cumulées pour mettre davantage en évidence les zones de stockage. L'accumulation de fluorescence est un phénomène temporel caractérisé par une certaine stabilité des zones de stockage pendant plusieurs instants consécutifs. Cette stabilité temporelle offre ainsi un deuxième critère pour détecter les régions

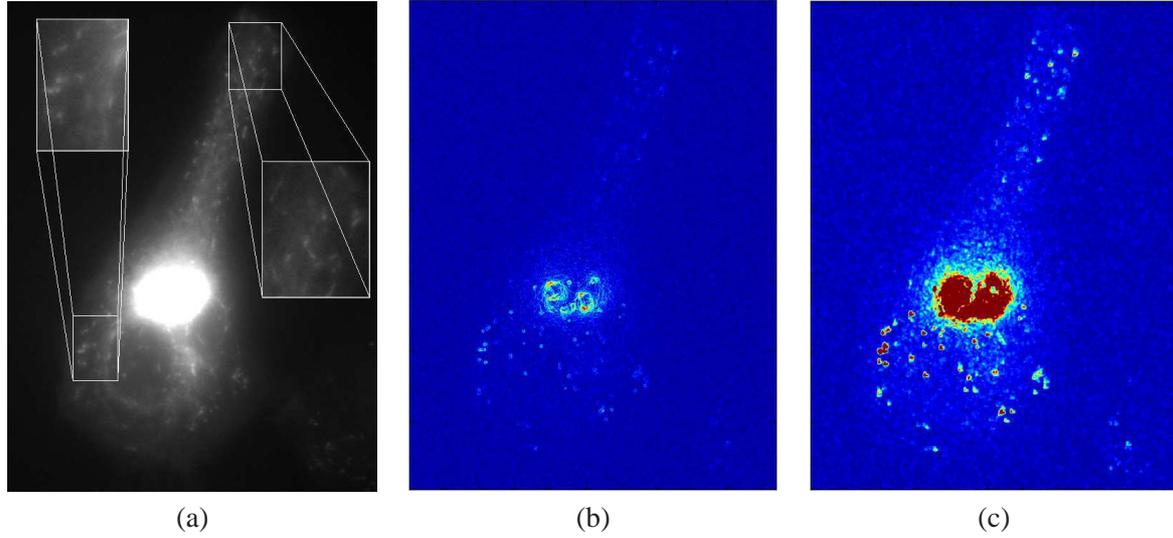


FIGURE 5.1: (a) Image de microscopie de fluorescence où les protéines Rab6 sont marquées par la GFP (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation et deux régions sont zoomées); (b) amplitude du gradient spatial calculée sur l'image (a); (c) mesure  $\Phi$  calculée sur l'image (a) (dans les images (b-c), les régions bleues correspondent à de faibles valeurs tandis que les régions rouges correspondent à de fortes valeurs).

souhaitées.

### Seuillage de la mesure de contraste

À partir des interactions non locales, la mesure de contraste décrite dans la section 4.2.2 est définie au pixel  $s$  et à l'instant  $t$  comme suit :

$$\Phi_t(s) = \sum_{r \in \mathcal{N}_s} \left( (N_z - 2) \log(\|\mathbf{z}_t(s) - \mathbf{z}_t(r)\|) - \frac{\|\mathbf{z}_t(s) - \mathbf{z}_t(r)\|^2}{4\sigma_\xi^2} \right), \quad (5.4)$$

où  $\sigma_\xi^2 \in \mathbb{R}$  est la variance du bruit dans l'image. En présence de fortes inhomogénéités induites par le stockage de plusieurs vésicules, la mesure  $\Phi_t(s) \in \mathbb{R}$  est élevée au site  $s$ . Afin de détecter ces pixels, nous proposons de définir un seuil automatique à partir de la loi empirique des contrastes mesurés en chaque site de l'image  $\Phi_t$ . On considère le modèle de mélange suivant :

$$P(\Phi_t(s)) = 1[\Phi_t(s) < \Phi_0] P_0(\Phi_t(s)) + (1 - 1[\Phi_t(s) < \Phi_0]) P_1(\Phi_t(s)), \quad (5.5)$$

où  $P_0(\cdot)$  et  $P_1(\cdot)$  sont deux densités de probabilité à définir. Un choix satisfaisant en pratique pour approcher la loi empirique est de considérer une fonction de Dirac centrée en 0 ( $\Phi_0 = 0^+$ ) pour représenter  $P_0(\cdot)$  puisque le potentiel  $\Phi_t$  est relativement faible sur le support de l'image. Pour modéliser la loi des contrastes significatifs mais en faible nombre, nous optons pour une loi de Pareto :

$$P_1(\Phi_t(s)) = \frac{\kappa_t (\Phi_0)^{\kappa_t}}{(\Phi_t(s))^{\kappa_t+1}}, \quad \forall \Phi_t(s) \geq \Phi_0 \quad (5.6)$$

qui dépend du paramètre  $\kappa_t \in \mathbb{R}$  et de  $\Phi_0 > 0$  supposé constant  $\forall t \in \{1, \dots, T\}$ . L'estimation au sens du maximum de vraisemblance de  $\kappa_t$  est simplement obtenue :

$$\hat{\kappa}_t = N_{\Phi_0} \left( \sum_{s \in \mathcal{S} : \Phi_t(s) \geq \Phi_0} \log(\Phi_t(s)) - \log(\Phi_0) \right)^{-1}, \quad (5.7)$$

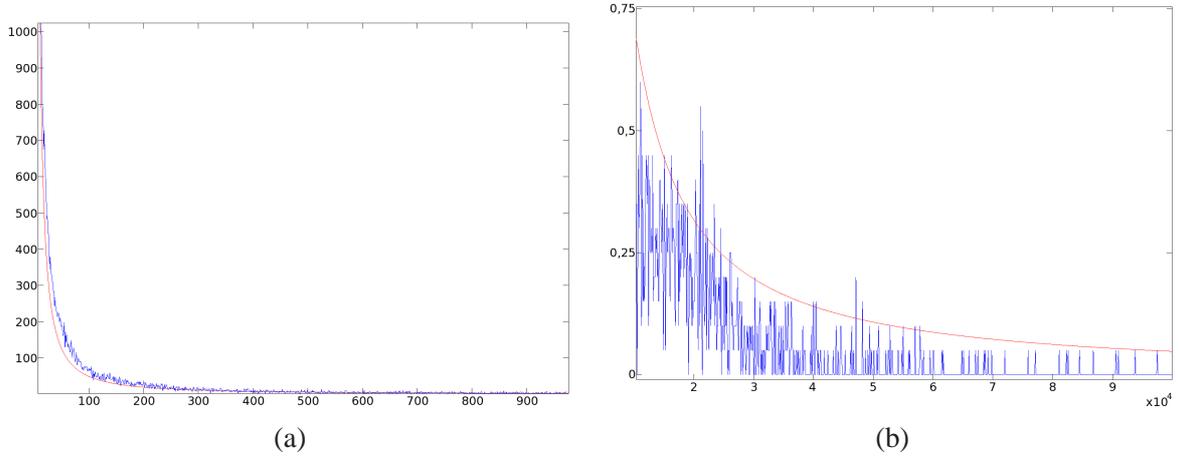


FIGURE 5.2: Approximation de la mesure  $\Phi_t$  (courbe bleue) par le mélange des distributions  $P_0(\cdot)$  et  $P_1(\cdot)$  (courbe rouge) pour l'image présentée sur la figure 5.1. (a) Tête de la distribution ; (b) queue de la distribution.

où  $N_{\Phi_0} = \#\{s \in \mathcal{S} : \Phi_t(s) \geq \Phi_0\}$ . La modélisation choisie donne de bons résultats en pratique comme l'atteste la figure 5.2, surtout si on s'intéresse à la queue de la distribution. De plus, la probabilité de fausse alarme associée à une distribution de Pareto est explicite :

$$\mathbb{P}(\Phi_t(s) \geq \tau_t^{OD}) = \left( \frac{\tau_t^{OD}}{\Phi_0} \right)^{-\kappa_t}. \quad (5.8)$$

Pour une probabilité de fausse alarme donnée  $P(\Phi_t(s) \geq \tau_t^{OD})$  et choisie par l'utilisateur, il est possible d'estimer le seuil correspondant  $\tau_t^{OD}$  :

$$\hat{\tau}_t^{OD} = \exp \left( \log(\Phi_0) - \frac{\log(\mathbb{P}(\Phi_t(s) \geq \tau_t^{OD}))}{\hat{\kappa}_t} \right), \quad (5.9)$$

où  $\hat{\tau}_t^{OD} \in \mathbb{R}$  désigne le seuil permettant de localiser les origines et les destinations à l'instant  $t$ . En pratique,  $\hat{\kappa}_t$  est d'abord estimé par maximum de vraisemblance. Pour une probabilité de fausse alarme donnée  $P(\Phi_t(s) \geq \tau_t^{OD})$ , le seuil  $\hat{\tau}_t^{OD}$  est ensuite estimé pour chaque image de la séquence.

### Carte de cumul des détections

L'estimation d'un seuil  $\hat{\tau}_t^{OD}$  à chaque instant  $t$  de la séquence d'images permet d'obtenir une carte binaire pour chaque image. Le cumul des cartes binaires produit une nouvelle carte spatio-temporelle telle que présentée sur la figure 5.3 (c). On sait par ailleurs que les vésicules qui sont dans un état *pseudo-stable* demeurent stockées au même endroit pendant un laps de temps assez court. La détection peut donc être améliorée potentiellement en ne considérant que les zones détectées pendant plusieurs instants consécutifs. Soit  $b_t^{OD}(s)$  la carte binaire définie au point  $s$  et à l'instant  $t$  :

$$b_t^{OD}(s) = \begin{cases} 1, & \text{si } \Phi_t(s) > \hat{\tau}_t^{OD}, \\ 0, & \text{sinon.} \end{cases} \quad (5.10)$$

Le nombre de détections au point  $s$  est défini comme :

$$b^{OD}(s) = \sum_{t=1}^T b_t^{OD}(s). \quad (5.11)$$

La carte de cumul des détections consécutives au point  $s$  s'écrit comme :

$$\tilde{b}^{od}(s) = \sum_{t=t_0}^T 1 \left[ \sum_{k=t-t_0}^t b_{t-k}^{od}(s) = t_0 \right], \quad (5.12)$$

où  $t_0$  désigne le temps de séjour nécessaire pour distinguer un lieu qui coïncide avec un état "pseudo-stable" et un lieu de stockage temporaire. La carte des détections cumulées calculée sur la séquence de la figure 5.1 avec une probabilité de fausse alarme égale à 0,17 est présentée sur la figure 5.3 (c), tandis que la carte de cumul des détections consécutives calculée sur la même séquence, avec la même probabilité de fausse alarme et un intervalle  $t_0 = 5$ , est présentée sur la figure 5.3 (d). Le fait de ne prendre en compte que des détections consécutives permet d'éliminer un certain nombre des zones intermédiaires qui ne correspondent pas à des zones de stockage, mais plutôt au passage de vésicules (par exemple entre l'appareil de Golgi et le haut de la cellule). Ceci donne lieu à une hiérarchisation des régions de stockage. En effet, entre les cartes (c) et (d), certains lieux sont caractérisés par des niveaux de détection cumulée comparables (région en haut de la cellule, région en bas à droite de la cellule, appareil de Golgi), alors que d'autres zones sont caractérisées par des niveaux de détection plus faibles (région à mi-chemin entre l'appareil de Golgi et le haut de la cellule, région juste en-dessous de l'appareil de Golgi), ce qui permet d'établir une hiérarchie entre ces régions détectées.

### 5.2.2 Évaluation des méthodes de détection des zones de stockage

Nous proposons de comparer les résultats obtenus par trois méthodes différentes pour extraire les régions de stockage sur la séquence d'images présentée sur la figure 5.1 (a). Cette séquence est constituée de 121 images de microscopie de fluorescence acquises avec un microscope à champ large (les protéines Rab6 sont marquées par la GFP). Cette séquence est d'abord restaurée puis convertie en une séquence 2D+T en moyennant l'intensité le long de l'axe du microscope. Les images sont codées sur 2 octets et la taille du voxel est égale à  $160 \times 160 \times 300 \text{ nm}^3$ . L'échantillonnage temporel est égal à 1 image/sec. Les trois méthodes évaluées sont illustrées par la carte de projection maximale de l'intensité, la carte de cumul de l'amplitude seuillée du gradient spatial (seuillage manuel) et la carte de cumul des détections consécutives (probabilité de fausse alarme égale à 0,17 et  $t_0 = 5$ ).

La carte de Projection d'Intensité Maximale (PIM) est un outil couramment utilisé par les biologistes et est définie au pixel  $s$  sur l'image  $I_t$  comme :

$$\text{pim}(I_t)(s) = \max_{t \in \{1, \dots, T\}} I_t(s). \quad (5.13)$$

Sur la figure 5.3 (a), l'appareil de Golgi (au centre de la cellule) ainsi que des points d'entrée potentiels dans le reticulum endoplasmique (en particulier en bas à gauche de la cellule) sont relativement contrastés par rapport au fond. Cependant, de nombreuses courbes partant de l'appareil de Golgi sont tout aussi bien contrastées, alors qu'elles ne coïncident pas avec des lieux de stockage. Sur la carte PIM, les points situés sur la trajectoire d'une ou de plusieurs vésicules présentent une valeur élevée, tout comme les points situés dans des zones de stockage. Malheureusement, la carte PIM ne permet pas de distinguer les deux situations. La carte PIM semble donc davantage appropriée pour extraire les lieux de passage des vésicules menant à un sous-ensemble du réseau de microtubules. Les extrémités des courbes observées sur la carte PIM coïncident avec la localisation d'une partie des zones de stockage. Ces lieux correspondent en effet aux destinations d'une partie des vésicules. En revanche, la carte PIM ne permet pas de localiser les zones de stockage intermédiaires.

La carte de cumul obtenue après seuillage de l'amplitude du gradient spatial permet d'isoler quelques zones d'intérêt dans la cellule (figure 5.3 (b)). Les zones détectées sont localisées pour la plupart entre l'appareil de Golgi et l'extrémité de la cellule. Or, elles sont sensées être positionnées en majorité à

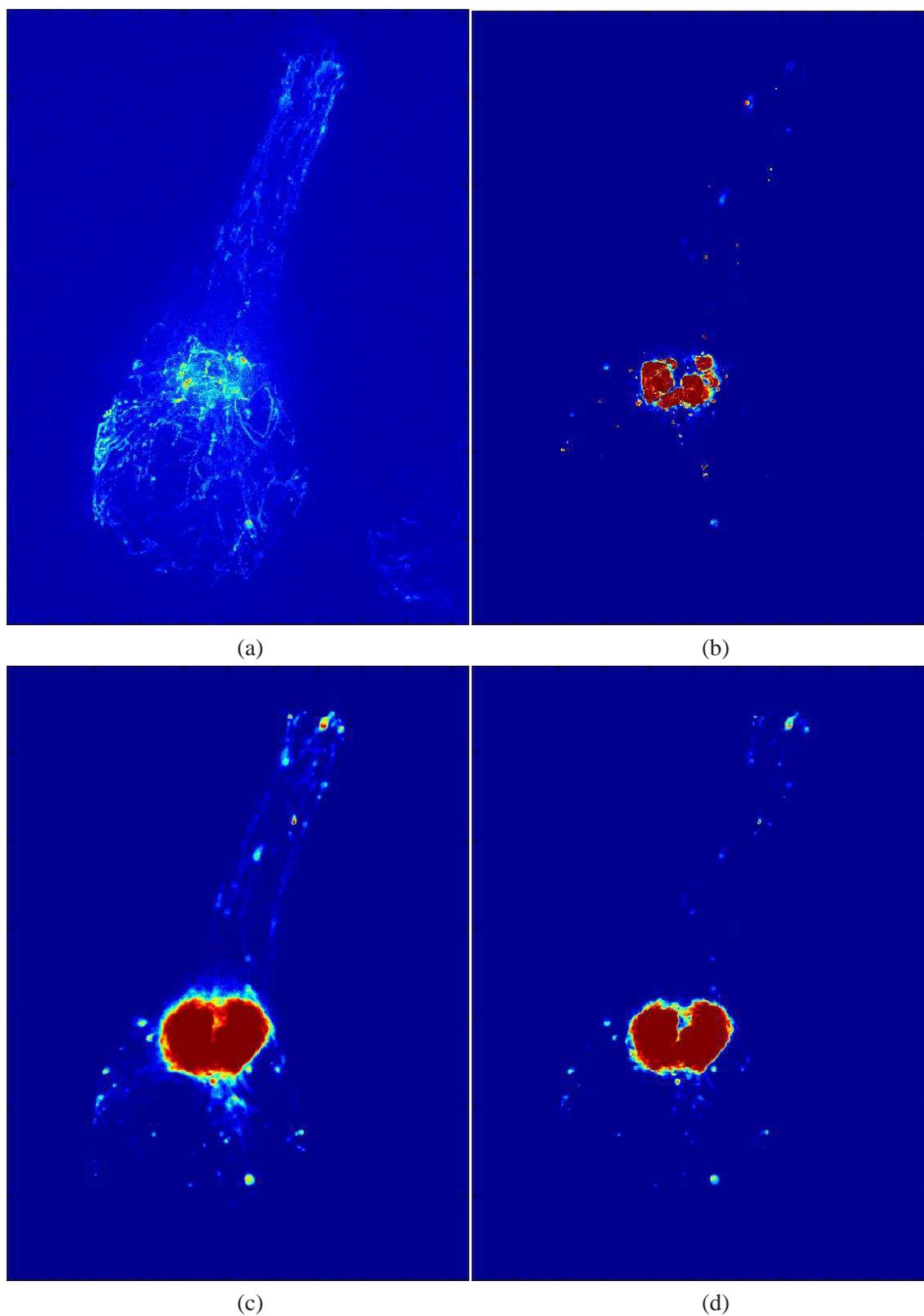


FIGURE 5.3: (a) Carte PIM extraite de la séquence d'images présentée sur la figure 5.1 (a); (b) carte de cumul de l'amplitude seuillée du gradient spatial calculée sur la figure 5.1 (a); (c) carte  $\tilde{b}^{OD}$  calculée avec une probabilité de fausse alarme égale à 0,17 sur la figure 5.1 (a); (d) carte  $\tilde{b}^{OD}$  calculée avec une probabilité de fausse alarme égale à 0,17 et un temps de séjour  $t_0 = 5$  sur la figure 5.1 (a) (les régions bleues correspondent à de faibles valeurs tandis que les régions rouges correspondent à de fortes valeurs).

la périphérie de la cellule. Les zones détectées selon ce critère ne sont donc pas pertinentes. On peut soupçonner une trop grande sensibilité de l'opérateur de gradient au bruit ou à de petits éléments résiduels présents dans la séquence.

La carte de cumul des détections consécutives illustrée sur la figure 5.3 (d) permet d'isoler précisément l'appareil de Golgi. Les autres zones détectées sont situées à la périphérie de la cellule, et correspondent à des zones de stockage intermédiaires (notamment une région située entre l'appareil de Golgi et l'extrémité haute de la cellule). La localisation de ces zones est cohérente avec la carte PIM. Sur le plan quantitatif (le comptage est plus important dans une région située en haut de la cellule, dans une autre située en bas et dans une dernière située à gauche que dans les autres régions détectées), ces informations permettent de mesurer les destinations privilégiées des vésicules.

Nous calculons aussi les cartes de cumul des détections consécutives sur des séquences d'images pour lesquelles les cellules acquises avec un microscope "spinning disk" sont contraintes par un *micro-patron*. Ces séquences sont composées de 180 images  $380 \times 380$  pixels. N'étant pas acquises avec un microscope à champ large, la distribution d'intensité dans les images n'est pas la même, et la probabilité de fausse alarme est légèrement différente ( $\mathbb{P}(\Phi_t(s) \geq \tau_t^{OD}) = 0,15$ ). Nous considérons tout d'abord deux séquences pour lesquelles les cellules observées sont contraintes par un *micro-patron* en forme d'arbalète (figure 5.5 (a-b)). Les détections consécutives sont nombreuses au niveau de l'appareil de Golgi, c'est-à-dire la région de la cellule dans laquelle la concentration en Rab6 est la plus importante. Ces détections sont également nombreuses dans les zones situées aux trois pointes de l'arbalète. Ce constat est conforme aux observations réalisées sur ce type de cellules (Thery, Racine, Pepin, Dimitrov, Chen, Sibarita & Bornens 2006).

Enfin, nous calculons les cartes de cumul des détections consécutives sur des séquences d'images pour lesquelles les cellules acquises sont contraintes par un *micro-patron* de forme circulaire (figure 5.5 (c-d)). Les *micro-patrons* de forme circulaire ont été conçus pour organiser le réseau de microtubules de manière non polarisée. Les vésicules se déplaçant sur ce réseau, l'idée sous-jacente est d'observer une distribution spatiale uniforme à la périphérie de la cellule, lieux de destination des vésicules. Sur la première séquence considérée (figure 5.5 (c)), les zones détectées sont distribuées uniformément en périphérie de la cellule, conformément à l'hypothèse initiale. En revanche, sur la carte de cumul des détections calculée pour la deuxième séquence d'images (figure 5.5 (d)), les zones de stockage ne sont plus uniformément distribuées à la périphérie de la cellule, mais semblent alignées selon l'axe de l'appareil de Golgi. Ceci suit une hypothèse alternative selon laquelle l'appareil de Golgi influence l'architecture du réseau de microtubules, impliquant un trafic vésiculaire orienté selon l'axe de l'appareil de Golgi. Pour conclure, il faudrait calculer les cartes de cumul des détections consécutives sur un nombre plus conséquent de séquences d'images. Une série d'expériences à plus grande échelle est désormais indispensable pour conforter ces premiers résultats.

### 5.3 Partitionnement de l'image

La tomographie de réseaux permet d'estimer le trafic global à partir d'un graphe et de comptages locaux. Ce graphe, qui décrit l'architecture du support servant au trafic, est d'une importance capitale. Dans la seule tentative d'application de la tomographie de réseaux en analyse d'images, Boyd et al. (1999) proposaient de découper l'image en régions et de construire un graphe indexé sur une partition de l'image. Sur ce graphe, chaque région est associée à un sommet et chacune des frontières entre régions voisines est associée à deux arêtes (une arête pour chaque sens de déplacement). Le but est d'estimer le trafic sur les paires OD, c'est-à-dire les trajectoires globales des objets en mouvement sur l'ensemble d'une séquence caractérisées par leur origine, leur destination et leur contribution au trafic global. Pour traiter une situation de vidéo-surveillance, Boyd et al. (1999) proposent aussi de subdiviser le domaine de l'image par un pavage régulier d'hexagones. Ce pavage arbitraire étant trop complexe

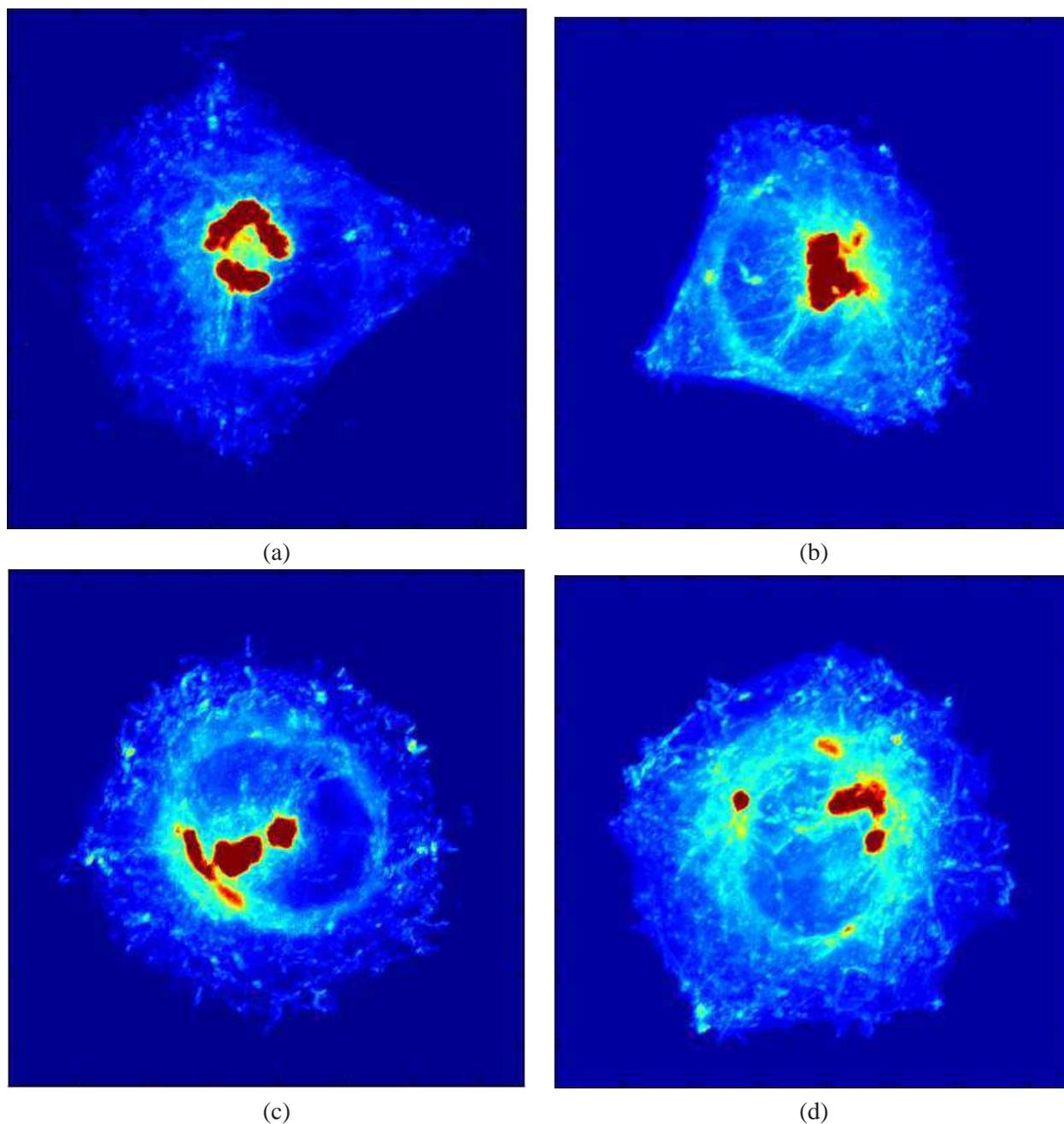


FIGURE 5.4: Cartes PIM calculées pour quatre séquences d'images acquises avec un microscope "spinning disk". (a-b) Les cellules acquises sont contraintes par un micro-patron en forme d'arbalète ; (c-d) les cellule acquises sont contraintes par un micro-patron de forme circulaire (les régions bleues correspondent à de faibles valeurs tandis que les régions rouges correspondent à de fortes valeurs).

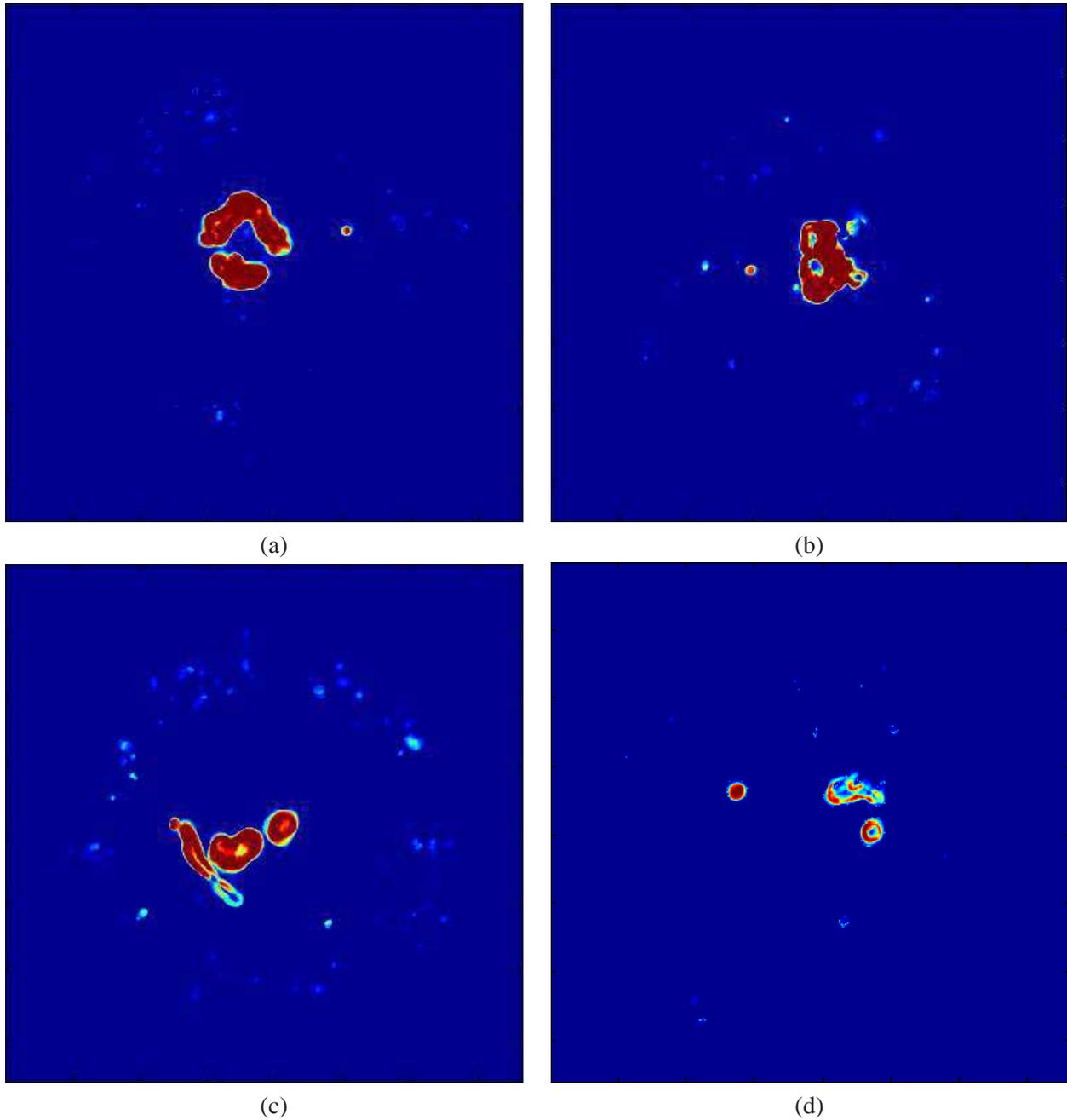


FIGURE 5.5: Cartes de cumul des détections consécutives en considérant  $\mathbb{P}(\Phi_t(s) \geq \tau_t^{OD}) = 0,15$  et  $t_0 = 5$ , calculées sur la séquence (a) de la figure 5.4 (a); (b) de la figure 5.4 (b); (c) de la figure 5.4 (c); (d) de la figure 5.4 (d) (les régions bleues correspondent à de faibles valeurs de comptage tandis que les régions rouges correspondent à de fortes valeurs de comptage).

pour l'estimation des données (nombre d'objets se déplaçant d'une région à une autre) et pour établir la matrice de routage, les auteurs simplifient manuellement le graphe. Dans notre étude, les zones de stockage des vésicules permettent une localisation spatiale assez fiable des régions origine et destination des vésicules, éventuellement révisée par un expert. Nous exploitons donc cette connaissance pour construire une partition adaptée au trafic observé, et par la suite un graphe exploitable en tomographie de réseaux. La méthode la plus connue pour subdiviser le domaine de l'image en différentes régions est un découpage en cellules de Voronoï.

### 5.3.1 Partition de Voronoï

À partir de  $N_{germes}$  germes, une partition de Voronoï permet d'établir  $N_{germes}$  régions dans l'image. Tous les pixels d'une région associée à un germe de référence sont plus proches de ce germe que de n'importe quel autre germe, au sens d'une métrique choisie.

#### Notations et définitions

Soit un ensemble de germes  $\{g_i\}_{i=1,\dots,N_{germes}}$  définis dans  $\mathbb{R}^2$ . Soit  $\text{dist}(s, g_i)$  une mesure de distance entre le point  $s \in \mathbb{R}^2$  et le germe  $g_i$ . La région de dominance du germe  $g_i$  est définie comme :

$$\text{Dom}(g_i) = \{s : \text{dist}(s, g_i) \leq \text{dist}(s, g_j), \forall j, j \neq i\}. \quad (5.14)$$

L'ensemble des  $N_{germes}$  régions associées aux germes permet d'établir une partition de Voronoï :

$$\text{Part}(S) = \bigcup_{i=1,\dots,N_{germes}} \text{Dom}(g_i). \quad (5.15)$$

La distance la plus utilisée est la distance euclidienne. Afin d'exploiter la détection des zones de stockage pour construire une partition, nous identifions les germes par les centres de gravité des régions extraites avec la méthode exposée dans la section 5.2. Un exemple de partition en cellules de Voronoï est présenté sur la figure 5.6 (a).

Comme les zones de stockage détectées sont des régions, il est aussi pertinent de considérer des régions "germe"  $\{G_i\}_{i=1,\dots,N_{germes}}$ . La distance euclidienne entre la région "germe"  $G_i$  qui contient  $N_{G_i}$  points  $\{s_{i,1}, \dots, s_{i,N_{G_i}}\}$  et le point  $s$  est alors définie comme :

$$\text{dist}(s, G_i) = \min_{j \in \{1,\dots,N_{G_i}\}} \|s - s_{i,j}\|^2. \quad (5.16)$$

La partition de Voronoï obtenue pour la séquence d'images de la figure 5.1 et calculée sur la base des zones de stockage identifiées comme régions "germe" est illustrée sur la figure 5.6 (c). Le fait de prendre en compte les régions plutôt que les centres de gravité de ces régions n'est pas équivalent, certaines frontières ont disparu (entre la zone verte et la zone jaune et entre la zone verte et la zone bleue) tandis qu'une nouvelle frontière est apparue (entre la zone rouge et la zone orange).

#### Chemins minimaux

La distance euclidienne ne prend en compte que l'information spatiale. Une mesure de distance qui prendrait davantage en compte l'organisation spatiale et la géométrie du support servant au trafic serait plus avantageuse. Le réseau de microtubules, support du trafic vésiculaire, est un bon candidat en première approximation. Comme nous l'avons vu en section 5.2.2, la carte PIM permet d'extraire un nombre significatif de microtubules. Une partition de l'image obtenue en considérant une distance

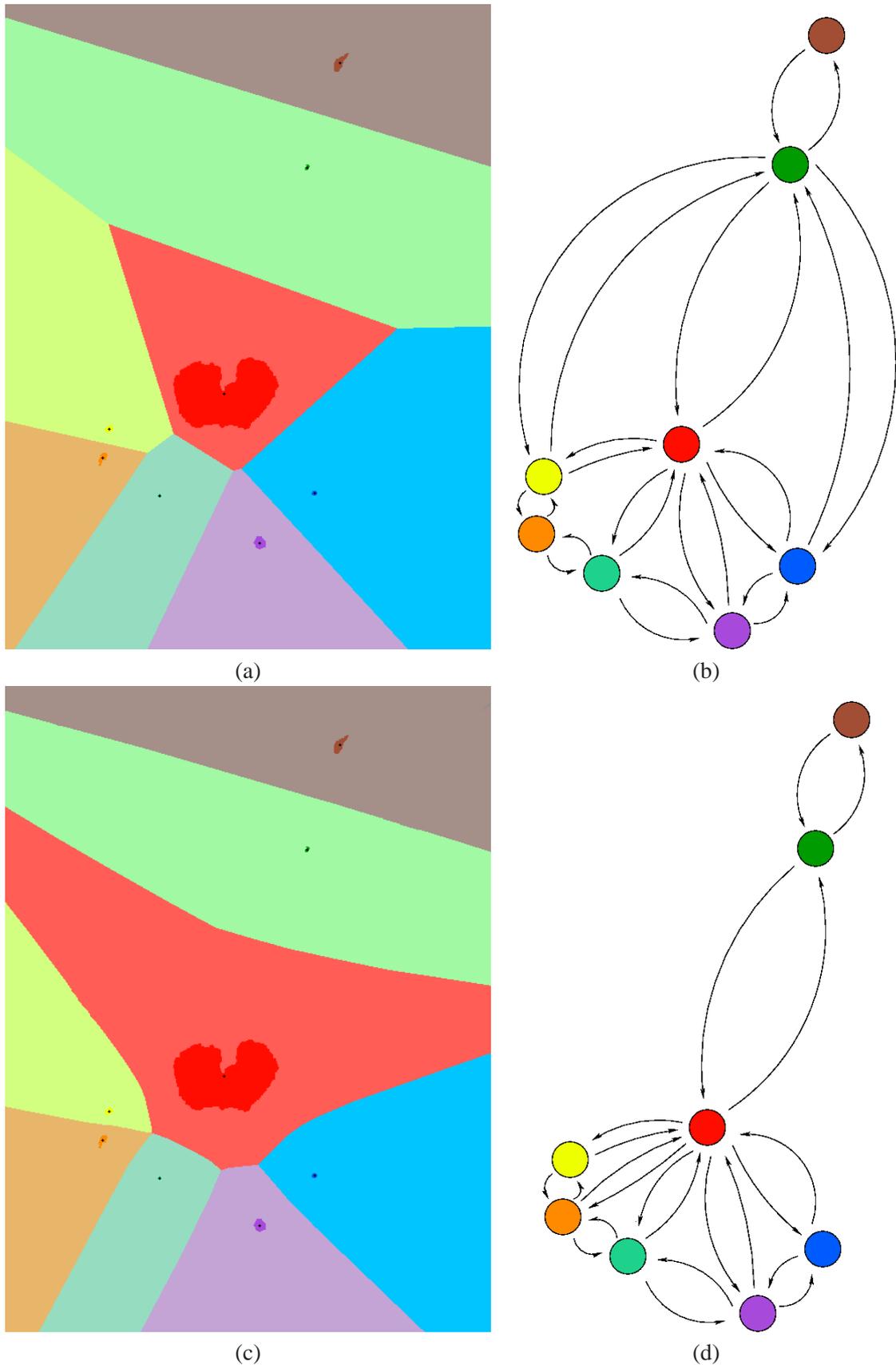


FIGURE 5.6: Cellules de Voronoï calculées sur la séquence de la figure 5.1 en considérant la distance euclidienne et les régions de stockage comme régions "germe" (c), et les centres de gravité de ces régions comme points "germe" (a); (b) graphe associé aux cellules de Voronoï (a); (d) graphe associé aux cellules de Voronoï (c).

géodésique calculée sur la carte PIM dépendra du support du trafic, et semble plus judicieuse qu'une partition obtenue avec une distance euclidienne. Pour la mise en oeuvre, nous avons repris la méthode des chemins minimaux décrite dans (Cohen & Kimmel 1997, Cohen 2001, Bonneau, Dahan & Cohen 2005, Racine et al. 2007). Il s'agit d'estimer la courbe de longueur minimale reliant deux points dans une image.

Considérons une constante  $w_0$  et un potentiel  $\mathcal{P} : \mathcal{S} \rightarrow \mathbb{R}$  qui prend des valeurs faibles le long de la courbe que l'on cherche à extraire de l'image PIM. Soit  $\mathcal{A}(s_1, s_2) \in \mathcal{S} \times \mathcal{S}$  l'ensemble des courbes planes reliant les points  $s_1 \in \mathcal{S}$  et  $s_2 \in \mathcal{S}$ , et  $\gamma(s_1, s_2) \in \mathcal{A}(s_1, s_2)$ . Le potentiel est alors défini comme

$$\mathcal{P}(s) = \max_{r \in \mathcal{S}} \text{pim}(I_t)(r) - \text{pim}(I_t)(s), \quad (5.17)$$

et le chemin minimal  $\mathcal{C}(s_1, s_2)$  minimise globalement l'intégrale du potentiel  $w_0 + \mathcal{P}(s)$  le long du chemin joignant les deux extrémités  $s_1$  et  $s_2$  :

$$\mathcal{C}(s_1, s_2) = \min_{\mathcal{A}(s_1, s_2)} \left\{ \int_{\gamma(s_1, s_2)} (w_0 + \mathcal{P}(\gamma(s_1, s_2))(\ell)) d\ell \right\}, \quad (5.18)$$

où  $\ell$  est l'abscisse curviligne et  $w_0$  permet d'imposer une contrainte sur la longueur de la courbe désirée. Le découpage du domaine de l'image ne nécessite pas de calculer les chemins minimaux entre tous les points de l'image pris deux à deux, mais seulement de déterminer les chemins minimaux entre les germes et le reste de l'image. Le chemin minimal entre un point de référence  $s_1$  et un point quelconque  $s \in \mathcal{S}$  est obtenu à partir de la carte d'action minimale  $\mathcal{U}_1 : \mathcal{S} \rightarrow \mathbb{R}^+$  associée à  $s_1$  :

$$\forall s \in \mathcal{S}, \mathcal{U}_1(s) = \min_{\mathcal{A}(s_1, s)} \left\{ \int_{\gamma(s_1, s)} (w_0 + \mathcal{P}(\gamma(s_1, s))(\ell)) d\ell \right\}. \quad (5.19)$$

Ainsi, le calcul de la carte d'action minimale associée à un germe procure en chaque point de l'image une distance au sens des chemins minimaux sur la carte PIM. Le calcul de la carte d'action minimale associée à chaque germe établit en principe l'appartenance du point à la région pour laquelle la carte d'action minimale coïncide avec la valeur la plus faible. On fait remarquer que la carte d'action minimale est la solution d'une Équation Différentielle Partielle (EDP) (Bruckstein 1988) où on assimile les lignes de niveau de  $\mathcal{U}_1$  à des fronts d'onde se propageant depuis le point de référence  $s_1$ . Bruckstein (1988) considère une courbe plane fermée  $\Gamma : \mathbb{S}^1 \rightarrow \mathcal{S}$  définie à l'instant initial par un cercle infinitésimal centré au point  $s_1$ , qui se propage perpendiculairement à elle-même au cours du temps avec une vitesse inversement proportionnelle au potentiel  $w_0 + \mathcal{P}$  :

$$\frac{\partial \Gamma}{\partial t} = \frac{1}{w_0 + \mathcal{P}} n_\Gamma, \quad (5.20)$$

où  $n_\Gamma$  désigne la normale extérieure unitaire à  $\Gamma$  et  $t$  est une variable analogue à une variable temporelle. À l'instant  $t$ , la courbe  $\Gamma$  correspond aux points de  $\mathcal{S}$  atteints par le front se propageant depuis  $s_1$  :

$$\{s \in \mathcal{S} : \mathcal{U}_1(s) = t\}. \quad (5.21)$$

Par conséquent, la carte d'action minimale  $\mathcal{A}_1$  satisfait l'équation Eikonale :

$$\begin{cases} \|\nabla \mathcal{U}_1(s)\| &= w_0 + \mathcal{P}(s) \quad \forall s \in \mathcal{S}, \\ \mathcal{U}_1(s_1) &= 0. \end{cases} \quad (5.22)$$

Il est établi que l'algorithme rapide "Fast Marching" (Cohen 2005) permet de résoudre numériquement l'équation Eikonale qui admet comme solution unique le point  $s_1$ . Nous l'utilisons aussi pour partitionner le domaine de l'image dans le contexte de notre étude.

Les cellules de Voronoï obtenues sur la séquence d'images de la figure 5.1 en exploitant les notions de chemins minimaux et les centres des régions de stockage détectées (resp. les régions de stockage détectées) pour initialiser les points "germe" (resp. régions "germe"), sont illustrées sur la figure 5.7 (a) (resp. figure 5.7 (c)).

### 5.3.2 Partitions d'images et cellules contraintes par micro-patrons

Les *micro-patrons* servent à contraindre la forme des cellules imagées (Thery et al. 2005). Ils permettent ainsi de réduire la variabilité inter cellules et de faciliter la comparaison des processus spatiaux, dans notre cas, le trafic membranaire. En effet, si toutes les cellules sont de forme *arbalète*, l'analyse du trafic quantifié entre l'appareil de Golgi et la pointe inférieure de l'arbalète peut être analysée pour différentes conditions expérimentales. En revanche, si les cellules sont de forme quelconque, il n'est pas possible d'identifier de manière précise une même région de la cellule à partir de différentes acquisitions. Pour des cellules contraintes, on peut donc adopter une partition standard et identique pour toutes les conditions. D'emblée, on peut faire remarquer que le trafic des vésicules Rab6 positives a pour origine l'appareil de Golgi. Celui-ci joue un rôle essentiel et occupe un statut particulier dans la séquence. Une fois isolé, on applique une homothétie sur la zone détectée et l'aire résultante définit la région associée à l'appareil de Golgi (voir figure 5.8). L'opération d'homothétie permet de définir une région dans laquelle tout l'activité liée à l'appareil de Golgi reste confinée. L'appareil de Golgi étant un lieu de trafic et d'échanges intenses, nous choisissons de ne lui attribuer qu'une seule région voisine : la région enclavée dans une couronne. Il est également établi que les destinations présumées des vésicules se positionnent à la périphérie de la cellule. Les autres régions de la partition sont uniformément réparties sur la couronne extérieure de la cellule. Ce choix est motivé par l'identification de trois types de déplacement :

- *import* : trafic de la périphérie de la cellule vers l'appareil de Golgi,
- *export* : trafic de l'appareil de Golgi vers la périphérie de la cellule,
- *échanges transversaux* : trafic résiduel.

L'architecture spatiale décrite précédemment semble bien adaptée pour estimer ces trois types d'échanges.

Dans les séquences d'images analysées, nous avons considéré deux types de *micro-patrons* (section 1.4.2) : les *cercles* et les *arbalètes*. Pour comparer plusieurs cellules, il faut que celles-ci aient la même orientation. L'appareil de Golgi est le seul élément commun dans chaque cellule qui permette d'établir un repère (angle entre l'axe horizontal et l'axe de l'appareil de Golgi). La partition est donc orientée selon cet axe, telle qu'elle est présentée sur la figure 5.8 (a). Les cellules en forme d'arbalète ne nécessitent pas ce recalage. Afin d'avoir des résultats comparables, le partitionnement est topologiquement similaire à celui recommandé pour les cellules de forme circulaire : deux régions centrales et des régions périphériques (figure 5.8 (c)).

On peut désormais déduire une représentation graphique de la cellule sur la base de ces partitions.

### 5.4 Estimation du nombre de vésicules se déplaçant d'une région à une autre

La tomographie de réseaux cherche à estimer le trafic sur les paires OD sans recourir au suivi individuel des objets. Dans ce cadre, de simples mesures de comptage d'objets sont nécessaires. Nous avons vu qu'une partition du domaine de l'image permet d'élaborer un graphe. Les objets empruntant une arête du graphe franchissent la frontière commune entre deux régions. Il faut aussi connaître le sens de franchissement des frontières puisque les arêtes du graphe sont orientées. On sait que le niveau de fluorescence mesuré dans une image est proportionnel au nombre de vésicules. On note par ailleurs que la somme totale de l'intensité dans l'image est constante après compensation du photoblanchiment 1.4.5. Les protéines Rab6 observent un cycle en circuit fermé à l'intérieur de la cellule. Ainsi, la fluorescence mesurée dans chaque région de la partition renseigne, à une constante multiplicative près, sur le nombre

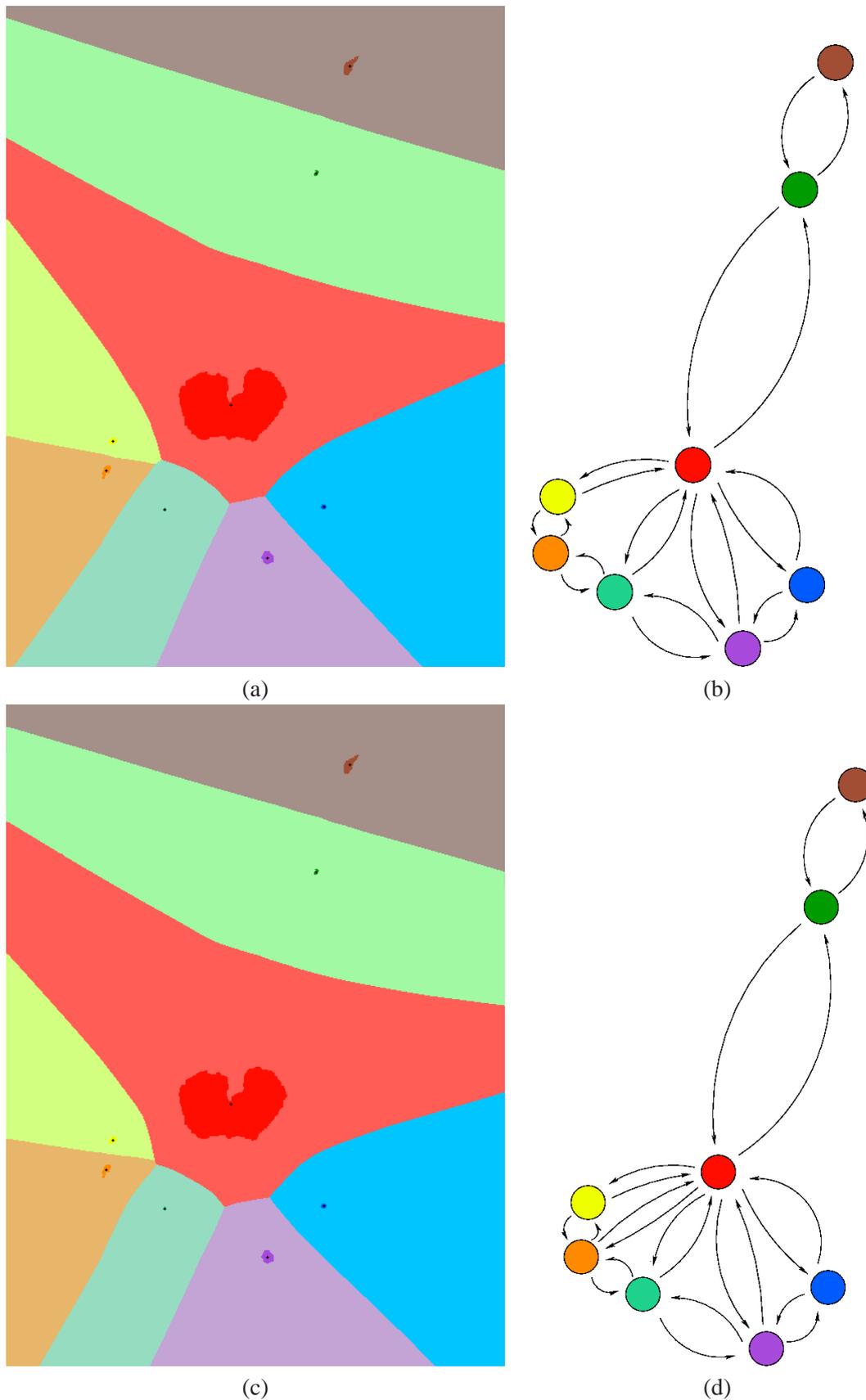


FIGURE 5.7: Cellules de Voronoï calculées sur la séquence de la figure 5.1 en considérant les chemins minimaux et les zones de stockage comme régions "germe" (c), et les centres de gravité de ces régions comme points "germe" (a); (b) graphe associé aux cellules de Voronoï (a); (d) graphe associé aux cellules de Voronoï (c).

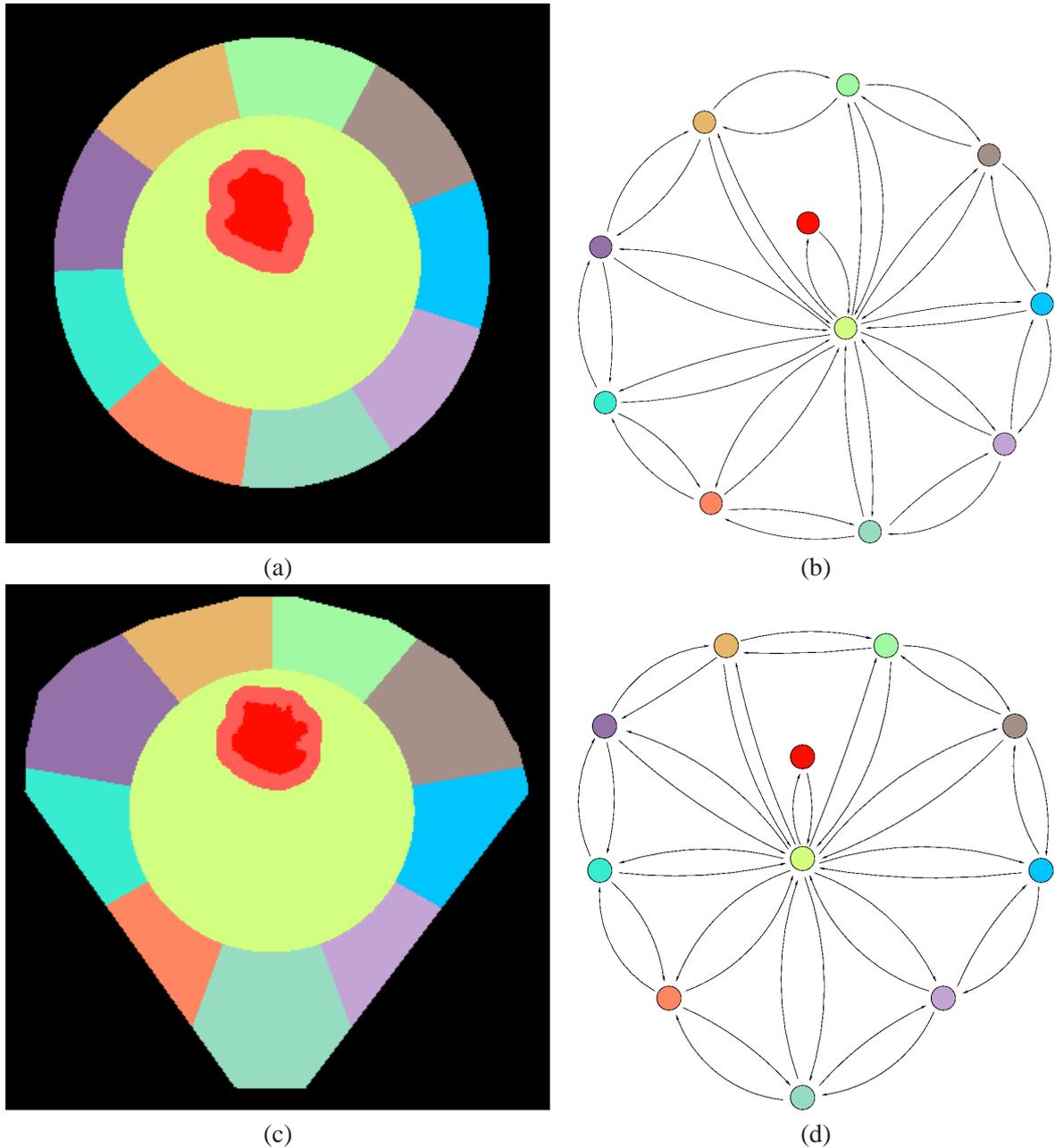


FIGURE 5.8: Partition de cellules contraintes par un *micro-patron* de forme circulaire (a) et un *micro-patron* en forme d'arbalète (c). Dans les deux cas, l'appareil de Golgi est détecté et affiché en rouge sombre. La région associée est labellisée en rouge. Les deux partitions considérées sont composées de 11 domaines ; (b) graphe associé à la partition (a) ; (d) graphe associé à la partition (c).

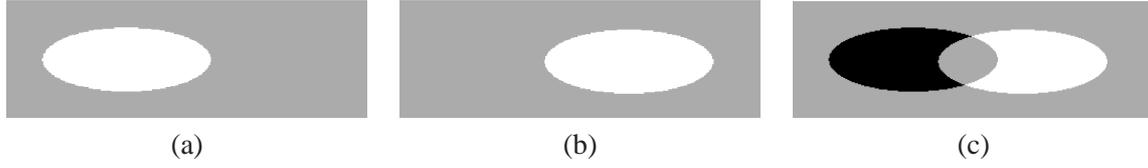


FIGURE 5.9: Illustration de la différence  $\Delta \mathbf{b}_t$ . (a) Position d'une vésicule à l'instant  $t$ ; (b) position de la même vésicule à l'instant  $t + 1$ ; (c) différence  $\Delta \mathbf{b}_t$  calculée entre les instants  $t + 1$  (b) et  $t$  (a) (la région noire correspond à la composante négative, et la région blanche à la composante positive).

de protéines présentes. De ce fait, les échanges de vésicules entre régions voisines peuvent être inférés à partir des fluctuations d'intensité mesurées dans ces régions. Une approche de ce type est présentée en annexe C. Cette approche ne peut être envisagée dans le cadre de notre étude car la fluorescence n'est pas proportionnelle au nombre de vésicules dans des séquences d'images acquises avec un microscope "spinning-disk" (C.5).

Nous proposons maintenant une méthode qui permet de compter le nombre de vésicules qui franchissent chacune des frontières (dans un sens ou dans l'autre) à chaque instant.

### Méthode d'appariement au plus proche voisin

Compter les vésicules qui franchissent les frontières nécessite un suivi local des vésicules au niveau des frontières. Nous avons choisi de mettre en oeuvre une méthode relativement simple dite d'appariement au plus proche voisin. Il faut bien noter que l'objectif n'est pas de suivre les vésicules tout au long de la séquence, mais seulement entre deux images consécutives, ce qui est beaucoup plus aisé.

Pour la mise en oeuvre, l'algorithme de détection de la section 4.2.2 est très utile dans ce contexte. Pour chaque image de la séquence traitée, nous disposons d'une carte binaire  $\mathbf{b}_t$  nous informant de la présence ( $b_t(s) = 1$ ) ou de l'absence ( $b_t(s) = 0$ ) d'une vésicule à la position  $s$ . Nous calculons une image de différence :

$$\Delta \mathbf{b}_t = \mathbf{b}_{t+1} - \mathbf{b}_t, \quad t = 1, \dots, T - 1. \quad (5.23)$$

Les valeurs positives de  $\Delta \mathbf{b}_t$  identifient les vésicules présentes à la position  $s$  à l'instant  $t + 1$ , absentes à l'instant  $t$ . Cette situation correspond aux lieux d'arrivée des vésicules à l'instant  $t + 1$ . À l'inverse, les composantes négatives de  $\Delta \mathbf{b}_t$  identifient les vésicules présentes à l'instant  $t$ , mais absentes à l'instant  $t + 1$ . Il s'agit des lieux de départ de vésicules à l'instant  $t$ . Sur la figure 5.9, nous illustrons ces deux situations. Notre objectif est d'associer une région de départ à l'instant  $t$  à la région d'arrivée la plus proche à l'instant  $t + 1$ , caractérisant ainsi le déplacement d'une vésicule entre les instants  $t$  et  $t + 1$ . Pour cela, les régions connexes caractérisées par une valeur positive (respectivement négative) dans  $\Delta \mathbf{b}_t$  sont extraites. L'ensemble correspondant est noté  $\{R_1^{t+}, \dots, R_{N_{R^{t+}}}^{t+}\}$  (respectivement  $\{R_1^{t-}, \dots, R_{N_{R^{t-}}}^{t-}\}$ ), où  $N_{R^{t+}}$  (respectivement  $N_{R^{t-}}$ ) désigne le nombre de régions connexes en question. Ces régions sont identifiées par les coordonnées de leur centre de gravité définissant l'ensemble  $\{g_1^{t+}, \dots, g_{N_{R^{t+}}}^{t+}\}$  (respectivement  $\{g_1^{t-}, \dots, g_{N_{R^{t-}}}^{t-}\}$ ). Le but est d'associer à chaque centre de gravité  $g_i^{t+}$  proche d'une frontière un centre de gravité  $g_j^{t-}$ . Si deux régions  $R_i^{t-}$  et  $R_j^{t+}$  sont associées, nous confirmons qu'une vésicule s'est déplacée entre  $g_i^{t-}$  et  $g_j^{t+}$  entre les instants  $t$  et  $t + 1$ . Si par ailleurs  $g_i^{t-}$  et  $g_j^{t+}$  appartiennent à deux régions différentes de la partition considérée, la vésicule a effectivement franchi une frontière. La composante correspondant  $y_{t,e}^{arête}$  est donc incrémentée.

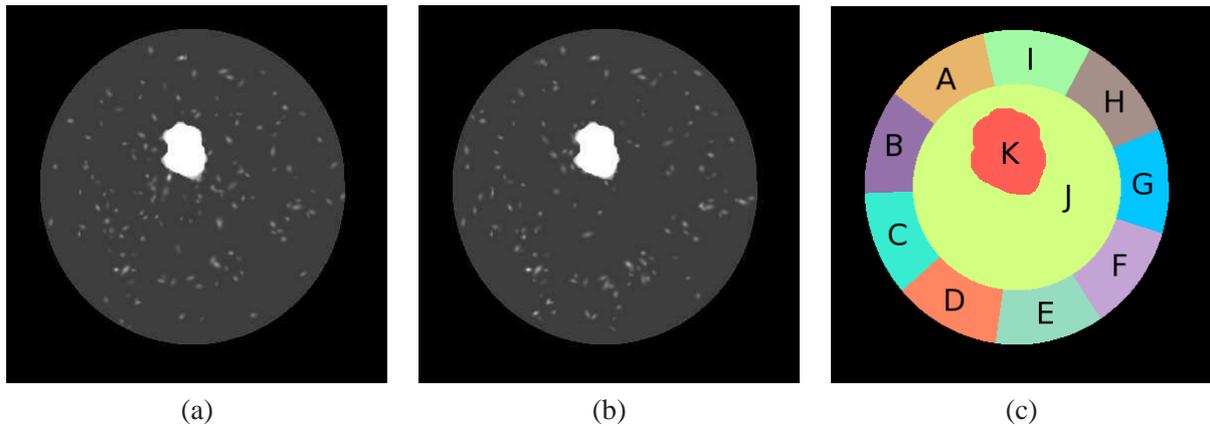


FIGURE 5.10: (a-b) Images n° 50 (a) et n° 100 (b) extraites d'une séquence d'images simulée ; (c) partition utilisée pour estimer les échanges de fluorescence entre régions voisines.

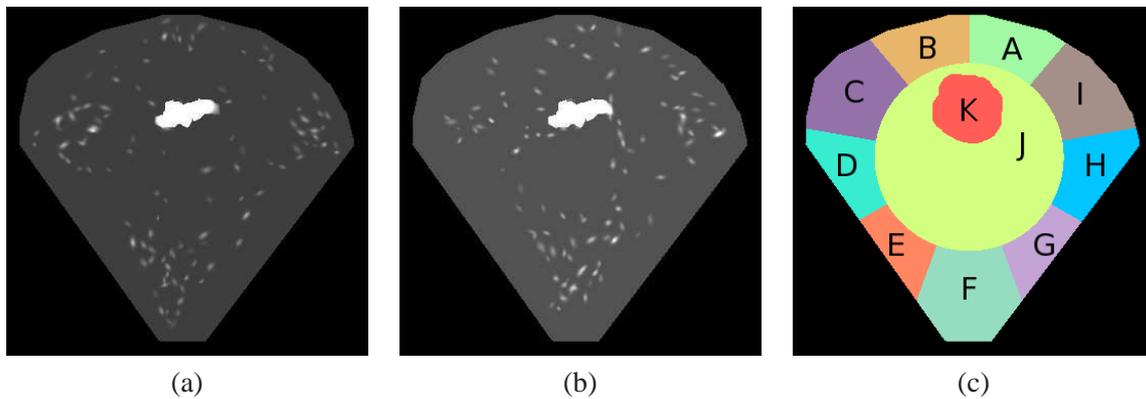


FIGURE 5.11: (a-b) Images n° 50 (a) et n° 100 extraites d'une séquence d'images simulée (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation) ; (c) partition utilisée pour estimer les échanges de fluorescence entre régions voisines.

### Évaluation de la méthode d'appariement

Afin d'évaluer la méthode d'appariement pour le comptage de vésicules franchissant les frontières, nous simulons cinq séquences de 180 images  $380 \times 380$  représentant une cellule de forme circulaire (figure 5.10 (a-b)), et cinq séquences de 180 images  $380 \times 380$  représentant une cellule en forme d'arbalète (figure 5.11 (a)). Ces 10 séquences sont simulées selon le principe exposé au chapitre 3 et respectent les comportements observés sur des données réelles. Les vésicules se déplacent à des vitesses cohérentes avec celles observées dans la réalité.

Afin de quantifier les résultats, Trois critères d'évaluation sont proposés :

i) *Probabilité de Bonne Estimation* :

$$PBE = \frac{\text{nombre correct de vésicules se déplaçant entre deux régions}}{\text{nombre total de transitions de vésicules entre régions voisines}}$$

ii) *Probabilité de Mauvaise Estimation* :

$$PME = \frac{\text{nombre de vésicules transitant entre deux régions qui ne sont pas estimées}}{\text{nombre total de transitions de vésicules entre régions voisines}}$$

	1 image/0,02sec		1 image/0,04sec		1 image/sec	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
<b>PBE</b>	90,7%	1,6%	92,6%	2,2%	92,3%	1,9%
<b>PME</b>	9,3%	1,6%	7,4%	2,2%	7,7%	1,9%
<b>PFE</b>	5,9%	1,2%	5,9%	0,8%	6,3%	1,1%
	1 image/1,4sec		1 image/2sec			
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type		
<b>PBE</b>	90,7%	1,5%	89,2%	3,1%		
<b>PME</b>	9,3%	1,5%	10,8%	3,1%		
<b>PFE</b>	7,2%	1,5%	9%	3%		

TABLE 5.1: Performances des comptages moyens sur l'ensemble des frontières réalisés sur cinq séquences avec une cellule de forme circulaire, et cinq séquences avec une cellule en forme d'arbalète. Les moyenne et écart-type des critères PBE, PME et PFE sont indiqués pour différents échantillonnages temporels.

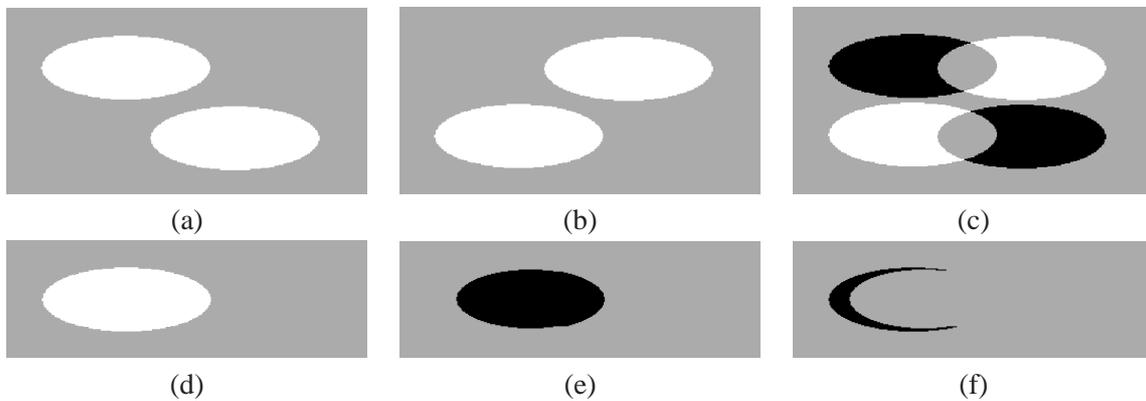


FIGURE 5.12: Illustration d'une mauvaise mise en correspondance due à une déformation de la vésicule. (a) Position d'une vésicule à l'instant  $t$  ; (b) position de la même vésicule à l'instant  $t + 1$  ; (c) gradient temporel calculé entre les instants  $t + 1$  (b) et  $t$  (a) (la région noire correspond à la composante négative, et la région blanche à la composante positive).

iii) *Probabilité de Fausse Estimation* :

$$\text{PFE} = \frac{\text{nombre de vésicules faussement estimées}}{\text{nombre total de transitions de vésicules entre régions voisines}}.$$

Pour chaque frontière, nous calculons la moyenne et l'écart-type des valeurs de comptage obtenu sur les 10 séquences, avec différents échantillonnages temporels. Ces résultats sont présentés dans le tableau 5.1. L'échantillonnage temporel est pris en considération et limite souvent les performances de suivi s'il est trop important.

Le comptage des vésicules est effectué sur la partition de la figure 5.10 (c), et sur la partition de la figure 5.11 (b). Les résultats ne sont pas sans erreur, même avec un échantillonnage temporel très faible. Les sources d'erreur sont multiples. Certaines erreurs viennent du fait qu'au cours du déplacement de deux vésicules très proches, la composante connexe négative de la première dans  $\Delta \mathbf{b}_t$  est plus proche de la composante connexe positive de la seconde dans  $\Delta \mathbf{b}_t$  (voir figures 5.12 (a-c)). Les erreurs peuvent aussi provenir d'une déformation de la vésicule pendant son déplacement. Sur les figures 5.12 (d-e), la vésicule devient plus petite en se déformant ; il n'y a alors plus de composante connexe positive. Globalement, la valeur PBE est supérieure à 90% pour un échantillonnage temporel inférieur à une image

toutes les 1,4 sec, et même supérieure à 92% pour un échantillonnage temporel inférieur à 1 image/sec. D'autre part, la valeur PFE reste constante pour un échantillonnage temporel égal à 1 image/sec, et augmente ensuite rapidement si l'échantillonnage temporel augmente. Bien que la méthode soit très simple, les résultats obtenus sont satisfaisants, même pour un échantillonnage temporel égal à 1 image/sec.

Dans cette section, nous avons développé une méthode permettant d'estimer des mesures de comptage indispensables à la tomographie de réseaux. Avant d'estimer le trafic sur les paires OD, il nous reste à préciser le routage supposé des vésicules.

## 5.5 Estimation de la matrice de routage

Les comptages locaux de vésicules estimés dans la section précédente rendent partiellement compte du trafic membranaire dans la cellule. Pour caractériser les trajectoires complètes des vésicules, les comptages locaux quantifient la succession de différents points de passage, reliés entre eux par l'intermédiaire d'une matrice de routage. Cette matrice est clairement dépendante de la structure du graphe. Dans le cas le plus simple, elle est binaire : on considère le chemin le plus court pour une paire origine-destination (OD). Le chemin le plus court sur l'image est différent selon la métrique utilisée pour valuer les arêtes (uniforme, métrique euclidienne ou géodésique). Toutefois, la matrice de routage peut aussi prendre en compte plusieurs chemins pour une même paire OD. À chaque chemin, on associe une énergie qui représente l'effort nécessaire pour atteindre une destination. Cette matrice de routage identifie ainsi les chemins préférentiels pour relier une origine à une destination. Il est également possible de prendre en compte l'activité mesurée sur les arêtes du graphe au cours du temps.

### 5.5.1 Définition du coût des arêtes

L'idée la plus intuitive pour définir le routage, unique ou multiple pour caractériser une paire OD, est d'associer un coût à chaque arête du graphe. Le coût d'un chemin est la somme des coûts sur les arêtes qui contribuent au chemin. Cette notion de coût permet de déterminer soit le plus court chemin, soit d'associer une probabilité à chaque chemin pour un routage multiple.

#### Coût constant par arête

Si l'utilisateur juge que seule la topologie du graphe influe sur les trajectoires empruntées par les vésicules, alors il n'y a aucune raison de privilégier certaines arêtes (distance, trafic, ...). Par conséquent, on associe à chaque arête un coût identique. Soit  $C(e) \in \mathbb{R}$ ,  $e \in \{1, \dots, r\}$  le coût défini pour l'arête  $e$  dans le graphe. On pose :

$$C(e) = C_0, \quad \forall e \in \{1, \dots, r\}, \quad (5.24)$$

où  $C_0$  est une constante positive. Cependant, il semble plus raisonnable de prendre en compte la distance séparant deux régions voisines pour définir le coût de l'arête.

#### Coût et distance euclidienne

La distance euclidienne entre les centres de gravité de deux régions voisines (reliées par une arête sur le graphe) permet de spécifier le coût associé à cette arête. Ainsi, le coût de l'arête  $e$  est défini de la manière suivante :

$$C(e) = \|g_{e,1} - g_{e,2}\|^2, \quad (5.25)$$

où les points  $g_{e,1}$  et  $g_{e,2}$  sont les centres de gravité des régions reliées par l'arête  $e$ . La distance euclidienne qui prend en compte l'information spatiale peut être suffisante. Toutefois, une distance géodésique mesurée sur la séquence d'images semble plus appropriée, car dépendante des données.

### Coût et distance géodésique

Comme nous l'avons déjà vu dans la section 5.2.2, la carte PIM recupère un sous-ensemble du réseau de microtubules, support du trafic des protéines Rab6 dans la cellule. La distance géodésique calculée sur la carte PIM entre les centres de gravité des régions est une métrique qui prend en compte à la fois la distance spatiale et le caractère dynamique de la séquence d'images. De ce fait, il semble intéressant d'indexer le coût d'une arête sur la distance géodésique calculée entre régions voisines. D'après (5.18), nous avons :

$$\mathcal{C}(g_{e,1}, g_{e,2}) = \min_{\mathcal{A}(g_{e,1}, g_{e,2})} \left\{ \int_{\gamma(g_{e,1}, g_{e,2})} (w_0 + \mathcal{P}(\gamma(g_{e,1}, g_{e,2}))(\ell)) d\ell \right\}, \quad (5.26)$$

où les points  $g_{e,1}$  et  $g_{e,2}$  sont les centres de gravité des régions voisines reliées par l'arête  $e$ , et le potentiel est défini comme :

$$\mathcal{P}(s) = \max_{r \in \mathcal{S}} (\text{pim}(I_t)(r)) - \text{pim}(I_t)(s). \quad (5.27)$$

Préalablement, la carte d'action minimale  $\mathcal{U}_{e,1}$  est calculée à l'aide de l'algorithme "Fast Marching" (Cohen 2005). Cette carte d'action minimale admet un minimum unique  $g_{e,1}$ , et la convergence vers  $g_{e,1}$  est assurée quel que soit le point  $s \in \mathcal{S}$  en suivant la direction opposée à  $\nabla \mathcal{U}_{e,1}$ . Ainsi, pour déterminer le chemin minimal  $\mathcal{C}(g_{e,1}, g_{e,2})$ , il suffit d'effectuer une descente de gradient sur  $\mathcal{U}_{e,1}$  depuis le point  $g_{e,2}$  vers le point  $g_{e,1}$  en résolvant l'équation différentielle :

$$\begin{cases} \frac{\partial \mathcal{C}(g_{e,1}, g_{e,2})(\ell)}{\partial \ell} = -\nabla \mathcal{U}_{e,1}(\mathcal{C}(g_{e,1}, g_{e,2})(\ell)), \\ \mathcal{C}(g_{e,1}, g_{e,2})(0) = g_{e,2}. \end{cases} \quad (5.28)$$

Après convergence, il est possible d'extraire la courbe  $\gamma(g_{e,1}, g_{e,2})$  qui coïncide avec le chemin minimal entre les régions de centres  $g_{e,1}$  et  $g_{e,2}$ . Afin de ne prendre en compte que l'activité de trafic observée entre les régions, nous définissons le coût de l'arête  $e$  comme l'intégrale de l'intensité observée dans la carte PIM le long du chemin minimal :

$$C(e) = \int_{\gamma(g_{e,1}, g_{e,2})} (w_0 + \mathcal{P}(\gamma(g_{e,1}, g_{e,2}))(\ell)) d\ell, \quad (5.29)$$

où  $g_{e,1}$  et  $g_{e,2}$  sont les centres de gravité des deux régions reliées par l'arête  $e$ . Finalement, un chemin avec un faible coût correspond à une route fréquemment utilisée par les vésicules.

La différence entre distance euclidienne et distance géodésique est illustrée à l'aide de deux exemples (figure 5.13). Dans chaque cas, les distances sont calculées entre les deux régions voisines. Ici, la région associée à l'appareil de Golgi n'a qu'une seule région voisine. Un coût constant est attribuée à la frontière entre ces deux régions. Sur l'exemple (a), les deux chemins calculés sont très proches. En revanche, sur l'exemple (b), le chemin minimal au sens géodésique est beaucoup plus long que la distance euclidienne entre les deux régions.

À présent, nous reportons ces résultats dans la métrique du routage.

#### 5.5.2 Définition de la matrice de routage

La définition de la matrice de routage dépend des chemins identifiés par l'utilisateur pour relier une origine à une destination. Si on considère que toutes les vésicules traversent les mêmes régions pour aller d'un endroit à un autre, la matrice de routage est binaire.

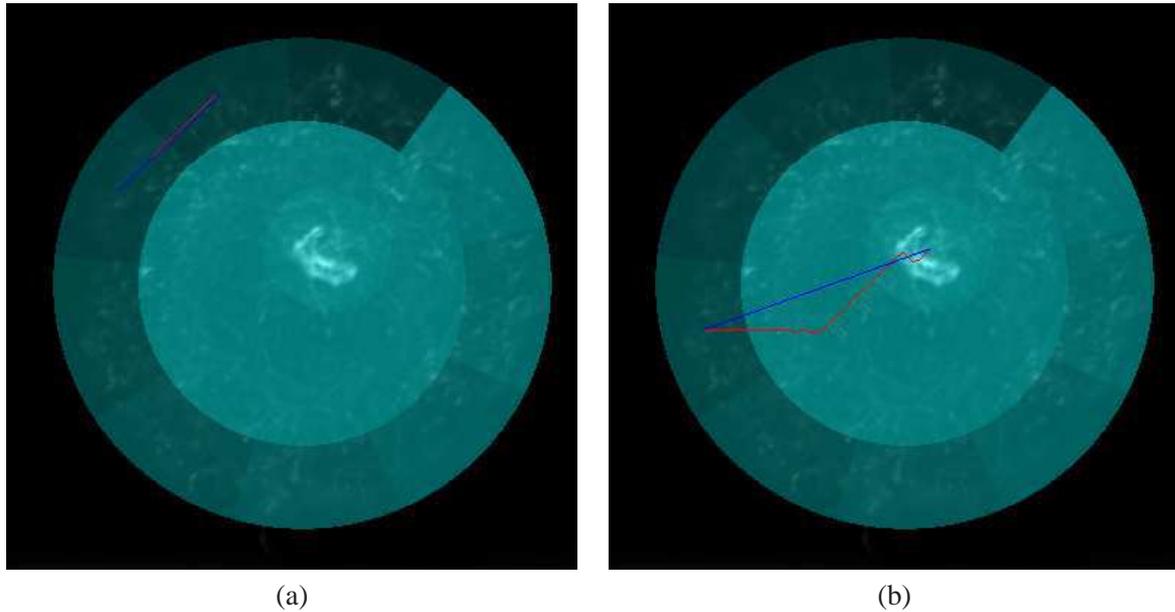


FIGURE 5.13: Comparaisons entre distance euclidienne et distance géodésique. La distance euclidienne est labellisée en bleu tandis que la distance géodésique est en rouge. Les différentes régions apparaissent en niveaux de vert et la carte PIM est représentée en niveaux de gris.

paire OD	n° arête									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$A \rightarrow B$	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

TABLE 5.2: Ligne de la matrice de routage binaire correspondant à la paire OD  $A \rightarrow B$  calculée sur le graphe de la figure 5.14.

### Routage unique

L'extraction du plus court chemin sur un graphe valué est un problème relativement bien connu en théorie des graphes et généralement résolu par l'algorithme de Dijkstra (Dijkstra 1959). Au cours du traitement, l'idée est de manipuler un sous-graphe, réduit au sommet origine à l'initialisation. À chaque étape, toutes les arêtes reliant les sommets du sous-graphe aux sommets du graphe non présents dans le sous-graphe sont considérées. Parmi celles-ci, l'arête qui présente la distance la plus petite entre le sommet origine et le sommet non représenté dans le sous-graphe auquel elle est reliée est choisie. Ces nouveaux sommet et arête sont alors inclus dans le sous-graphe. L'algorithme converge une fois que le sommet destination est atteint. La ligne de la matrice de routage correspondant à la paire OD  $A \rightarrow B$  de la figure 5.14 nous informe que le chemin le plus court s'effectue via l'arête n°5, et nous le reportons dans le tableau 5.2.

L'extraction du plus court chemin est rapide et facile à mettre en oeuvre en pratique. Malheureusement, cette idée préconçue est trop simple pour caractériser un trafic vésiculaire. Les vésicules se déplacent dans la cellule et ne respectent pas les compartiments empiriques définis. Il faut donc considérer un routage multiple pour les paires OD.

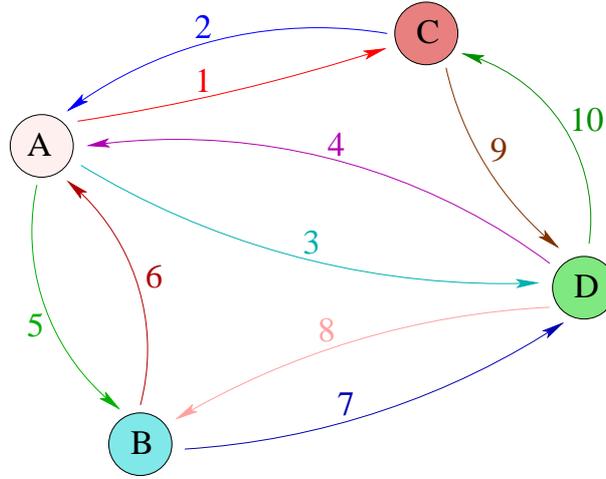


FIGURE 5.14: Graphe simple. Sur ce graphe, les sommets sont caractérisés par des lettres tandis que les arêtes sont labellisées par des chiffres.

### Probabilisation de la matrice de routage et topologie du graphe

Il semble aisé d'imaginer que toutes les vésicules n'empruntent pas le même chemin pour atteindre une même destination. La matrice de routage doit donc prendre en compte ce fait en considérant plusieurs chemins possibles pour une paire OD. Une solution est d'associer des probabilités aux différents chemins. Pour cela, la première étape consiste à extraire tous les chemins possibles joignant une origine à une destination. Nous adoptons une approche *en profondeur* ; il s'agit de parcourir de manière exhaustive le graphe depuis le sommet origine  $\vartheta_O$  vers le sommet destination  $\vartheta_D$  afin d'extraire tous les chemins. Plus précisément, on commence par choisir un sommet voisin de  $\vartheta_O$  dans le graphe. Si ce sommet n'est pas  $\vartheta_D$ , on choisit un nouveau sommet voisin. Cette étape est reproduite jusqu'à ce que le sommet  $\vartheta_D$  soit atteint. Un premier chemin depuis  $\vartheta_O$  jusqu'à  $\vartheta_D$  est obtenu et mis en mémoire. Dans une seconde étape, le sommet précédent  $\vartheta_D$  sur le chemin traité est à nouveau considéré. S'il existe un nouveau sommet voisin différent de  $\vartheta_D$ , alors l'algorithme de recherche précédent est repris. Dans le cas contraire, le sommet qui précède est examiné à son tour. Ces étapes sont effectuées jusqu'à ce que tout le graphe soit parcouru. L'approche *en profondeur* est alors achevée, et tous les chemins possibles pour relier l'origine  $\vartheta_O$  à la destination  $\vartheta_D$  dans le graphe sont identifiés. À chacun de ces chemins est associé un coût égal à la somme des coûts des arêtes du chemin. Pour définir la matrice de routage probabilisée, il suffit de poser :

$$P(\Gamma) \propto \exp\left(-\frac{C(\Gamma)}{K_0}\right), \quad (5.30)$$

où  $C(\Gamma) \in \mathbb{R}$  indique le coût du chemin  $\Gamma$  et  $K_0 \in \mathbb{R}$  est une constante. En pratique,  $K_0$  est différente pour chaque paire OD et elle est choisie comme le chemin de coût minimal pour la paire OD considérée. On privilégie ainsi les chemins les plus courts. Dans cette modélisation, plus le coût d'un chemin est élevé, plus la probabilité est faible. Les probabilités associées aux chemins permettent de définir les éléments de la matrice de routage probabilisée. Soit  $\{\Gamma_{i,e}^j, i \in \{1, \dots, N_e^j\}\}$  l'ensemble des  $N_e^j$  chemins utilisant l'arête  $e$  pour la paire OD  $j$ , et soit  $P(\Gamma_{i,e}^j)$  la probabilité associée au chemin  $\Gamma_{i,e}^j$ . Chaque

paire OD	n° arête									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A → B	$\frac{P_{ACDB}}{P_{total}}$	0	$\frac{P_{ADB}}{P_{total}}$	0	$\frac{P_{AB}}{P_{total}}$	0	0	$\frac{P_{ADB} + P_{ACDB}}{P_{total}}$	$\frac{P_{ACDB}}{P_{total}}$	0

TABLE 5.3: Rangée de la matrice de routage non binaire correspondant à la paire OD  $A \rightarrow B$  calculée sur le graphe de la figure 5.14.

élément  $a_e^j$  de la matrice de routage non binaire  $\mathbf{A}$  est alors défini comme suit :

$$a_e^j = \frac{\sum_{i=1}^{N_e^j} P(\Gamma_{i,e}^j)}{\sum_{\tilde{e}=1}^r \sum_{i=1}^{N_{\tilde{e}}^j} P(\Gamma_{i,\tilde{e}}^j)}. \quad (5.31)$$

Pour illustrer cette définition, on s'intéresse à la paire OD  $A \rightarrow B$  de la figure 5.14. Trois chemins sont possibles pour atteindre le sommet  $B$  depuis le sommet origine  $A$  :

- $A \rightarrow B$  auquel on associe la probabilité  $P_{AB}$ ,
- $A \rightarrow D \rightarrow B$  auquel on associe la probabilité  $P_{ADB}$ ,
- $A \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow B$  auquel on associe la probabilité  $P_{ACDB}$ .

La ligne de la matrice de routage correspondant à la paire OD  $A \rightarrow B$  est reportée dans le tableau 5.3, où  $P_{total} = P_{AB} + P_{ADB} + P_{ACDB}$ .

À présent, la matrice de routage prend en compte plusieurs chemins possibles, pondérés suivant une distance euclidienne ou géodésique. Dans un cas, seule la topologie du graphe est prise en compte. Dans l'autre cas, seul le chemin emprunté fréquemment par les vésicules est utilisé. Par ailleurs, les comptages de vésicules au niveau des frontières sont également accessibles, voire pertinents pour caractériser les chemins en question.

### Probabilisation de la matrice de routage en fonction des échanges de vésicules aux frontières

Les échanges  $\mathbf{y}^{arête}$  moyens de vésicules entre régions caractérisent le trafic au niveau des frontières. L'intensité du trafic observé sur une arête est un bon indicateur de la contribution au trafic global, voire de son implication dans le routage des paires OD. On fait aussi remarquer que le trafic observé sur un chemin ne peut être supérieur au trafic observé sur chacune des arêtes de ce chemin. En particulier, si les échanges sont nuls sur l'une des arêtes d'un chemin, alors il ne peut y avoir de trafic sur ce chemin. Le trafic observé sur les différents chemins possibles pour joindre une origine à une destination est donc intimement liés aux échanges de vésicules mesurés sur les arêtes. Nous illustrons ce constat sur la figure 5.15. Soit un trafic observé sur une cellule (contrainte par un *micro-patron* de forme circulaire) pour laquelle les échanges  $\mathbf{y}^{arête}$  moyennés au cours du temps sont calculés. Les 6 régions sont représentées par des couleurs différentes et sont identifiées par des lettres. Nous nous intéressons à la paire  $A \rightarrow C$  et cinq chemins sont possibles :

- $A \rightarrow B \rightarrow C$ ,
- $A \rightarrow B \rightarrow D \rightarrow C$ ,
- $A \rightarrow B \rightarrow E \rightarrow C$ ,
- $A \rightarrow B \rightarrow F \rightarrow D \rightarrow C$ ,
- $A \rightarrow B \rightarrow F \rightarrow E \rightarrow C$ .

Seuls les échanges  $\mathbf{y}^{arête}$  significatifs sont retenus sur la figure 5.15 et labellisés par des flèches noires. Comme l'essentiel du trafic est issu de l'appareil de Golgi en direction de la périphérie, les échanges

de vésicules sont importants de la région  $B$  vers les régions  $C, D, E$  et  $F$ . Ils sont plus faibles entre les régions périphériques. La probabilité d'emprunter le chemin  $A \rightarrow B \rightarrow C$  est donc la plus élevée. Ainsi les échanges les plus faibles mesurés le long d'un chemin permettent de calculer une borne inférieure pour le trafic potentiel sur ce chemin. Cette information est utile pour fixer les probabilités attribuées à chaque chemin. Dans notre exemple, il n'y a pas d'échanges de vésicules entre les régions  $F$  et  $E$ , donc le trafic est nul sur le chemin  $A \rightarrow B \rightarrow F \rightarrow E \rightarrow C$ . Le nombre minimal de vésicules empruntant le chemin  $A \rightarrow B \rightarrow F \rightarrow D \rightarrow C$  dépend des échanges entre  $D$  et  $C$ , et est égal à 0,2 vésicule par image. De manière analogue, le nombre minimal de vésicules utilisant le chemin  $A \rightarrow B \rightarrow E \rightarrow C$  est de 0,1 vésicule par image, le chemin  $A \rightarrow B \rightarrow D \rightarrow C$ , 0,2 vésicule par image et le chemin  $A \rightarrow B \rightarrow C$ , 0,8 vésicule par image. Il suit que les probabilités pour qu'une vésicule emprunte l'un des 5 chemins sont :

$$\begin{aligned}
P_{ABC} &= \frac{0,8}{0,8 + 0,2 + 0,1 + 0,2} = \frac{0,8}{1,3}, \\
P_{ABDC} &= \frac{0,2}{1,3}, \\
P_{ABEC} &= \frac{0,1}{1,3}, \\
P_{ABFDC} &= \frac{0,2}{1,3}, \\
P_{ABFEC} &= 0.
\end{aligned} \tag{5.32}$$

Une fois établies les probabilités associées à chaque chemin, la matrice de routage est caractérisée de la même manière que dans la section précédente. Soit  $\{\Gamma_i^j, i \in \{1, \dots, N_j\}\}$  l'ensemble des  $N_j$  chemins possibles pour une paire OD  $j$ . Pour un chemin donné  $\Gamma_i^j$ , soit  $\{e_{\Gamma_i^j, 1}, \dots, e_{\Gamma_i^j, N_i^j}\}$  l'ensemble des arêtes constituant le chemin  $\Gamma_i^j$  où  $N_i^j$  est le cardinal de cet ensemble. La probabilité associée au chemin  $\Gamma_i^j$  est égale à :

$$P(\Gamma_i^j) = \frac{\inf_k y^{\text{arête}}(e_{\Gamma_i^j, k})}{\sum_{i'} \inf_k y^{\text{arête}}(e_{\Gamma_{i'}^j, k})}, \tag{5.33}$$

où  $y^{\text{arête}}(e_{\Gamma_i^j, k})$  désigne les échanges moyens temporels mesurés sur l'arête  $e_{\Gamma_i^j, k}$ . Soit  $\{\Gamma_{i,e}^j, i \in \{1, \dots, N_e^j\}\}$  l'ensemble des chemins utilisant l'arête  $e$  pour la paire OD  $j$ , et soit  $P(\Gamma_{i,e}^j)$  la probabilité associée au chemin  $\Gamma_{i,e}^j$ . Chaque élément  $a_e^j$  de la matrice de routage non binaire  $\mathbf{A}$  est alors défini comme suit :

$$a_e^j = \frac{\sum_{i=1}^{N_e^j} P(\Gamma_{i,e}^j)}{\sum_{\tilde{e}=1}^r \sum_{i=1}^{N_{\tilde{e}}^j} P(\Gamma_{i,\tilde{e}}^j)}. \tag{5.34}$$

Depuis le début de ce chapitre, nous avons décrit une manière de partitionner le domaine de l'image, d'estimer le nombre de vésicules se déplaçant d'une région à une autre, et nous avons proposé plusieurs solutions pour définir la matrice de routage. Tous les éléments nécessaires à l'estimation des paires OD par tomographie de réseaux sont désormais identifiés.

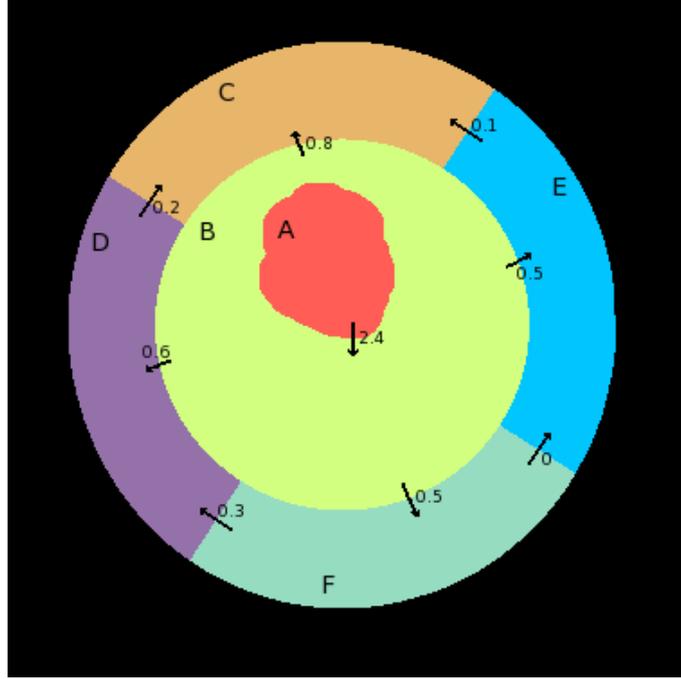


FIGURE 5.15: Échanges  $y^{arête}$  observés au cours d'une séquence de vidéo-microscopie pour une cellule contrainte par un micro-patron de forme circulaire. Les six régions sont représentées par une couleur différente et sont identifiées par des lettres. Les échanges entre régions sont symbolisés par des flèches. L'intensité des échanges est mentionnée également.

## 5.6 Estimation du trafic sur les paires origine-destination

L'équation fondamentale de la tomographie de réseaux est de la forme :

$$\mathbf{y}^{arête} = \mathbf{A}\mathbf{v}^{OD}. \quad (5.35)$$

Le système d'équations (5.35) comporte  $c$  équations pour  $r$  inconnues, avec  $c > r$ . L'estimation de  $\mathbf{v}^{OD}$  nécessite donc d'intégrer des contraintes pour mieux caractériser la solution.

### 5.6.1 Stratégies d'estimation du trafic sur les paires origine-destination

Le vecteur  $\mathbf{v}^{OD}$  représente les volumes de trafic entre les origines et les destinations. Ces proportions sont par définition positives, ce qui réduit l'espace des solutions possibles. Il est nécessaire d'introduire d'autres hypothèses afin de mieux estimer le trafic sur les paires OD.

#### Hypothèse de Poisson

Vardi (1996) suppose que les proportions de trafic sur les paires OD sont des variables aléatoires et suivent une loi de Poisson. Cette hypothèse se traduit par l'énoncé des contraintes :

$$\text{cov}(y_e^{arête}, y_{e'}^{arête}) = \sum_{j=1}^c \alpha_e^j \alpha_{e'}^j v_j^{OD}, \quad 1 \leq e \leq e' \leq r, \quad (5.36)$$

où  $\text{cov}(y_e^{arête}, y_{e'}^{arête})$  désigne la covariance entre les éléments  $e$  et  $e'$  de la matrice  $\mathbf{y}^{arête}$ . Une fois combiné au système d'équations (5.35), nous disposons désormais de  $\frac{r(r+3)}{2}$  équations linéaires auxquelles il

convient d'ajouter la contrainte de positivité sur les éléments de  $\mathbf{v}^{OD}$ . D'une manière plus compacte, nous avons :

$$\begin{pmatrix} \mathbf{y}^{arête} \\ \mathbf{s}_{cov} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \mathbf{A} \\ \mathbf{B} \end{pmatrix} \mathbf{v}^{OD}, \quad \text{sous la contrainte } v_j^{OD} \geq 0, \quad \forall j = 1, \dots, c, \quad (5.37)$$

où  $\mathbf{s}_{cov}$  est la matrice de covariance réécrite comme un vecteur de longueur  $\frac{r(r+1)}{2}$ , et  $\mathbf{B}$  est une matrice de dimension  $\frac{r(r+1)}{2} \times c$  où la colonne  $n^\circ(er + e' + 1 - \frac{i(e+1)}{2})$  est définie comme le produit, élément par élément, des lignes  $e$  et  $e'$  de la matrice  $\mathbf{A}$ . Vardi (1996) propose de résoudre ce système par la méthode EM tandis que Boyd et al. (1999) privilégient l'algorithme des projections convexes. Nous utilisons plus volontiers la méthode des moindres carrés avec contrainte de positivité qui a donné davantage de satisfaction en pratique (Lawson & Hanson 1974).

### Contrainte de parcimonie

Le nombre de paires OD possibles croît très rapidement avec le nombre d'arêtes. Par exemple, pour une partition représentée par 11 régions, on dénombre  $r = 40$  arêtes et  $c = 1560$  paires OD. Cependant, le nombre de paires OD sur lesquelles le trafic est significatif est moins élevé. Une contrainte de parcimonie doit donc permettre de limiter le nombre de paires OD réellement utiles. On résout alors le problème d'optimisation suivant (Dantzig, Orden & Wolfe 1955) :

$$\min_{\mathbf{v}^{OD}} \lambda \mathbf{v}^{OD} \quad \text{sous la contrainte} \quad \begin{cases} \mathbf{y}^{arête} = \mathbf{A} \mathbf{v}^{OD}, \\ v_j^{OD} \geq 0, \quad j \in \{1, \dots, c\}. \end{cases} \quad (5.38)$$

Si les origines ou les destinations des véhicules sont connues *a priori*, il est possible d'introduire cette contrainte directement dans la définition de la matrice de routage.

### Origine(s) et/ou destination(s) connue(s)

Si les origines ou les destinations sont connues, c'est-à-dire spécifiées par l'expert, le problème est mieux contraint et probablement plus intéressant en pratique. Cette connaissance *a priori* est prise en compte directement par le schéma d'estimation. Cela revient en quelque sorte à spécifier une contrainte de parcimonie puisque cette contrainte limite le nombre possible de paires OD. Dans un cas simple, supposons que le sommet  $\vartheta_O$  est la seule région origine. Alors, toutes les paires OD ayant pour sommet origine un sommet différent de  $\vartheta_O$  sont ignorées. Plus formellement, soit  $\mathcal{O}$  l'ensemble des paires OD ayant pour origine le sommet  $\vartheta_O$ , et soit  $\mathcal{OD}$  l'ensemble de toutes les paires OD. Les éléments de la matrice de routage  $\mathbf{A}$  sont ensuite redéfinis de la manière suivante :

$$a_e^j = 0, \quad \forall e \in \{1, \dots, r\}, \forall j \in \mathcal{OD} \setminus \mathcal{O}, \quad (5.39)$$

où  $\mathcal{OD} \setminus \mathcal{O}$  représente l'ensemble des paires OD qui ont pour origine un autre sommet que  $\vartheta_O$ . Il est évidemment possible de définir plusieurs sommets origine, ainsi qu'un ou plusieurs sommets destination en suivant le même procédé.

### Évaluation des différentes stratégies

Nous pouvons maintenant évaluer les performances de l'estimation du trafic sur les paires OD selon le principe de la tomographie de réseaux. Comme il n'existe pas de vérité-terrain pour des séquences d'images réelles, nous générons des séquences artificielles pour lesquelles le trafic sur les paires OD  $\mathbf{v}^{OD}$ , mais aussi le nombre de véhicules  $\mathbf{Y}^{arête}$  à chaque instant sont parfaitement connus. Afin d'éprouver les

n° paire OD	paire OD	n° paire OD	paire OD	n° paire OD	paire OD
0	$C \rightarrow D$	10	$F \rightarrow C$	20	$B \rightarrow C$
1	$C \rightarrow F$	11	$F \rightarrow D$	21	$B \rightarrow D$
2	$C \rightarrow E$	12	$F \rightarrow E$	22	$B \rightarrow F$
3	$C \rightarrow B$	13	$F \rightarrow B$	23	$B \rightarrow E$
4	$C \rightarrow A$	14	$F \rightarrow A$	24	$B \rightarrow A$
5	$D \rightarrow C$	15	$E \rightarrow C$	25	$A \rightarrow C$
6	$D \rightarrow F$	16	$E \rightarrow D$	26	$A \rightarrow D$
7	$D \rightarrow E$	17	$E \rightarrow F$	27	$A \rightarrow F$
8	$D \rightarrow B$	18	$E \rightarrow B$	28	$A \rightarrow E$
9	$D \rightarrow A$	19	$E \rightarrow A$	29	$A \rightarrow B$

TABLE 5.4: Numéros des paires OD définies pour la partition illustrée sur la figure 5.15.

différentes modélisations servant à établir la matrice de routage et les schémas d'estimation des paires OD, nous analysons les séquences simulées en utilisant directement les comptages réels et moyennés au cours du temps, c'est-à-dire le vecteur  $\mathbf{y}^{arête}$ .

Dans un premier temps, nous générons dix séquences composées de 250 images  $380 \times 380$  (figure 5.16 (a)) sur un réseau relativement complexe (figure 5.16 (b)) pour une cellule de forme circulaire. Nous choisissons seulement 4 paires OD. Un seul chemin est défini pour chacune des paires (figure 5.16 (b)). La dynamique des vésicules est simple aussi et nous n'avons pas simulé de comportements soudains tels que le déplacement selon un comportement "stop-and-go", l'état pseudo-stable, le rebroussement de chemin, ou la fusion de vésicules. Les vésicules ne sont générées qu'à partir du premier instant de la séquence (il n'y a pas de trafic avant l'enregistrement). Par ailleurs, elles arrivent toutes à destination avant la fin de la séquence. Cette contrainte est nécessaire pour garantir des trajectoires complètes. Pour cette première évaluation, la partition choisie est simple et composée de 6 régions (figure 5.16 (b)). Dans cet exemple, les quatre trajectoires coïncident avec les chemins les plus courts dans le graphe. Par conséquent, une matrice de routage binaire (plus court chemin) est suffisante pour l'estimation du trafic sur les paires OD. Les numéros associés aux paires OD sont reportés dans le tableau 5.4. Les paires OD mesurées dans ces séquences d'images correspondent aux paires OD n°25-28. Les résultats présentés sur la figure 5.16 (c) démontrent l'intérêt de la contrainte de parcimonie puisque les résultats sont exacts. En revanche, l'estimation effectuée sous une hypothèse de Poisson est incorrecte. Les paires OD identifiées (paires OD n°20-23 et n°29) correspondent aux échanges au niveau des frontières. Cette hypothèse ne semble donc pas adaptée à l'estimation du trafic intracellulaire, même pour des cas simples et simulés.

Dans une seconde évaluation, nous considérons à nouveau dix simulations générées sur le même graphe en considérant cette fois huit paires OD (figure 5.17 (a)). Bien que les trajectoires des vésicules soient toujours uniques pour chaque paire OD sur le réseau, l'une d'elles ne coïncide pas avec le chemin le plus court. En effet, on remarque sur la figure 5.17 (b) qu'une des deux paires OD générées entre les régions A et D (correspondant à la paire OD n°26) traverse quatre régions, alors que les autres paires OD générées ne traversent que trois régions. Par conséquent, l'estimation sur la base d'un routage unique ne peut pas produire de résultats exacts (figure 5.17 (c)). La paire OD n°0 est identifiée comme étant un lieu de trafic n'existant pas dans la simulation ; les volumes de trafic sur les paires OD n°25-28 sont aussi incorrects. Ces erreurs ont pour origine les échanges liés au déplacement des vésicules qui traversent quatre régions sur leur trajectoire. L'estimation sur la base d'une matrice de routage probabilisée, fonction des chemins minimaux, donne des résultats encore plus décevants. Ce manque de performance s'explique par le fait que le chemin minimal entre deux régions ne prend en compte que les vésicules ayant une trajectoire directe. Or, seul un faible nombre de vésicules présente cette caractéristique. Le chemin minimal

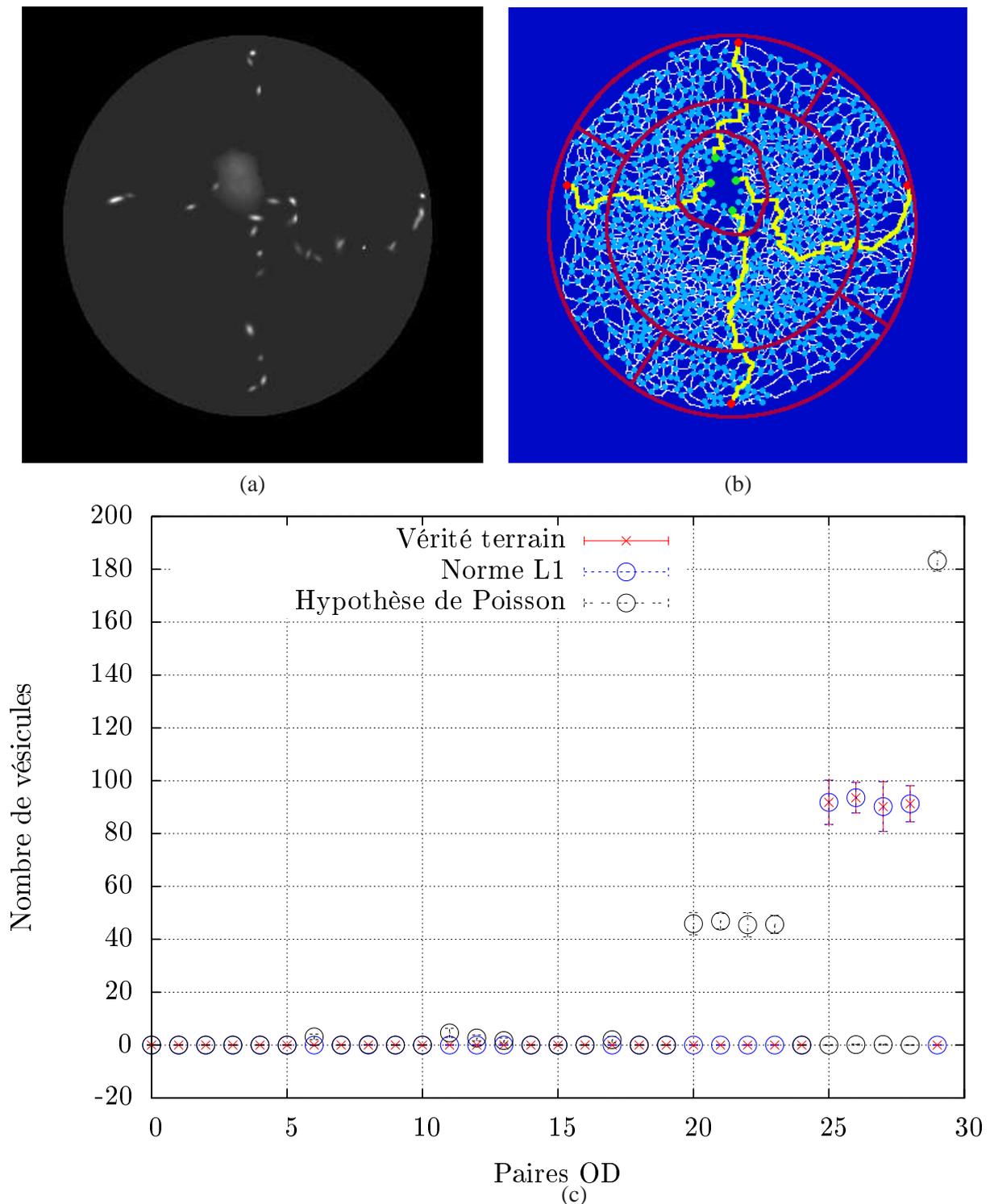


FIGURE 5.16: (a) Image n° 50 extraite d'une des dix séquences d'images simulées; (b) sommets (bleu ciel) et arêtes (blanc) du graphe, ainsi que sommets origine (vert) et sommets destination (rouge) utilisés pour générer les séquences d'images. Seuls les chemins les plus courts pour les 4 paires OD considérées sont empruntés par les vésicules (courbes jaunes dans l'image (b)); (c) estimation (moyenne et écart-type) des paires OD sur les séquences d'images simulées en considérant la partition illustrée en rouge sur l'image (b).

n° paire OD	paire OD	n° paire OD	paire OD
0	$A \rightarrow B$	10	$C \rightarrow E$
1	$A \rightarrow C$	11	$C \rightarrow D$
2	$A \rightarrow D$	12	$D \rightarrow A$
3	$A \rightarrow E$	13	$D \rightarrow B$
4	$B \rightarrow A$	14	$D \rightarrow C$
5	$B \rightarrow C$	15	$D \rightarrow E$
6	$B \rightarrow D$	16	$E \rightarrow A$
7	$B \rightarrow E$	17	$E \rightarrow B$
8	$C \rightarrow A$	18	$E \rightarrow C$
9	$C \rightarrow B$	19	$E \rightarrow D$

TABLE 5.5: Numéros des paires OD définies pour la partition illustrée sur la figure 5.19 (e).

n'est pas assez représentatif de l'ensemble des trajectoires des vésicules pour caractériser les différents chemins d'une paire OD. Les résultats sur la base d'une matrice de routage probabilisée qui dépend du trafic sont exacts. Ici, le fait de considérer les échanges observés sur les frontières permet d'intégrer les échanges entre la région C et la région D pour la paire OD n°26.

À présent nous proposons une évaluation sur dix séquences générées de manière analogue aux précédentes (mêmes paires OD, routage unique). Cette fois-ci, les simulations sont enregistrées alors qu'il y a déjà du trafic, et s'arrêtent alors que le trafic continue. Ce type d'acquisition se traduit par l'observation en début et en fin de séquence de trajectoires partielles : les vésicules déjà présentes à l'instant initial ont déjà parcourues une partie de leur trajectoire ; les vésicules générées à la fin de la séquence n'ont pas pu parcourir entièrement leur trajectoire. Les résultats sont présentés sur la figure 5.18. Sur la figure 5.18 (a), on remarque qu'en plus des paires OD que nous avons imposées (paires OD n°25-28), nous observons un volume significatif sur les paires OD n°0, n°20-23, et n°29. Ce trafic supplémentaire correspond aux trajectoires partielles des vésicules en début de séquence (paires OD n°0 et n°20-23) et en fin de séquence (paire OD n°29). L'algorithme d'estimation semble mettre en relation les trajectoires partielles observées en début et en fin de séquence afin d'estimer les paires OD simulées. Ainsi, l'approche par tomographie de réseaux permet d'estimer les trajectoires cycliques observées sur la séquence d'images générée, définies par les paires OD utilisées pour la simulation. Ce constat est très intéressant, puisque l'hypothèse retenue pour décrire le comportement des protéines Rab6 s'appuie sur un comportement cyclique du trafic vésiculaire. Par la suite, nous comparons directement les proportions de trafic générées et estimées pour les paires OD dans les simulations pour évaluer notre méthode. Cette comparaison est présentée sur la figure 5.18 (b).

Dans une nouvelle évaluation, nous considérons dix séquences d'images avec les paires OD définies sur la figure 5.19 (c), en utilisant un routage multiple et en simulant toutes les caractéristiques dynamiques des vésicules ("stop-and-go", état *pseudo-stable*, fusion de vésicules, rebroussement de chemin). Deux images extraites d'une de ces séquences d'images sont présentées sur la figure 5.19 (a-b). Ces séquences sont beaucoup plus complexes que celles générées précédemment. Le comportement dynamique des vésicules est très proche de celui observé dans des séquences d'images réelles. Dans un premier temps, l'estimation est effectuée sur une partition simple composée de six régions (figure 5.19 (c)). Les numéros associés aux paires OD sont reportés dans le tableau 5.5. Les résultats obtenus pour cette partition sont illustrés sur la figure 5.20. Bien que les résultats ne soient pas exacts, les quatre paires OD générées (paires OD n°16-18) sont clairement identifiées, et les proportions de trafic sur chacune de ces paires sont proches de celles simulées. Le trafic est également estimé sur d'autres paires OD, mais dans des proportions moindres. Dans un second temps, nous estimons le trafic pour une partition plus

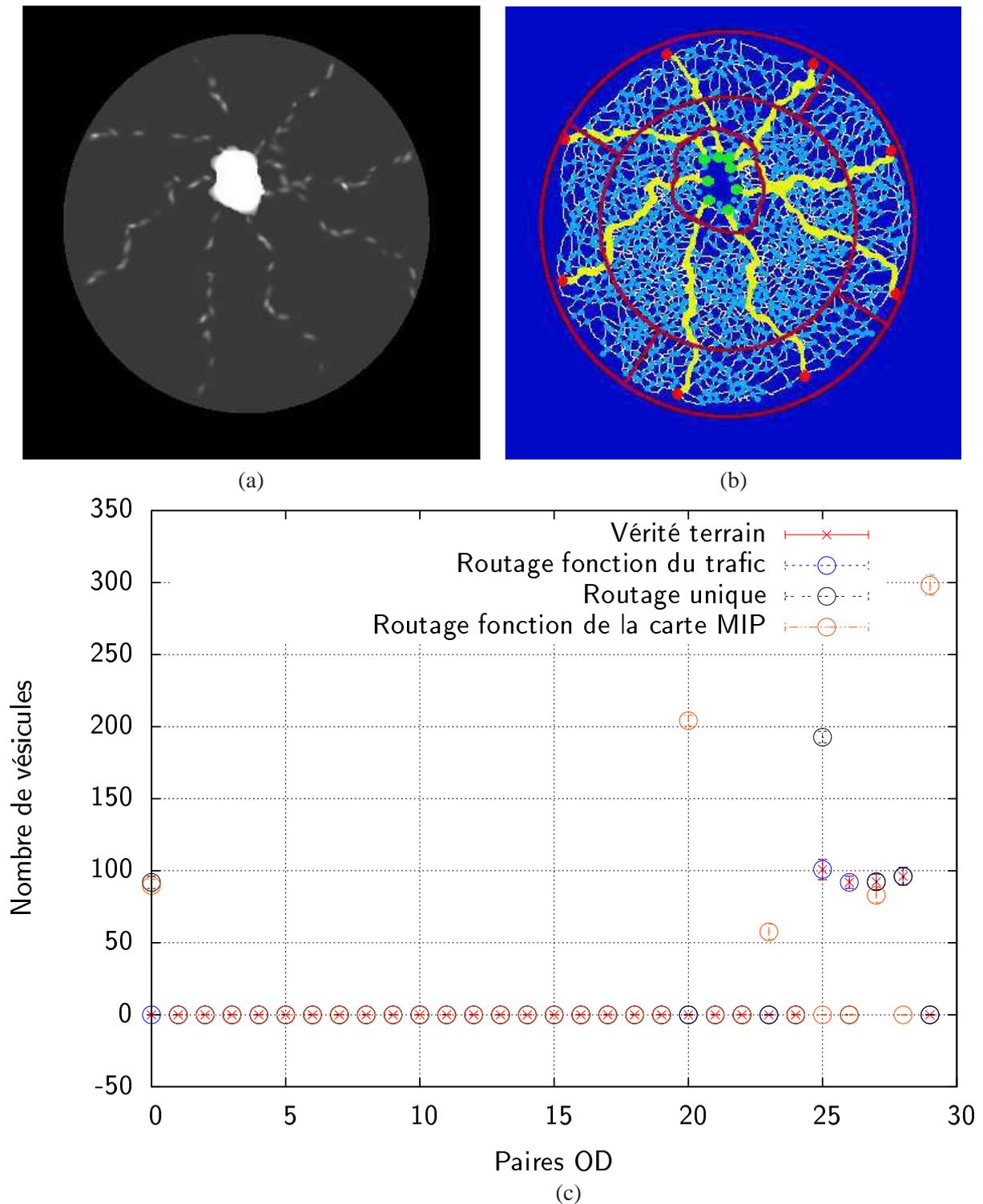


FIGURE 5.17: (a) Image n° 50 extraite d'une des dix séquences d'images simulées; (b) sommets (bleu ciel) et arêtes (blanc) du graphe, ainsi que sommets origine (vert) et sommets destination (rouge) utilisés pour générer les séquences d'images. Seuls les chemins les plus courts pour les 8 paires OD considérées sont empruntés par les vésicules (courbes jaunes dans l'image (b)); (c) estimation (moyenne et variance) des paires OD sur les séquences d'images simulées en considérant la partition illustrée en rouge sur l'image (b).

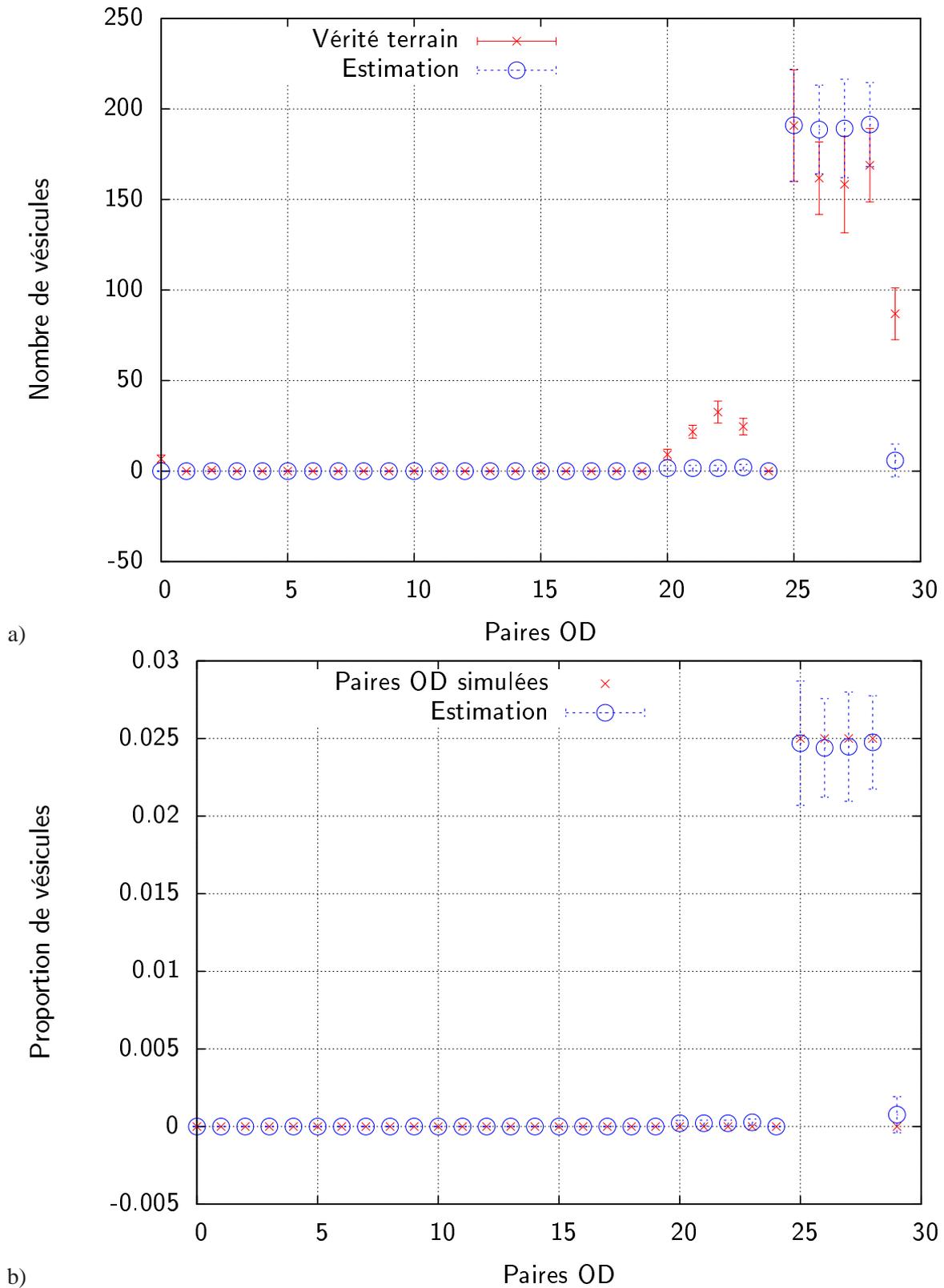


FIGURE 5.18: (a) Comparaison des volumes de trafic observés et estimés sur les paires OD pour dix séquences d'images simulées avec le graphe, les origines et destinations, et la partition illustrés sur la figure 5.17 (b); (b) comparaison des proportions de trafic simulées et estimées sur les paires OD pour les dix même séquences d'images simulées.

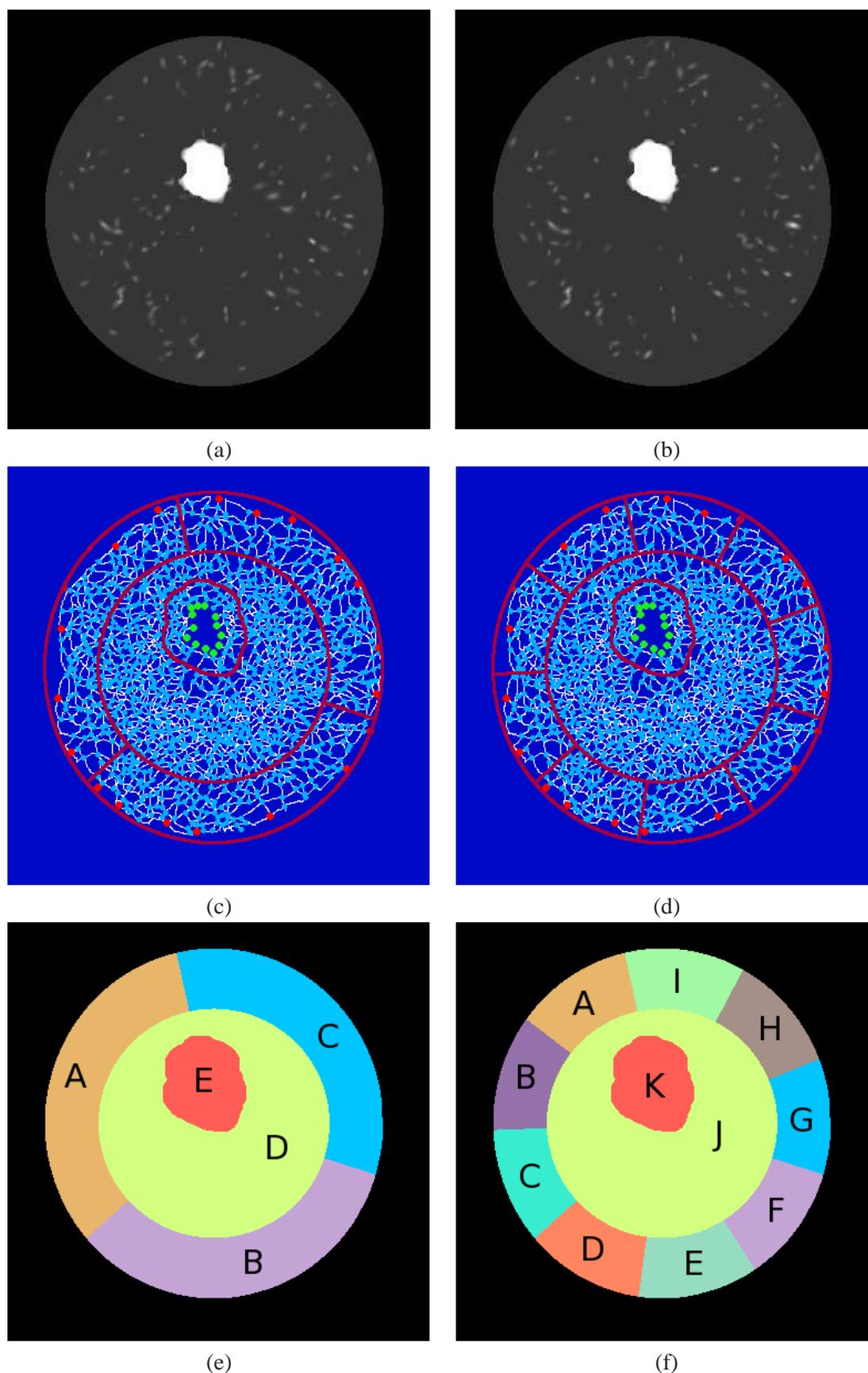
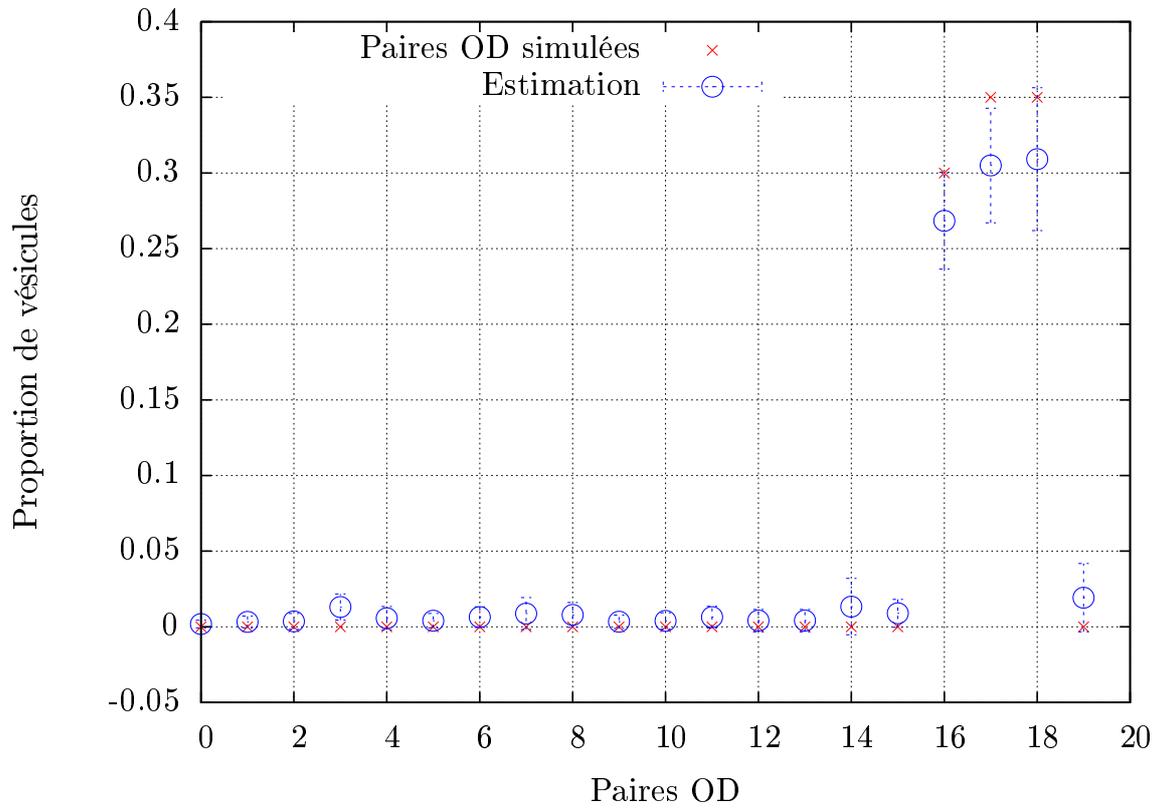
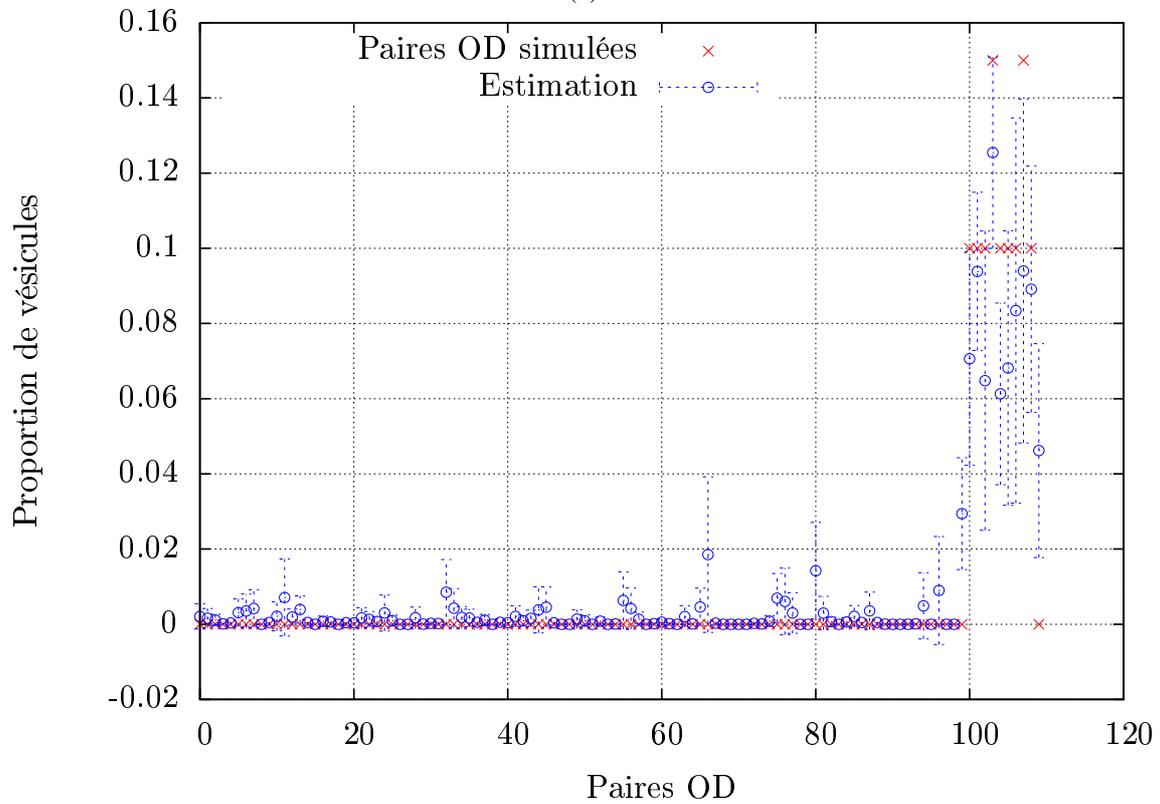


FIGURE 5.19: (a-b) Images n° 50 (a) et n° 100 (b) d'une des dix séquences d'images simulées ; (c-d) sommets (bleu ciel) et arêtes (blanc), ainsi que sommets origine (vert) et destination (rouge) utilisés pour générer les séquences d'images ; (e) labels des régions de la partition (c) ; (f) labels des régions de la partition (d).



(a)



(b)

FIGURE 5.20: Estimation des proportions de trafic générées sur les paires OD d'après le graphe et les origines et destinations illustrées sur les figures 5.19 (c-d) sur la partition (a) de la figure 5.19 (c); (b) de la figure 5.19 (d).

n° OD	OD						
0	$A \rightarrow B$	28	$C \rightarrow J$	56	$F \rightarrow H$	83	$I \rightarrow D$
1	$A \rightarrow C$	29	$C \rightarrow K$	57	$F \rightarrow I$	84	$I \rightarrow E$
2	$A \rightarrow D$	30	$D \rightarrow A$	58	$F \rightarrow J$	85	$I \rightarrow F$
3	$A \rightarrow E$	31	$D \rightarrow B$	59	$F \rightarrow K$	86	$I \rightarrow G$
4	$A \rightarrow F$	32	$D \rightarrow C$	60	$G \rightarrow A$	87	$I \rightarrow H$
5	$A \rightarrow G$	33	$D \rightarrow E$	61	$G \rightarrow B$	88	$I \rightarrow J$
6	$A \rightarrow H$	34	$D \rightarrow F$	62	$G \rightarrow C$	89	$I \rightarrow K$
7	$A \rightarrow I$	35	$D \rightarrow G$	63	$G \rightarrow D$	90	$J \rightarrow A$
8	$A \rightarrow J$	36	$D \rightarrow H$	64	$G \rightarrow E$	91	$J \rightarrow B$
9	$A \rightarrow K$	37	$D \rightarrow I$	65	$G \rightarrow F$	92	$J \rightarrow C$
10	$B \rightarrow A$	38	$D \rightarrow J$	66	$G \rightarrow H$	93	$J \rightarrow D$
11	$B \rightarrow C$	39	$D \rightarrow K$	67	$G \rightarrow I$	94	$J \rightarrow E$
12	$B \rightarrow D$	40	$E \rightarrow A$	68	$G \rightarrow J$	95	$J \rightarrow F$
13	$B \rightarrow E$	41	$E \rightarrow B$	69	$G \rightarrow K$	96	$J \rightarrow G$
14	$B \rightarrow F$	42	$E \rightarrow C$	70	$H \rightarrow A$	97	$J \rightarrow H$
15	$B \rightarrow G$	43	$E \rightarrow D$	71	$H \rightarrow B$	98	$J \rightarrow I$
16	$B \rightarrow H$	44	$E \rightarrow F$	72	$H \rightarrow C$	99	$J \rightarrow K$
17	$B \rightarrow I$	45	$E \rightarrow G$	73	$H \rightarrow D$	100	$K \rightarrow A$
18	$B \rightarrow J$	46	$E \rightarrow H$	74	$H \rightarrow E$	101	$K \rightarrow B$
19	$B \rightarrow K$	47	$E \rightarrow I$	75	$H \rightarrow F$	102	$K \rightarrow C$
20	$C \rightarrow A$	48	$E \rightarrow J$	76	$H \rightarrow G$	103	$K \rightarrow D$
21	$C \rightarrow B$	49	$E \rightarrow K$	77	$H \rightarrow I$	104	$K \rightarrow E$
22	$C \rightarrow D$	50	$F \rightarrow A$	78	$H \rightarrow J$	105	$K \rightarrow F$
23	$C \rightarrow E$	51	$F \rightarrow B$	79	$H \rightarrow K$	106	$K \rightarrow G$
24	$C \rightarrow F$	52	$F \rightarrow C$	80	$I \rightarrow A$	107	$K \rightarrow H$
25	$C \rightarrow G$	53	$F \rightarrow D$	81	$I \rightarrow B$	108	$K \rightarrow I$
26	$C \rightarrow H$	54	$F \rightarrow E$	82	$I \rightarrow C$	109	$K \rightarrow J$
27	$C \rightarrow I$	55	$F \rightarrow G$				

TABLE 5.6: Numéros des paires OD définies pour la partition illustrée sur la figure 5.19 (f).

complexe composée de onze régions (figure 5.19 (d)). Les numéros associés aux paires OD sont reportés dans le tableau 5.6. Dans ce cas, les résultats (figure 5.20 (a)) sont beaucoup moins satisfaisants. En particulier, la proportion de trafic estimée pour les paires OD n°99 et n°109 pour lesquelles aucun trafic n'est attendu est comparable à celle estimée pour les paires OD n°100-108, qui sont elles logiquement espérées. Une partition plus fine semble mettre en difficulté notre schéma d'estimation. Une approche hiérarchique semble être une voie prometteuse pour y remédier.

### 5.6.2 Approche hiérarchique pour l'estimation des paires origine-destination

Les bons résultats obtenus avec un nombre faible de régions et les résultats moins convaincants lorsque le domaine de l'image est davantage segmenté militent pour une stratégie hiérarchique. Des approches de ce type ont été développées dans le domaine des réseaux de télécommunications (Cao, Scott, Wiel, Yu & Zhu 2000, Castro et al. 2004). Castro et al. (2004) estiment dans un premier temps le trafic sur des sous-graphes ; les sous-graphes sont ensuite agrégés pour déterminer le trafic global. Dans notre cas, l'idée relativement naturelle consiste à utiliser les résultats d'estimation de trafic sur une

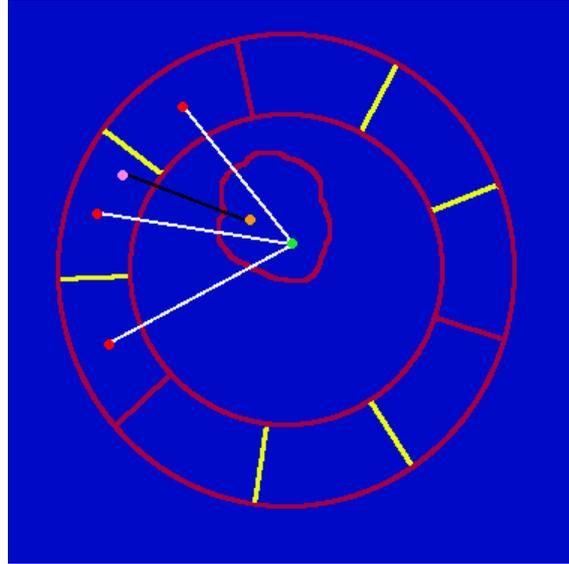


FIGURE 5.21: Partition de niveau 0 (frontières rouges) et de niveau 1 (frontières rouges et jaunes). La paire OD reliant la région associée à l'appareil de Golgi à la région de gauche dans la partition de niveau 0 est représentée en noir. Les 3 paires OD définies dans la partition de niveau 1 qui sont incluses dans la paire OD représentée en noir sont étiquetées en blanc.

partition grossière afin d'estimer le trafic sur un domaine segmenté plus finement. Une approche de ce type nécessite un emboîtement des partitions. Les applications visées concernent des cellules contraintes par un *micro-patron* de forme circulaire, ou en forme d'arbalète. Il est établi que l'essentiel de l'activité membranaire est mesurable au niveau de l'appareil de Golgi. Nous associons toujours une région à l'appareil de Golgi, elle-même enclavée dans une couronne (section 5.3.2). Ces deux régions restent inchangées quel que soit le niveau de hiérarchisation adopté, afin de caractériser au mieux cette partie de la cellule où le trafic est intense. Une partition plus fine ne présente par ailleurs que peu d'intérêt puisque le but est avant tout de décrire le trafic en import, en export ainsi que les échanges transversaux (section 5.3.2). On sait que les régions privilégiées de destination des vésicules dans les cellules contraintes par des *micro-patrons* en forme d'arbalète sont localisées aux trois extrémités de l'arbalète. Il paraît naturel de fixer 3 régions périphériques au moins, soit donc 5 régions pour la partition de niveau minimal. Le passage au niveau hiérarchique supérieur est effectué par la division de chaque région périphérique en 3 nouvelles régions, soit donc 11 régions pour le niveau 1, 29 régions pour le niveau 2, et ainsi de suite.

Les partitions étant définies, il reste à proposer un schéma d'estimation hiérarchique. Soit une partition minimale composée de 5 régions, 14 arêtes et 20 paires OD. La partition supérieure est constituée de 11 régions, 26 arêtes et 110 paires OD. Les 110 paires OD du niveau 1 sont incluses dans les 20 paires OD du niveau 0. Sur la figure 5.21, les 3 paires OD appartenant au niveau 1, et représentées par des segments blancs sont incluses dans la paire OD du niveau 0, caractérisée par un segment noir. Les estimations obtenues au niveau 0 sont en fait exploitables pour l'estimation des paires OD au niveau 1 : tout d'abord, les paires OD estimées comme nulles sont supprimées dans la matrice de routage, comme nous l'avons évoqué pour contraindre les origines ou les destinations. Soit  $\{j'\}$  l'ensemble des paires OD au niveau  $k + 1$  incluses dans la paire OD  $j$  au niveau  $k$  et  $\mathcal{OD}_0^{(k)}$  l'ensemble des paires OD sur lesquelles le trafic estimé au niveau  $k$  est nul. Les éléments de la matrice de routage utilisés au niveau  $k + 1$  vérifient alors :

$$a_e^{j'} = 0, \quad \forall e = \{1, \dots, r\}, \quad \forall j' : j \in \mathcal{OD}_0^{(k)}. \quad (5.40)$$

Cette première opération permet déjà de diminuer immédiatement le nombre d'inconnues dans le système d'équations (5.35). Soit  $v^{OD(k)}$  les paires OD estimées au niveau  $k$ , et  $\{v_{j'}^{OD(k+1)}\}$  les paires OD incluses dans la paire OD  $v_j^{OD(k)}$ . Les proportions de trafic estimées pour les paires OD au niveau  $k$  doivent être conservées au niveau  $k + 1$ . Ceci se traduit par la contrainte suivante :

$$\sum_{j'} v_{j'}^{OD(k+1)} = v_j^{OD(k)}. \quad (5.41)$$

### Évaluation de l'approche hiérarchique

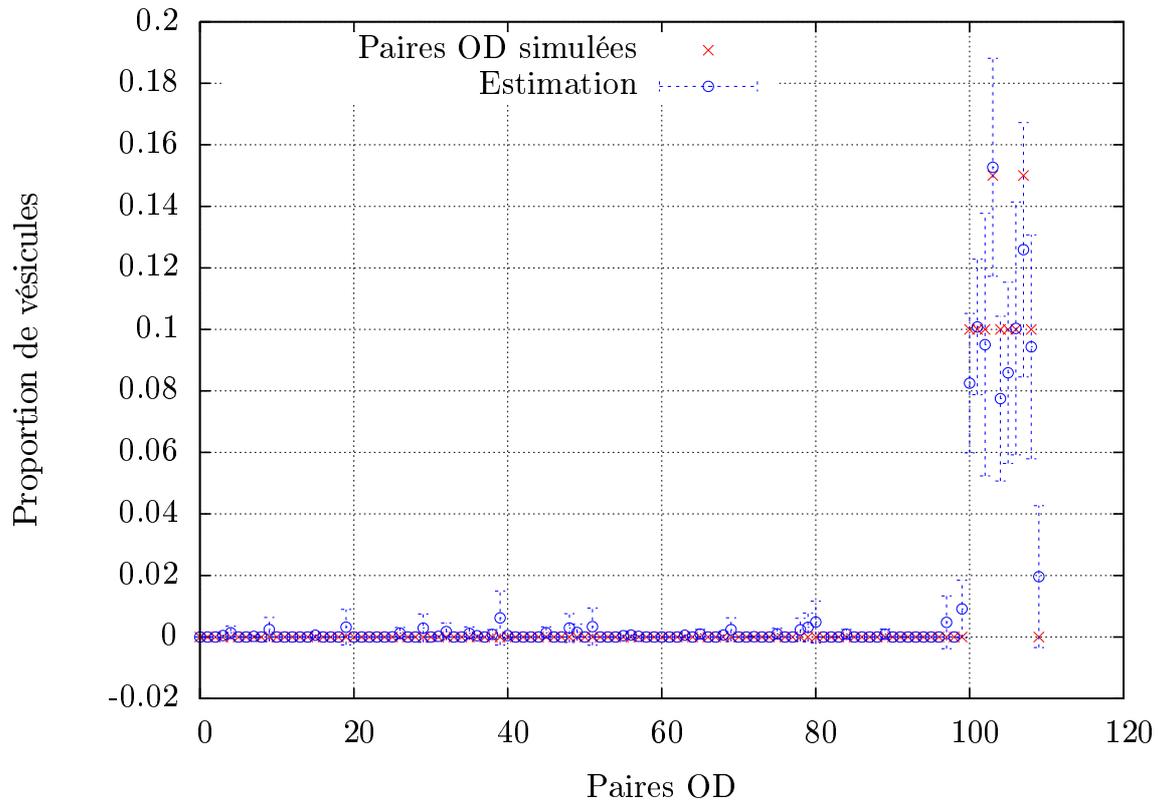
Pour évaluer les performances de l'approche hiérarchique, nous considérons à nouveau les séquences d'images traitées précédemment. Nous reprenons la partition de la figure 5.19 (c), satisfaisante, et celle de la figure 5.19 (d), assez décevante dans la section 5.6.1. Cette évaluation permet de comparer les résultats obtenus avec une approche hiérarchique (figure 5.22 (a)) avec ceux obtenus précédemment (figure 5.20 (b)). Alors que la proportion moyenne de vésicules est supérieure à 3% pour les paires OD n°99 et n°109 en estimation directe (la paire n°109 avoisine les 5%), l'approche hiérarchique estime une proportion moyenne de trafic inférieure à 2% pour ces deux paires. Ainsi, l'approche hiérarchique semble plus efficace pour détecter les paires OD contribuant au trafic vésiculaire. L'erreur moyenne est est essentiellement commise sur les paires OD contribuant au trafic (figure 5.22 (b)).

### Évaluation des performances de l'estimation en fonction de la longueur des séquences

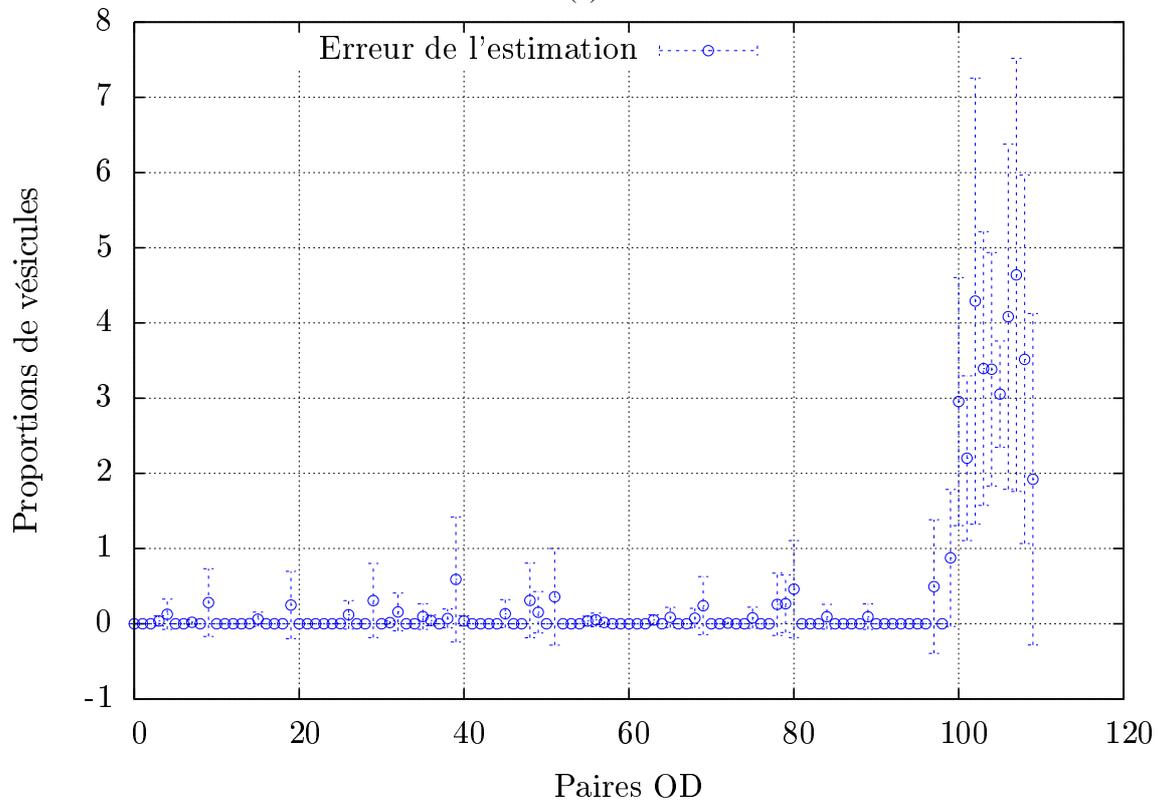
La tomographie de réseaux permet d'estimer le trafic global en régime continu. Il est donc nécessaire de s'interroger sur la durée minimale d'acquisition des séquences à traiter, afin d'extraire suffisamment d'informations pour inférer les trajectoires globales des vésicules. En effet, dans les séquences artificielles, les trajectoires des vésicules simulées dépendent des paires OD définies par l'expert, et sont observées de manière cyclique dans la séquence. Suivant la longueur de la séquence, le cycle des trajectoires sera observé partiellement (séquence trop courte), ou plusieurs fois (séquence longue). Nous considérons désormais dix séquences constituées chacune de 300 images, avec un échantillonnage temporel de 1 image/sec. Le trafic est estimé sur les différentes paires OD pour des longueurs de séquence variables. Dans une première situation, seules les dix premières images de chaque séquence sont prises en compte. Ensuite, les vingt premières images sont considérées, et ainsi de suite jusqu'à prendre en compte l'ensemble de chacune des séquences d'images. Les erreurs commises pour chaque paire OD sont additionnées, et mesurées dans chaque cas. Les résultats sont présentés sur la figure 5.23 (a). Si la séquence comporte moins de cinquante images, l'erreur globale est élevée. Si le nombre d'images est doublé, l'erreur globale est réduite nettement. Pour des séquences de plus de 100 images, l'erreur globale décroît lentement. Pour les séquences d'images considérées, la durée moyenne des trajets de chaque vésicule est comprise entre 50 sec et 100 sec. La tomographie de réseaux est relativement efficace dès que l'horizon temporel considéré permet d'observer un cycle vésiculaire complet.

### Robustesse de la tomographie de réseaux en fonction des données

Nous avons vu dans la section précédente qu'il est nécessaire de s'appuyer sur des mesures de comptage effectuées sur une période supérieure ou égale au cycle minimum des vésicules. Nous nous intéressons maintenant à la robustesse de l'estimation du trafic aux variations des comptages locaux. Dans ce but, nous simulons une séquence longue composée de 1000 images échantillonnée avec une résolution temporelle de 1 image/sec. Nous considérons 20 paires OD uniformément distribuées sur une cellule de forme circulaire (figure 5.19 (c-d)). Le trafic est estimé sur une partition de l'image en cinq régions (figure 5.19 (c)) et prend en compte les comptages locaux moyens de vésicules mesurés sur une

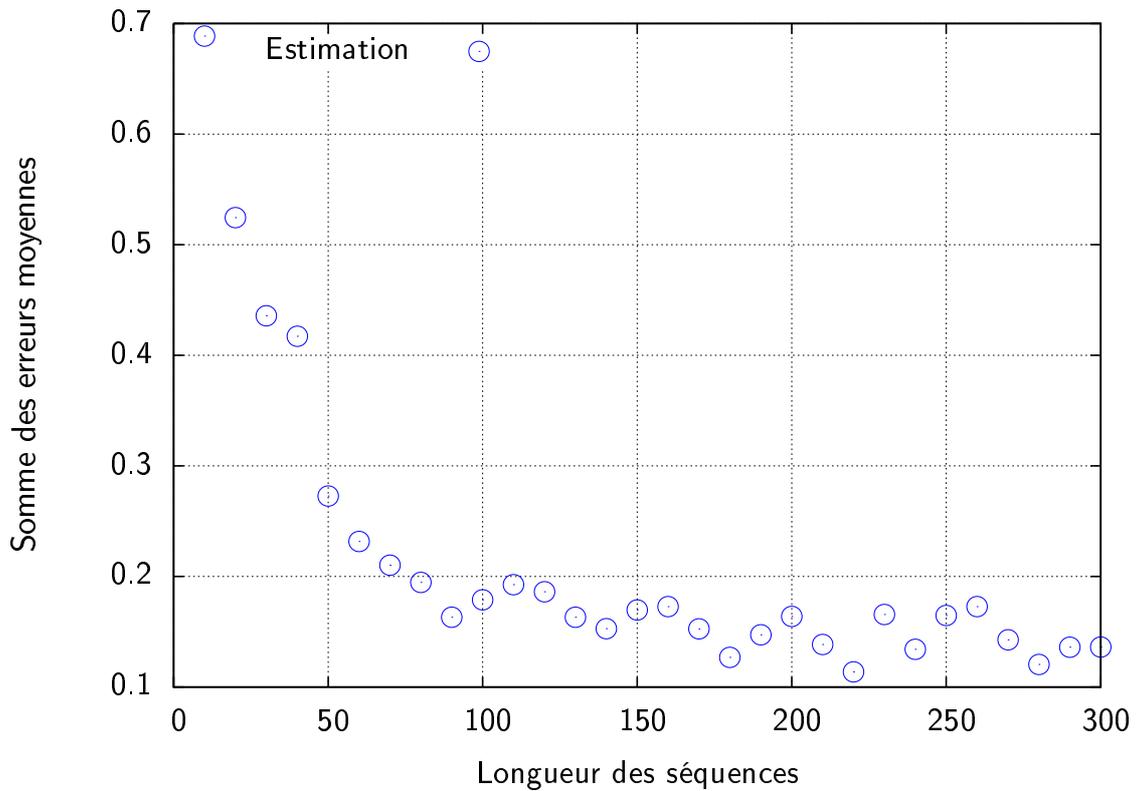


(a)

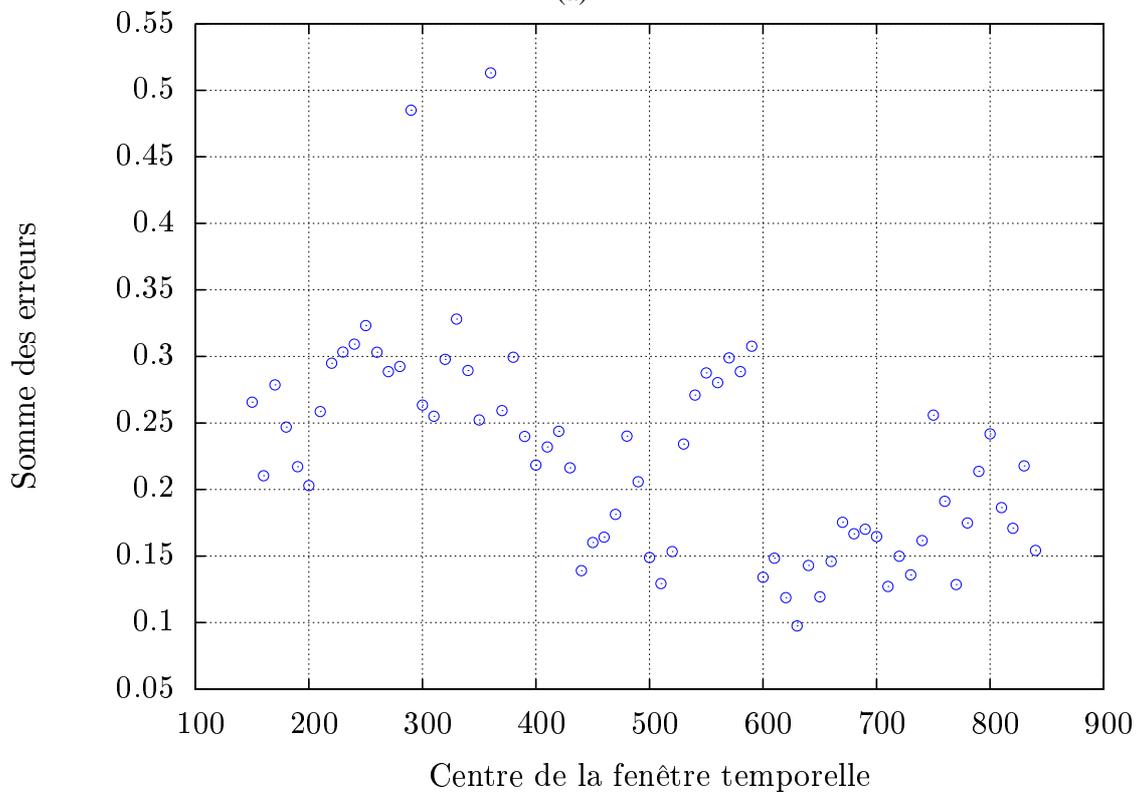


(b)

FIGURE 5.22: (a) Estimation des proportions de trafic simulées sur les paires OD définies sur le graphe et les origines et destinations illustrés sur les figures 5.19 (c-d); (b) erreur de l'estimation.

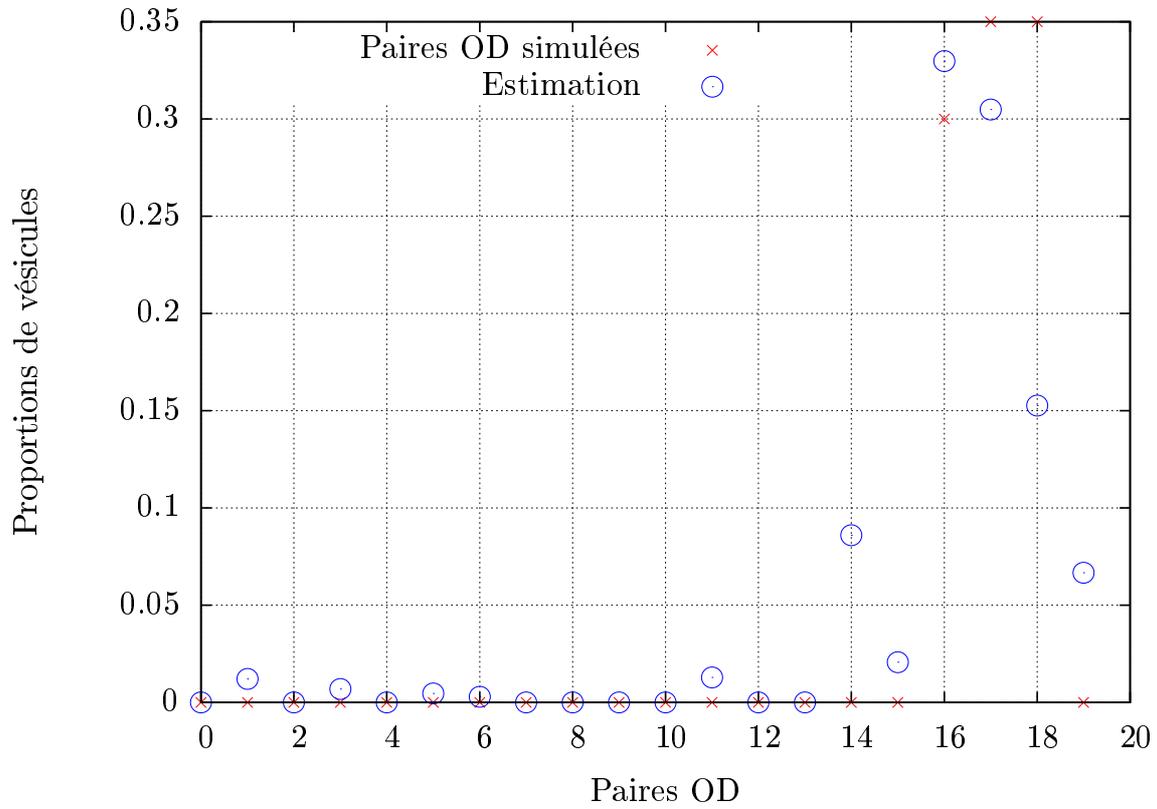


(a)

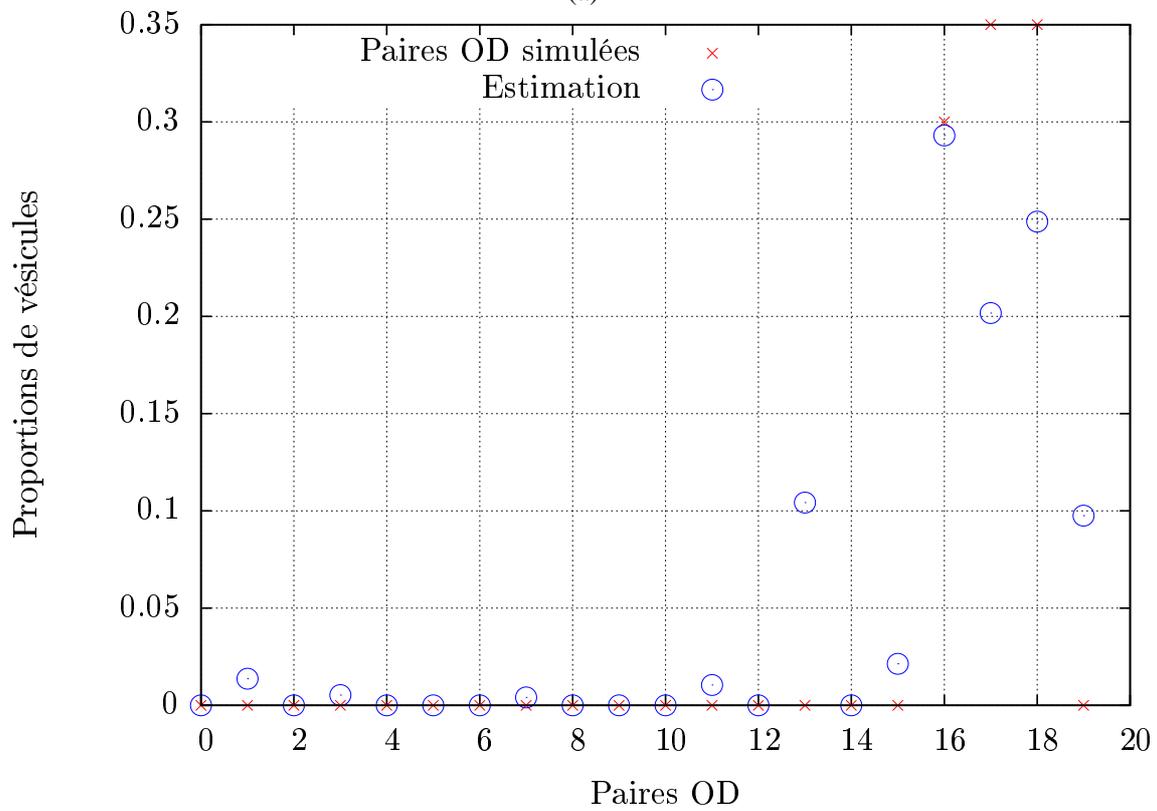


(b)

FIGURE 5.23: (a) Évolution de la somme de l'erreur moyenne commise en chaque paire OD en fonction de la longueur des séquences; (b) évolution de la somme des erreurs commises pour chaque paire OD en considérant une fenêtre temporelle de 300 images, et en décalant cette fenêtre toutes les 10 images sur l'ensemble de la séquence simulée composée de 1000 images.



(a)



(b)

FIGURE 5.24: Estimation des proportions de trafic sur les paires OD simulées sur la séquence composée de 1000 images en considérant les fenêtres temporelles centrées en  $t=290$  (a) et  $t=360$  (b).

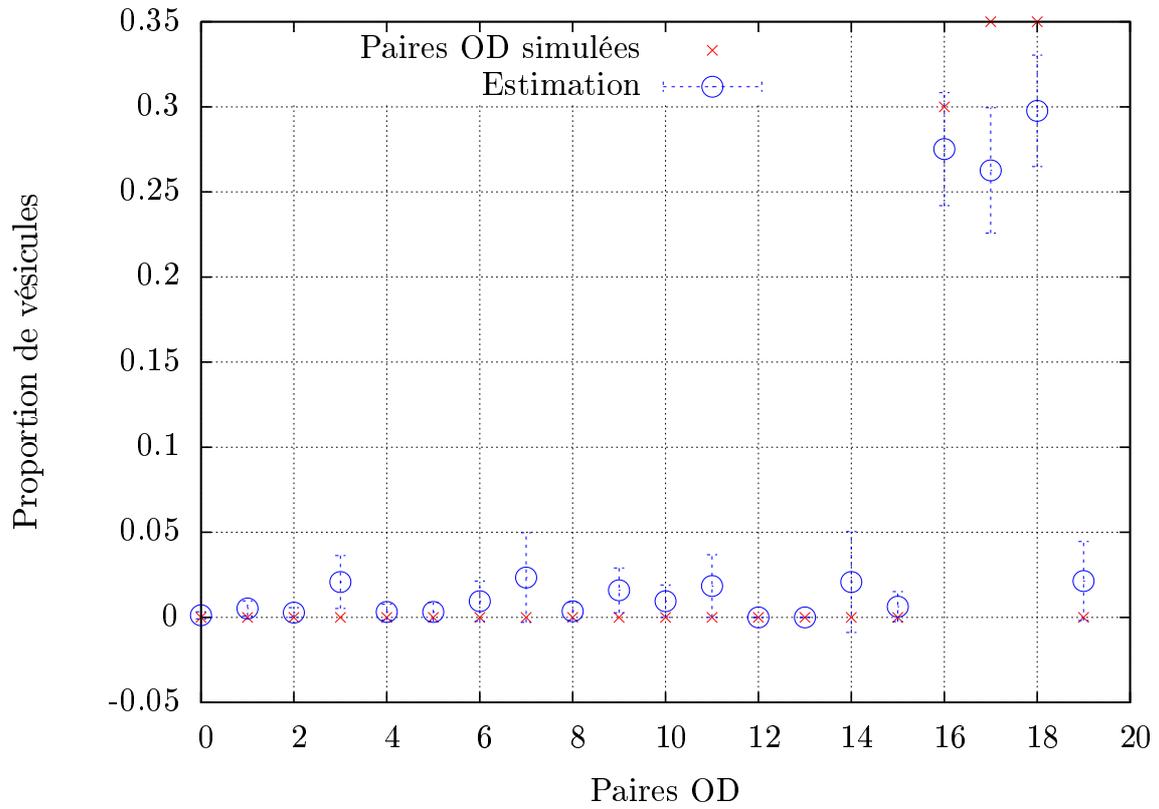
fenêtre temporelle correspondant à 300 images. Une estimation du trafic est obtenue avec des fenêtres décalées temporellement de 10 images. Nous obtenons ainsi 700 estimations du trafic différentes (la première fenêtre temporelle est centrée à l'instant  $t = 150$ , la dernière est centrée à l'instant  $t = 850$ ). Nous considérons des fenêtres temporelles de 300 images afin de s'assurer que l'horizon temporel considéré pour estimer les trajectoires des vésicules est largement supérieur au cycle minimum des vésicules. Les résultats présentés sur la figure 5.23 (b) correspondent aux sommes des erreurs commises pour chaque paire OD. Nous pouvons remarquer que ces erreurs sont comprises entre 0,1 et 0,3. Toutefois, deux exceptions sont notables pour les estimations effectuées avec une fenêtre temporelle centrée à l'instant  $t = 290$  et avec une fenêtre temporelle centrée à l'instant  $t = 360$ . Dans ces deux cas, la somme des erreurs est nettement plus élevée et avoisine 0,5. Afin d'appréhender les causes de ces pics d'erreurs, les estimations des proportions de trafic sur les paires OD dans ces deux cas sont reportées sur la figure 5.24. Dans le premier cas (respectivement le second cas), on remarque que la paire OD n°18 (respectivement n°17) est sous-estimée et fragmentée comme la somme des deux paires OD n°14 et n°19 (respectivement n°13 et n°20). Dans les deux cas, les trajectoires globales ne sont pas estimées (fractionnement d'une paire OD en deux), mais l'identification des principales voies de transport reste possible. Ces deux cas isolés ne représentent qu'à peine 3% de l'ensemble des estimations réalisées (au nombre de 300).

### Évaluation complète de l'estimation globale du trafic sur des séquences d'images simulées

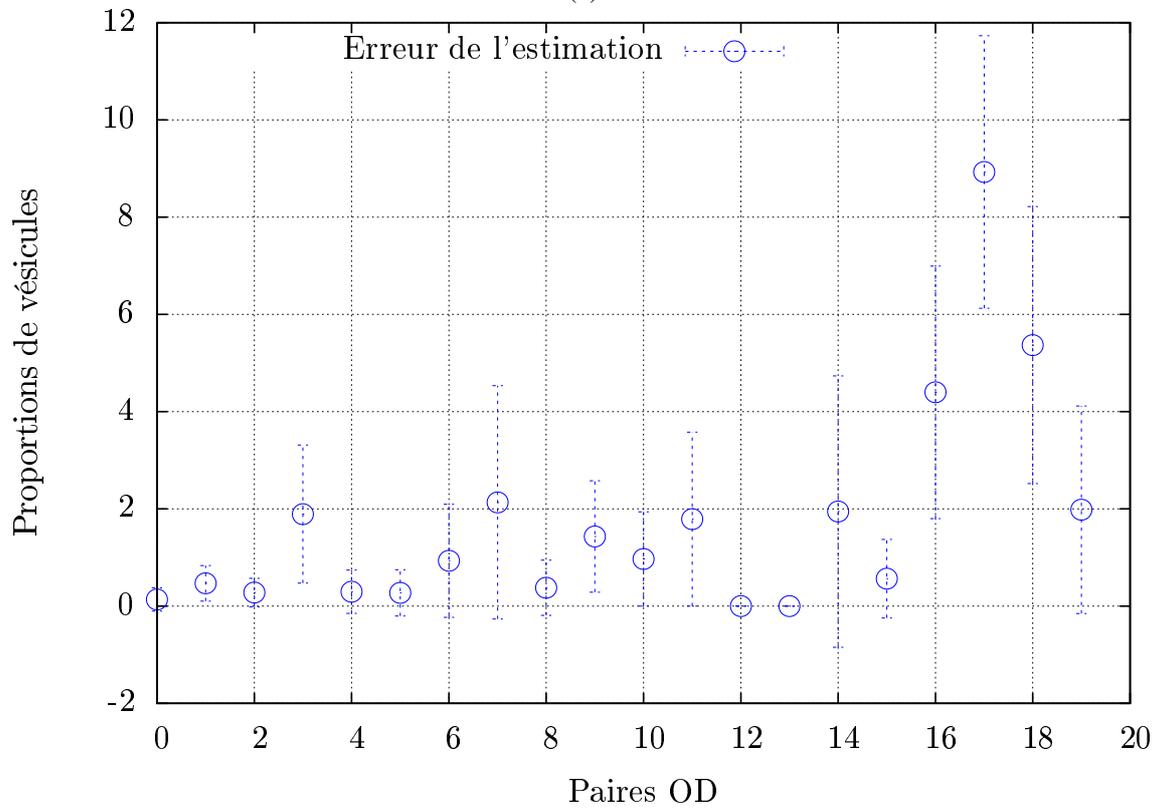
Dans les précédentes évaluations, le comptage des vésicules franchissant chacune des frontières était directement issu des simulations. Dans cette nouvelle évaluation, nous considérons les mêmes séquences d'images que précédemment. Cette fois, la détection des vésicules est réalisée avec la méthode décrite à la section 4.2.2. Le comptage des vésicules aux frontières est obtenu selon la méthode développée à la section 5.4. Les résultats sont présentés sur les figures 5.25 et 5.26 (avec approche hiérarchique). Que ce soit pour des partitions composées de 5 ou 11 régions, les résultats sont moins bons que ceux obtenus avec les *vrais* comptages. Toutefois, ces résultats restent tout à fait satisfaisants. Ils permettent notamment de détecter facilement quelles sont les paires OD générées (la proportion de trafic estimée sur ces paires est largement supérieure à celle estimée sur les autres paires). L'erreur moyenne de l'estimation pour chaque paire OD reste faible : un maximum de 8 vésicules par séquence pour une partition composée de 5 régions, et un maximum de 6 vésicules par séquence pour une partition composée de 11 régions.

### Comparaison des résultats obtenus avec une méthode de suivi individuel et notre méthode d'analyse du trafic

Afin d'identifier les points forts et les points faibles d'une approche globale par rapport à une approche plus locale, nous comparons les résultats obtenus par notre méthode d'analyse du trafic à ceux obtenus par une méthode de suivi (Racine et al. 2006) sur une simulation obtenue en considérant le graphe et les origines et destinations présentées sur la figure 5.19. Trois images extraites de cette séquence sont présentées sur la figure 5.27 (a). Afin d'obtenir des résultats très satisfaisants avec cette méthode de suivi, la séquence est simulée avec un échantillonnage temporel élevé égal à 5 images/sec. En revanche, nous ne considérons qu'une image sur cinq lorsque nous évaluons notre méthode. Les proportions de vésicules estimées par les deux méthodes sont comparées aux paires OD générées sur la figure 5.28, et le nombre de vésicules estimées sont comparées au nombre de vésicules observées sur les paires OD sur la figure 5.29. Cette deuxième comparaison est effectuée car si la tomographie de réseaux estime les proportions du trafic en régime permanent, le suivi individuel extrait des trajectoires complètes ou partielles des vésicules en début et en fin de séquence. Notre approche estime les trois paires OD générées dans des proportions proches de la vérité-terrain. En revanche, la méthode de suivi

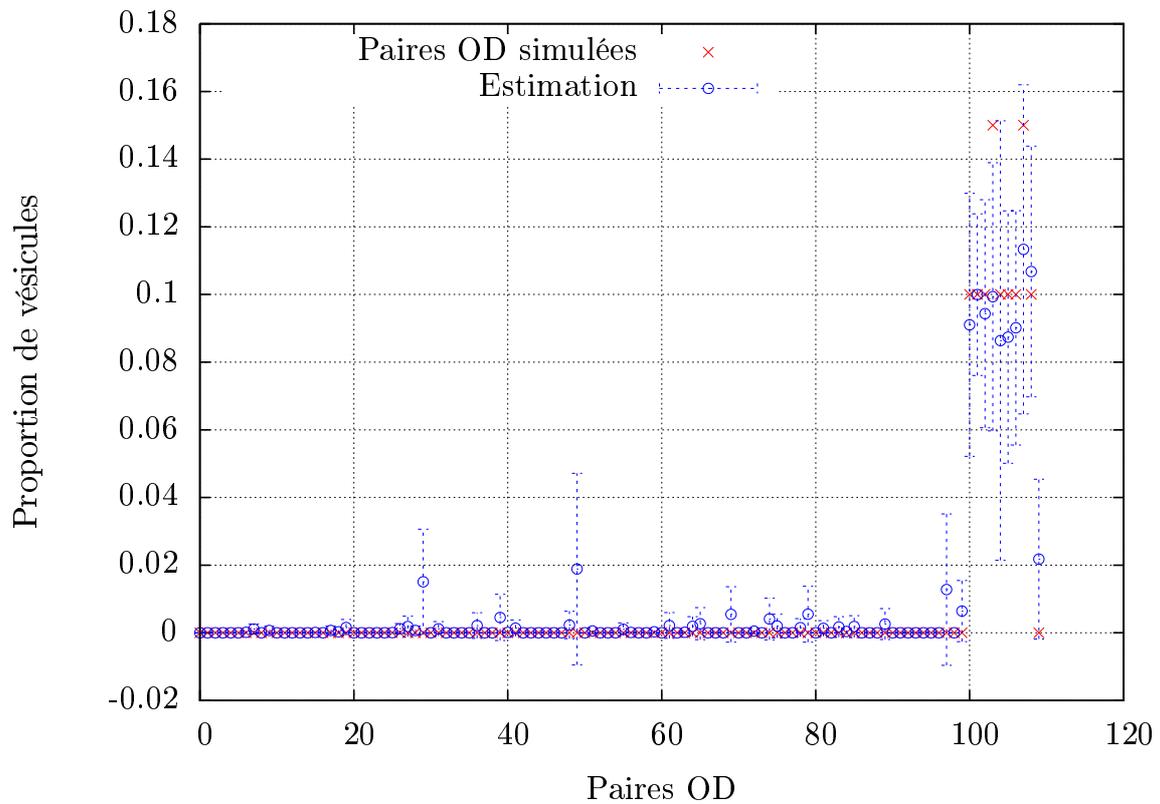


(a)

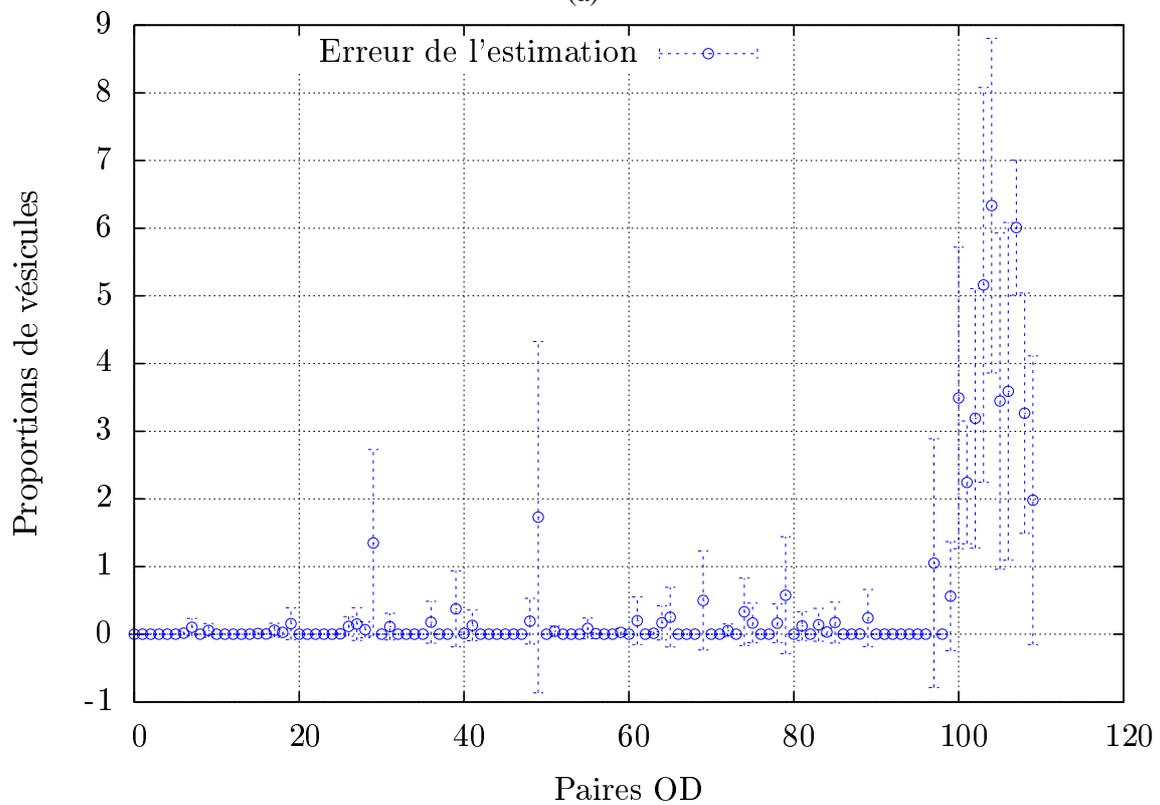


(b)

FIGURE 5.25: (a) Estimation des proportions de trafic sur les paires OD simulées à partir du graphe et des origines et destinations illustrés sur les figures 5.19 (c-d); (b) erreur de l'estimation.



(a)



(b)

FIGURE 5.26: (a) Estimation des proportions de trafic sur les paires OD simulées à partir du graphe et des origines et destinations illustrés sur les figures 5.19 (c-d); (b) erreur de l'estimation.

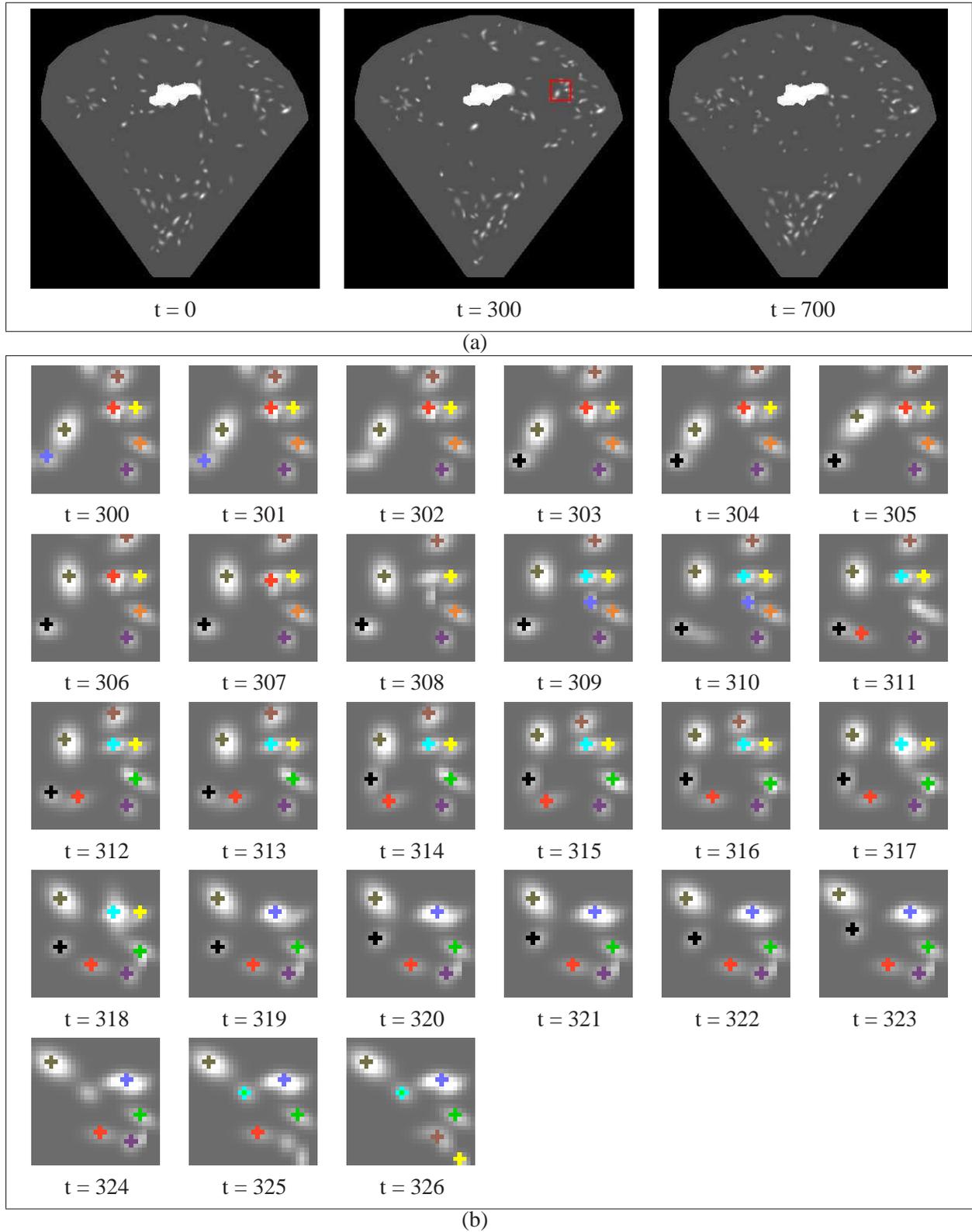
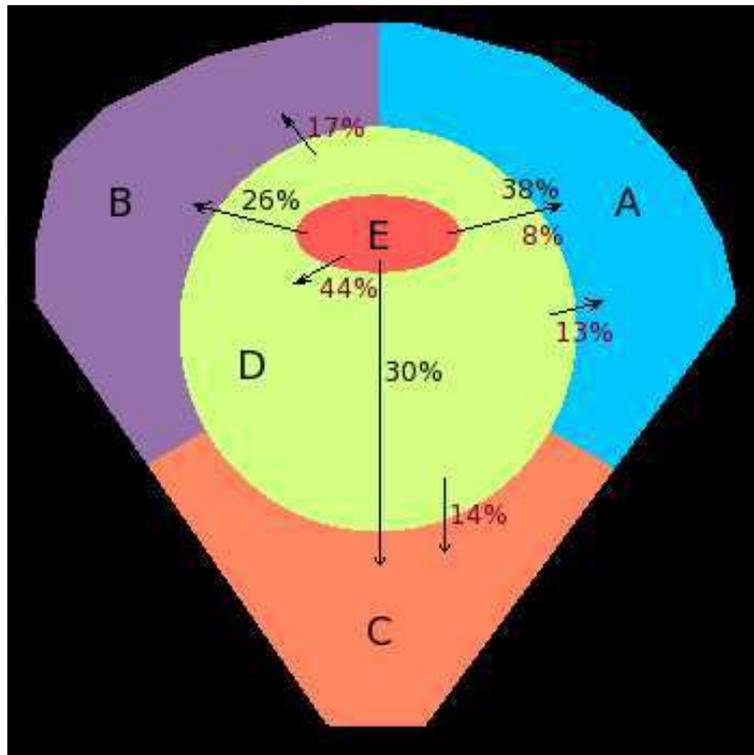
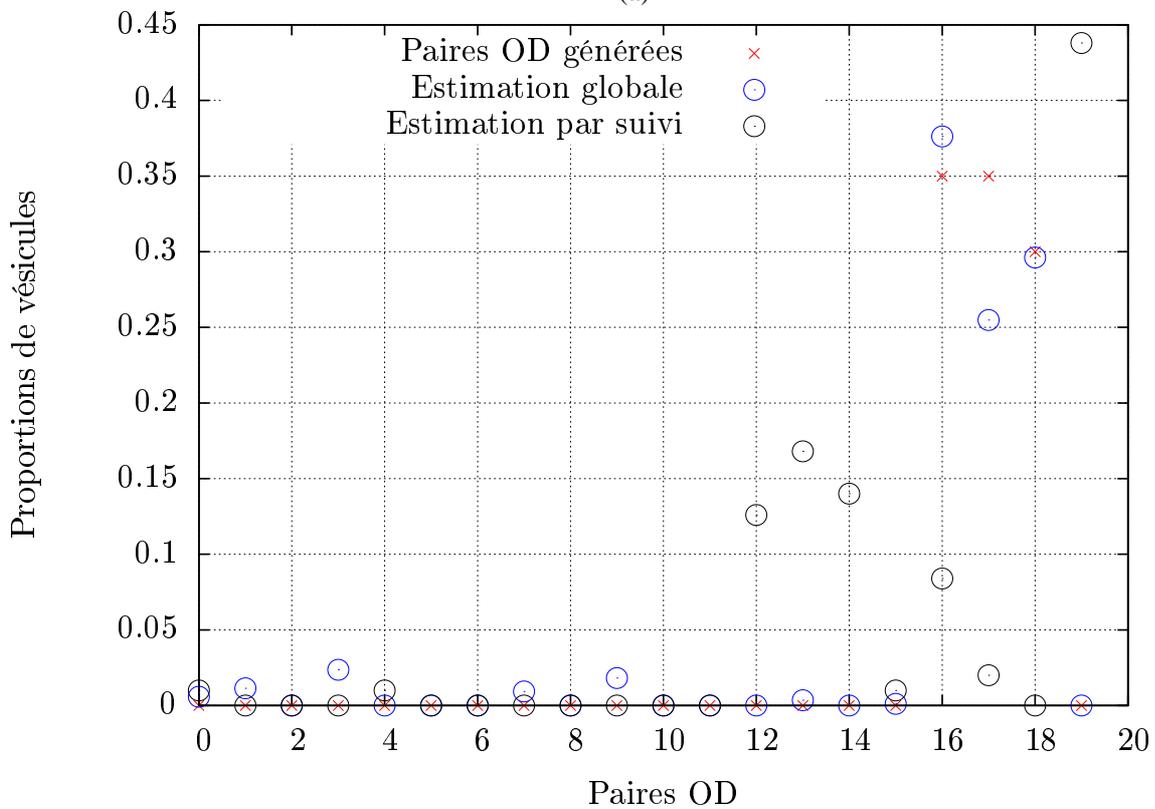


FIGURE 5.27: (a) Trois images extraites de la simulation considérée pour comparer les résultats de l'analyse globale du trafic avec une méthode de suivi individuel des vésicules ; (b) suivi réalisé pendant 27 instants consécutifs dans la zone encadrée en rouge sur l'image simulée à l'instant  $t = 300$  (chaque trajectoire est caractérisée par une croix de couleur différente).



(a)



(b)

FIGURE 5.28: Estimation des proportions de trafic sur les paires OD simulées à partir du graphe et des origines et destinations illustrés sur les figures 5.19 (c-d). (a) Représentation des résultats sous forme graphique et labels des régions. Les proportions de trafic estimées avec la méthode de suivi sont indiquées en marron tandis que celles estimées avec notre méthode d'analyse du trafic sont représentées en noir ; (b) proportions de trafic estimées pour chaque paire OD.

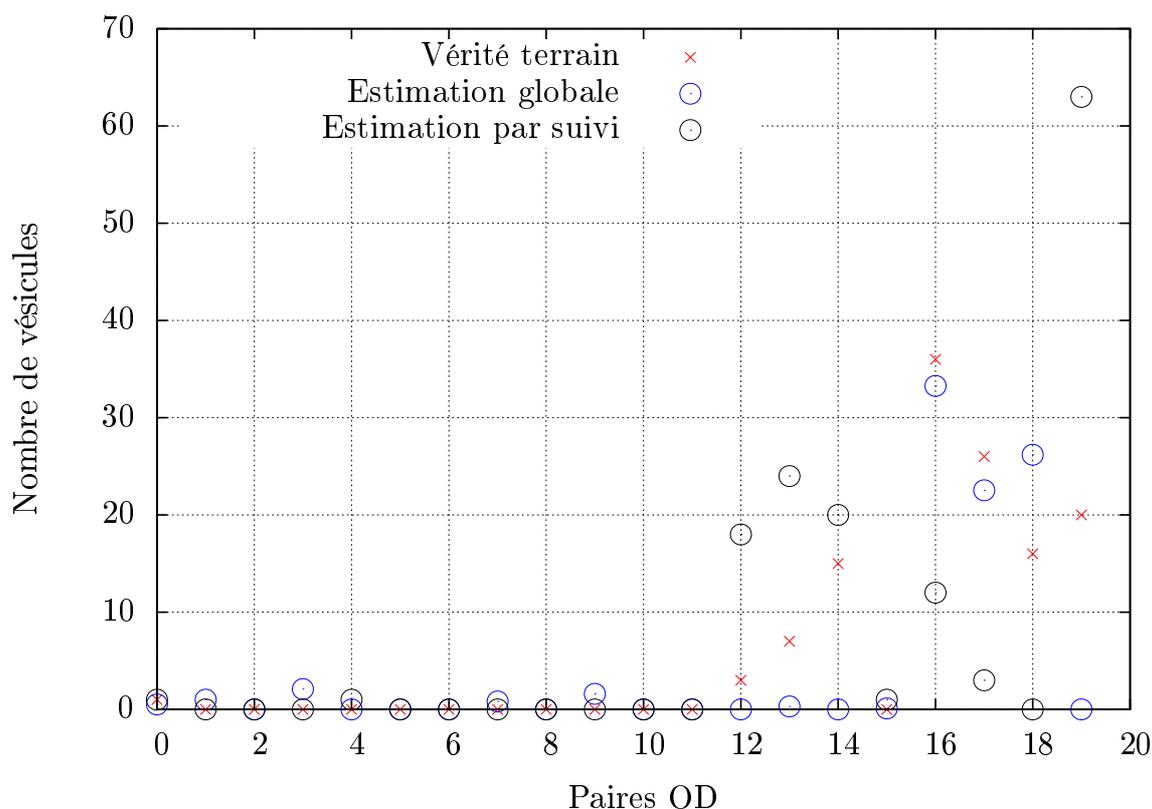


FIGURE 5.29: Comparaison entre l'estimation du nombre de vésicules sur chaque paire OD avec notre méthode d'analyse du trafic, avec une méthode de suivi individuel, et de la vérité-terrain sur une séquence d'images simulée à partir du graphe et des origines et destinations illustrés sur les figures 5.19 (c-d).

identifie principalement quatre paires OD (n°12, n°13, n°14 et n°19), fragmentant ainsi les trajectoires globales des vésicules en deux parties : depuis la région de l'appareil de Golgi vers sa région voisine, et de cette dernière vers les régions situées à la périphérie de la cellule, et ceci dans des proportions bien supérieures aux trajectoires partielles de début et de fin de séquence (figure 5.29). Seule une faible proportion de vésicules est estimée sur les trajectoires complètes (8% sur la paire n°16 et 2% sur la paire n°17). Pour en comprendre la raison, il est intéressant d'observer de plus près les trajectoires extraites par la méthode de suivi. Sur la figure 5.27 (b), le résultat du suivi dans une petite fenêtre spatiale entre les instants  $t = 300$  et  $t = 326$  est illustré. Si en règle générale, les trajectoires des vésicules sont bien estimées, on remarque qu'un certain nombre de vésicules ne sont pas associées à une même trajectoire du début à la fin. Ceci est dû à de mauvaises détections (croix bleue à  $t = 301$  disparue à  $t = 302$ ), à la position trop proche de deux vésicules (croix rouge et jaune à  $t = 307$ , seule la croix jaune reste à l'instant  $t = 308$ ) ou au croisement de deux ou plusieurs trajectoires (croix rouge et violette à  $t = 324$ , aucune d'entre elles n'est visible à l'instant  $t = 326$ ). Les séquences étudiées sont trop complexes pour pouvoir assurer un suivi individuel exact qui permette d'extraire les trajectoires complètes des vésicules. En revanche, ce suivi est efficace pour extraire des informations locales telles que la vitesse instantanée ou l'orientation des vésicules. L'exploitation conjointe d'une méthode de suivi et de la tomographie de réseaux permet ainsi une interprétation plus complète du caractère dynamique des objets étudiés. Il est par exemple possible de comparer la distribution du trafic en import, en export et en échanges transversaux estimée par tomographie de réseaux et la distribution instantanée du trafic estimée à partir de l'orientation des vésicules extraites par une méthode de suivi.

## Évaluation de l'estimation sur des séquences d'images réelles

La tomographie de réseaux s'avère efficace sur des simulations. Nous l'appliquons maintenant à des séquences d'images réelles. Comme il n'existe pas de vérité-terrain pour ces séquences, notre analyse est toutefois limitée, puisque seule une évaluation qualitative est possible. Nous estimons dans un premier temps le trafic vésiculaire sur trois séquences d'images acquises avec un microscope "spinning disk", pour lesquelles la cellule observée est contrainte par un *micro-patron* en forme d'arbalète. Ces séquences sont composées de 180 images  $380 \times 380$  pixels, avec un échantillonnage temporel égal à 1 image/sec. Elles sont présentées sur les figures 5.30 et 5.31. Les résultats sont présentés sur les figures 5.32 et 5.33. On remarque un volume de trafic moyen égal à 19% sur la paire OD n°19 sur la partition en cinq régions (figure 5.32), ce qui peut paraître surprenant. Ce trafic résulte vraisemblablement de trajectoires partielles de vésicules issues de l'appareil de Golgi, mais qui ne sont pas arrivées à destination (périphérie de la cellule) dans les séquences analysées. Il faut également ajouter que cette zone correspond à une région de trafic intense, et que le comptage des vésicules y est plus difficile, ce qui peut potentiellement conduire à des erreurs. Si on compare les trois types d'échanges dans la cellule, on observe 68% du trafic vésiculaire en "export", 20% en "import" et 12% en "échanges transversaux". La tomographie de réseaux estime donc une grande proportion de trafic en "export", ce qui est conforme aux hypothèses biologiques. En considérant la partition de l'image en onze régions (figure 5.33), les principales directions des vésicules sont les trois pointes de l'arbalète, fait déjà observé dans d'autres études (They et al. 2006). On note toutefois une proportion importante de trafic sur l'arête n°104. Il serait intéressant de traiter un plus grand nombre de séquences afin de vérifier si ce trafic sur l'arête n°104 est significatif.

Nous évaluons notre méthode sur trois autres séquences où les cellules sont contraintes par des *micro-patrons* de forme circulaire. Elles sont acquises dans les mêmes conditions que les précédentes et sont présentées sur les figures 5.31 et 5.34. Les résultats sont présentés sur les figures 5.35 et 5.36. On remarque que 38% du trafic estimé se résume à des échanges entre la région au niveau de l'appareil de Golgi et sa région voisine (paires OD n°15 et n°19 sur la partition de l'image en cinq régions). Ces échanges sont aussi surprenants, et sont sans doute liés à une grande activité au niveau de l'appareil de Golgi. Ces échanges peuvent aussi provenir de vésicules qui traversent la frontière dans les deux sens, ce qui perturbe le processus d'estimation de la tomographie de réseaux. En effet, notre approche considère tout comptage comme "informatif"; si une vésicule traverse une frontière dans les deux sens, elle est restée dans la même région, et les deux comptages résultant n'ont pas d'incidence sur la trajectoire de la vésicule. La tomographie de réseaux analyse ces comptages par définition, ce qui peut être mal approprié pour estimer le trafic vésiculaire. Si on examine de plus près les trois types d'échanges dans la cellule, on observe 68% du trafic vésiculaire en "export", 26% en "import" et 6% en "échanges transversaux". La majeure partie du trafic est donc estimée en "export". Il est aussi intéressant de noter sur la partition de l'image en onze régions que les échanges principaux entre l'appareil de Golgi et la périphérie de la cellule se déroulent selon l'axe de l'appareil de Golgi (33% contre 11%). Les *micro-patrons* de forme circulaire ont été conçus pour organiser le réseau de microtubules de manière non polarisée. Les vésicules se déplaçant sur le réseau de microtubules, le trafic observé est par conséquent distribué uniformément sur l'ensemble de la périphérie de la cellule. Néanmoins, on peut vraisemblablement considérer que l'appareil de Golgi joue également un rôle dans l'organisation du réseau de microtubules. L'estimation du trafic sur ces trois séquences illustre une polarisation selon l'axe de l'appareil de Golgi, ce qui tendrait à confirmer cette hypothèse. À nouveau, une série d'expériences plus conséquentes est désormais nécessaire pour confirmer cette idée.

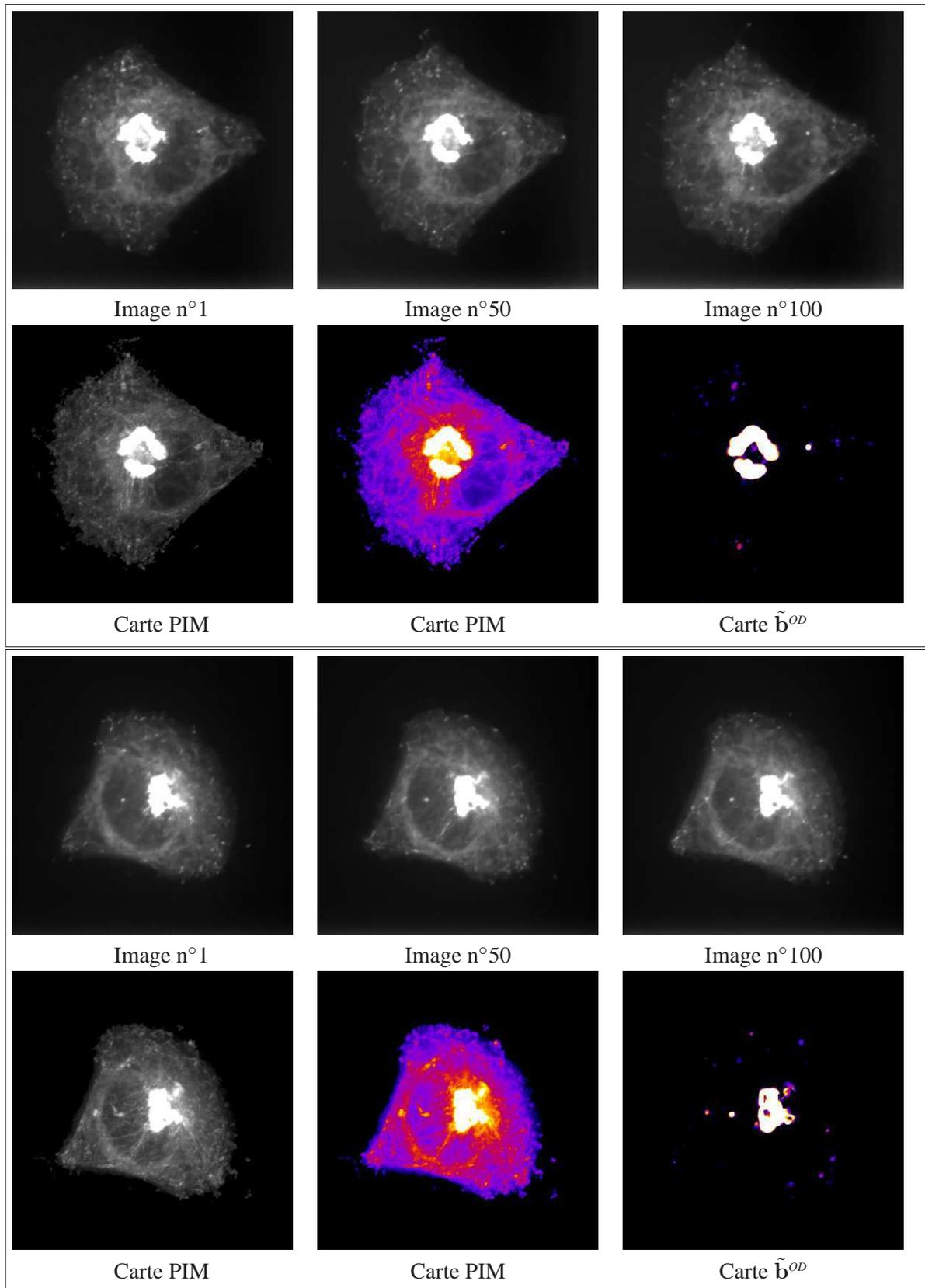


FIGURE 5.30: Deux séquences d'images réelles où les cellules sont contraintes par un micro-patron en forme d'arbalète (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation).

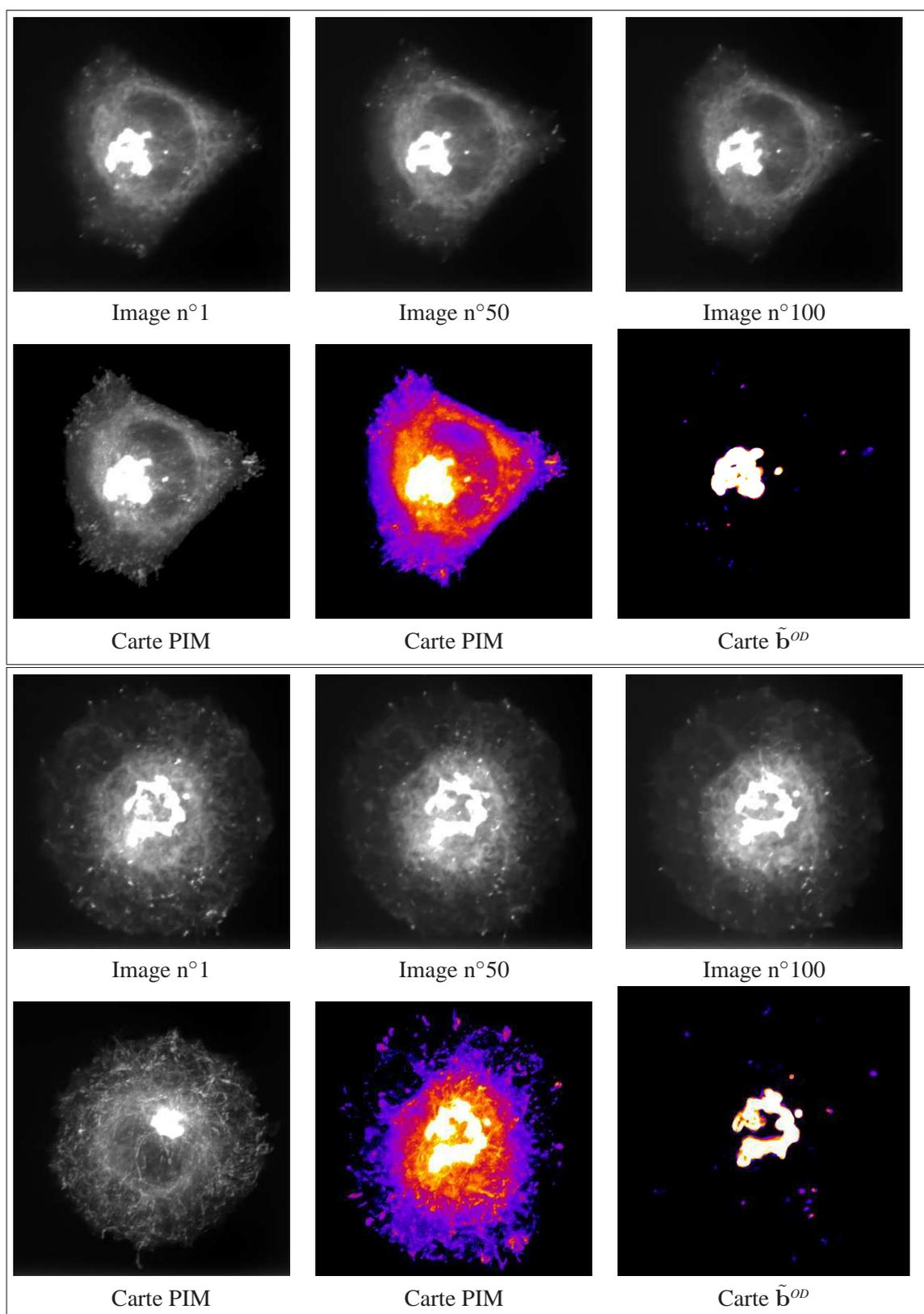
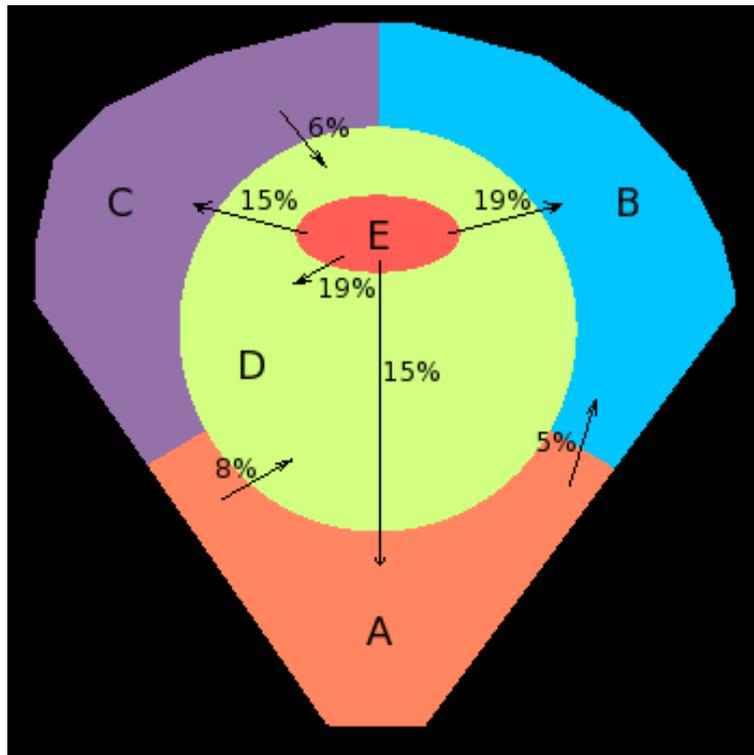
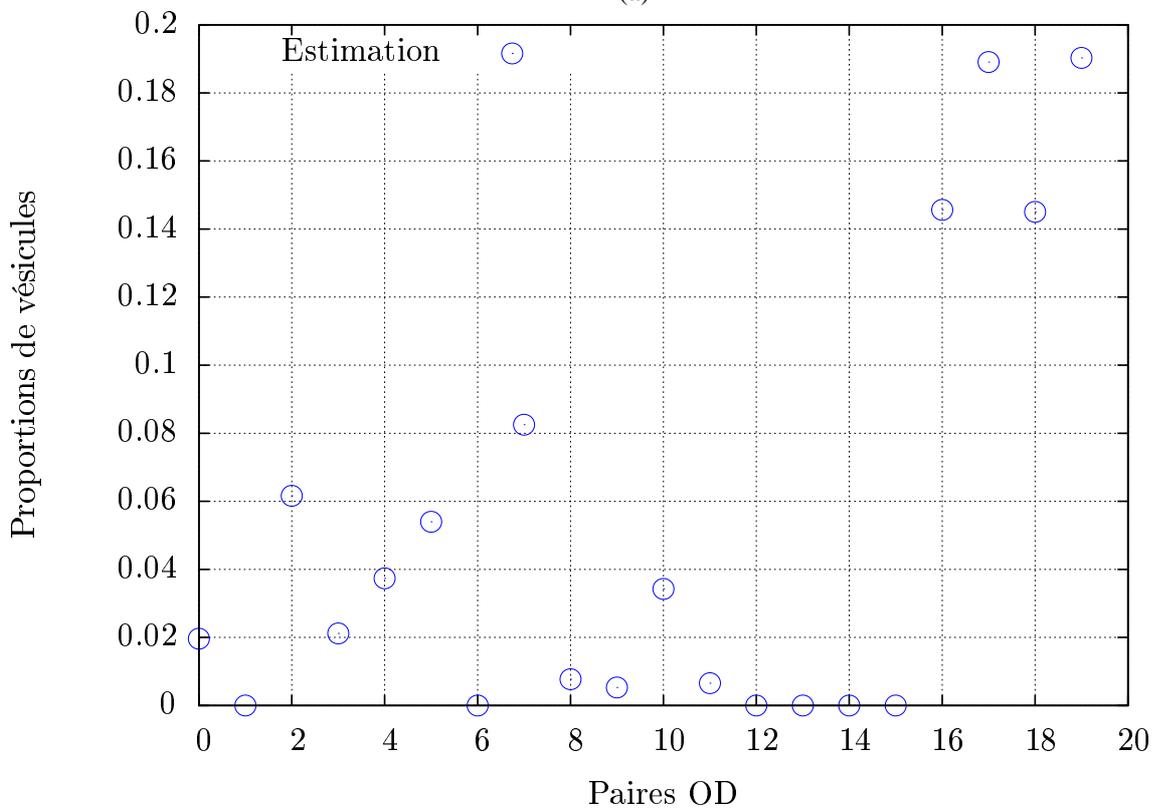


FIGURE 5.31: Deux séquences d'images réelles. La cellule acquise sur la première séquence (cadre du haut) est contrainte par un micro-patron en forme d'arbalète, et la cellule acquise sur la seconde séquence (cadre du bas) est contrainte par un micro-patron de forme circulaire (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation).

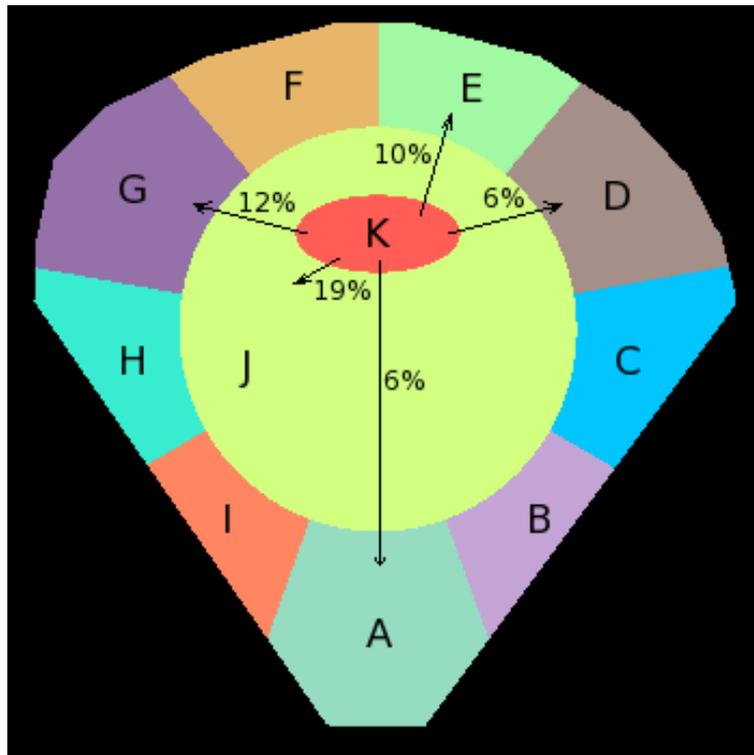


(a)

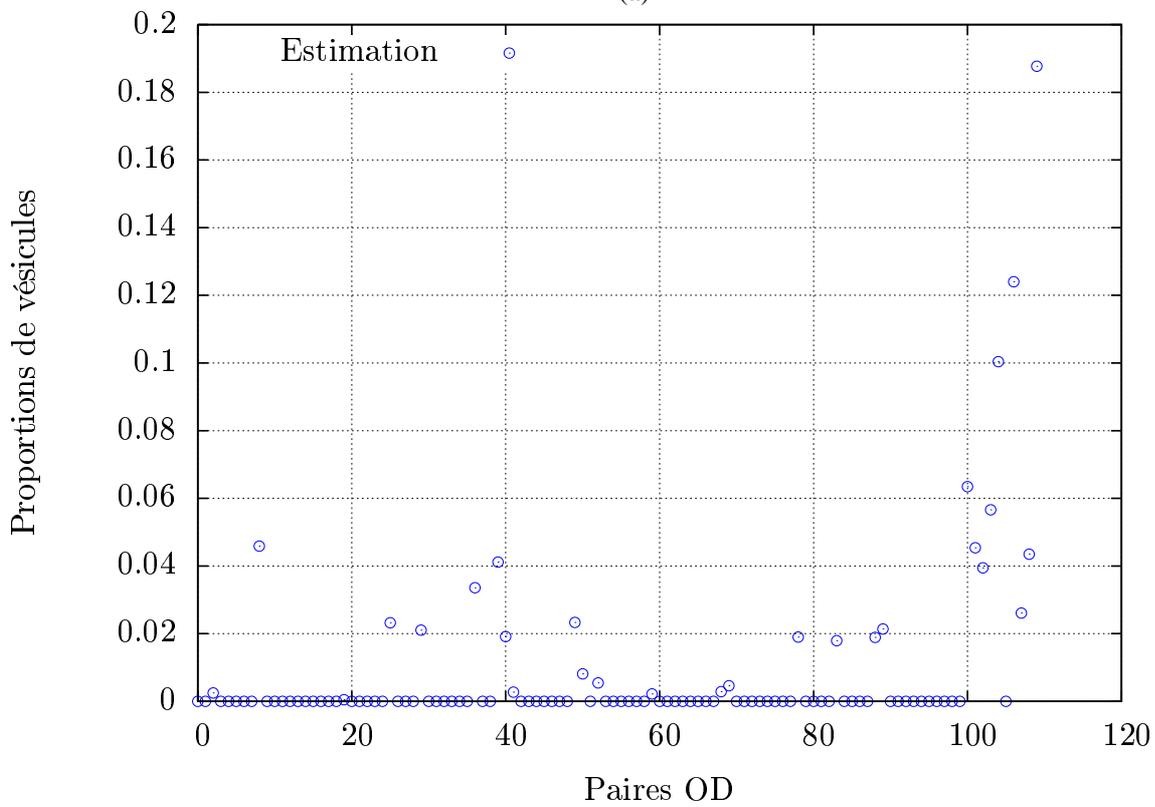


(b)

FIGURE 5.32: Résultats d'estimation du trafic vésiculaire sur trois séquences d'images réelles où la cellule est contrainte par un micro-patron en forme d'arbalète, en considérant une partition de l'image en cinq régions. (a) Représentation des résultats sous forme graphique et labels des régions ; (b) proportions de trafic estimées pour chaque paire OD.



(a)



(b)

FIGURE 5.33: Résultats d'estimation du trafic vésiculaire avec une approche hiérarchique sur trois séquences d'images réelles où la cellule est contrainte par un micro-patron en forme d'arbalète, en considérant une partition de l'image en onze régions. (a) Représentation des résultats sous forme graphique et labels des régions; (b) proportions de trafic estimées pour chaque paire OD.

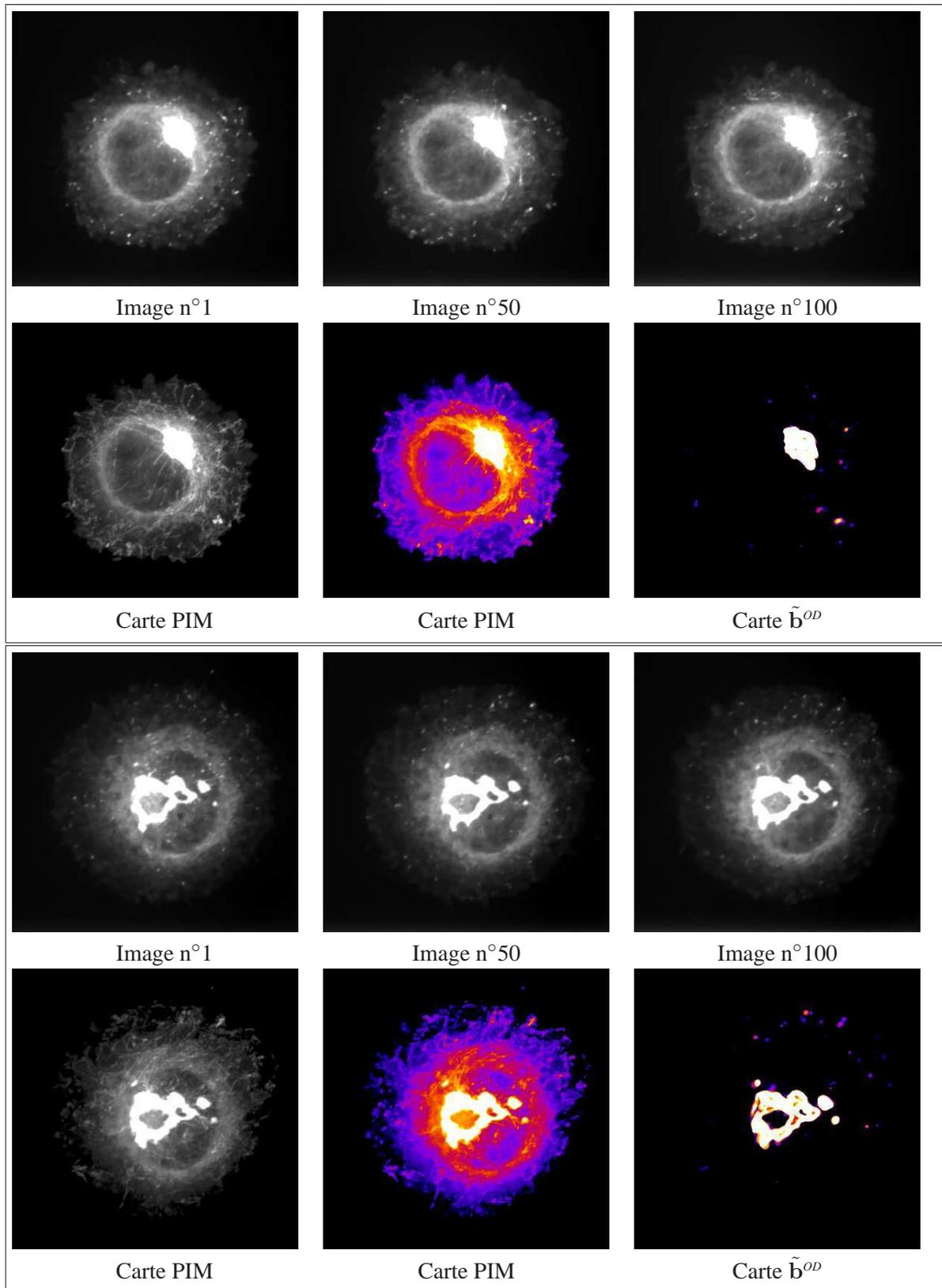
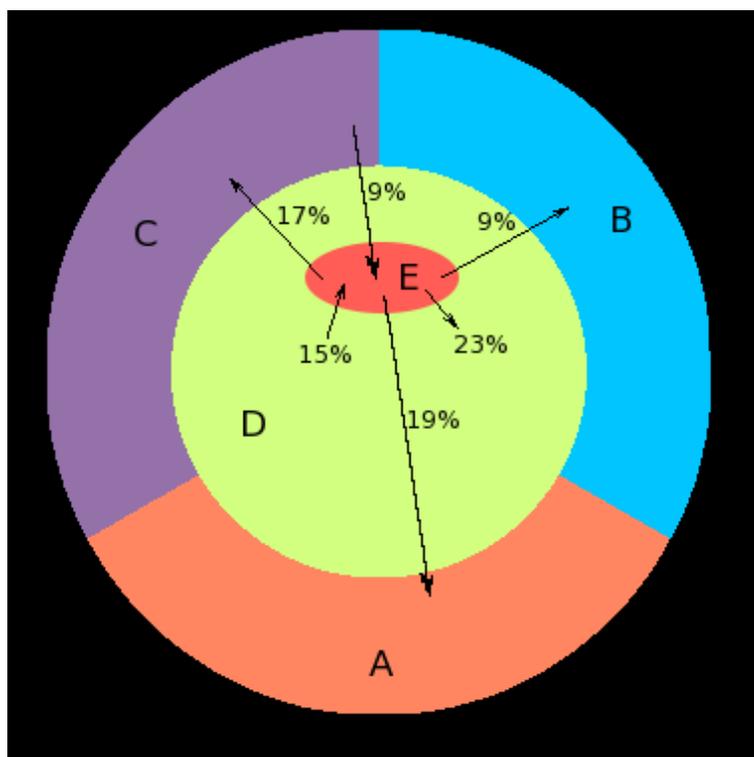
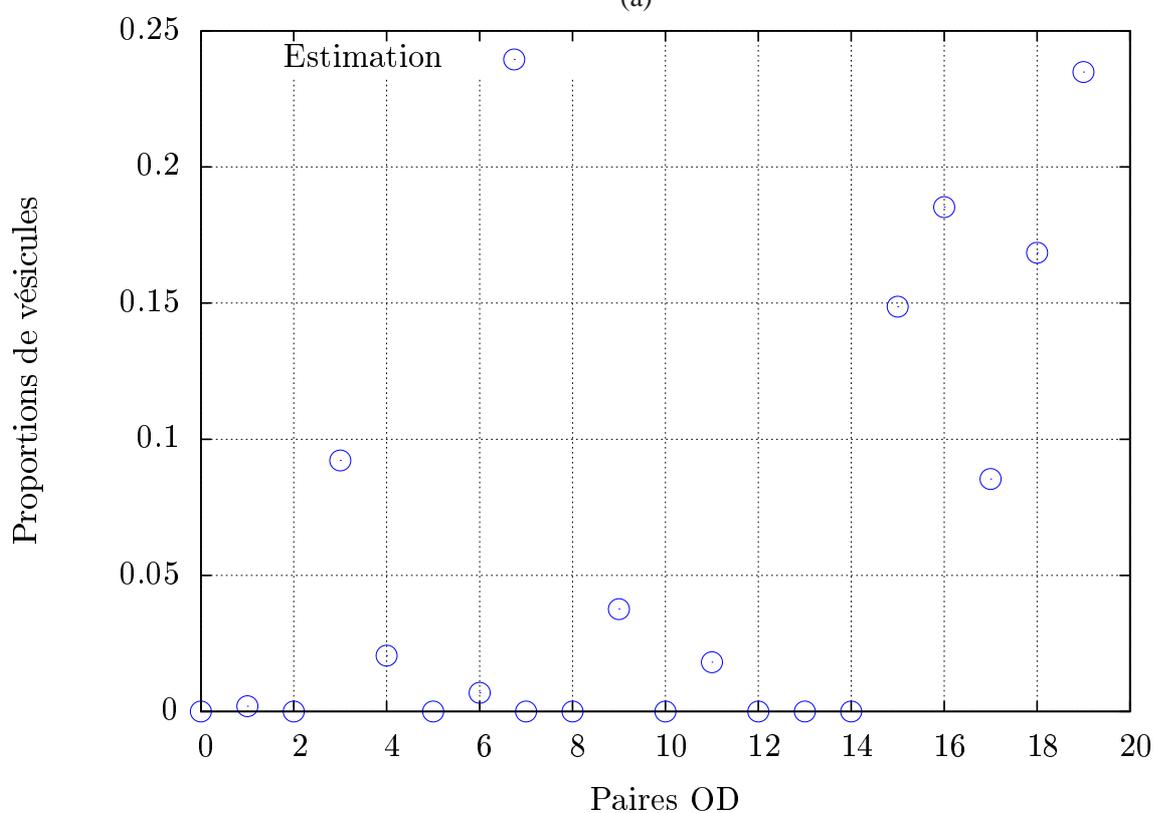


FIGURE 5.34: Deux séquences d'images réelles où les cellules sont contraintes par un micro-patron en forme d'arbalète (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation).

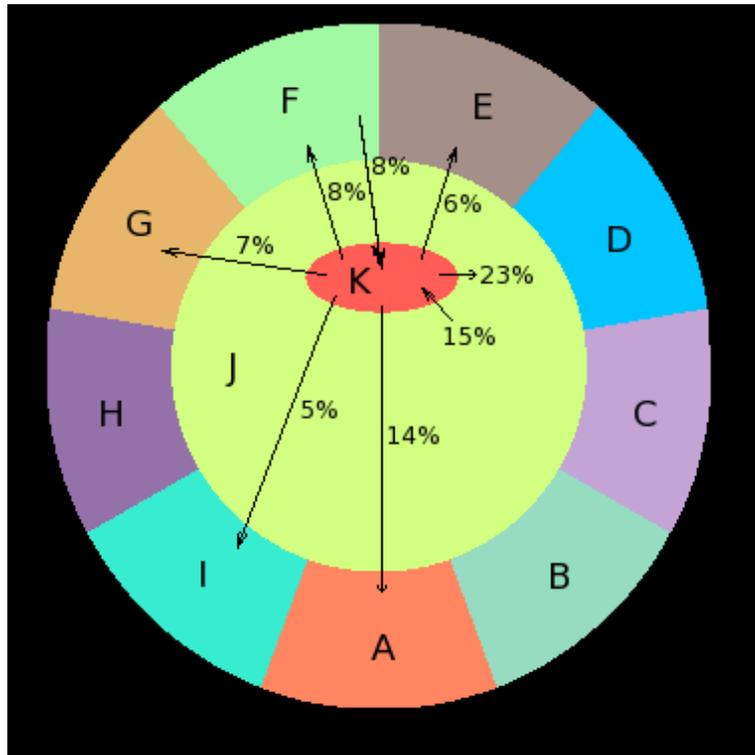


(a)

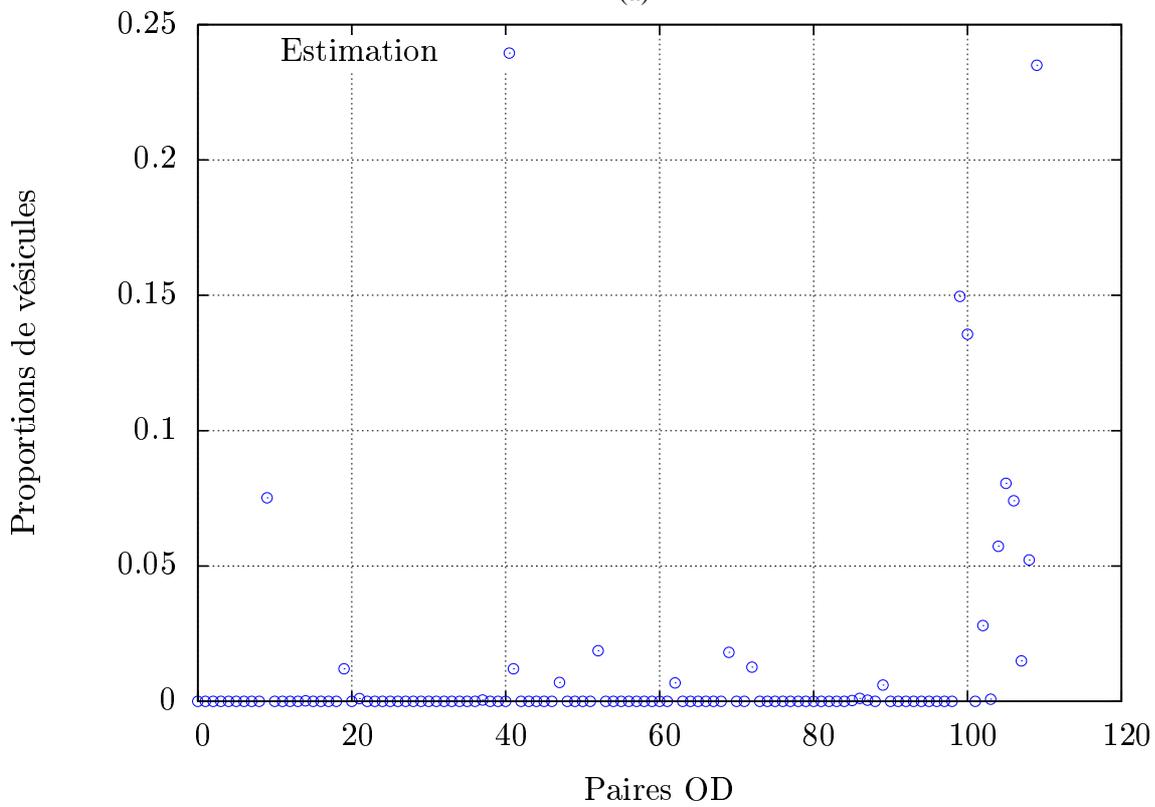


(b)

FIGURE 5.35: Résultats d'estimation du trafic vésiculaire sur trois séquences d'images réelles où la cellule est contrainte par un micro-patron de forme circulaire, en considérant une partition de l'image en cinq régions. (a) Représentation des résultats sous forme graphique et labels des régions ; (b) proportions de trafic estimées pour chaque paire OD.



(a)



(b)

FIGURE 5.36: Résultats de l'estimation du trafic vésiculaire avec une approche hiérarchique sur trois séquences d'images réelles où la cellule est contrainte par un micro-patron de forme circulaire, en considérant une partition de l'image en onze régions. (a) Représentation des résultats sous forme graphique et labels des régions; (b) proportions de trafic estimées pour chaque paire OD.

## 5.7 Bilan

Dans ce chapitre, nous avons présenté deux outils d'investigation pour la modélisation et la compréhension du trafic vésiculaire : la détection de zones OD et l'analyse globale du trafic par tomographie de réseaux.

### 5.7.1 Détection de zones origine-destination

La méthode que nous avons développée (section 5.2) est un outil d'aide à la décision pour les biologistes afin de détecter les zones OD. La détection de ces zones n'est pas automatique, mais la carte de cumul des détections consécutives, générée par l'algorithme, identifie des régions d'intérêt. L'utilisateur choisit ensuite les zones qui lui semblent correspondre le mieux parmi les régions détectées. Cette méthode a été développée sous C++, et il serait rapide de l'adapter à n'importe quel autre langage de programmation. Le temps de calcul est assez rapide (2 images/sec pour des images  $380 \times 380$  pixels avec un processeur 2.66 GHz) et l'unique paramètre requis est une p-value ( $P(\Phi_t(s) \geq \tau_t^{od})$ ). L'utilisation à très courts termes de cet algorithme est donc tout à fait envisageable par des utilisateurs non experts.

### 5.7.2 Analyse du trafic intracellulaire par tomographie de réseaux

Nous avons présenté au cours de ce chapitre toutes les étapes nécessaires à l'application de la tomographie de réseaux à l'analyse du trafic intracellulaire, en particulier celui de la protéine Rab6. Nous présentons ici les choix que nous avons fait à chaque étape.

**Partition de l'image** Dans le cas de cellules contraintes par un *micro-patron*, la partition est standard (une zone pour l'appareil de Golgi, une zone pour la couronne entourant l'appareil de Golgi, et plusieurs zones définies sur la périphérie de la cellule). Dans le cas de cellules de forme quelconque, il est intéressant de s'appuyer sur les zones OD détectées pour obtenir la partition. Dans tous les cas, il est nécessaire de détecter automatiquement l'appareil de Golgi et le support de la cellule sur l'image. Ces deux régions sont aisées à extraire après séparation des composantes "objet" et "fond" de la séquence (avec la méthode décrite à la section 4.2). L'application de l'algorithme EM tel qu'il est décrit à la section 4.1.1 à la composante "fond" de la séquence permet d'extraire le domaine de la cellule. Une projection de l'intensité minimale au cours de la séquence sur la composante "objet" segmente l'appareil de Golgi. En effet, la seule région appartenant à la composante "objet" tout au long de la séquence est l'appareil de Golgi qui occupe un statut particulier. Afin de limiter le nombre d'inconnues pour l'estimation des paires OD, il est nécessaire de limiter le nombre de régions (ce qui augmente le ratio "nombre d'arêtes"/"nombre de sommets", et par conséquent le nombre d'inconnues). Une partition de l'image en cinq régions est très satisfaisante (section 5.6.1). Un nombre plus faible de régions produit des résultats tout aussi convaincants. Il est ensuite possible d'affiner la partition pour analyser le trafic de manière plus détaillée ; une approche hiérarchique adaptée à la tomographie de réseaux est alors souhaitable (section 5.6.2). Notons que le nombre maximal de régions pour une partition est limité par le comptage des vésicules au niveau des frontières. Si le partitionnement devient trop fin, les vésicules sont en mesure de franchir plus d'une seule frontière entre deux images consécutives. Une partition de l'image en onze régions s'avère suffisante pour caractériser le trafic vésiculaire de la protéine Rab6. Une fois l'étape de détection de l'appareil de Golgi et de la cellule (nécessitant une séparation des composantes 4.2) achevée, la partition de l'image est très rapidement obtenue et facile à programmer sur n'importe quel support.

**Estimation du nombre de vésicules qui franchit chaque frontière de la partition** Pour compter les vésicules au niveau des frontières, nous exploitons la carte binaire de détection issue de la séparation des composantes, déjà réalisée pour partitionner l'image. Nous utilisons ensuite la méthode d'appariement

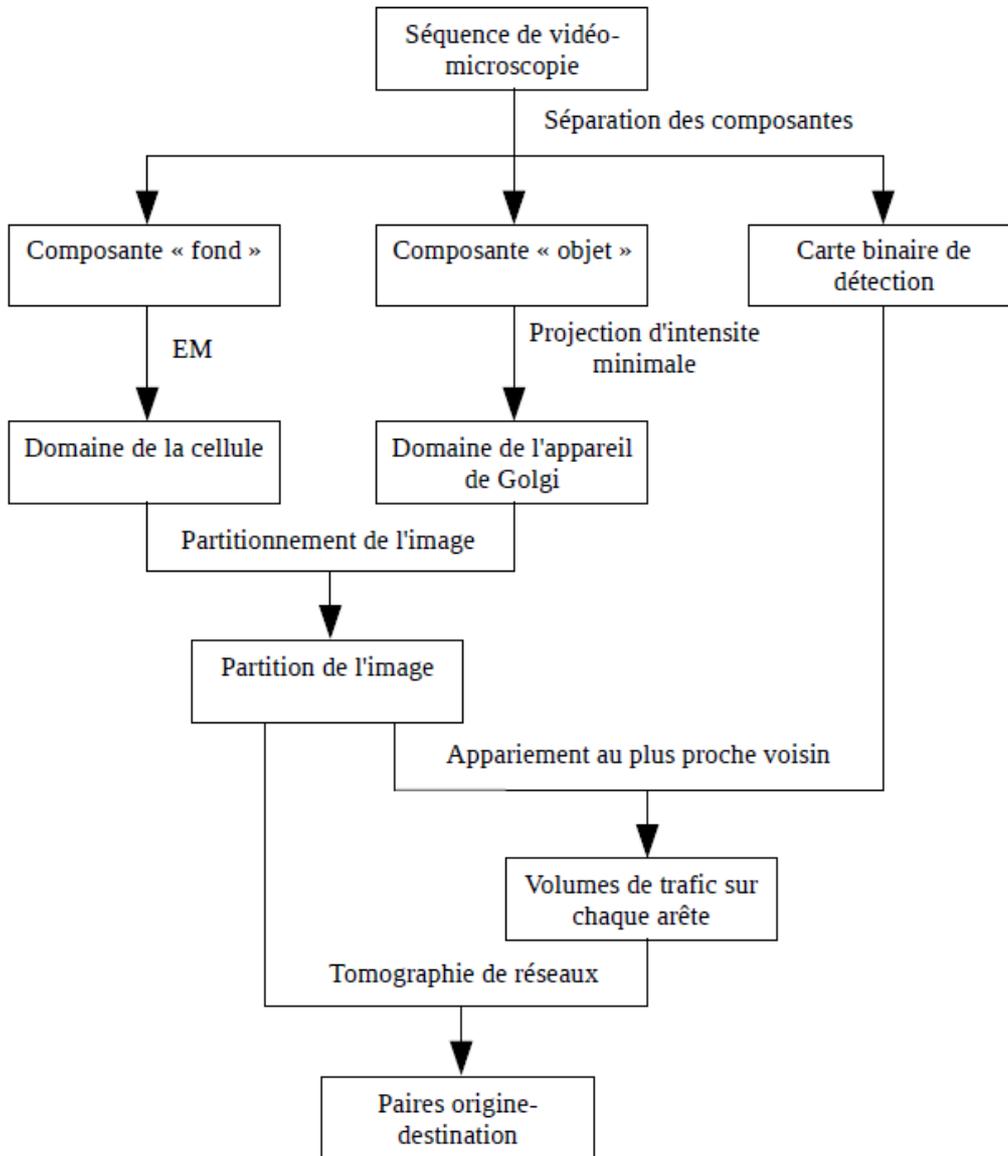


FIGURE 5.37: Étapes nécessaires à l'estimation du trafic vésiculaire.

au plus proche voisin (section 5.4) pour réaliser un suivi local des vésicules au niveau des frontières. Ce suivi est simple, il est donc très rapide et facile à programmer. Il faut simplement donner à l'algorithme la distance maximale potentiellement parcourue par les vésicules entre deux instants.

**Définition de la matrice de routage** La matrice de routage qui s'est avérée la plus efficace dans nos expériences est celle qui dépend des échanges de vésicules au niveau des frontières (section 5.5.2). La définition de cette matrice est très rapide et facile à programmer.

**Estimation du trafic sur les paires origine-destination** L'estimation du trafic sur les paires OD a

donné les résultats les plus probants en imposant une contrainte de parcimonie et de positivité sur les paires OD (section 5.6.1). La méthode des moindres carrés avec contrainte de positivité donne des résultats analogues. Ces méthodes d'optimisation sont disponibles dans la "toolbox" "Optimization" de "Matlab". Leur exécution est très rapide, et il serait intéressant de programmer ces méthodes en C++ pour établir toute la chaîne de traitement associée à l'analyse du trafic avec un même langage de programmation.

**Performances** La simulation de séquences d'images proches de la réalité (chapitre 3) nous a permis d'évaluer quantitativement notre méthode d'analyse du trafic dans des conditions difficiles. Les résultats obtenus sont tout à fait satisfaisants (section 5.6.2). Bien que nous ne disposions pas de réalité terrain sur des séquences d'images réelles, les résultats obtenus sont cohérents et semblent capables d'éclairer la compréhension du trafic vésiculaire des protéines Rab6 (section 5.6.2), et sans doute d'autres protéines en trafic à l'intérieur de la cellule. Nous avons développé toutes les étapes d'estimation du trafic sous C++, mise à part l'estimation de  $v^{OD}$  qui nécessite l'utilisation de "Matlab". L'estimation du trafic ne nécessite pas de paramètres, exceptée l'étape de séparation des composantes, ce qui ne simplifie pas son usage par des biologistes. Il est aussi possible d'exploiter d'autres méthodes de séparation des composantes membranaire et cytosolique. Les différentes étapes de l'estimation du trafic vésiculaire sont présentées sur la figure 5.37.

## 5.8 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons abordé l'analyse du trafic vésiculaire dans des séquences d'images de microscopie de fluorescence. Les méthodes utilisées généralement dans ce contexte cherchent à suivre individuellement chaque objet au cours du temps. Cependant, les séquences d'images traitées sont trop complexes pour permettre un suivi fiable. Nous avons proposé d'estimer ce trafic de manière plus globale, en exploitant le concept de tomographie de réseaux.

Pour la mise en oeuvre, il faut un graphe, support du trafic. Nous avons proposé deux stratégies pour obtenir ce graphe. La première consiste à détecter les régions origine et destination à partir des mesures de variations d'intensité (section 5.2.1). L'autre stratégie est adaptée aux séquences d'images dans lesquelles les cellules sont contraintes par des *micro-patterns*. Les *micro-patterns* facilitent la répétition des expérimentations, puisque les cellules analogues ont toutes la même forme. Il est donc recommandé de préciser une partition unique pour un type de *micro-pattern*, afin de pouvoir comparer les résultats entre eux. Ensuite, nous devons estimer le nombre de vésicules qui se déplacent d'une région à une autre à chaque instant. Nous avons choisi de suivre les vésicules au niveau des frontières. Nous avons démontré sur des simulations que ce suivi, très simple dans sa conception, est tout à fait efficace, même avec un échantillonnage temporel de l'ordre d'1 image/seconde.

Nous avons ensuite présenté plusieurs méthodes pour établir la matrice de routage. Deux procédures inédites dépendant du trafic observé ont été développées. La première tient compte de la carte PIM, tandis que la deuxième utilise directement les comptages de vésicules au niveau des frontières. Si la modélisation de la première avec des métriques géométriques est séduisante, les résultats se sont avérés décevants car les chemins minimaux extraits de la carte PIM ne sont pas représentatifs de l'ensemble des vésicules. En revanche, les résultats obtenus sur la base de comptages de vésicules se sont avérés satisfaisants. Enfin, il reste à définir une procédure d'estimation pour résoudre le problème inverse relatif à la tomographie de réseaux. Afin d'identifier les principales autoroutes du trafic à l'intérieur de la cellule, une contrainte de parcimonie est proposée pour limiter le nombre de paires OD. Dans les expérimentations, cette modélisation s'est avérée satisfaisante. Nous avons également évalué une approche hiérarchique qui s'est avérée efficace pour des partitions constituées de régions plus nombreuses.

Nous avons évalué notre méthode d'analyse du trafic sur des séquences d'images simulées. Ces

séquences sont complexes et proches des séquences d'images réelles. Les résultats obtenus sont tout à fait satisfaisants. Nous avons également évalué notre méthode d'analyse sur des séquences d'images réelles. Bien que nous ne disposions pas de vérités-terrain (labellisées par des experts-biologistes) difficiles à obtenir, les résultats obtenus sont encourageants. Désormais, une série d'expériences sur un grand nombre de séquences réelles pour tenter de mieux appréhender le trafic de la protéine Rab6 est nécessaire. D'autres protéines évoluant à l'intérieur de la cellule pourront également être appréhendées par nos approches.

---

## Conclusion générale et perspectives

---

### Synthèse des travaux effectués

Au cours de cette thèse, nous avons orienté nos travaux dans une direction originale qui visait à analyser le trafic vésiculaire. Nous avons étudié principalement la protéine Rab6. Pour atteindre nos objectifs, nous avons été confrontés à différentes problématiques.

**Séparation des composantes “objet” et “fond” en vidéo-microscopie.** L’acquisition de séquences d’images de microscopie de fluorescence permet d’observer des processus et mécanismes spatio-temporels à l’intérieur de la cellule. Cette technologie, relativement récente, a modifié en profondeur l’étude d’objets biologiques, notamment au niveau dynamique. L’étude spatio-temporelle d’objets en mouvement est généralement obtenue via une détection des objets d’intérêt. Peu de méthodes de traitement d’images ont été proposées pour séparer les composantes “objet” et “fond” dans ces séquences d’images. Pourtant, une séparation est pertinente pour un grand nombre d’applications. L’analyse du trafic vésiculaire est un bon exemple et notre étude a principalement porté sur la protéine Rab6. Dans la cellule, la protéine est présente sous une forme membranaire ou cytosolique. Le fait de séparer ces composantes permet donc de mesurer quantitativement les deux états.

Nous avons choisi d’exploiter les champs conditionnels aléatoires pour séparer les composantes “fond” et “objet”. Cette modélisation est flexible et permet de prendre en compte des informations de natures différentes, et d’estimer conjointement la composante “fond” et la détection des vésicules. Nous avons proposé un modèle bâti à partir de quatre termes différents : deux termes de régularisation (spatiale et temporelle), un terme de discrimination exploitant une mesure de détection, et un terme qui prend en compte la composante “fond”. En microscopie de fluorescence, le niveau d’intensité est proportionnel au nombre de fluorophores. La détection des objets d’intérêt semble possible par simple seuillage. Sur des données réelles, l’intensité du fond est aussi variable, ce qui est problématique. Nous avons donc proposé une mesure définie sur la base du contraste entre motifs d’image. L’approche par motifs tient mieux compte du contexte, et est beaucoup plus robuste aux imperfections de l’image. Une fois les objets d’intérêt détectés, nous estimons la composante “fond” en interpolant les régions détectées comme vésicules. Nous avons ensuite proposé un schéma alterné pour détecter les vésicules et estimer la composante “fond”.

**Simulation de la protéine Rab6.** Au cours de cette thèse, nous avons senti le besoin de développer un simulateur de trafic vésiculaire. Ce simulateur est un outil assez sophistiqué pour évaluer les performances de nos méthodes de séparation de composantes et d’analyse du trafic. C’est aussi un outil d’aide

à la compréhension du trafic vésiculaire, voire de contrôle pour les biologistes. Dans l'étude portant sur la protéine Rab6, nos collaborateurs biologistes de l'institut Curie admettent que la protéine Rab6 connaît une succession d'étapes : i) ancrage à l'appareil de Golgi ; ii) trafic entre l'appareil de Golgi et le reticulum endoplasmique ; iii) diffusion dans le cytosol, de la périphérie de la cellule vers l'appareil de Golgi. Nous avons simulé le trafic vésiculaire de la protéine Rab6 selon le principe de la tomographie de réseaux. Dans ce contexte, seules les origines et destinations des vésicules sur le réseau de microtubules sont spécifiées par l'expert. Ensuite, une procédure de routage permet d'observer un trafic sur l'ensemble du réseau. Nous incorporons un certain nombre d'informations connues pour améliorer la simulation. Nous cherchons à mimer au mieux le comportement dynamique observé dans des séquences d'images réelles.

**Analyse du trafic vésiculaire des protéines Rab6.** La complexité du comportement des protéines Rab6 sous leur forme vésiculaire et leur nombre important ne permettent pas d'extraire complètement les trajectoires de chacune des vésicules avec des méthodes *connexionnistes*, ou avec des méthodes de filtrage stochastique. La tomographie de réseaux s'est avérée utile à nouveau dans ce contexte d'analyse. L'idée est de compter localement le passage des vésicules, et d'inventer une procédure de routage pour relier les comptages locaux aux trajectoires globales des vésicules. Cette approche est innovante pour l'étude du trafic en analyse d'images, mais elle nécessite d'être adaptée à notre problème.

Un graphe représentant le support du trafic est obtenu par association avec une partition définie sur l'image. Nous avons proposé deux types de partition. Le premier s'adapte au trafic observé : les régions d'origine et de destination des vésicules sont détectées, et chaque région détectée définit une région de la partition. Le deuxième type de partition est fixe : une partition unique est déterminée quelle que soit la cellule, afin de comparer les résultats entre eux.

Ensuite, il faut estimer le nombre de vésicules qui se déplacent d'une région à une autre. Pour ce faire, nous avons proposé une méthode qui consiste à effectuer un suivi local des vésicules au niveau des frontières des régions.

L'étape suivante vise à établir une procédure de routage. Nous avons proposé deux nouvelles méthodes d'estimation du routage pour lesquelles plusieurs chemins sont possibles pour joindre une origine à une destination. À chacun de ces chemins, on associe une probabilité qui dépend du trafic observé dans la séquence d'images. Pour la première méthode, le chemin minimal au sens géodésique calculé sur la carte de projection du maximum d'intensité entre deux régions voisines définit un coût pour l'arête associée à la frontière entre deux régions. Pour la deuxième méthode, le comptage des vésicules au niveau des frontières est directement exploité pour calculer les probabilités des différents chemins. Cette méthode s'est révélée beaucoup plus efficace que la précédente car elle prend en compte l'ensemble des comptages, et par conséquent l'ensemble des vésicules, pour définir la procédure de routage.

La dernière opération vise à résoudre le problème inverse issu de l'équation fondamentale de la tomographie de réseaux. Pour cela, nous avons proposé d'utiliser une contrainte de parcimonie afin de n'extraire que les trajectoires significatives des vésicules. De plus, nous avons développé une approche hiérarchique qui permet d'obtenir de bons résultats si la partition est constituée de nombreuses régions.

## Perspectives

De nombreuses perspectives se dégagent de ces travaux, tant sur le plan théorique que pour la problématique biologique.

**Séparation des composantes "objet" et "fond" en vidéo-microscopie.** À court terme, notre but est de mettre cette méthode de séparation à la disposition des biologistes de l'Institut Curie. Bien que cette

méthode soit paramétrique, les performances semblent satisfaisantes avec les paramètres par défaut que nous avons utilisés. Toutefois, il serait intéressant de calibrer ces paramètres sur des séquences d'images réelles pour lesquelles la vérité-terrain est connue. On pourrait également essayer d'apprendre ces paramètres sur des simulations suivant le principe exposé au chapitre 3. Il faudrait pour cela complexifier l'apparence de la composante "fond" dans les simulations. Sur un plan formel, il serait intéressant de proposer une modélisation markovienne des images en exploitant les motifs (Freeman, Pasztor & Carmichael 2000, Roth & Black 2005) positionnés aux noeuds du graphe (grille  $S$  de l'image) (Chapitre 4). Il serait également utile de réviser davantage sur l'interpolation des zones détectées. On sait que l'interpolation est d'autant plus difficile à réaliser que la région à interpoler est grande, et l'interpolation de la composante "fond" dans la région de l'appareil de Golgi n'est visuellement pas très satisfaisante.

**Amélioration de la simulation de la composante "fond".** En comparant les simulations avec des séquences d'images réelles, la composante "fond" est bien souvent générée de manière trop simple. Sur les séquences d'images réelles, le fond est le résultat d'une diffusion des protéines dans le cytosol, et de phénomènes dynamiques associés à d'autres structures inconnues. Il serait intéressant de les simuler, au moins pour obtenir un rendu visuel plus convaincant. Ces modifications permettraient une meilleure évaluation des méthodes de séparation et d'analyse du trafic.

**Détection de comportements dynamiques pour les vésicules.** Nous aimerions dans le futur utiliser les simulations pour repérer certains comportements dynamiques singuliers des vésicules. L'idée serait de simuler des comportements particuliers pour les vésicules tels que la fusion de vésicules. Cette simulation permettrait d'observer ce comportement sur un grand nombre de situations, et ainsi d'apprendre la signature dynamique qui lui est associée. Il suffirait alors d'extraire cette signature dans des séquences d'images réelles pour détecter ces comportements sur des données réelles.

**Analyse du trafic vésiculaire.** Nous avons appliqué notre méthode d'analyse du trafic à quelques séquences d'images réelles où les protéines Rab6 sont marquées par fluorescence. À court terme, nous souhaitons appliquer notre approche à un grand nombre de séquences d'images réelles. L'idée est de coupler les informations globales sur le trafic obtenues par cette approche à des informations locales (vitesse instantanée, orientation locale des vésicules, ...) issues du suivi de chaque vésicule sur des séquences dans lesquelles l'échantillonnage temporel est beaucoup plus élevé (pour permettre le suivi individuel des vésicules). La confrontation de ces deux types d'informations permettrait d'avoir une compréhension plus globale du comportement des protéines Rab6 sous leur forme vésiculaire. Nous souhaiterions également appliquer notre méthode à l'analyse du trafic d'autres protéines intracellulaires.

**Analyse et simulation de séquences d'images réelles.** Une fois l'analyse du trafic réalisée, les proportions de trafic estimées sur les paires origine-destination peuvent être utilisées pour générer une simulation proche de la séquence d'images observée. Il est ensuite envisageable de perturber cette simulation pour produire des conséquences sur le trafic. Cette conception serait très utile aux biologistes car elle leur permettrait d'observer des comportements qui ne sont pas faciles à observer.

**Tomographie de réseaux paramétrée par le temps** La tomographie de réseaux est un outil qui permet d'estimer un trafic relativement stationnaire. Dans notre approche, nous exploitons notamment les moyennes temporelles des comptages sur toute la séquence traitée. Il serait intéressant d'adapter cette approche afin d'estimer un trafic qui varie au cours de la séquence. Pour cela, nous envisageons d'adapter la tomographie de réseaux telle que nous l'avons conçue sur une fenêtre temporelle dont la taille sera largement inférieure à la durée de la séquence, et de faire glisser cette fenêtre sur toute la séquence afin d'évaluer le trafic au cours du temps et plus seulement en moyenne. Cette approche aura d'autant

plus d'intérêt que la séquence traitée est longue. Si pour le moment, les séquences d'images acquises sont relativement courtes (autour de 200 images), on peut imaginer que dans les prochaines années, les progrès technologiques permettront d'extraire des séquences plus longues, rendant possible l'analyse de plusieurs "cycles" caractérisant un trafic. On peut également imaginer de nouvelles contraintes biophysiques pour les paires origine-destination afin d'améliorer leur estimation. Une connaissance plus précise des modèles d'intensité des vésicules permettrait de mieux contraindre l'estimation.

---

## Modélisation du transport routier

---

Cette revue des méthodes d'estimation globale du trafic sur des réseaux de transport routier est issue de la présentation assez synthétique proposée par Abrahamsson (1998). En analyse du transport, les seules données disponibles sont fournies par des capteurs, localisés en des points de passage (en général, les routes les plus fréquentées) qui comptent le nombre de véhicules qui transitent par ces points en une journée. Ces comptages ne sont pas suffisants pour exprimer les trajectoires complètes des véhicules. Cependant, il est possible de les relier aux principaux flux du trafic si les itinéraires des usagers sont connus. Le trafic est modélisé sous forme de graphe : les comptages de véhicules sont associés à des arêtes appelées *arcs de transport*, et les régions reliées par les routes sur lesquelles les véhicules sont comptés sont associées à des sommets. Les trajectoires des véhicules sur ce graphe sont caractérisées par le volume de trafic estimé sur des *paires Origine-Destination (OD)*, définies comme le trafic entre un sommet origine et un sommet destination. L'ensemble du volume de trafic estimé sur les paires origine-destination est agrégé dans une *matrice origine-destination* qui décrit les principaux flux de circulation sur le territoire étudié.

L'objectif est d'assigner une matrice OD à un réseau de transport, c'est-à-dire estimer une matrice OD qui vérifie les comptages locaux. En raison de la dimension élevée du problème, un grand nombre de matrices OD différentes sont potentiellement candidates. Le nombre de paires OD possibles excède en effet largement le nombre d'arcs de transport sur lesquels le trafic est mesuré. Quelques approches cherchent à résoudre ce problème en considérant une matrice OD de référence (Snickars & Weibull 1977, Erlander et al. 1979, Smith 1979, Van Zuylen & Willumsen 1980, Fisk & Boyce 1983), d'autres exploitent un modèle probabiliste (Maher 1983, Cascetta 1984, Spiess 1987, Bell 1991, Yang, Sasaki, Iida & Asakura 1992).

L'embouteillage des véhicules est un phénomène bien connu des automobilistes qu'il faut considérer dans l'assignement d'une matrice OD. Il est possible de prendre en compte ce phénomène en définissant une fonction de coût qui dépende du volume de trafic observé sur les arcs de transport. On qualifie alors l'assignement de la matrice OD d'*assignement à l'équilibre*. Lorsque les effets des embouteillages sont négligés, on parle d'*assignement proportionnel*.

Tous les modèles d'estimation des matrices OD utilisent de l'information *a priori*. Cette information s'exprime par l'utilisation d'une matrice OD *référence*, ou par la définition d'une hypothèse sur le nombre, les origines ou les destinations des voyageurs.

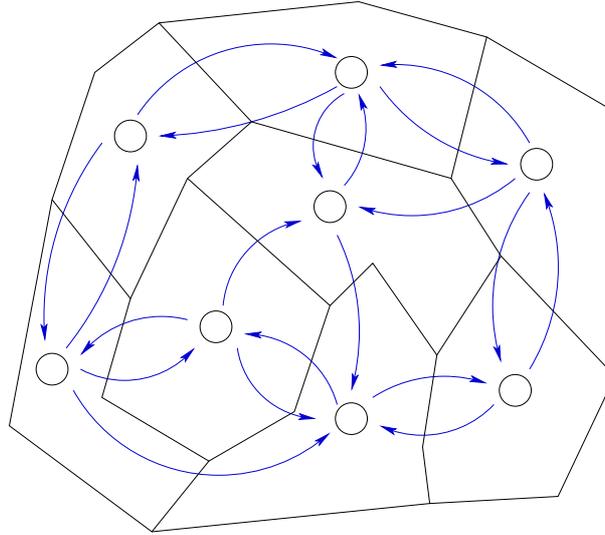


FIGURE A.1: Réseau de transport simple. Les sommets sont représentés par des cercles noirs, les arcs de transport par des flèches, et les différentes régions correspondant aux sommets sont représentées par des polygones.

### A.1 Estimation d'une matrice origine-destination

Soit  $\mathcal{G}_{trafic} = \{\mathcal{V}, \mathcal{E}\}$  le graphe de transport sur lequel le trafic est estimé. Les arcs de transport  $\mathcal{E} = \{\varphi_1, \dots, \varphi_r\}$  correspondent aux routes sur lesquelles les véhicules sont comptés, et les sommets  $\mathcal{V} = \{\vartheta_1, \dots, \vartheta_n\}$  représentent les régions reliées par ces routes. Un réseau de transport simple est illustré sur la figure A.1.

Soit  $\mathbf{v}^{OD} \in \mathbb{R}_+^c$  la "matrice"<sup>1</sup> OD de dimension  $c = n(n-1)$  définissant le volume de trafic sur chaque paire OD  $\mathbf{z}_j, j = 1, \dots, c$ . Soit  $\mathbf{y}^{arête}$  le volume de trafic mesuré sur chaque arc de transport, où  $y_e^{arête} \in \mathbb{N}, e = 1, \dots, r$ . Le problème d'estimation revient à trouver la matrice OD qui, une fois assignée au réseau de transport, reproduit le volume de trafic observé. Par la suite, nous reprenons la terminologie "matrice" pour désigner  $\mathbf{v}^{OD}$ , conformément au vocabulaire de la communauté du transport routier.

La technique d'assignement est un point crucial dans l'estimation d'une matrice OD. Elle doit répondre à la question suivante : quelle(s) est(sont) la(les) route(s) dans le réseau de transport qui est(sont) empruntée(s) par les voyageurs pour aller d'une zone  $\vartheta_1 \in \mathcal{V}$  à une zone  $\vartheta_2 \in \mathcal{V}$ ? Ces informations sont portées par la matrice de routage  $\mathbf{A}$ . Les éléments  $a_e^j \in \mathbb{R}$  de cette matrice de dimension  $r \times c$  représentent la proportion de véhicules se déplaçant sur la paire OD  $\mathbf{z}_j, j \in \{1, \dots, c\}$  qui empruntent la route associée à l'arc de transport  $\varphi_e, e \in \{1, \dots, r\}$ . Dans le cas d'un *assignement proportionnel*, les itinéraires des voyageurs sont indépendants des volumes de trafic mesurés sur les arcs de transport. En revanche, dans le cas d'un *assignement à l'équilibre*, le coût pour voyager sur un arc dépend du volume de trafic. Les techniques d'assignement à l'équilibre tentent de satisfaire le premier principe d'équilibre de Wardrop (Wardrop 1952) : le système de trafic est en *équilibre* quand aucun voyageur ne peut changer de route pour obtenir un coût de trafic moindre. La valeur  $a_e^j$  dépend alors du volume de trafic sur tous les arcs, c'est-à-dire  $a_e^j = a_e^j(\mathbf{y}^{arête})$ , et ne peut être définie indépendamment du processus d'estimation de la matrice OD. Cela nécessite la prise en compte de plusieurs chemins avec des coûts différents pour chaque paire OD. Une technique d'assignement à l'équilibre avec un traitement explicite des effets des embouteillages est beaucoup plus gourmande en temps de calcul qu'une technique d'assignement proportionnel. Soit  $\{\Gamma_i^j\}_{i=1, \dots, N_j}$  l'ensemble des  $N_j$  chemins possibles associé à la paire OD  $j$ . Soit

1. Les matrices OD sont nommées "matrices" de manière abusive, et sont en réalité des vecteurs.

$C(\Gamma_i^j) \in \mathbb{R}$  le coût associé au chemin  $\Gamma_i^j$ . La matrice  $\mathbf{A}$  est décomposable de la manière suivante :

$$a_e^j = \sum_{i=1}^{N_j} 1_{e[\Gamma_i^j]} P(\Gamma_i^j), \quad (\text{A.1})$$

$$\text{où } 1_{e[\Gamma_i^j]} = \begin{cases} 1 & \text{si le chemin } \Gamma_i^j \text{ emprunte l'arête } e, \\ 0 & \text{sinon,} \end{cases}$$

$$\text{et } P(\Gamma_i^j) = \frac{C(\Gamma_i^j)}{\sum_{i=1}^{N_j} C(\Gamma_i^j)}.$$

Pour un arc donné  $\varphi_e$ , la somme du volume de trafic  $v_j^{OD}$  sur les paires OD  $z_j, j \in \{1, \dots, c\}$  qui empruntent  $\varphi_e$  est égale au volume de trafic  $y_e^{arête}$ , ce qui conduit à l'équation fondamentale :

$$y_e^{arête} = \sum_{j=1}^c a_e^j v_j^{OD}, \quad e \in \{1, \dots, r\}. \quad (\text{A.2})$$

Si on considère l'ensemble des arcs de transport, l'équation (A.2) permet d'écrire :

$$\mathbf{y}^{arête} = \mathbf{A} \mathbf{v}^{OD}. \quad (\text{A.3})$$

La matrice OD  $\mathbf{v}^{OD}$  est déterminée en résolvant le système d'équations (A.3). Ce système est sous-déterminé car il y a beaucoup plus de paires OD que d'arcs de transport. Des données supplémentaires (information *a priori*) et/ou des hypothèses sur les trajets sont nécessaires pour trouver une unique matrice OD. Bien que les motivations et hypothèses pour les différentes approches diffèrent entre elles, l'estimation de la matrice OD  $\mathbf{v}^{OD}$  revient au problème d'optimisation général suivant (Spiess 1987, Cascetta & Nguyen 1988, Abrahamsson 1998) :

$$\min_{\mathbf{v}^{OD}} C(\mathbf{v}^{OD}), \text{ sous les contraintes } \begin{cases} \mathbf{y}^{arête} = \mathbf{A} \mathbf{v}^{OD}, \\ y_e^{arête} \geq 0, & \forall e = 1, \dots, r, \\ v_j^{OD} \geq 0, & \forall j = 1, \dots, c, \end{cases} \quad (\text{A.4})$$

où  $C(\cdot)$  représente une fonction de coût.

Il existe deux types d'approches pour estimer la matrice OD. Les approches de type "trafic" s'appuient sur des contraintes relatives au trafic, tandis que les approches statistiques requièrent la définition d'un modèle statistique.

## A.2 Approches de type "trafic"

En général, les approches de type "trafic" utilisent une matrice OD précédemment estimée, appelée *matrice référence*. Elles peuvent aussi s'appuyer sur la connaissance *a priori* des origines et destinations du trafic.

**Maximum d'entropie** Afin de résoudre le système d'équations (A.4), il est envisageable d'estimer la matrice OD présentant le maximum d'entropie. Si une matrice OD référence  $\mathbf{v}_0^{OD}$  est connue, la matrice OD à estimer est celle qui ajoute le plus possible d'information par rapport à la matrice référence, sous les contraintes d'assignement. La contrainte du maximum d'entropie s'exprime de la manière suivante :

$$C(\mathbf{v}^{OD}, \mathbf{v}_0^{OD}) = \sum_{j=1}^c v_j^{OD} \log_2 \left( \frac{v_j^{OD}}{v_{0,j}^{OD}} \right). \quad (\text{A.5})$$

Snickars & Weibull (1977) proposent une dérivation combinatoire de l'équation (A.5) (Abrahamsson 1998). Une matrice OD minimisant l'équation (A.5) tout en vérifiant l'assignement conduit à la solution suivante :

$$v_j^{OD} = v_{0,j}^{OD} \exp(\lambda_1 a_1^j + \lambda_2 a_2^j + \dots + \lambda_r a_r^j), \quad (\text{A.6})$$

où les  $\lambda_i$  sont les coefficients de Lagrange associés aux contraintes sur les volumes de trafic. L'expression (A.6) repose sur l'hypothèse d'assignement proportionnel (Van Zuylen & Willumsen 1980). Une matrice OD assignée au réseau de cette façon reproduit alors les volumes de trafic observés.

Fisk (1988) prend en compte la congestion du trafic avec un modèle de maximum d'entropie sans matrice référence (Abrahamsson 1998). Les conditions d'assignement à l'équilibre sont exprimées par des contraintes. Smith (1979) décrit ce modèle par une structure à deux niveaux qui maximise l'entropie au niveau supérieur, et résout le problème d'assignement à l'équilibre en introduisant les contraintes suivantes (Abrahamsson 1998) :

$$\min_{v^{OD}} \sum_{j=1}^c v_j^{OD} \log_2(v_j^{OD}) \text{ sous les contraintes} \quad (\text{A.7})$$

$$\left\{ \begin{array}{ll} \frac{C(\Gamma_{i'}^j) - C(\Gamma_i^j)}{N_j} \geq 0, & \forall j = 1, \dots, c, \forall i = 1, \dots, N_j, \forall i' \neq i, \\ \sum_{i=1}^{N_j} P(\Gamma_i^j) = v_j^{OD}, & \forall j = 1, \dots, c, \\ \sum_{j=1}^c \sum_{i=1}^{N_j} 1_e[\Gamma_i^j] P(\Gamma_i^j) = y_e^{arête}, & \forall e = 1, \dots, r, \\ v_j^{OD} \geq 0, & \forall j = 1, \dots, c, \\ P(\Gamma_i^j) \geq 0, & \forall j = 1, \dots, c, \forall i = 1, \dots, N_j, \end{array} \right.$$

où  $C(\Gamma_i^j)$  est le coût associé au chemin  $\Gamma_i^j$ . La première contrainte du système (A.7) sert à respecter le principe d'équilibre de Wardrop (Wardrop 1952). Les autres contraintes ont pour but d'imposer l'assignement de  $v^{OD}$  au réseau de transport.

**Origines et destinations connues** Si les origines et destinations des véhicules ainsi que leur proportion sont connues, ces informations sont également des contraintes supplémentaires à ajouter au système d'équations (A.4). En définissant une fonction de coût  $C(y_e^{arête})$  sur l'arc  $\varphi_e$  qui dépend du volume de trafic observé, le modèle considéré par Fisk & Boyce (1983) s'exprime de la manière suivante

(Abrahamsson 1998) :

$$\min_{\mathbf{v}^{OD}} \sum_{e=1}^r \left( \int_0^{y_e^{arête}} C(y_e^{arête}) dy^{arête} \right) \text{ sous les contraintes}$$

$$\left\{ \begin{array}{ll} \sum_{j=1}^c v_j^{OD} & = \mathcal{O}_{\vartheta_1}, \quad \forall \vartheta_1 = 1, \dots, n : \vartheta_2 \neq \vartheta_1, \\ \sum_{j=1}^c v_j^{OD} & = \mathcal{D}_{\vartheta_2}, \quad \forall \vartheta_2 = 1, \dots, n : \vartheta_1 \neq \vartheta_2, \\ \sum_{i=1}^{N_j} P(\Gamma_i^j) & = v_j^{OD}, \quad \forall j = 1, \dots, c, \\ \sum_{j=1}^c \sum_{i=1}^{N_j} 1_e[\Gamma_i^j] P(\Gamma_i^j) & = y_e^{arête}, \quad \forall e = 1, \dots, r, \\ v_j^{OD} & \geq 0, \quad \forall j = 1, \dots, c, \\ P(\Gamma_i^j) & \geq 0, \quad \forall j = 1, \dots, c, \forall i = 1, \dots, N_j, \end{array} \right. \quad (\text{A.8})$$

où  $z_j$  est la paire OD qui relie les zones  $\vartheta_1$  et  $\vartheta_2$ , et  $\mathcal{O}_{\vartheta_1}$  (respectivement  $\mathcal{D}_{\vartheta_2}$ ) désigne le nombre de voyages partant du sommet  $\vartheta_1$  (respectivement arrivant au sommet  $\vartheta_2$ ). Erlander et al. (1979) prouvent que le modèle peut être rigoureusement estimé et conduit à la solution unique suivante :

$$C_{total} = \sum_{e=1}^r \int_0^{y_e^{arête}} C(y_e^{arête}) dy^{arête}, \quad (\text{A.9})$$

si la somme des intégrales de toutes les fonctions de coût sur les arcs est connue.

**Méthode des moindres carrés** LeBlanc & Farhangian (1982) considèrent un *assignement à l'équilibre* et proposent un critère de minimisation au sens des moindres carrés (Abrahamsson 1998). Leur but est d'estimer une matrice OD respectant le principe d'équilibre de Wardrop qui soit le plus proche de la matrice OD référence :

$$\min_{\mathbf{v}^{OD}} \sum_{j=1}^c (v_j^{OD} - v_{0j}^{OD})^2 \text{ sous les contraintes}$$

$$\left\{ \begin{array}{ll} \sum_{e=1}^r \int_0^{y_e^{arête}} C(y_e^{arête}) dy^{arête} & = F_0 + \sum_{j=1}^c \sum_{i=1}^{N_j} 1_e[\Gamma_i^j] P(\Gamma_i^j), \\ \sum_{i=1}^{N_j} P(\Gamma_i^j) & = v_j^{OD}, \quad \forall j = 1, \dots, c, \\ \sum_{j=1}^c \sum_{i=1}^{N_j} 1_e[\Gamma_i^j] P(\Gamma_i^j) & = y_e^{arête}, \quad \forall e = 1, \dots, r, \\ v_j^{OD} & \geq 0, \quad \forall j = 1, \dots, c, \\ P(\Gamma_i^j) & \geq 0, \quad \forall j = 1, \dots, c, \forall i = 1, \dots, N_j, \end{array} \right. \quad (\text{A.10})$$

où  $F_0$  est la constante objectif définie par Nguyen (1977) pour les problèmes d'*assignement à l'équilibre*.

### A.3 Approches statistiques

Les approches statistiques supposent que la matrice OD référence suit une distribution de probabilité. En général, le vecteur  $\mathbf{v}_0^{OD}$  est obtenu par l'échantillonnage pour chaque paire OD d'une variable aléatoire qui suit une loi de type Poisson, d'espérance inconnue.

**Maximum de Vraisemblance (MV)** Sous l'hypothèse que le volume de trafic sur chaque paire OD  $v_j^{OD}$  suit une loi de Poisson de moyenne  $\rho_j$ , la probabilité d'observer  $v_j^{OD}$  est de la forme :

$$P(v_j^{OD}) = \frac{(\rho_j)^{v_j^{OD}} e^{-\rho_j}}{v_j^{OD}!}, \quad j = 1, \dots, c. \quad (\text{A.11})$$

La probabilité jointe d'observer la matrice  $\mathbf{v}^{OD}$  est par conséquent la suivante sous des hypothèses d'indépendance :

$$P(\mathbf{v}^{OD}) = \prod_{j=1}^c P(v_j^{OD}) = \prod_{j=1}^c \frac{(\rho_j)^{v_j^{OD}} e^{-\rho_j}}{v_j^{OD}!}. \quad (\text{A.12})$$

De plus, les éléments de la matrice  $\mathbf{v}^{OD}$  sont positifs ou nuls et consistants avec les volumes de trafic observés  $\mathbf{y}^{arête}$ . L'estimation au sens du Maximum de Vraisemblance (MV) (Wilks 1962, Wilson 1976, Spiess 1987) revient à déterminer la matrice  $\mathbf{v}^{OD}$  qui satisfait les contraintes d'assignement. Estimer  $\mathbf{v}^{OD}$  au sens du maximum de vraisemblance revient à résoudre le problème d'optimisation suivant :

$$\min_{\mathbf{v}^{OD}} \sum_{j=1}^c (\rho_j - v_j^{OD} \log(\rho_j)), \quad (\text{A.13})$$

sous les contraintes d'assignement. Il faut noter que l'équation (A.13) est convexe et que  $\mathbf{v}^{OD}$  est strictement convexe si tous ses éléments sont positifs ou nuls. Si les volumes de trafic sont consistants avec les contraintes d'assignement, alors l'existence d'une solution optimale est garantie et peut être obtenue par n'importe quelle méthode standard de programmation convexe.

**Méthode des moindres carrés généralisés (MCG)** La matrice OD référence ainsi que les volumes de trafic observés sont connus à une erreur près :

$$\begin{aligned} \mathbf{v}_0^{OD} &= \mathbf{v}^{OD} + \mathbf{n}_{\mathbf{v}^{OD}}, \\ \mathbf{y}_0^{arête} &= \mathbf{y}^{arête}(\mathbf{v}^{OD}) + \mathbf{n}_{\mathbf{y}^{arête}}. \end{aligned} \quad (\text{A.14})$$

En général,  $\mathbf{n}_{\mathbf{v}^{OD}}$  et  $\mathbf{n}_{\mathbf{y}^{arête}}$  sont des vecteurs aléatoires supposés de moyenne nulle. Il n'est pas nécessaire de faire des hypothèses sur la distribution des erreurs  $\mathbf{n}_{\mathbf{v}^{OD}}$  et  $\mathbf{n}_{\mathbf{y}^{arête}}$ , mais seulement d'assurer l'existence de matrices de dispersion. Comme dans l'approche par MV, la matrice OD référence et les volumes de trafic sont supposés indépendants. Si la matrice OD référence  $\mathbf{v}_0^{OD}$  est caractérisée par une matrice d'erreur de variance-covariance  $\Sigma_{\mathbf{v}^{OD}}$ , et si la matrice de dispersion des volumes de trafic est notée  $\Sigma_{\mathbf{y}^{arête}}$ , l'estimateur des MCG revient à résoudre le problème de minimisation suivant :

$$\min_{\mathbf{v}^{OD}} \frac{1}{2} (\mathbf{v}_0^{OD} - \mathbf{v}^{OD})^T \Sigma_{\mathbf{v}^{OD}}^{-1} (\mathbf{v}_0^{OD} - \mathbf{v}^{OD}) + \frac{1}{2} (\mathbf{y}_0^{arête} - \mathbf{y}^{arête}(\mathbf{v}^{OD}))^T \Sigma_{\mathbf{y}^{arête}}^{-1} (\mathbf{y}_0^{arête} - \mathbf{y}^{arête}(\mathbf{v}^{OD})), \quad (\text{A.15})$$

sous les contraintes d'assignement. Notons que Cascetta (1984) traite la méthode des MCG sans les contraintes de non-négativité pour  $\mathbf{v}^{OD}$ , et que Bell (1991), pour sa part, propose un algorithme qui

considère explicitement la contrainte de non négativité pour la matrice OD avec un *assignement proportionnel*. Minimiser (A.15) conduit à la solution suivante :

$$\mathbf{v}^{OD} = \mathbf{v}_0^{OD} + \Sigma_{\mathbf{v}^{OD}} \mathbf{A}^T (\mathbf{A} \Sigma_{\mathbf{v}^{OD}} \mathbf{A}^T + \Sigma_{\mathbf{y}^{arête}})^{-1} (\mathbf{y}_0^{arête} - \mathbf{A} \mathbf{v}_0^{OD}) + (\Sigma_{\mathbf{v}^{OD}} - \Sigma_{\mathbf{v}^{OD}} \mathbf{A}^T (\mathbf{A} \Sigma_{\mathbf{v}^{OD}} \mathbf{A}^T + \Sigma_{\mathbf{y}^{arête}})^{-1} \mathbf{A} \Sigma_{\mathbf{v}^{OD}}) \boldsymbol{\lambda}_{\mathbf{v}^{OD}}, \quad (\text{A.16})$$

où  $\boldsymbol{\lambda}_{\mathbf{v}^{OD}}$  désigne les coefficients de Lagrange associés à la contrainte de non négativité des composantes de la matrice OD. Yang et al. (1992) étendent l'approche des MCG en prenant en compte un *assignement à l'équilibre* (Abrahamsson 1998). L'estimation de la matrice OD est formulée comme un problème d'optimisation à deux niveaux avec l'estimation des MCG au niveau supérieur et l'*assignement à l'équilibre* au niveau inférieur. Cependant, ce problème d'optimisation demeure difficile à résoudre.

**Inférence bayésienne** L'inférence bayésienne considère que la matrice OD référence sert à établir une loi *a priori*  $P(\mathbf{v}^{OD})$  sur la matrice OD à estimer. La probabilité des volumes de trafic observés conditionnellement à  $\mathbf{v}^{OD}$   $P(\mathbf{y}_0^{OD} | \mathbf{v}^{OD})$  permet d'exprimer la probabilité *a posteriori* selon la règle de Bayes :

$$P(\mathbf{v}^{OD} | \mathbf{y}_0^{arête}) \propto P(\mathbf{y}_0^{arête} | \mathbf{v}^{OD}) P(\mathbf{v}^{OD}). \quad (\text{A.17})$$

Maximiser la probabilité *a posteriori* permet en principe d'estimer  $\mathbf{v}^{OD}$  au sens du Maximum *a Posteriori*. La probabilité *a priori* peut être établie selon un critère d'entropie :

$$P(\mathbf{v}^{OD}) \propto \sum_{j=1}^c v_j^{OD} \log(v_j^{OD}). \quad (\text{A.18})$$

On peut aussi considérer une distribution de Poisson, comme cela été décrit précédemment. Maher (1983) choisit une distribution normale (Abrahamsson 1998) :  $\mathbf{v}^{OD} \sim \mathcal{N}(\boldsymbol{\mu}_{\mathbf{v}^{OD}}, \Sigma_{\mathbf{v}^{OD}})$  :

$$P(\mathbf{v}^{OD}) \propto \exp -\frac{1}{2} (\mathbf{v}^{OD} - \boldsymbol{\mu}_{\mathbf{v}^{OD}})^T \Sigma_{\mathbf{v}^{OD}}^{-1} (\mathbf{v}^{OD} - \boldsymbol{\mu}_{\mathbf{v}^{OD}}). \quad (\text{A.19})$$



---

## Algorithme de coupe minimale-flot maximal

---

### B.1 Graphe

Soit un graphe  $\mathcal{G} = [\mathcal{S}, \mathcal{A}]$  composé d'un ensemble de sommets  $\mathcal{S}$  et d'un ensemble d'arêtes  $\mathcal{A}$ . Il existe trois types de sommets dans le graphe : la source  $T_{source}$ , le puits  $T_{puits}$  (ces deux sommets forment les sommets terminaux du graphe) et les sommets intermédiaires. Chaque sommet intermédiaire est relié à chacun des deux terminaux, ainsi qu'aux autres sommets intermédiaires qui lui sont voisins dans  $\mathcal{A}$ . Par conséquent, chaque terminal est voisin de tous les autres sommets du graphe, excepté l'autre terminal. À chaque arête  $e = (r, s) \in \mathcal{A}$  reliant deux sommets  $r \in \mathcal{S}$  et  $s \in \mathcal{S}$  voisins dans  $\mathcal{S}$ , est associée un poids positif  $\omega(r, s)$  appelé capacité de l'arête. Les arêtes d'un graphe orienté sont orientées :  $(r, s) \neq (s, r)$ , et par conséquent  $\omega(r, s) \neq \omega(s, r)$ , où  $(r, s) \in \mathcal{A}$  et  $(s, r) \in \mathcal{A}$ .

### B.2 Coupe

Une coupe est une partition  $\mathcal{S}_1 \cup \mathcal{S}_2$  des sommets du graphe, séparant ce dernier en deux sous-graphes contenant chacun un terminal. Plus formellement, une coupe entre deux sommets  $r$  et  $s$  est définie de la manière suivante :

**Définition 1.** Si  $r$  et  $s$  sont deux sommets d'un graphe  $\mathcal{G} = [\mathcal{S}, \mathcal{A}]$ , une  $(r, s)$ -coupe revient à retirer l'ensemble  $\mathcal{A}_{rs}$  d'arêtes déconnectant  $r$  de  $s$ , tel qu'il n'existe plus de chemin orienté de  $r$  à  $s$  dans le graphe partiel  $(\mathcal{S}, \mathcal{A} \setminus \mathcal{A}_{rs})$ .

De manière analogue aux arêtes du graphe, à chaque coupe est associée une capacité.

**Définition 2.** La capacité  $|\mathcal{A}_c|$  d'une coupe  $\mathcal{A}_c$  est la somme des capacités des arêtes formant cette coupe :

$$|\mathcal{A}_c| = \sum_{(r,s) \in \mathcal{A}, r \in \mathcal{S}_1, s \in \mathcal{S}_2} \omega(r, s). \quad (\text{B.1})$$

Parmi toutes les coupes possibles d'un graphe, on cherche la coupe minimale.

**Définition 3.** On appelle coupe minimale dans un graphe la coupe  $\mathcal{A}_{min}$  de capacité minimale, i.e.  $\forall \mathcal{A}_c, |\mathcal{A}_{min}| \leq |\mathcal{A}_c|$ .

### B.3 Flot

La définition d'un flot est liée à la métaphore entre un graphe et des "tuyaux de plomberie". En effet, un flot  $F : \mathcal{A} \rightarrow \mathbb{R}$  représente la quantité d'eau qu'il est possible d'acheminer depuis la source  $T_{source}$  jusqu'au puits  $T_{puits}$  transitant par les arêtes du graphe, assimilées à des "tuyaux".

**Propriété 1.** Un flot vérifie les deux propriétés suivantes :

1. Loi de Kirchoff :  $\sum_r F(r, s) = \sum_q F(s, q), \forall r \in \mathcal{S} \setminus \{T_{source}, T_{puits}\}, \forall s \in \mathcal{S} \setminus \{T_{source}, T_{puits}\}, \forall q \in \mathcal{S} \setminus \{T_{source}, T_{puits}\}, \forall (r, s) \in \mathcal{A}, \forall (s, q) \in \mathcal{A}$ ,
2.  $0 \leq F(r, s) \leq \omega(r, s), \forall (r, s) \in \mathcal{A}$ .

Ces propriétés énoncées, nous pouvons introduire deux nouvelles définitions.

**Définition 4.**  $F(T_{source}, T_{puits})$  est un flot de  $T_{source}$  à  $T_{puits}$  dans le graphe  $\mathcal{G}$  si et seulement si la loi de Kirchoff est vérifiée en chacun des sommets du graphe, sauf en chacun des terminaux où le flot est égal à :

$$\sum_{r \in \mathcal{S} \setminus \{T_{source}, T_{puits}\}} F(T_{source}, r) = \sum_{s \in \mathcal{S} \setminus \{T_{source}, T_{puits}\}} F(s, T_{puits}) = |F|. \quad (\text{B.2})$$

$|F|$  est appelé "valeur d'un flot".

**Définition 5.** Le flot maximal  $F_{max}$  associé à un graphe est le flot de valeur maximale sur le graphe.

### B.4 Coupe minimale et flot maximal

Afin de relier coupe minimale et flot maximal, une nouvelle arête de capacité infinie appelée arête de retour de flot est ajoutée entre le puits et la source. Cette arête ajoutée au graphe  $\mathcal{G}$  définit un nouveau graphe  $\bar{\mathcal{G}}$ . Dans ce nouveau graphe, la loi de Kirchoff s'étend aux terminaux. Le problème de flot maximal de  $T_{source}$  à  $T_{puits}$  dans  $\mathcal{G}$  revient à trouver un flot  $\bar{F}$  dans  $\bar{\mathcal{G}}$  tel que  $|F(T_{puits}, T_{source})|$  soit maximal. Il est maintenant possible de définir la valeur d'un flot dans une coupe.

**Propriété 2.** Si  $\mathcal{A}_c = \mathcal{A}_1 \cup \mathcal{A}_2$  est une coupe, et  $F(T_{source}, T_{puits})$  est un flot de  $T_{source}$  à  $T_{puits}$  dans le graphe  $\mathcal{G}$ , alors :

$$|F(T_{source}, T_{puits})| = \sum_{r \in \mathcal{A}_1, s \in \mathcal{A}_2: (r,s) \in \mathcal{A}} F(r, s) - \sum_{r \in \mathcal{A}_1, s \in \mathcal{A}_2: (s,r) \in \mathcal{A}} F(s, r). \quad (\text{B.3})$$

Les propriétés 1 et 2 permettent de montrer que la valeur de tout flot entre  $T_{source}$  et  $T_{puits}$  est inférieure à la capacité de n'importe quelle coupe. En effet, comme  $\forall (r, s) \in \mathcal{A}, 0 \leq F(r, s) \leq \omega(r, s)$ , on a :

$$|F(T_{source}, T_{puits})| \leq \sum_{s \in \mathcal{A}_1, r \in \mathcal{A}_2: (r,s) \in \mathcal{A}} \omega(r, s), \quad (\text{B.4})$$

c'est-à-dire  $|F(T_{source}, T_{puits})| \leq |\mathcal{A}_c|$ . Cela permet d'écrire la propriété suivante :

**Propriété 3.** Si  $\mathcal{A}_c = \mathcal{A}_1 \cup \mathcal{A}_2$  est une coupe, alors  $|F_c| \leq |\mathcal{A}_c|$ , ce qui permet d'écrire :

$$|F_{max}| \leq |\mathcal{A}_{min}|. \quad (\text{B.5})$$

Ainsi, la capacité d'une coupe est une borne supérieure pour la valeur maximale d'un flot. Nous allons maintenant voir que cette borne est toujours atteinte, et qu'il y a donc équivalence entre coupe minimale et flot maximal.

**Définition 6.** Une arête  $(r, s)$  est dite saturée par un flot si  $F(r, s) = \omega(r, s)$ . Par extension, un chemin est saturé si l'une de ses arêtes est saturée.

Tant qu'une arête n'est pas saturée, il est possible d'augmenter le flot. Cette quantité de flot possiblement additionnelle est appelée capacité résiduelle.

**Définition 7.** La capacité résiduelle d'une arête  $(r, s)$  est la quantité  $\omega(r, s) - F(r, s)$  de flot qui peut encore y transiter. Par extension, la capacité résiduelle d'un chemin est la plus petite capacité résiduelle observée dans chacune des arêtes générant ce chemin.

Saturer un chemin entre  $T_{source}$  et  $T_{puits}$  consiste à augmenter la valeur du flot transitant sur ce chemin, et par conséquent à diminuer la capacité résiduelle de ce chemin. Tant qu'il reste des chemins non saturés entre  $T_{source}$  et  $T_{puits}$ , le flot n'est pas maximum. On introduit maintenant la notion de graphe résiduel.

**Définition 8.** Le graphe résiduel  $\mathcal{G}_r$  associé au flot sur un graphe  $\mathcal{G}$  possède les mêmes sommets que  $\mathcal{G}$ . En revanche, chaque arête  $(r, s)$  de  $\mathcal{G}$  est associée dans  $\mathcal{G}_r$  à :

- l'arête *forward*  $(r, s)_F$  de capacité  $\omega(r, s) - F(r, s)$ ,
- l'arête *backward*  $(r, s)_B$  de capacité  $F(r, s)$ .

Lorsque l'arête  $(r, s)$  est saturée dans  $\mathcal{G}$ , la capacité *forward* correspondante est nulle. La capacité *backward* associée à une arête  $(r, s)$  est nulle dans  $\mathcal{G}_r$  si le flot est non nul sur l'arête  $(r, s)$  dans  $\mathcal{G}$ . Ainsi, si la valeur du flot de  $T_{source}$  à  $T_{puits}$  est nulle, alors le graphe résiduel est identique au graphe initial. Tant que tous les chemins de  $T_{source}$  à  $T_{puits}$  ne sont pas saturés, il est possible d'ajouter une quantité de flot dans le graphe résiduel appelée flot résiduel.

**Propriété 4.** Soit  $F'$  le flot qui vérifie la valuation suivante sur le graphe  $\mathcal{G}$  :

$$F'(r, s) = F(r, s) + F_r(r, s)_F - F_r(s, r)_B. \quad (\text{B.6})$$

$F'$  vérifie alors les propriétés suivantes :

- $F'$  est un flot sur le graphe  $\mathcal{G}$ ,
- la valeur de  $F'$  est la somme des deux flots :  $|F'| = |F| + |F_r|$ .

**Définition 9.** Un chemin augmentant pour un flot sur un graphe  $\mathcal{G}$  est un chemin orienté de capacité non nulle reliant  $T_{source}$  à  $T_{puits}$  dans le graphe résiduel  $\mathcal{G}_r$ .

### Équivalence entre flot maximal et coupe minimale

L'équivalence entre coupe minimale et flot maximal est une conséquence du théorème de Ford et Fulkerson (Ford & Fulkerson 1962) :

**Théorème 1.** *Il y a équivalence entre les propriétés suivantes pour n'importe quel flot défini sur le graphe  $\mathcal{G}$  :*

1. *la valeur du flot est maximale,*
2. *il n'existe pas de chemin augmentant pour le flot,*
3. *il existe une coupe  $\mathcal{A}_c$  de capacité égale à la valeur du flot.*

Ainsi, il existe une coupe de capacité égale à la valeur du flot maximal dans un graphe. Or, la capacité de coupe minimale est une borne supérieure au flot maximal. Il y a donc équivalence entre coupe minimale et flot maximal :

**Théorème 2.** *La valeur maximale d'un flot entre deux sommets dans un graphe est égale à la capacité minimale d'une coupe :*

$$|F_{max}| = |\mathcal{A}_{min}|. \quad (\text{B.7})$$

## B.5 Extraction du flot maximal

Il existe deux types d'algorithmes permettant de trouver le flot maximal dans un graphe : i) les algorithmes par "saturation de chemins" (Dinic 1970, Boykov & Kolmogorov 2004) ; ii) les algorithmes par "poussage de flot" (Goldberg & Tarjan 1988, Schrijver 2003). Les algorithmes par "saturation de chemins" atteignent le flot maximal par saturation itérative de tous les chemins entre la source et le puits. En effet, la saturation d'un chemin entre la source et le puits revient à augmenter le flot sur les arêtes de ce chemin, et par conséquent à diminuer sa capacité résiduelle. Cependant, tant qu'il reste des chemins non saturés, le flot n'est pas maximal. Il suffit donc de saturer itérativement tous les chemins de la source au puits dans le graphe résiduel  $\mathcal{G}_r$ .

Le principe des algorithmes de "poussage de flot" est d'envoyer autant de flot que possible à partir de la source. Certains sommets reçoivent alors un excès de flot. Cet excès est ensuite envoyé vers d'autres sommets disponibles. Cette opération est itérée jusqu'à ce que les arêtesaturent.

---

## Estimation des échanges de fluorescence entre régions voisines

---

Nous choisissons de caractériser le nombre de vésicules par la quantité de fluorescence mesurée dans l'image afin d'estimer les volumes de vésicules qui transitent sur chacune des arêtes d'un graphe. Les données  $\mathbf{y}_t^{\text{arête}}$  ne correspondent plus au comptage de vésicules mais à une quantité de fluorescence, et prennent par conséquent des valeurs réelles, d'où  $\mathbf{y}_t^{\text{arête}} \in \mathbb{R}_+^r$ . Les vésicules sont supposées se déplacer au plus d'une région à une région voisine entre deux instants consécutifs. Il est donc possible de relier les échanges de fluorescence entre régions et les fluctuations d'intensité observées dans chaque région.

### C.1 Définition des échanges de fluorescence entre régions voisines

Soit  $o_t(\vartheta) \in \mathbb{R}$  la différence d'intensité dans la région  $R_\vartheta$  associée au sommet  $\vartheta \in \{1, \dots, n\}$  entre les instants  $t$  et  $t + 1$  et définie telle que :

$$o_t(\vartheta) = \sum_{s \in R_\vartheta} (I_{t+1}(s) - I_t(s)). \quad (\text{C.1})$$

Soit  $\{\vartheta_1, \dots, \vartheta_{|\partial R_\vartheta|}\}$  les sommets associés aux régions voisines de  $R_\vartheta$ , où  $|\partial R_\vartheta|$  désigne le nombre de régions voisines de la région  $R_\vartheta$ . Soit  $\{\varphi_1^+, \dots, \varphi_{|\partial R_\vartheta|}^+\}$  (respectivement  $\{\varphi_1^-, \dots, \varphi_{|\partial R_\vartheta|}^-\}$ ) l'ensemble des arêtes reliant les régions voisines de  $R_\vartheta$  à  $R_\vartheta$  (respectivement  $R_\vartheta$  à ses régions voisines). La différence d'intensité  $o_t(\vartheta)$  est égale à la quantité de fluorescence issue des régions voisines  $y_{t,e_1^+}^{\text{arête}} + \dots + y_{t,e_{|\partial R_\vartheta|}^+}^{\text{arête}}$  à laquelle est retranchée la quantité de fluorescence délivrée par la région  $R_\vartheta$ , c'est-à-dire  $y_{t,e_1^-}^{\text{arête}} + \dots + y_{t,e_{|\partial R_\vartheta|}^-}^{\text{arête}}$ . Sur l'exemple de la figure C.1, les échanges mesurés au sommet  $A$  permettent d'écrire :

$$o_t(A) = y_{t,2}^{\text{arête}} - y_{t,1}^{\text{arête}} + y_{t,4}^{\text{arête}} - y_{t,3}^{\text{arête}} + y_{t,6}^{\text{arête}} - y_{t,5}^{\text{arête}}. \quad (\text{C.2})$$

Si on s'intéresse à l'ensemble du graphe, on notera  $\mathbf{o}_t \in \mathbb{R}^n$  le vecteur (de dimension  $n$ ) de différence d'intensité mesurée dans chaque région entre les instants  $t$  et  $t - 1$ ,  $\mathbf{y}_t^{\text{arête}} \in \mathbb{R}_+^r$  le vecteur de dimension  $r$  représentant les échanges de fluorescence entre régions voisines à l'instant  $t$ , et  $\mathbf{M} = (M_{i,e}), i = 1, \dots, n, e = 1, \dots, r$  la matrice de dimension  $n \times r$  (*matrice de voisinage*) décrivant les relations de voisinage entre régions. Cette matrice  $\mathbf{M}$  met en correspondance l'intensité observée dans chaque région avec les échanges de fluorescence entre régions. Elle n'est donc composée que d'éléments ternaires  $\{-1, 0, 1\}$  identifiant les échanges entrants ( $M_{i,e} = 1$ ) et sortants ( $M_{i,e} = -1$ ), et l'absence d'échanges

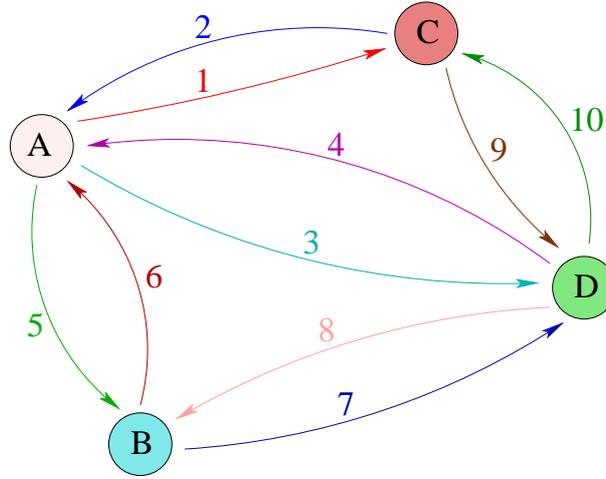


FIGURE C.1: Graphe simple. Sur ce graphe, les sommets sont caractérisés par des lettres tandis que les arêtes sont labellisées par des chiffres.

sommets	n° arête									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	-1	1	-1	1	-1	1	0	0	0	0
B	0	0	0	0	1	-1	-1	1	0	0
C	1	-1	0	0	0	0	0	0	-1	1
D	0	0	1	-1	0	0	1	-1	1	-1

TABLE C.1: Définition de la matrice de voisinage  $M$  pour le graphe de la figure C.1.

( $M_{i,e} = 0$ ). La matrice  $M$  associée au graphe illustré sur la figure C.1 est reportée dans le tableau C.1. En définitive, l'équation (C.2) étendue à l'ensemble du graphe est de la forme :

$$\mathbf{o}_t = M\mathbf{y}_t^{\text{arête}}. \quad (\text{C.3})$$

Comme  $r > n$ , le système d'équations (C.3) est par nature sous-contraint. On cherche donc de nouvelles contraintes pour estimer la matrice  $\mathbf{Y}^{\text{arête}} = (\mathbf{y}_t^{\text{arête}})_{t=1,\dots,T}$  nécessaire à l'application de la tomographie de réseaux.

## C.2 Stratégies de résolution

Le système (C.3) comporte  $n$  équations et  $r$  inconnues avec  $r > n$ . Les arêtes du graphe sont dirigées du fait des échanges entre régions dans les deux sens. Les composantes de  $\mathbf{y}_t^{\text{arête}}$  sont donc positives ou nulles, ce qui fera l'objet d'une première contrainte. En pratique, nous avons évalué trois méthodes. Dans un premier temps, nous avons évalué la solution pseudo-inverse qui ne nécessite pas *a priori* d'algorithme d'optimisation :

$$\hat{\mathbf{y}}_t^{\text{arête}} = (M^T M)^{-1} M^T \mathbf{o}_t, \quad (\text{C.4})$$

où  $M^T$  désigne la matrice transposée de  $M$ . La contrainte de positivité imposée à la solution  $\hat{\mathbf{y}}_t^{\text{arête}}$  est prise en compte de la manière suivante : une première estimation  $\mathbf{y}_t^{\text{arête}(0)}$  est obtenue grâce à l'équation

Tolérance temporelle		séquence (b)			séquence (d)			séquence (f)		
		0	1	2	0	1	2	0	1	2
PICP	PFE	35%	9%	5%	33%	9%	7%	36%	7%	3%
	PME	36%	11%	7%	35%	13%	10%	40%	13%	9%
	PBE	63%	89%	93%	65%	87%	90%	60%	87%	91%
VMCP	PFE	14%	2,5%	<b>1%</b>	9%	2%	<b>1%</b>	15%	2%	<b>0,5%</b>
	PME	71%	60%	58%	72%	65%	64%	73%	60%	59%
	PBE	29%	40%	42%	28%	35%	36%	27%	40%	41%
MCCP	PFE	36%	9%	5%	33%	8%	5%	39%	9%	5%
	PME	36%	9%	<b>5%</b>	34%	11%	<b>8%</b>	39%	11%	<b>7%</b>
	PBE	64%	91%	<b>95%</b>	66%	89%	<b>92%</b>	61%	89%	<b>93%</b>

TABLE C.2: Évaluation quantitative comparée des méthodes pseudo-inverse avec contrainte de positivité (PICP), variance minimale avec contrainte de positivité (VMCP) et moindres carrés avec contrainte de positivité (MCCP) pour estimer le nombre de vésicules se déplaçant d'une région à une autre sur les séquences d'images simulées (figure C.2 (b), (d) et (f)).

(C.4), puis les composantes négatives sont mises à 0 pour produire une nouvelle estimation  $\hat{\mathbf{y}}_t^{\circ, \text{arête}(0)}$  :

$$\hat{\mathbf{y}}_t^{\circ, \text{arête}(0)} = \max(0, \hat{\mathbf{y}}_t^{\text{arête}(0)}). \quad (\text{C.5})$$

À l'itération  $(k + 1)$ , on obtient :

$$\mathbf{y}_t^{\text{arête}(k+1)} = (\mathbf{M}^T \mathbf{M})^{-1} \mathbf{M}^T (\mathbf{o}_t - \mathbf{M} \hat{\mathbf{y}}_t^{\circ, \text{arête}(k)}). \quad (\text{C.6})$$

Cette procédure est itérée jusqu'à convergence et permet d'obtenir un estimateur  $\hat{\mathbf{y}}_t^{\text{arête}}$ .

Nous nous sommes aussi intéressés à la méthode d'estimation au sens de la variance minimale avec contrainte de positivité :

$$\hat{\mathbf{y}}_t^{\text{arête}} = \min_{\mathbf{y}_t^{\text{arête}}} (\mathbf{y}_t^{\text{arête}})^T \mathbf{y}_t^{\text{arête}} \text{ sous la contrainte } \begin{cases} \mathbf{o}_t &= \mathbf{M} \mathbf{y}_t^{\text{arête}}, \\ y_{t,e}^{\text{arête}} &\geq 0, \quad \forall e = 1, \dots, r. \end{cases} \quad (\text{C.7})$$

La solution obtenue présente des valeurs proches pour chacune de ses composantes. Si les échanges entre régions sont homogènes, alors ce critère est pertinent.

Enfin, nous avons évalué la méthode des moindres carrés itérés avec contrainte de positivité :

$$\hat{\mathbf{y}}_t^{\text{arête}} = \min_{\mathbf{y}_t^{\text{arête}}} \|\mathbf{o}_t - \mathbf{M} \mathbf{y}_t^{\text{arête}}\| \text{ sous la contrainte } y_{t,e}^{\text{arête}} \geq 0, \quad \forall e = 1, \dots, r. \quad (\text{C.8})$$

Cette méthode est rapide et largement utilisée en sciences expérimentales pour sa simplicité. Les paramètres obtenus sont ceux qui minimisent la somme quadratique des résidus du système d'équations (C.3).

### C.3 Évaluation des stratégies de résolution

Nous évaluons les trois méthodes d'estimation du vecteur  $\mathbf{y}_t^{\text{arête}}$  décrites sur trois séquences d'images simulées et illustrées sur les figures C.2 (b), (d) et (f). Dans ces séquences, seules des dynamiques de vésicules ont été simulées. Elles se déplacent sur des réseaux de plus en plus complexes illustrés sur la figure C.2 : le réseau (a) est composé de  $n = 9$  sommets et de  $r = 24$  arêtes, le réseau (c) de  $n = 21$  sommets et de  $r = 52$  arêtes, et le réseau (e) de  $n = 31$  sommets et de  $r = 76$  arêtes. Dans cette évaluation, nous exploitons directement les vecteurs  $\mathbf{o}_t$  issus des simulations. Trois critères d'évaluation sont proposés :

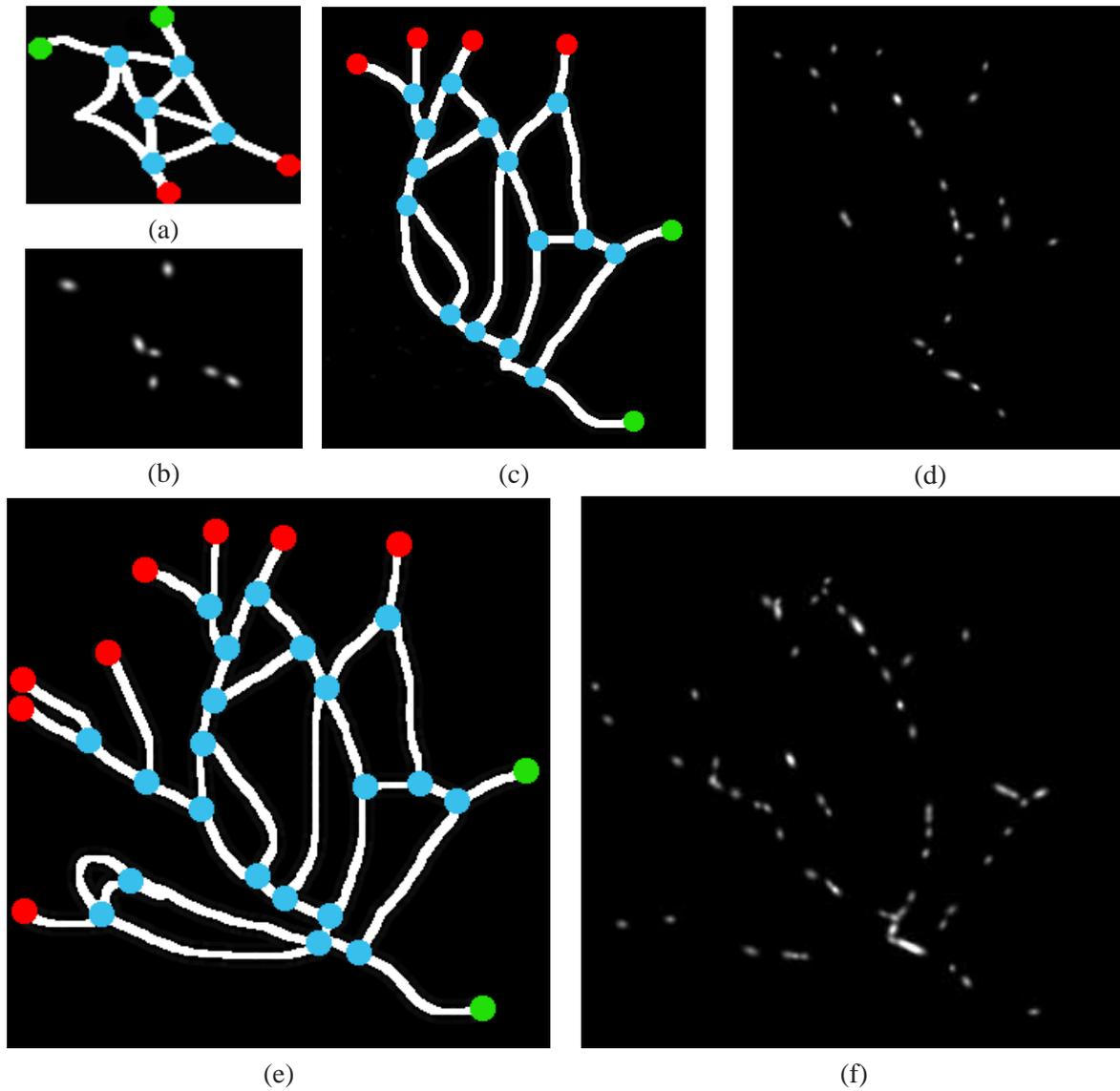


FIGURE C.2: Les séquences d'images (b), (d) et (f) sont des séquences artificielles où seules les vésicules sont simulées à partir des graphes (a), (c) et (e). Sur ces graphes, les sommets origine sont représentés par des disques verts et les sommets destination par des disques rouges. Les disques bleus correspondent aux sommets intermédiaires et les segments blancs caractérisent le réseau de microtubules qui sert de support aux vésicules en trafic.

i) *Probabilité de Bonne Estimation :*

$$\text{PBE} = \frac{\text{nombre correct de vésicules se déplaçant entre deux régions}}{\text{nombre total de transitions de vésicules entre régions voisines}},$$

ii) *Probabilité de Mauvaise Estimation :*

$$\text{PME} = \frac{\text{nombre de vésicules transitant entre deux régions qui ne sont pas estimées}}{\text{nombre total de transitions de vésicules entre régions voisines}},$$

iii) *Probabilité de Fausse Estimation :*

$$\text{PFE} = \frac{\text{nombre de vésicules faussement estimées}}{\text{nombre total de transitions de vésicules entre régions voisines}}.$$

Les résultats obtenus avec les méthodes pseudo-inverse avec contrainte de positivité (PICP), variance minimale avec contrainte de positivité (VMCP) et de moindres carrés avec contrainte de positivité (MCCP) sur les séquences simulées de la figure C.2 sont reportés dans le tableau C.2. Ces résultats sont exprimés avec une *tolérance* temporelle : une vésicule qui franchit une arête à l'instant  $t$  est considérée comme correctement estimée si le franchissement de la frontière est détecté à l'instant  $t + \Delta\tau$ . Comme seule la moyenne temporelle des échanges sera requise pour la tomographie de réseaux, de faibles décalages temporels nous semblent tout à fait acceptables à ce niveau. Nous comparons donc les résultats obtenus en prenant en compte une tolérance temporelle unitaire ( $\Delta\tau = \pm 1$ ) ou égale à 2 ( $\Delta\tau = \pm 2$ ).

On remarque dans le tableau C.2 que la plus faible PFE calculée en moyenne sur les trois séquences considérées est obtenue avec la méthode VMCP. Cependant, les résultats de PME et de PBE sont en deçà. Les méthodes PICP et MCCP ont une PFE supérieure, mais les PME et PBE sont bien meilleures. Les moins bonnes performances obtenues avec la méthode VMCP s'expliquent par le fait que cette méthode estime des résultats homogènes, ce qui n'est pas le cas dans notre application (beaucoup d'échanges entre la région associée à l'appareil de Golgi et sa région voisine, et beaucoup moins d'échanges sur les autres frontières). La méthode MCCP présente des valeurs de PFE similaires à celles de la méthode PICP, et sa PBE est légèrement supérieure. En conséquence, nous avons décidé de retenir la méthode MCCP pour la suite de notre étude.

Dans cette section, nous avons montré qu'il est possible d'estimer la quantité de vésicules se déplaçant d'une région à une autre uniquement à partir du nombre de vésicules observées dans chaque région. Toutefois, l'évaluation a été réalisée à partir des vecteurs  $\mathbf{o}_t$  issus de la simulation. Il nous faut à présent obtenir ces vecteurs directement sur la séquence d'images.

#### C.4 Modélisation des échanges de fluorescence avec une motivation biologique

Dans la section précédente, les fluctuations d'intensité observées dans chaque région sont représentées par  $\mathbf{o}_t$ , supposées ne correspondre qu'aux déplacements seuls des vésicules. Or, les variations d'intensité observées dans une séquence d'images sont aussi imputables à la diffusion des protéines dans le cytosol, ainsi qu'aux changements d'état des protéines (dissociation d'une vésicule dans le cytosol ou association de protéines présentes dans le cytosol à l'appareil de Golgi). Le système d'équations (C.3) est une représentation idéalisée ne prenant pas en compte ces variations. Une nouvelle représentation graphique s'impose pour prendre en compte tous les échanges possibles de fluorescence à l'intérieur de la cellule :

- trafic des vésicules dans la composante membranaire,
- diffusion des protéines dans la composante cytosolique,
- dissociation des vésicules dans le cytosol et association de protéines à l'appareil de Golgi (échanges entre les composantes membranaire et cytosolique).

Ces échanges s'effectuant à l'intérieur d'une même composante ou entre composantes, il est indispensable de proposer un nouveau graphe d'échanges avec l'hypothèse que les composantes peuvent être individualisées.

Au sein de la composante membranaire, seules les vésicules sont responsables des variations d'intensité. La partition précédemment établie est par conséquent encore valide. À l'intérieur de la composante cytosolique, les variations d'intensité sont liées à des processus de diffusion depuis la périphérie de la cellule vers l'appareil de Golgi. Nous identifions donc deux régions sur la composante cytosolique : l'appareil de Golgi et son complément à la cellule. Il reste à caractériser les échanges entre composantes. La *dissociation* des vésicules dans le cytosol coïncide avec les échanges entre les régions localisées à la périphérie de la cellule dans la composante membranaire, et le complément à la cellule de l'appareil de Golgi de la composante cytosolique 1.3.4. L'*association* des protéines à l'appareil de Golgi corre-

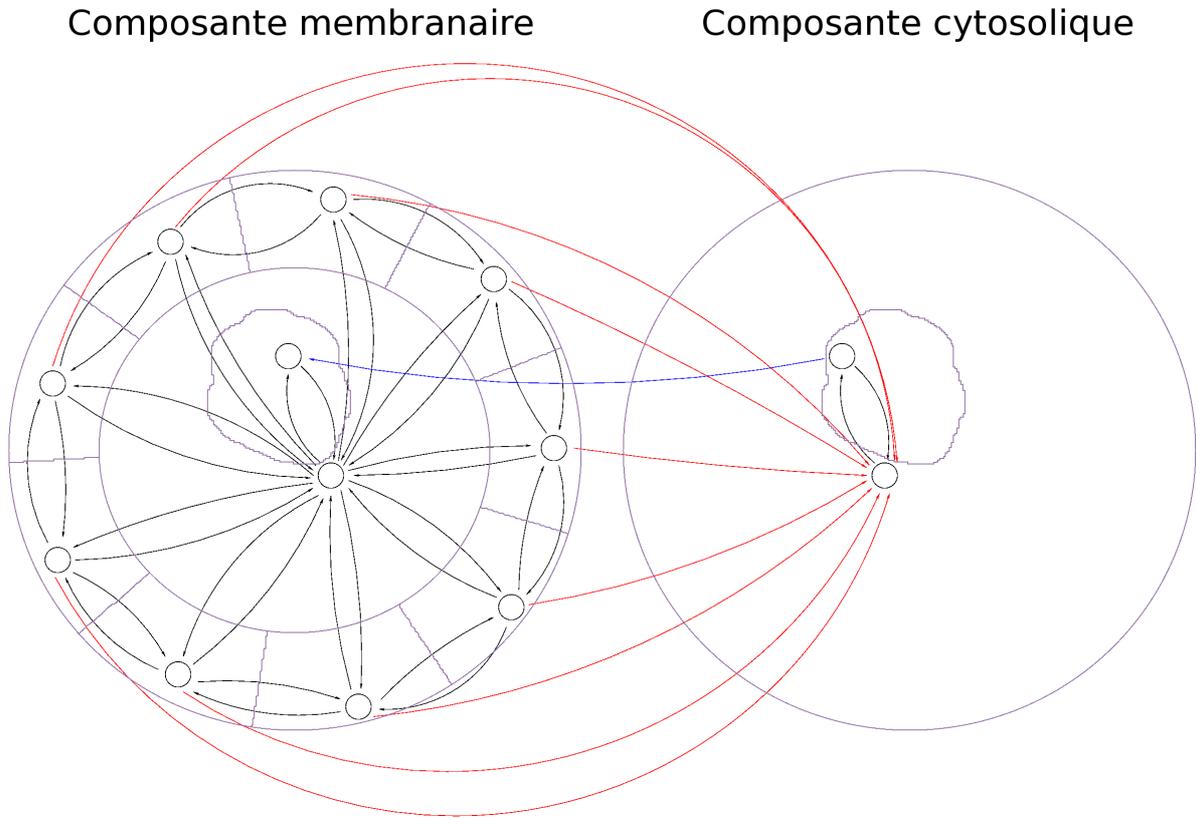


FIGURE C.3: Partition (violet) et graphe pour une cellule contrainte par un *micro-patron* de forme circulaire. Les sommets du graphe sont représentés par des cercle noirs. Les arêtes du graphe pour une même composante sont identifiées par des flèches noires. Les arêtes du graphe correspondant à des échanges depuis la composante membranaire vers la composante cytosolique sont illustrées par des flèches rouges tandis que celles correspondant à des échanges depuis la composante cytosolique vers la composante membranaire sont illustrées par une flèche bleue.

spont aux échanges entre la région associée à l'appareil de Golgi de la composante cytosolique et de la composante membranaire 1.3.4. Cette nouvelle représentation graphique est illustrée pour une cellule contrainte par un *micro-patron* de forme circulaire sur la figure C.3. Pour la composante membranaire, le graphe et la partition présentés sur les figures 5.8 (a) et (b) sont préservés. Par souci d'homogénéité, les échanges bilatéraux au sein de la composante cytosolique sont possibles, bien qu'il soit envisageable de ne les autoriser que dans une seule direction (la diffusion du cytosol se déroule de l'extérieur de la cellule vers l'appareil de Golgi). Les échanges correspondant aux vésicules en dissociation et en transit vers le cytosol sont caractérisés par des flèches rouges sur la figure C.3. Les échanges correspondant aux protéines en diffusion dans le cytosol ancrées à l'appareil de Golgi sont représentés par une flèche unique sur la figure C.3.

Sur ce graphe, la différence d'intensité entre les deux instants consécutifs  $t - 1$  et  $t$  dans chacune des régions est issue des observations obtenues après séparation des composantes et est captée par le vecteur  $\tilde{\mathbf{o}}_t$  de dimension  $n + 2$  ( $n$  régions pour la composante membranaire et deux pour la composante cytosolique). La matrice de voisinage  $\tilde{\mathbf{M}}$  est de dimension  $(n + 2) \times (r + n + 1)$ . Enfin, les différents échanges entre régions sont représentés à l'instant  $t$  par le vecteur  $\tilde{\mathbf{y}}_t^{\text{arête}}$  de dimension  $r + n + 1$  ( $r$  échanges pour la composante membranaire, 2 échanges pour la composante cytosolique et  $n - 1$  échanges

n° arête	frontière						
1	$A \rightarrow I$	11	$J \rightarrow H$	21	$B \rightarrow C$	31	$J \rightarrow D$
2	$I \rightarrow A$	12	$H \rightarrow J$	22	$C \rightarrow B$	32	$D \rightarrow J$
3	$I \rightarrow H$	13	$J \rightarrow K$	23	$C \rightarrow J$	33	$J \rightarrow E$
4	$H \rightarrow I$	14	$K \rightarrow J$	24	$J \rightarrow C$	34	$E \rightarrow J$
5	$I \rightarrow J$	15	$B \rightarrow J$	25	$G \rightarrow F$	35	$E \rightarrow F$
6	$J \rightarrow I$	16	$J \rightarrow B$	26	$F \rightarrow G$	36	$F \rightarrow E$
7	$A \rightarrow J$	17	$H \rightarrow G$	27	$J \rightarrow F$	37	$D \rightarrow E$
8	$J \rightarrow A$	18	$G \rightarrow H$	28	$F \rightarrow J$	38	$E \rightarrow D$
9	$B \rightarrow A$	19	$J \rightarrow G$	29	$C \rightarrow D$		
10	$A \rightarrow B$	20	$G \rightarrow J$	30	$D \rightarrow C$		

TABLE C.3: Numéros des arêtes correspondant aux frontières sur les figures C.4 (c) et 5.11 (b).

entre composantes). Nous avons un système d'équations légèrement augmenté :

$$\tilde{\mathbf{o}}_t = \tilde{\mathbf{M}}\tilde{\mathbf{y}}_t^{\text{arête}}. \quad (\text{C.9})$$

## C.5 Évaluation de l'estimation des échanges de fluorescence

Afin d'évaluer cette représentation, nous générons une séquence d'images selon la démarche exposée à la section 3. Cette séquence est composée de 200 images  $380 \times 380$  pour une cellule contrainte par un *micro-patron* de forme circulaire. L'image n°50 de cette séquence est présentée sur la figure C.4 (a). Les composantes membranaire et cytosolique sont isolées grâce à la méthode décrite à la section 4.2.2. Les échanges de fluorescence entre régions voisines sont ensuite estimés sur la partition présentée à la figure C.4 (b). Les échanges au niveau des frontières pour la composante membranaire, mais également ceux liés à la diffusion des protéines dans le cytosol, et les échanges entre composantes membranaire et cytosolique sont estimés (figure C.4 (e)). Nous avons donc les échanges sur 50 arêtes pour cet exemple. L'estimation étant effectuée sur une séquence artificielle d'images, il est possible de comparer les résultats obtenus avec la vérité-terrain. Comme seuls les échanges de la composante membranaire sont nécessaires pour caractériser le trafic vésiculaire, l'évaluation ne portera que sur cette partie (figure C.4 (c)). Les numéros associés à chaque arête sont répertoriés dans le tableau C.3. Les échanges estimés sur l'arête la plus fréquentée (arête n°14) sont nombreux et semblent conformes à ceux observés dans la simulation. Les échanges estimés sont néanmoins décalés dans le temps par rapport aux échanges réels (phénomène déjà remarqué précédemment). Par la suite, ce décalage aura peu de conséquences en tomographie de réseaux puisque nous ne nous intéressons qu'à la moyenne temporelle des échanges. C'est la raison pour laquelle nous comparons directement les moyennes temporelles estimée et réelle (illustrées sur la figure C.4 (f)). L'estimation est cohérente avec les échanges réels. On note toutefois une sous-estimation des échanges sur l'arête n°14, et globalement une sur-estimation des échanges sur les autres arêtes.

Malheureusement, l'hypothèse selon laquelle la quantité de fluorescence reste constante au sein d'une même vésicule tout au long de sa trajectoire doit être remise en question. Pour tester cette hypothèse, nous avons séparé les composantes membranaire et cytosolique d'une séquence réelle d'images de microscopie de fluorescence, acquise avec un microscope "spinning disk". Nous avons ensuite suivi deux vésicules dans la composante membranaire au cours du temps. Ces vésicules sont précisément choisies parce qu'elles demeurent isolées durant leur trajet. La première vésicule marquée en rouge sur les images (a-b) de la figure C.5 est très mobile, et se déplace de l'instant n°1 à l'instant n°110. La

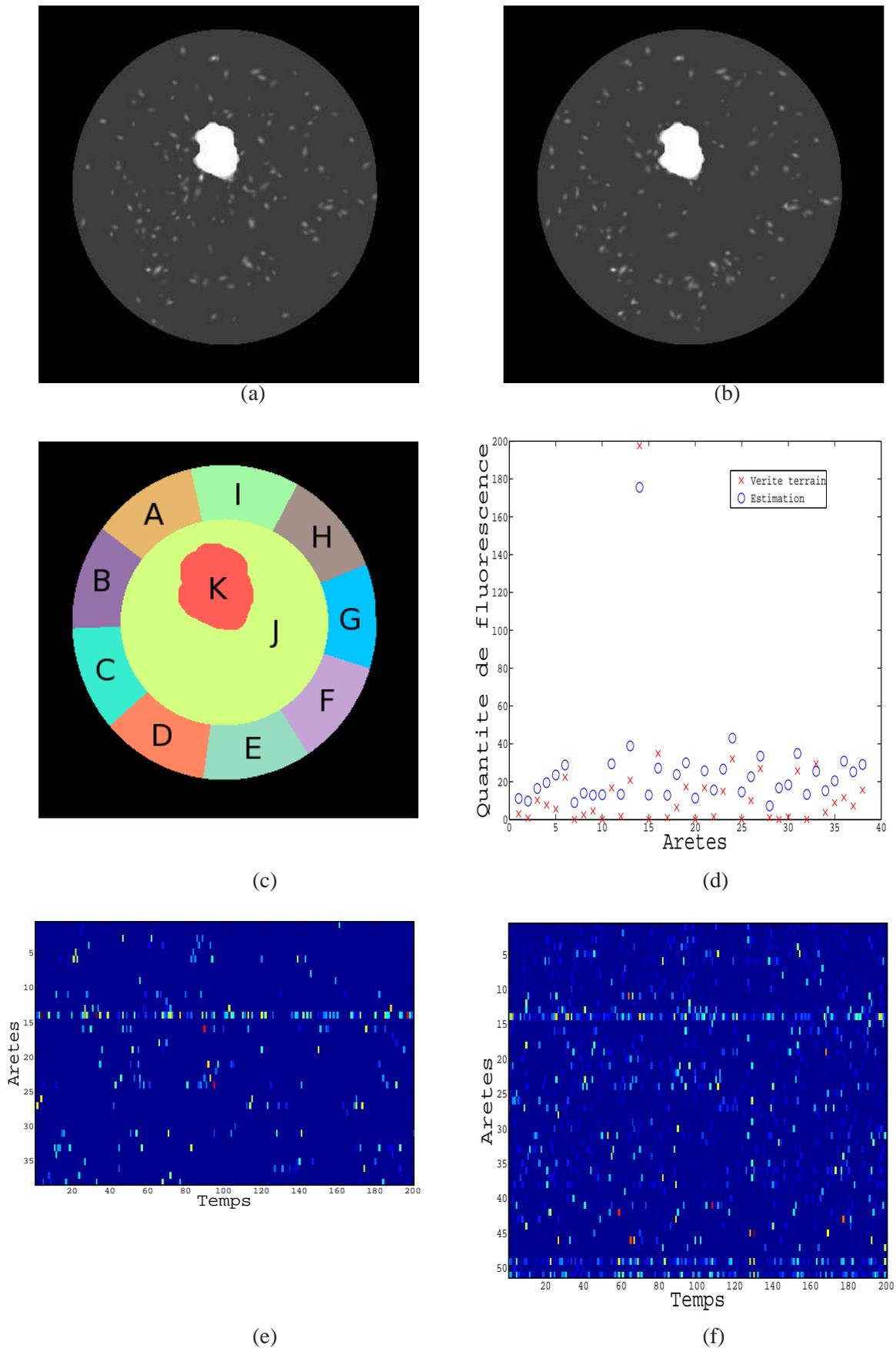


FIGURE C.4: (a-b) Images n° 50 (a) et n° 100 (b) extraites d'une séquence d'images simulée ; (c) partition utilisée pour estimer les échanges de fluorescence entre régions voisines ; (d) comparaison entre échanges moyens de la composante membranaire et échanges moyens estimés ; (e) quantité de fluorescence échangée sur chaque frontière de la composante membranaire au cours du temps ; (f) estimation des échanges de fluorescence.

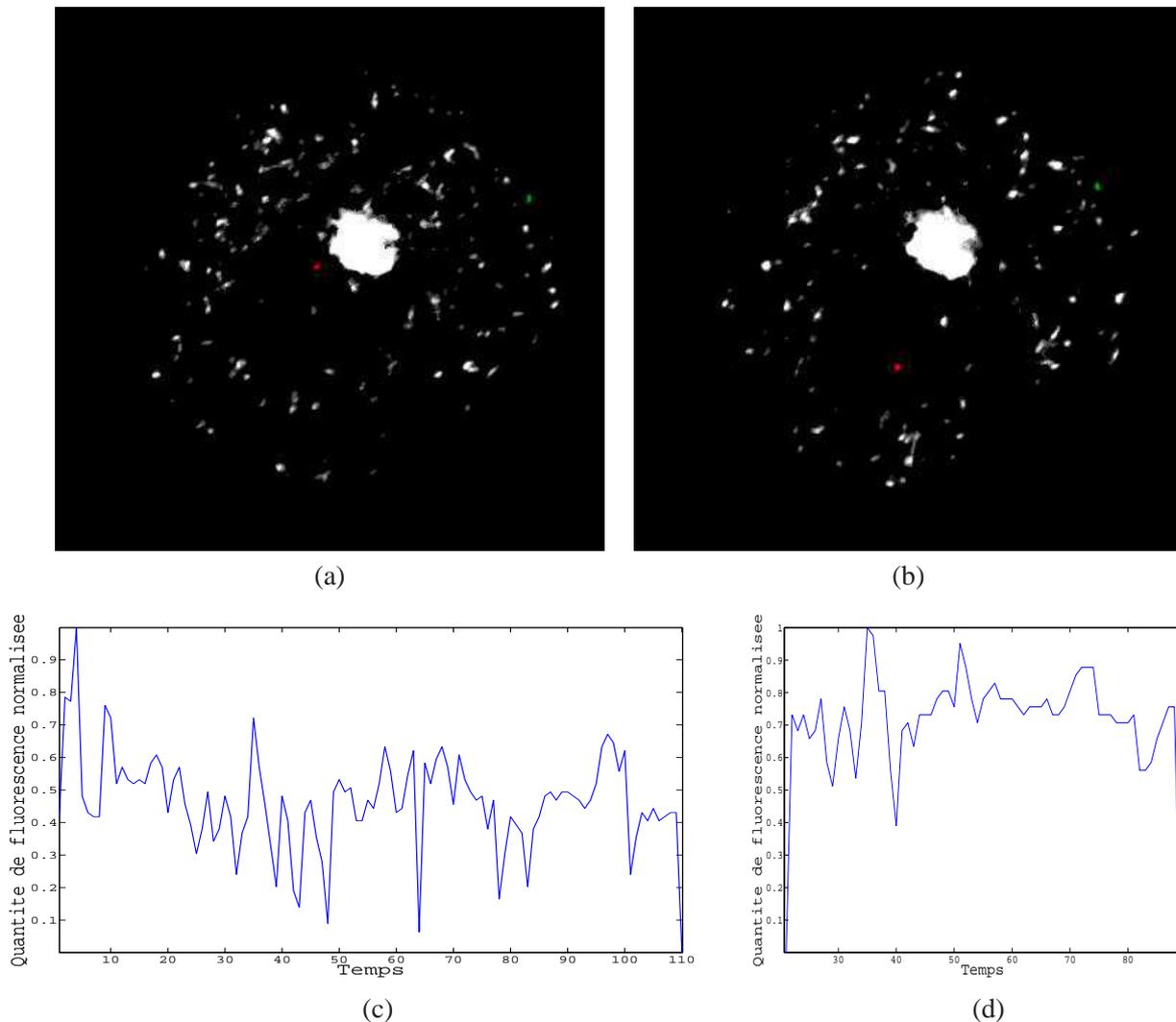


FIGURE C.5: Variation temporelle de la quantité de fluorescence pour deux vésicules (séquence d'images réelle acquise avec un microscope "spinning disk"). (a-b) Images n°25 et n°75 extraites de la séquence d'images pour lesquelles les deux vésicules considérées sont labellisées en rouge et en vert; (c) variation de la quantité de fluorescence mesurée au sein de la vésicule labellisée en rouge dans les images (a) et (b) de l'instant initial à l'instant  $t = 110$ ; (d) variation de la quantité de fluorescence mesurée dans la vésicule labellisée en vert dans les images (a) et (b) de l'instant  $t = 22$  à l'instant  $t = 88$ .

deuxième vésicule marquée en vert sur les images (a-b) de la figure C.5 est moins mobile, et son trajet s'effectue entre les instants n°22 et n°88. L'évolution de la quantité de fluorescence à l'intérieur des deux vésicules est illustrée sur la figure C.5 (c-d). Préalablement, la quantité de fluorescence est normalisée entre 0 et 1 : à chaque instant, la quantité de fluorescence est divisée par la quantité maximale mesurée. Manifestement, la quantité de fluorescence n'est pas constante pour ces deux vésicules. On peut expliquer ce phénomène par diverses raisons : tout d'abord, la détection des vésicules est peut-être imprécise. La détection de la vésicule marquée en rouge est peut-être inexacte du fait de sa forte mobilité. Cependant, la vésicule marquée en vert, plus stable, est bien détectée au cours du temps. Une imprécision sur la détection n'est donc pas seule responsable de ces variations ; on peut aussi remettre en question la séparation des composantes, sans doute imprécise également. Il est aussi possible d'envisager des échanges entre le cytosol et les vésicules au cours du trajet. Ce phénomène nécessiterait un affine-

ment du modèle biologique. Pour caractériser cet affinement, il serait possible de générer des séquences avec de nouvelles hypothèses pour le modèle biologique, et de les comparer à des données réelles. Plus probablement, lors de l'acquisition, la cellule n'est pas complètement acquise en 3D. Dans ce cas, la fluorescence hors champ (au-dessus ou au-dessous du volume acquis) n'est pas prise en compte, et ne peut être mesurée dans la séquence d'images.

---

## Table des figures

---

1.1	Grossissement d'un objet réel par l'utilisation de deux lentilles convergentes. . . . .	14
1.2	Illustration de l'effet de la diffraction de la lumière. Première ligne : projection de la distribution de l'intensité dans le plan image ; deuxième ligne : distribution de l'intensité en trois dimensions ; (a) effet de la diffraction de la lumière sur l'acquisition d'un point ; (b) effet de la diffraction de la lumière sur l'acquisition de deux points proches. . . . .	15
1.3	Utilisation des <i>trous d'aiguille</i> dans le microscope confocal. . . . .	17
1.4	Principe de l'émission lumineuse d'un fluorophore ; 1) l'énergie d'excitation absorbée par le fluorophore crée un état excité $S_2$ ; 2) une partie de l'énergie est échangée via des interactions avec le milieu et le niveau d'excitation diminue pour atteindre $S_1$ ; 3) un photon est émis par le fluorophore qui retourne dans son état fondamental $S_0$ . . . . .	18
1.5	Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission pour différents fluorophores (image extraite d'un cours sur la fluorescence réalisé par la société Zeiss). . . . .	19
1.6	La cellule eucaryote animale (figure extraite de l'encyclopédie numérique Wikipedia). . . . .	21
1.7	(a) Polymérisation des côtés "+" et "-" d'un filament du cytosquelette en fonction de sa concentration ; (b) localisation des différentes protéines Rab dans la cellule (figure extraite de (Zerial & McBride 2001)). . . . .	23
1.8	Succession d'états de la protéine Rab6 à l'intérieur de la cellule. . . . .	24
1.9	Cellule contrainte par un <i>micro-patron</i> de forme circulaire pour laquelle les protéines Rab6 sont marquées par fluorescence. L'appareil de Golgi est entouré en vert et les vésicules, en rouge. . . . .	24
1.10	Six images successives illustrant le déplacement d'une vésicule (grosse boule bleue) le long d'un microtubule par l'intermédiaire d'un moteur moléculaire. Ce dernier se déplace à la manière d'un piéton, en <i>marchant</i> sur le microtubule. Ces images sont extraites du film d'animation "The inner life of the cell", développé par l'équipe "BioVisions", université de Harvard. . . . .	25
1.11	(a) <i>Micro-patron</i> circulaire ; (b) cellule contrainte par un <i>micro-patron</i> circulaire pour laquelle les protéines Rab6 sont marquées par fluorescence ; (c) <i>micro-patron</i> en forme d'arbalète ; (d) cellule contrainte par un <i>micro-patron</i> en forme d'arbalète pour laquelle les protéines Rab6 sont marquées par fluorescence (une correction gamma est appliquée aux images (b) et (d) pour une meilleure visualisation). . . . .	27

2.1	(a) Mesures correspondant à la détection de plusieurs objets entre les instants 1 et 4 ; (b) arbre de suivi correspondant aux mesures (a) ; (c) mesures $q_t^1$ , $q_t^2$ , $q_t^3$ et $q_t^4$ réalisées à l'instant $t$ . À l'instant $t - 1$ , deux trajectoires $l_1$ (rouge) et $l_2$ (bleu) sont connues. . . . .	34
2.2	(a) Réseau de télécommunications constitué de 4 sommets et de 8 liens ; (b) réseau de télécommunications constitué de 4 sommets et de 9 liens. . . . .	44
2.3	Diagrammes markoviens correspondant aux paires OD pour le réseau de télécommunications présenté sur la figure 2.2 (b), pour lequel le routage markovien est spécifié par la matrice présentée dans le tableau 2.3. . . . .	46
2.4	(a) Réseau de télécommunications composé de trois routeurs. R1-R3 sont les routeurs, 1-6 sont les sommets origine et destination, a-r sont les liens dirigés du graphe ; (b) arbre associé au réseau (a). . . . .	53
3.1	(a) Réseau de microtubules simpliste ; (b) graphe associé au réseau de la figure (a). . . . .	58
3.2	20 portions d'images consécutives extraites d'une séquence d'images réelle sur lesquelles une vésicule se déplace de la droite vers la gauche (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation). . . . .	60
3.3	Particule gaussienne présentant la même orientation que celle du microtubule, utilisée pour représenter une vésicule. L'élongation des particules est proportionnelle à la vitesse de déplacement des vésicules. . . . .	61
3.4	Trois exemples de comportements dynamiques différents de vésicules ; (a) séquence d'images illustrant la trajectoire par à-coups observée par une vésicule ; (b) fusion de deux vésicules ; (c) rebroussement de chemin simulé par une vésicule. . . . .	64
3.5	(a) Réseau de microtubules (blanc) et paires OD sur le réseau caractérisées par des disques verts pour les origines et des disques rouges pour les destinations ; (b-d) 3 images extraites de la séquence d'images simulée avec le réseau et les paires OD de la figure (a), et les paramètres de simulation indiqués dans le tableau 3.1. . . . .	66
3.6	Succession d'états de la protéine Rab6 dans la cellule. . . . .	67
3.7	Exemples simples de zones locales situées sur le bord de la cellule. Le bord de la cellule résultant de la discrétisation sur la grille de pixels est représenté par des lignes noires tandis que le bord réel local est illustré par des lignes bleues. Les pixels sont illustrés par des croix vertes pour ceux qui sont à l'intérieur de la cellule et par des croix rouges pour ceux qui sont à l'extérieur de la cellule. . . . .	68
3.8	(a) Domaines de diffusion représenté en blanc et source de diffusion illustrée en rouge ; (b-d) trois images simulant la diffusion du disque à l'intérieur du carré ; (e) mesure de l'intensité présente dans chaque région labellisée en vert sur la figure (a). . . . .	69
3.9	Image en haut à gauche : masque définissant le domaine occupé par l'appareil de Golgi ; les images suivantes illustrent le processus de simulation de l'appareil de Golgi à différents instants. . . . .	71
3.10	(a-b) Projection 2D de l'acquisition en 3D du réseau de microtubules marqué par la GFP pour une cellule contrainte par un <i>micro-patron</i> circulaire (a) et en forme d'arbalète (b) (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation) ; (c-d) réseaux de microtubules obtenus à partir des acquisitions (a-b) en appliquant l'algorithme de Steger amélioré manuellement ; (e-f) cellule (bleu foncé) et appareil de Golgi (rouge) utilisés pour générer une séquence d'images synthétique. Le réseau de microtubules est représenté en blanc et les sommets du graphe associé sont en bleu clair. Les paires OD simulées dans les figures 3.11 et 3.12 sont définies par les disques verts (origines) et rouges (destinations). . . . .	74

3.11	(a) Images consécutives extraites d'une séquence d'images réelle avec une cellule contrainte par un <i>micro-patron</i> de forme circulaire ; (b) images consécutives extraites d'une simulation avec une cellule de forme circulaire ; (c) carte PIM et carte PIE calculées à partir de la séquence d'images réelle (a) ; (d) carte PIM et carte PIE calculées à partir de la séquence artificielle (b). . . . .	75
3.12	(a) Images consécutives extraites d'une séquence d'images réelle avec une cellule contrainte par un <i>micro-patron</i> en forme d'arbalète ; (b) images consécutives extraites d'une simulation avec une cellule en forme d'arbalète ; (c) carte PIM et carte PIE calculées à partir de la séquence d'images réelle (a) ; (d) carte PIM et carte PIE calculées à partir de la séquence artificielle (b). . . . .	76
3.13	Images consécutives extraites d'une simulation pour une cellule de forme circulaire. Une simulation de FRAP est opérée sur la deuxième image dans un domaine rond. . . . .	77
4.1	(a) Érosion (courbe rouge) et dilatation (courbe verte) appliquées à la courbe bleue en considérant un segment de longueur 5 comme "élément structurant" ; (b) Illustration de l'effet de l'algorithme "rolling ball". Sur cette figure, la boule ne peut pas entrer en contact avec la surface interne du pic, les pixels en question appartiendront donc à la composante "objet". . . . .	85
4.2	(1) Image de vidéo-microscopie ; (2-4) évolution de l'intensité au cours du temps (courbe bleue) observée aux pixels 1, 2 et 3 labellisés dans l'image (1). La courbe verte est la composante "fond" obtenue avec la méthode paramétrique, la courbe rouge est la composante "fond" identifiée par la méthode "Hullkground". . . . .	87
4.3	Illustration de la décomposition d'un signal par la méthode "Hullkground". (1) Signal synthétique observé en un pixel d'une image de microscopie de fluorescence ; (2) enveloppe convexe du signal (1) représentative de la composante "fond" ; (3) soustraction de la composante "fond" (2) au signal original (1) permettant d'identifier la composante "objet". Trois objets sont ainsi mis en évidence. . . . .	88
4.4	Les dix types de cliques pour un système de voisinage des 8 plus proches voisins. . . . .	90
4.5	À gauche : image de vidéo-microscopie où les protéines Rab6 sont marquées par la GFP (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation). En haut à droite : carte topographique représentant l'intensité observée dans la région encadrée en bleu dans l'image de gauche ; en bas à droite : carte topographique représentant l'intensité observée dans la région encadrée en rouge dans l'image de gauche. . . . .	94
4.6	(a) Image de vidéo-microscopie où les protéines Rab6 sont marquées par la GFP (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation) ; (b) carte topographique représentant l'intensité observée dans la région encadrée en rouge dans l'image (a) ; (c) carte topographique représentant le gradient spatial de la région encadrée en rouge dans l'image (a) ; (d) carte topographique représentant les potentiels d'interaction entre pixels dans la région encadrée en bleu dans l'image (a) ; (e) carte topographique représentant les potentiels d'interaction entre motifs dans la région encadrée en bleu dans l'image (a). . . . .	96
4.7	Histogramme de $y_t$ en bleu, et boîtes englobantes permettant d'estimer $\hat{\tau}_t$ . . . . .	97
4.8	Première ligne : images n°50 et n°100 extraites d'une séquence d'images simulée (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation) ; deuxième ligne : résultats produits par la méthode OAT (gauche) et CAC (droite) appliquées à l'image n°50 de la séquence d'images simulée. Les pixels bleus correspondent au Golgi, les pixels blancs aux bonnes détections, les pixels verts aux faux négatifs, et les pixels rouges aux fausses alarmes. . . . .	100

4.9	Ensemble des sites (en orange) de la composante “fond” utilisés pour interpoler l’intensité de la région détectée (en blanc). . . . .	101
4.10	(a) Image réelle de microscopie de fluorescence où les protéines Rab6 sont marquées par la GFP ; (b) les régions détectées dans l’image (a) sont labellisées en blanc, et les régions connexes appartenant à la composante “fond” et utilisées pour interpoler la composante “fond” dans les régions détectées sont labellisées en orange ; (c) composante “fond” estimée. . . . .	101
4.11	Première ligne : images n°50 et n°100 extraites d’une séquence d’images simulée (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation) ; deuxième ligne : résultats obtenus avec les méthodes OAT (gauche) et CACEF (droite) sur l’image n°100 de la séquence d’images simulée. Les pixels bleus correspondent à la région du Golgi, les pixels blancs aux bonnes détections, les pixels verts aux faux négatifs, et les pixels rouges aux fausses alarmes. . . . .	103
4.12	(a) Image n°1 extraite d’une séquence d’images réelle ; (b) résultats obtenus avec les méthodes OAT et CACEF sur l’image (a). Les pixels blancs correspondent aux pixels détectés par les deux méthodes, les pixels verts aux pixels détectés uniquement par la méthode CACEF, et les pixels rouges à ceux détectés uniquement par la méthode OAT ; (c) composante “fond” estimée avec la méthode CACEF pour l’image (a) ; (d) composante “objet” résultant de la différence entre l’image (a) et la composante “fond” (c) (une correction gamma est appliquée sur les images (a), (c) et (d) pour une meilleure visualisation). . . . .	104
4.13	Lignes impaires : images n°1 à n°24 correspondant à la région encadrée en bleu sur la figure 4.12 (b) (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation) ; lignes paires : résultats obtenus avec les méthodes OAT et CACEF calculés sur les images des lignes impaires. Les pixels blancs correspondent aux pixels détectés par les deux méthodes, les pixels verts aux pixels détectés uniquement par la méthode CACEF, et les pixels rouges à ceux détectés uniquement par la méthode OAT. Sur toutes les images, les pixels bleus correspondent aux contours des détections obtenues avec la méthode CACEF. . . . .	105
4.14	Images synthétiques générées pour évaluer les méthodes de détection avec un RSB égal à 2. (a) Image de type A présentant des spots gaussiens isotropes ; (b) image de type A présentant des spots gaussiens anisotropes ; (c) image de type B présentant des spots gaussiens isotropes ; (d) image de type C présentant des spots gaussiens isotropes. . . . .	107
4.15	(a) Image n°50 extraite de la séquence d’images synthétique de la figure 4.11 (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation) ; (b) composante vésiculaire de l’image (a) ; (c-f) différence d’intensité observée entre la vérité-terrain et les résultats obtenus avec les méthodes CACEF (c), OATIF (d), “rolling ball” (e) et “Hullkground” (f) pour la composante “objet”, sans prendre en compte la région de l’appareil de Golgi sur l’image (a). Les résultats en rouge correspondent à une sur-estimation tandis que ceux en bleu correspondent à une sous-estimation. . . . .	112
4.16	Comparaison des résultats obtenus pour l’estimation de la composante “objet” avec les méthodes CACEF (a), OATIF (b), “rolling ball” (c) et “Hullkground” (d) sur l’image n°100 de la séquence d’images présentée sur la figure 4.12 (une correction gamma est appliquée sur les images (a), (c) et (d) pour une meilleure visualisation). . . . .	113
4.17	Comparaison des résultats obtenus pour l’estimation de la composante “fond” avec les méthodes CACEF (a), OATIF (b), “rolling ball” (c) et “Hullkground” (d) sur l’image n°100 de la séquence d’images présentée sur la figure 4.12 (une correction gamma est appliquée sur les images (a), (c) et (d) pour une meilleure visualisation). . . . .	114

5.1	(a) Image de microscopie de fluorescence où les protéines Rab6 sont marquées par la GFP (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation et deux régions sont zoomées); (b) amplitude du gradient spatial calculée sur l'image (a); (c) mesure $\Phi$ calculée sur l'image (a) (dans les images (b-c), les régions bleues correspondent à de faibles valeurs tandis que les régions rouges correspondent à de fortes valeurs).	120
5.2	Approximation de la mesure $\Phi_t$ (courbe bleue) par le mélange des distributions $P_0(\cdot)$ et $P_1(\cdot)$ (courbe rouge) pour l'image présentée sur la figure 5.1. (a) Tête de la distribution; (b) queue de la distribution.	121
5.3	(a) Carte PIM extraite de la séquence d'images présentée sur la figure 5.1 (a); (b) carte de cumul de l'amplitude seuillée du gradient spatial calculée sur la figure 5.1 (a); (c) carte $\mathbf{b}^{od}$ calculée avec une probabilité de fausse alarme égale à 0,17 sur la figure 5.1 (a); (d) carte $\tilde{\mathbf{b}}^{od}$ calculée avec une probabilité de fausse alarme égale à 0,17 et un temps de séjour $t_0 = 5$ sur la figure 5.1 (a) (les régions bleues correspondent à de faibles valeurs tandis que les régions rouges correspondent à de fortes valeurs).	123
5.4	Cartes PIM calculées pour quatre séquences d'images acquises avec un microscope "spinning disk". (a-b) Les cellules acquises sont contraintes par un <i>micro-patron</i> en forme d'arbalète; (c-d) les cellule acquises sont contraintes par un <i>micro-patron</i> de forme circulaire (les régions bleues correspondent à de faibles valeurs tandis que les régions rouges correspondent à de fortes valeurs).	125
5.5	Cartes de cumul des détections consécutives en considérant $\mathbb{P}(\Phi_t(s) \geq \tau_t^{od}) = 0, 15$ et $t_0 = 5$ , calculées sur la séquence (a) de la figure 5.4 (a); (b) de la figure 5.4 (b); (c) de la figure 5.4 (c); (d) de la figure 5.4 (d) (les régions bleues correspondent à de faibles valeurs de comptage tandis que les régions rouges correspondent à de fortes valeurs de comptage).	126
5.6	Cellules de Voronoï calculées sur la séquence de la figure 5.1 en considérant la distance euclidienne et les régions de stockage comme régions "germe" (c), et les centres de gravité de ces régions comme points "germe" (a); (b) graphe associé aux cellules de Voronoï (a); (d) graphe associé aux cellules de Voronoï (c).	128
5.7	Cellules de Voronoï calculées sur la séquence de la figure 5.1 en considérant les chemins minimaux et les zones de stockage comme régions "germe" (c), et les centres de gravité de ces régions comme points "germe" (a); (b) graphe associé aux cellules de Voronoï (a); (d) graphe associé aux cellules de Voronoï (c).	131
5.8	Partition de cellules contraintes par un <i>micro-patron</i> de forme circulaire (a) et un <i>micro-patron</i> en forme d'arbalète (c). Dans les deux cas, l'appareil de Golgi est détecté et affiché en rouge sombre. La région associée est labellisée en rouge. Les deux partitions considérées sont composées de 11 domaines; (b) graphe associé à la partition (a); (d) graphe associé à la partition (c).	132
5.9	Illustration de la différence $\Delta \mathbf{b}_t$ . (a) Position d'une vésicule à l'instant $t$ ; (b) position de la même vésicule à l'instant $t + 1$ ; (c) différence $\Delta \mathbf{b}_t$ calculée entre les instants $t + 1$ (b) et $t$ (a) (la région noire correspond à la composante négative, et la région blanche à la composante positive).	133
5.10	(a-b) Images n°50 (a) et n°100 (b) extraites d'une séquence d'images simulée; (c) partition utilisée pour estimer les échanges de fluorescence entre régions voisines.	134
5.11	(a-b) Images n°50 (a) et n°100 extraites d'une séquence d'images simulée (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation); (b) partition utilisée pour estimer les échanges de fluorescence entre régions voisines.	134

5.12	Illustration d'une mauvaise mise en correspondance due à une déformation de la vésicule. (a) Position d'une vésicule à l'instant $t$ ; (b) position de la même vésicule à l'instant $t + 1$ ; (c) gradient temporel calculé entre les instants $t + 1$ (b) et $t$ (a) (la région noire correspond à la composante négative, et la région blanche à la composante positive). . . . .	135
5.13	Comparaisons entre distance euclidienne et distance géodésique. La distance euclidienne est labellisée en bleu tandis que la distance géodésique est en rouge. Les différentes régions apparaissent en niveaux de vert et la carte PIM est représentée en niveaux de gris.	138
5.14	Graphe simple. Sur ce graphe, les sommets sont caractérisés par des lettres tandis que les arêtes sont labellisées par des chiffres. . . . .	139
5.15	Échanges $y^{arête}$ observés au cours d'une séquence de vidéo-microscopie pour une cellule contrainte par un <i>micro-patron</i> de forme circulaire. Les six régions sont représentées par une couleur différente et sont identifiées par des lettres. Les échanges entre régions sont symbolisés par des flèches. L'intensité des échanges est mentionnée également. . . . .	142
5.16	(a) Image n°50 extraite d'une des dix séquences d'images simulées; (b) sommets (bleu ciel) et arêtes (blanc) du graphe, ainsi que sommets origine (vert) et sommets destination (rouge) utilisés pour générer les séquences d'images. Seuls les chemins les plus courts pour les 4 paires OD considérées sont empruntés par les vésicules (courbes jaunes dans l'image (b)); (c) estimation (moyenne et écart-type) des paires OD sur les séquences d'images simulées en considérant la partition illustrée en rouge sur l'image (b). . . . .	145
5.17	(a) Image n°50 extraite d'une des dix séquences d'images simulées; (b) sommets (bleu ciel) et arêtes (blanc) du graphe, ainsi que sommets origine (vert) et sommets destination (rouge) utilisés pour générer les séquences d'images. Seuls les chemins les plus courts pour les 8 paires OD considérées sont empruntés par les vésicules (courbes jaunes dans l'image (b)); (c) estimation (moyenne et variance) des paires OD sur les séquences d'images simulées en considérant la partition illustrée en rouge sur l'image (b). . . . .	147
5.18	(a) Comparaison des volumes de trafic observés et estimés sur les paires OD pour dix séquences d'images simulées avec le graphe, les origines et destinations, et la partition illustrés sur la figure 5.17 (b); (b) comparaison des proportions de trafic simulées et estimés sur les paires OD pour les dix même séquences d'images simulées. . . . .	148
5.19	(a-b) Images n°50 (a) et n°100 (b) d'une des dix séquences d'images simulées; (c-d) sommets (bleu ciel) et arêtes (blanc), ainsi que sommets origine (vert) et destination (rouge) utilisés pour générer les séquences d'images; (e) labels des régions de la partition (c); (f) labels des régions de la partition (d). . . . .	149
5.20	Estimation des proportions de trafic générées sur les paires OD d'après le graphe et les origines et destinations illustrées sur les figures 5.19 (c-d) sur la partition (a) de la figure 5.19 (c); (b) de la figure 5.19 (d). . . . .	150
5.21	Partition de niveau 0 (frontières rouges) et de niveau 1 (frontières rouges et jaunes). La paire OD reliant la région associée à l'appareil de Golgi à la région de gauche dans la partition de niveau 0 est représentée en noir. Les 3 paires OD définies dans la partition de niveau 1 qui sont incluses dans la paire OD représentée en noir sont étiquetées en blanc.	152
5.22	(a) Estimation des proportions de trafic simulées sur les paires OD définies sur le graphe et les origines et destinations illustrés sur les figures 5.19 (c-d); (b) erreur de l'estimation.	154
5.23	(a) Évolution de la somme de l'erreur moyenne commise en chaque paire OD en fonction de la longueur des séquences; (b) évolution de la somme des erreurs commises pour chaque paire OD en considérant une fenêtre temporelle de 300 images, et en décalant cette fenêtre toutes les 10 images sur l'ensemble de la séquence simulée composée de 1000 images. . . . .	155

5.24	Estimation des proportions de trafic sur les paires OD simulées sur la séquence composée de 1000 images en considérant les fenêtres temporelles centrées en $t=290$ (a) et $t=360$ (b).	156
5.25	(a) Estimation des proportions de trafic sur les paires OD simulées à partir du graphe et des origines et destinations illustrés sur les figures 5.19 (c-d) ; (b) erreur de l'estimation.	158
5.26	(a) Estimation des proportions de trafic sur les paires OD simulées à partir du graphe et des origines et destinations illustrés sur les figures 5.19 (c-d) ; (b) erreur de l'estimation.	159
5.27	(a) Trois images extraites de la simulation considérée pour comparer les résultats de l'analyse globale du trafic avec une méthode de suivi individuel des véhicules ; (b) suivi réalisé pendant 27 instants consécutifs dans la zone encadrée en rouge sur l'image simulée à l'instant $t = 300$ (chaque trajectoire est caractérisée par une croix de couleur différente).	160
5.28	Estimation des proportions de trafic sur les paires OD simulées à partir du graphe et des origines et destinations illustrés sur les figures 5.19 (c-d). (a) Représentation des résultats sous forme graphique et labels des régions. Les proportions de trafic estimées avec la méthode de suivi sont indiquées en marron tandis que celles estimées avec notre méthode d'analyse du trafic sont représentées en noir ; (b) proportions de trafic estimées pour chaque paire OD.	161
5.29	Comparaison entre l'estimation du nombre de véhicules sur chaque paire OD avec notre méthode d'analyse du trafic, avec une méthode de suivi individuel, et de la vérité-terrain sur une séquence d'images simulée à partir du graphe et des origines et destinations illustrés sur les figures 5.19 (c-d).	162
5.30	Deux séquences d'images réelles où les cellules sont contraintes par un <i>micro-patron</i> en forme d'arbalète (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation).	164
5.31	Deux séquences d'images réelles. La cellule acquise sur la première séquence (cadre du haut) est contrainte par un <i>micro-patron</i> en forme d'arbalète, et la cellule acquise sur la seconde séquence (cadre du bas) est contrainte par un <i>micro-patron</i> de forme circulaire (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation).	165
5.32	Résultats d'estimation du trafic véhiculaire sur trois séquences d'images réelles où la cellule est contrainte par un <i>micro-patron</i> en forme d'arbalète, en considérant une partition de l'image en cinq régions. (a) Représentation des résultats sous forme graphique et labels des régions ; (b) proportions de trafic estimées pour chaque paire OD.	166
5.33	Résultats d'estimation du trafic véhiculaire avec une approche hiérarchique sur trois séquences d'images réelles où la cellule est contrainte par un <i>micro-patron</i> en forme d'arbalète, en considérant une partition de l'image en onze régions. (a) Représentation des résultats sous forme graphique et labels des régions ; (b) proportions de trafic estimées pour chaque paire OD.	167
5.34	Deux séquences d'images réelles où les cellules sont contraintes par un <i>micro-patron</i> en forme d'arbalète (une correction gamma est appliquée pour une meilleure visualisation).	168
5.35	Résultats d'estimation du trafic véhiculaire sur trois séquences d'images réelles où la cellule est contrainte par un <i>micro-patron</i> de forme circulaire, en considérant une partition de l'image en cinq régions. (a) Représentation des résultats sous forme graphique et labels des régions ; (b) proportions de trafic estimées pour chaque paire OD.	169
5.36	Résultats de l'estimation du trafic véhiculaire avec une approche hiérarchique sur trois séquences d'images réelles où la cellule est contrainte par un <i>micro-patron</i> de forme circulaire, en considérant une partition de l'image en onze régions. (a) Représentation des résultats sous forme graphique et labels des régions ; (b) proportions de trafic estimées pour chaque paire OD.	170

5.37	Étapes nécessaires à l'estimation du trafic vésiculaire. . . . .	172
A.1	Réseau de transport simple. Les sommets sont représentés par des cercles noirs, les arcs de transport par des flèches, et les différentes régions correspondant aux sommets sont représentées par des polygones. . . . .	180
C.1	Graphe simple. Sur ce graphe, les sommets sont caractérisés par des lettres tandis que les arêtes sont labellisées par des chiffres. . . . .	192
C.2	Les séquences d'images (b), (d) et (f) sont des séquences artificielles où seules les vésicules sont simulées à partir des graphes (a), (c) et (e). Sur ces graphes, les sommets origine sont représentés par des disques verts et les sommets destination par des disques rouges. Les disques bleus correspondent aux sommets intermédiaires et les segments blancs caractérisent le réseau de microtubules qui sert de support aux vésicules en trafic. . . . .	194
C.3	Partition (violet) et graphe pour une cellule contrainte par un <i>micro-patron</i> de forme circulaire. Les sommets du graphe sont représentés par des cercles noirs. Les arêtes du graphe pour une même composante sont identifiées par des flèches noires. Les arêtes du graphe correspondant à des échanges depuis la composante membranaire vers la composante cytosolique sont illustrées par des flèches rouges tandis que celles correspondant à des échanges depuis la composante cytosolique vers la composante membranaire sont illustrées par une flèche bleue. . . . .	196
C.4	(a-b) Images n°50 (a) et n°100 (b) extraites d'une séquence d'images simulée ; (c) partition utilisée pour estimer les échanges de fluorescence entre régions voisines ; (d) comparaison entre échanges moyens de la composante membranaire et échanges moyens estimés ; (e) quantité de fluorescence échangée sur chaque frontière de la composante membranaire au cours du temps ; (f) estimation des échanges de fluorescence. . . . .	198
C.5	Variation temporelle de la quantité de fluorescence pour deux vésicules (séquence d'images réelle acquise avec un microscope "spinning disk"). (a-b) Images n°25 et n°75 extraites de la séquence d'images pour lesquelles les deux vésicules considérées sont labellisées en rouge et en vert ; (c) variation de la quantité de fluorescence mesurée au sein de la vésicule labellisée en rouge dans les images (a) et (b) de l'instant initial à l'instant $t = 110$ ; (d) variation de la quantité de fluorescence mesurée dans la vésicule labellisée en vert dans les images (a) et (b) de l'instant $t = 22$ à l'instant $t = 88$ . . . . .	199

**Estimation du trafic**

$\mathcal{G}_{trafic}$	graphe, support du trafic.
$\mathcal{V}$	ensemble des sommets de $\mathcal{G}_{trafic}$ .
$\mathcal{E}$	ensemble des arêtes de $\mathcal{G}_{trafic}$ .
$\vartheta$	sommet du graphe $\mathcal{G}_{trafic}$ .
$e$	arête du graphe $\mathcal{G}_{trafic}$ .
$n$	nombre de sommets du graphe $\mathcal{G}_{trafic}$ .
$r$	nombre d'arêtes du graphe $\mathcal{G}_{trafic}$ .
$c$	nombre de paires origine-destination du graphe $\mathcal{G}_{trafic}$ .
$\mathbf{v}^{OD}$	vecteur origine-destination, de dimension $c$ .
$\mathbf{y}_e^{OD}$	vecteur de volume du trafic sur les arêtes, de dimension $r$ .
$\mathbf{A}$	matrice de routage, de dimension $r \times c$ .
$\mathbf{M}$	matrice de voisinage, de dimension $n \times r$ .
$\mathbf{b}_t$	carte binaire de détection des véhicules.
$\Delta \mathbf{b}_t$	image de différence entre les cartes binaires consécutives $\mathbf{b}_{t+1}$ et $\mathbf{b}_t$ .
$\mathcal{OD}$	ensemble de toutes les paires OD.
$\mathcal{OD}_0^{(k)}$	ensemble des paires OD sur lesquelles le trafic estimé au niveau $k$ est nul.
$\mathcal{O}$	ensemble des paires OD ayant pour origine le sommet $\vartheta_{\mathcal{O}}$ .
$\mathbf{v}^{OD(k)}$	paires OD estimées au niveau $k$ .
$o_t(k)$	différence d'intensité dans la région associée au sommet $\vartheta_k$ entre les instants $t$ et $t + 1$ .
$\Gamma_i^j$	chemin $i$ associé à la paire origine-destination $j$ .

## Simulation du trafic

$D_{ves}$	diamètre des vésicules.
$I_{ves}$	intensité maximale moyenne observée pour les vésicules.
$v_{ves}$	module des vitesses des vésicules.
$\gamma_p$	courbe sur le support de l'image associée au chemin parcouru par la vésicule $p$ .
$s(p, t)$	position de la vésicule $p$ à l'instant $t$ .
$E(p, t)$	état de la vésicule $p$ à l'instant $t$ .
$M$	état "mouvement".
$A$	état "arrêt".
$PS$	état "pseudo-stable".
$T_{PS}(p)$	temps d'arrêt à l'état pseudo-stable de la vésicule $p$ .
$P_{NPS}$	proportion de vésicules pseudo-stables.
$b_{PS}(p)$	variable binaire qui indique si la vésicule $p$ connaît un état "pseudo-stable" au cours de son trajet.
$T_M(p)$	durée totale pendant laquelle la vésicule $p$ a été en "mouvement".
$P_A$	probabilité pour qu'une vésicule $p$ en "mouvement" s'arrête.
$P_M$	probabilité pour qu'une vésicule $p$ à l'"arrêt" reparte.
$P_{PS}$	probabilité pour qu'une vésicule $p$ passe à l'état "pseudo-stable".
$T_{PS}(p)$	durée pendant laquelle la vésicule $p$ reste "pseudo-stable".
$T_{PS}^{min}$	durée minimale pour un état "pseudo-stable".
$T_{PS}^{max}$	durée maximale pour un état "pseudo-stable".
$P_{fusion}$	probabilité de fusion pour deux vésicules.
$P_{retour}$	probabilité pour qu'une vésicule de change de chemin.
$\Delta T_{séquence}$	pas de temps utilisé pour la séquence d'images générée.
$\Delta T_{simulation}$	pas de temps utilisé pour la simulation.
<b>RM</b>	réseau de microtubules (support du trafic) défini par l'utilisateur.
$\Omega_{cell}$	masque de la cellule défini par l'utilisateur.
$\partial\Omega_{cell}$	bord de la cellule.
$\mathbf{m}_{AG}$	région occupée par l'appareil de Golgi déterminée par l'utilisateur.
<b>RG</b>	proportion de l'intensité observée dans l'appareil de Golgi.
<b>RC</b>	proportion de l'intensité observée dans le cytosol.
<b>RV</b>	proportion de l'intensité observée dans les vésicules.
$\bar{I}_c$	intensité moyenne observée dans le cytosol.
$C_0$	concentration initiale de fluorescence à l'intérieur de la cellule.
$K_d$	coefficient de diffusion dans le cytosol.
$RS$	résolution spatiale des pixels de la séquence d'images simulée.

## Chemins minimaux

$w_0$	constante.
$\mathcal{P}$	potentiel.
$\mathcal{A}(s_1, s_2)$	ensemble des courbes planes reliant les points $s_1$ et $s_2$ .
$\gamma(s_1, s_2)$	courbe dans $\mathcal{A}(s_1, s_2)$ .
$\mathcal{C}(s_1, s_2)$	chemin minimal entre les points $s_1$ et $s_2$ .
$\ell$	abscisse curviligne.
$\mathcal{U}_1$	carte d'action minimale associée à $s_1$ .
$\Gamma$	courbe plane fermée.
$n_\Gamma$	normale extérieure unitaire à $\Gamma$ .

## Détection et séparation des composantes “objet” et “fond”

$\mathbf{I}_t$	image d'intensité à l'instant $t$ .
$I_t(s)$	intensité observée au pixel de coordonnées $s = (s_x, s_y)$ .
$\mathcal{S}$	support de l'image.
$N_I$	nombre de pixels de l'image $\mathbf{I}$ ( $N_I =  \mathcal{S} $ ).
$T$	nombre d'images de la séquence.
$\varsigma$	seuil sur l'image $\mathbf{I}$ .
$\text{pim}(I)$	carte de projection d'intensité maximale.
$\text{pie}(I)$	carte de projection d'intensité en écart-type.
$\sigma_I$	écart-type du bruit mesuré sur l'image $\mathbf{I}$ .
$\Omega$	ensemble des observations.
$\Lambda$	espace d'états.
$\mathcal{G} = [\mathcal{S}, \mathcal{A}]$	graphe d'indépendance.
$\mathcal{S}$	ensemble des sommets du graphe d'indépendance.
$\mathcal{A}$	ensemble des arêtes du graphe d'indépendance.
$\mathbf{x}_t$	vecteur d'état à l'instant $t$ .
$\mathbf{y}_t$	observations à l'instant $t$ .
$\mathbf{d}_t$	champ d'étiquettes binaires indiquant la présence ou l'absence de vésicule à l'instant $t$ .
$\mathbf{f}_t$	composante “fond” à l'instant $t$ .
$\Phi_t$	mesure exploitant les motifs voisins qui caractérise la présence de fortes variations à l'instant $t$ .
$\mathbf{b}_t^{OD}$	carte binaire de détection des zones origine-destination à l'instant $t$ .
$\tilde{\mathbf{b}}^{OD}$	carte de cumul des détections consécutives.
$V$	potentiel.
$U$	fonctionnelle d'énergie.
$P(\cdot)$	densité de probabilité.
$1[\cdot]$	fonction indicatrice.
$C(\cdot)$	fonction de coût.
$\mathbf{z}_t(s)$	motif d'image centré au point $s$ , de dimension $N_z$ .
$\boldsymbol{\xi}_t$	erreurs.
$\sigma_\xi$	écart-type des erreurs.
$\mathcal{N}_s$	système de voisinage centré au point $s$ .
$\mathfrak{N}_s$	voisinage spatial centré au point $s$ .
$\tau_t$	seuil estimé sur les observations $\mathbf{y}_t$ .
$\tau_t^{OD}$	seuil estimé sur la mesure $\Phi_t$ .



- Abrahamsson, T. (1998), Estimation of origin-destination matrices using traffic counts - a literature survey, Technical report, International Institute for Applied Systems Analysis.
- Awate, S. & Whitaker, R. (2006), 'Unsupervised, information-theoretic, adaptive image filtering for image restoration', *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **28**(3), 364–376.
- Axelrod, D. (1981), 'Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence', *The journal of Cell Biology* **89**, 141–145.
- Bathe, K.-J. & Khoshgoftaar, M. (1979), Finite element formulation and solution of nonlinear heat transfer, in 'Nuclear Engineering and Design', Vol. 51, pp. 389–401.
- Baxter, R. (1992), *Exactly solved models in statistical mechanics*, Academic press.
- Bell, M. (1991), 'The estimation of origin-destination matrices by constrained generalized least squares', *Transportation research B* **25**, 13–22.
- Benson, D., Bryan, J., Plant, A., Gotto Jr, A. & Smith, L. (1985), 'Digital imaging fluorescence microscopy : spatial heterogeneity of photobleaching rate constants in individual cells', *Journal Cell Biol.* **100**, 1309–1323.
- Bergsma, C., Streekstra, G., Smeulders, A. & Manders, E. (2000), Velocity estimation of spots in 3D confocal image sequences of living cells, Technical Report 23, ISIS.
- Bergsma, C., Streekstra, G., Smeulders, A. & Manders, E. (2001), 'Velocity estimation of spots in 3D confocal image sequences of living cells', *Cytometry* **53**(4), 261–272.
- Besag, J. (1974), 'Spatial interaction and the statistical analysis of lattice systems', *Journal Royal Statistical Society* **36**, 192–236.
- Betzig, E., Patterson, G., Sougrat, R., Lindwasser, O., Olenych, S., Bonifacino, J., Davidson, M., Lippincott-Schwartz, J. & Hess, H. (2006), 'Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution', *Science* **313**(5793), 1642–1645.
- Bonneau, S., Dahan, M. & Cohen, L. (2005), Tracking single quantum dots in live cells with minimal paths, in 'Computer Vision and Pattern Recognition', Vol. 3, pp. 141–141.
- Boulanger, J., Gidon, A., Kervrann, C. & Salamero, J. (2010), 'A patch-based method for repetitive and transient event detection in fluorescence imaging', *In submission* .
- Boulanger, J., Kervrann, C. & Bouthemy, P. (2006), Simulation and estimation of fluorescence in microscopy image sequence, in 'Proc. of the MICCAI Workshop on Microscopic Image Analysis and Application to Biology', Copenhagen.

- Boulanger, J., Kervrann, C. & Bouthemy, P. (2007), 'Space-time adaptation for patch-based image sequence restoration', *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* **29**(6), 1096–1102.
- Boulanger, J., Kervrann, C. & Bouthemy, P. (2009), 'A simulation and estimation framework for intracellular dynamics and trafficking in video-microscopy and fluorescence imagery', *Medical Image Analysis* **13**, 132–142.
- Boulanger, J., Kervrann, C., Bouthemy, P., Elbau, P., Sibarita, J.-B. & Salamero, J. (2009), 'Patch-based non-local functional for denoising fluorescence microscopy image sequences', *IEEE Transactions on Medical Imaging* **28**(12).
- Boulanger, J., Pécot, T., Bouthemy, P., Salamero, J., Sibarita, J.-B. & Kervrann, C. (2008), *Microscopic image analysis for life science applications*, Artech Publishing House, chapter Simulation and estimation of intracellular dynamics and trafficking.
- Boulanger, J., Sibarita, J.-B., Kervrann, C. & Bouthemy, P. (2008), Non-parametric regression for patch-based fluorescence microscopy image sequence denoising, in 'Proceedings of the IEEE International Symposium on Biomedical Images', Paris, pp. 748–751.
- Boyd, J. E., Meloche, J. & Vardi, Y. (1999), Statistical tracking in video traffic surveillance, in 'International Conference on Computer Vision', Vol. 1, pp. 163–168.
- Boykov, Y. & Joly, M.-P. (2001), Interactive graph cuts for optimal boundary and region segmentation of objects in N-D images, in 'International Conference on Computer Vision', Vol. 1, pp. 105–112.
- Boykov, Y. & Kolmogorov, V. (2004), 'An experimental comparison of min-cut/max-flow algorithms for energy minimization in vision', *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* **26**, 1124–1137.
- Bregman, L. (1965), 'The method of successive projection for finding a common point of convex sets', *Doklady* **3**(162), 688–692.
- Brown, A., Wang, L. & Jung, P. (2005), 'Stochastic simulation of neurofilament transport in axons : The "stop-and-go" hypothesis', *Molecular Biology of the Cell* **16**, 4243–4255.
- Bruckstein, A. (1988), 'On shape from shading', *Computer Vision, Graphics, and Image Processing* **44**, 139–154.
- Bu, T., Duffield, N., Lo Presti, F. & Towsley, D. (2002), 'Network tomography on general topologies', *ACM Sigmetrics* **30**(1), 21–30.
- Buades, A., Coll, B. & Morel, J. (2005), 'A review of image denoising algorithms, with a new one', *Multiscale Modeling and Simulation : A SIAM Interdisciplinary Journal* **4**(2), 490–530.
- Cao, J., Davis, D., Vander Wiel, S. & Yu, B. (2000), 'Time-varying network tomography : Router link data', *Journal of the American Statistical Association* **95**(452).
- Cao, J., Scott, V., Wiel, S., Yu, B. & Zhu, Z. (2000), A scalable method for estimating network traffic matrices from link counts, Technical report, Bell Labs.
- Carter, B., Shubeita, G. & Gross, S. (2005), 'Tracking single particles : A user-friendly quantitative evaluation', *Physical Biology* **2**(1), 60–72.
- Cascetta, E. (1984), 'Estimation of trip matrices from traffic counts and survey data : A generalized least squares estimator', *Transportation Research* **18**(4-5), 289–299.
- Cascetta, E. & Nguyen, S. (1988), 'A unified framework for estimating or updating origin/destination matrices from traffic counts', *Transportation Research* **22**(6), 437–455.
- Casella, G. & Robert, C. (1996), 'Rao-Blackwellisation of sampling schemes', *Biometrika* **83**(1), 81–94.

- Castro, R., Coates, M., Liang, G., Nowak, R. & Yu, B. (2004), 'Network tomography : Recent developments', *Statistical science* **19**(3), 499–517.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. & Prasher, D. (1994), 'Green Fluorescent Protein as a marker for gene expression', *Science* **263**, 802–805.
- Chalmond, B. (1991), 'PSF estimation for image deblurring', *CVGIP : Graphical Models and Image Processing* **53**(4), 364–372.
- Chalmond, B. (2000), *Éléments de modélisation pour l'analyse d'images*, Vol. 33, Mathématiques et Applications edn, Broché.
- Chang, Y.-C., Kadaba, S., Doerschuk, P. & Gelfand, S. (2001), 'Image restoration using recursive Markov random field models driven by Cauchy distributed noise', *IEEE Signal Processing letters* **8**(3), 65–66.
- Chavrier, P. & Goud, B. (1999), 'The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport', *Cell biology* **11**, 466–475.
- Cheezum, M., Walker, W. & Guilford, W. (2001), 'Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles', *Biophysical Journal* **81**, 2378–2388.
- Chen, A., Cao, J. & Bu, T. (2007), Network tomography : Identifiability and Fourier domain estimation, in 'Proceedings of the 26th IEEE International Conference on Computer', pp. 1875–1883.
- Chenouard, N., Bloch, I. & Olivo-Marin, J.-C. (2009), Multiple hypothesis tracking in microscopy images, in 'Proceedings of the IEEE International Symposium on Biomedical Images', pp. 1346–1349.
- Chessel, A., Cinquin, B., Bardin, S., Kervrann, C. & J., S. (2009), Computational geometry-based scale-space and modal image decomposition : Application to light video-microscopy imaging, in 'Conference on Scale Space and Variational Methods', Vol. 5567, Voss, pp. 770–781.
- Cohen, L. (2005), 'Minimal paths and fast marching methods for image analysis', *Mathematical Models in Computer Vision : the Handbook*.
- Cohen, L. D. (2001), 'Multiple contour finding and perceptual grouping using minimal paths', *J. Math. Imaging Vis.* **14**(3), 225–236.
- Cohen, L. & Kimmel, R. (1997), 'Global minimum for active contour models : A minimal path approach', *Internation Journal of Computer Vision* **24**, 57–78.
- Criminisi, A., Cross, G., Blake, A. & Kolmogorov, K. (2006), Bilayer segmentation of live video, in 'Computer Vision and Pattern Recognition', Vol. 1, pp. 53–60.
- Crivelli, T., Piriou, G., Cernuschi-Frias, B., Bouthemy, P. & Yao, J. (2008), Simultaneous motion detection and background reconstruction with mixed-state conditional Markov random field, in 'Proc. Eur. Conf. Computer Vision', Vol. 1, pp. 113–126.
- Dantzig, G., Orden, A. & Wolfe, P. (1955), 'Generalized simplex method for minimizing a linear form under linear inequality restraints', *Pacific Journal of Mathematics* **5**, 183–195.
- Del Moral, P. (2002), 'Nonlinear filtering : Interacting particle resolution', *Comptes rendus de l'Académie des sciences* **325**(6), 653–658.
- Dempster, A., Laird, N. & Rubin, D. (1977), 'Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm', *Journal of the Royal statistical society, Series B* **39**(1), 1–38.
- Deriche, R. & Faugeras, O. (1990), Tracking line segments, in 'Proceedings of the European Conference on Computer Vision', Vol. 427, pp. 259–268.

- Dey, N., Blanc-Féraud, L., Zimmer, C., Kam, Z., Roux, P., Olivo-Marin, J. & Zerubia, J. (2006), 'Richardson-lucy algorithm with total variation regularization for 3d confocal microscope deconvolution', *Microscopy Research Technique* **69**, 260–266.
- Dijkstra, E. (1959), 'A note on two problems in connexion with graphs', *Numerische Mathematik* **1**(1), 269–271.
- Dinh, A.-T., Pangarkar, C., Theofanus, T. & Mitragotri, S. (2007), 'Understanding intracellular transport processes pertinent to synthetic gene delivery via stochastic simulations and sensitivity analyses', *Biophysical Journal* **92**, 831–846.
- Dinh, A.-T., Theofanus, T. & Mitragotri, S. (2005), 'A model for intracellular trafficking of adenoviral vectors', *Biophysical Journal* **89**(3), 1574–1588.
- Dinic, E. (1970), 'Algorithm for solution of a problem of maximum flow in a network with power estimation', *Doklady Akademii Nauk SSSR* **194**(4), 1270–1280.
- Doucet, A., Godsill, S. & Andrieu, C. (2000), 'On sequential Monte Carlo sampling methods for Bayesian filtering', *Statistics and Computing* **10**(3), 197–208.
- Duda, R. & Hart, P., eds (1973), *Pattern Classification and Scene Analysis*, Wiley, New York.
- El-Zehiry, N. & Elmaghraby, A. (2007), Brain MRI tissue classification using graph cut optimization of the Mumford-Shah functional, in 'Proc. of Image and Vision Computing', Hamilton, pp. 321–326.
- Erlander, S., Nguyen, S. & Stewart, N. (1979), 'On the calibration of the combined distribution/assignment model', *Transportation Research* **13**(3), 259–267.
- Fisk, C. (1988), 'On combining maximum entropy trip matrix estimation with user-optimal assignment', *Transportation Research* **22**(1), 69–73.
- Fisk, C. & Boyce, D. E. (1983), 'A note on trip matrix estimation from link traffic count data', *Transportation Research* **23**(5), 331–336.
- Fontaine, E., Barr, A. & Burdick, J. (2007), Tracking multiple worms and fish for biological studies, in 'Proceedings of ICCV Workshop on Dynamical Vision'.
- Ford, L. & Fulkerson, D., eds (1962), *Flows in networks*, Princeton university press.
- Freeman, W. T., Pasztor, E. C. & Carmichael, O. T. (2000), 'Learning low-level vision', *Int. J. Comput. Vision* **40**(1), 25–47.
- Garcia-Parajo, M., Segers-Nolten, G., Veerman, J.-A., Greve, J. & van Hulst, N. (2000), 'Real-time light-driven dynamics of the fluorescence emission in single Green Fluorescent Protein molecules', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(13), 7237–7242.
- Geman, S. & Geman, D. (1984), 'Stochastic relaxation, Gibbs distributions, and the Bayesian restoration of images', *PAMI* **6**(6), 721–741.
- Genovesio, A., Liedl, T., Emiliani, V., Parak, W., Coppey-Moisan, M. & Olivo-Marin, J.-C. (2006), 'Multiple particle tracking in 3D+t microscopy : Method and application to the tracking of endocytosed quantum dots', *IEEE Transactions on Image Processing* **15**(5), 1062–1070.
- Ghozi, R. & Levy, B. (1994), Critical Markov random fields and fractional Brownian motion in texture synthesis, in 'International Conference on Image Processing', Vol. 3, pp. 426–430.
- Gibbons, F., Chauwin, J., Despósito, M. & José, J. (2001), 'A dynamical model of kinesin-microtubule motility assays', *Biophysical Journal* **80**(6), 2515–2526.
- Girod, A., Storrie, B., Simpson, J., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L., Lord, J., Nilson, T. & Pepperkok, R. (1999), 'Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum', *Nature Cell Biology* **1**, 423–430.

- Goldberg, A. & Tarjan, R. (1988), 'A new approach to the maximum-flow problem', *Journal of the Association of Computing Machinery* **35**(4), 921–940.
- Goldenshuger, A. (1999), 'On pointwise adaptive nonparametric deconvolution', *Bernoulli* **5**, 907–925.
- Gordon, N., Salmond, D. & Smith, A. (1993), Novel approach to nonlinear/non-Gaussian Bayesian state estimation, in 'Proceedings of the IEEE F', Vol. 140, pp. 107–113.
- Greig, D., Porteous, B. & Seheult, A. (1989), 'Exact maximum a posteriori estimation for binary images', *Journal Royal Statistical Society* **51**(2), 271–279.
- Gunnar, A., Johansson, M. & Telkamp, T. (2004), Traffic matrix estimation on large IP backbone : A comparison on real data, in 'Proceedings of the 4th ACM SIGCOMM conference on Internet Measurement', pp. 149–160.
- Gustafsson, M., Shao, L., Carlton, P., Wang, C., Golubovskaya, I., Agard, D. & Sedat, J. (2008), 'Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination', *Biophysical Journal* **94**(12), 4957–4970.
- Gustavo, D., De Veciana, G. & Evans, B. (2004), Network tomography based on flow level measurements, in 'Proceedings of the IEEE International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing'.
- Hager, G., Dewan, M. & Stewart, C. (2004), Multiple kernel tracking with SSD, in 'Computer Vision and Pattern Recognition', Vol. 1, pp. 790–797.
- Heitz, F. & Bouthemy, P. (1993), 'Mutimodal estimation of discontinuous optical flow using Markov random fields', *PAMI* **15**(12), 1217–1232.
- Hirokawa, N. (1998), 'Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport', *Science* **279**(5350), 519–526.
- Holschneider, M., Kronland-Martinet, R., Morlet, J. & Tchamitchian, P. (1989), *A real-time algorithm for signal analysis with the help of the wavelet transform*, Wavelets, Springer.
- Hoogenboom, J., van Dijk, E., Hernando, J., van Hulst, N. & Garcia-Parajo, M. (2005), 'Power-law-distributed dark states are the main pathway for photobleaching of single organic molecules', *Physical Review Letters* **95**(9), 097401.1–097401.4.
- Horn, B. & Schunk, B. (1981), 'Determining optical flow', *Artificial Intelligence* **17**, 185–203.
- Hue, C. (2003), Méthodes séquentielles de Monte Carlo pour le filtrage non linéaire multi-objets dans un environnement bruité. Applications au pistage multi-cibles et à la trajectographie d'entités dans des séquences d'images 2D, PhD thesis, Université de Rennes 1.
- Hue, C., Le Cadre, J.-P. & Pérez, P. (2002), 'Sequential Monte Carlo methods for multiple target tracking and data fusion', *IEEE Transactions on Signal Processing* **50**(2), 309–325.
- Isard, M. & Blake, A. (1998), 'Condensation - conditional density propagation for visual tracking', *International Journal of Computer Vision* **1**, 343–356.
- Jaqaman, K., Loerke, D., Mettlen, M., Kuwata, H., Grinstein, S., Schmid, S. & Danuser, G. (2008), 'Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences', *Nature Methods* **8**(5), 695–702.
- Jiang, S., Zhou, X., Kirchhausen, T. & Wong, S. (2007), 'Detection of molecular particles in live cells via machine learning', *Cytometry Part A* **71**(8), 563–575.
- Kachouie, N., Fieguth, P., Ramunas, J. & Jervis, E. (2006), 'Probabilistic model-based cell tracking', *International Journal of Biomedical Imaging* **2006**, 1–10.
- Kapur, J., Sahoo, P., & Wong, A. (1985), 'A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram', *Computer Vision, Graphics and Image Processing* **29**, 273–285.

- Kato, Z. & Pong, T.-C. (2006), 'A Markov random field image segmentation model for color textured images', *Image and Vision Computing* **24**(10), 1103–1114.
- Kervrann, C. & Boulanger, J. (2006), 'Optimal spatial adaptation for patch-based image denoising', *IEEE Transactions on Image Processing* **15**(10), 2866–2878.
- Kitagawa, G. (1996), 'Monte Carlo filter and smoother for non-Gaussian nonlinear state space models', *Journal of Computational and Graphical Statistics* **5**, 1–25.
- Kolmogorov, V. & Wainwright, M. (2005), On the optimality of tree-reweighted max-product message-passing, in 'Conference on Uncertainty in Artificial Intelligence'.
- Kong, A., Liu, J. & Wong, W. (1994), 'Sequential imputations and Bayesian missing data problems', *Journal of the American Statistical Association* **89**, 278–298.
- Kumar, S. & Hebert, M. (2006), 'Discriminative random fields', *International Journal of Computer Vision* **68**, 179–201.
- Kwatra, V., Schödl, A., Essa, I., Turk, G. & Bobick, A. (2003), 'Graphcut textures : image and video synthesis using graph cuts', *Transactions on Graphics* **22**(3), 277–286.
- Lafferty, J., McCallum, A. & Pereira, F. (2001), Conditional random fields : Probabilistic models for segmenting and labeling sequence data, in 'Proceedings of International Conference on Machine Learning', pp. 282–289.
- Lagache, T. & Holcman, D. (2008), 'Quantifying intermittent transport in cell cytoplasm', *Physical Review* **77**(3), 30901.1–30901.4.
- Lawson, C. & Hanson, R. (1974), *Solving least squares problem*, Englewood Cliffs, NJ, Prentice Hall.
- LeBlanc, L. & Farhangian, K. (1982), 'Selection of a trip table which reproduces observed link flows', *Transportation Research* **16**(2), 83–88.
- Li, K., Miller, E., Weiss, L., Campbell, P. & Kanade, T. (2006), Online tracking of migrating and proliferating cells images with phase-contrast microscopy, in 'Proceedings of the Conference on Computer Vision and Pattern Recognition', pp. 65–72.
- Lucas, B. & T., K. (1981), An iterative image registration technique with an application to stereo vision, in 'Proc. DARPA Image Understanding Workshop'.
- Lukosz, W. (1961), 'Optical systems with resolving powers exceeding the classical limit', *Journal of the Optical Society of America* **56**(11), 1463–1471.
- Maher, M. (1983), 'Inferences on trip matrices from observations on link volumes : A Bayesian statistical approach', *Transportation Research* **17**(6), 435–447.
- Marr, D. & Hildreth, E. (1980), 'Theory of edge detection', *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* **207**(1167), 187–217.
- Metropolis, N. & Ulam, S. (1949), 'The Monte Carlo method', *Journal of the American Statistical Association* **44**, 335–341.
- Meyer, F. (1977), *Quantitative analysis of microstructures in material sciences, biology and medicine*, Riederer-Verlag, chapter Contrast feature extraction.
- Morefield, C. (1977), 'Application of 0-1 integer programming to multitarget tracking problems', *IEEE Transactions on Automatic Control* **25**(4), 856–864.
- Morin, J. & Hastings, J. (1971), 'Energy transfer in a bioluminescent system', *Journal of Cellular Physiology* **77**(3), 313–318.
- Morton, K. & Mayers, D. (2005), *Numerical Solution of Partial Differential Equations, an Introduction*, Cambridge University Press.

- Murino, V. (1996), 'Acoustic image reconstruction by Markov random fields', *Electronic letters* **32**(7), 607–698.
- Nguyen, S. (1977), Estimation of an OD matrix from network data : A network equilibrium approach, Technical Report 60, Centre de Recherche sur les Transports, Université de Montréal, Montréal.
- Nishii, R. & Eguchi, S. (2006), 'Image classification based on Markov random fields with Jeffreys divergence', *Journal of multivariate analysis* **97**(9), 1997–2008.
- Nédélec, F. (2001), 'Computer simulations reveal motor properties generating stable antiparallel microtubule interactions', *Journal of Cell Biology* **158**(6), 1005–1015.
- Nédélec, F. & Surrey, T. (2000), 'De l'action collective des moteurs à l'ordre cellulaire', *Médecine/Sciences* **16**, 739–744.
- Odobez, J. & Bouthemy, P. (1997), *Separation of moving region from background in an image sequence acquired with a mobile camera*, Kluwer, chapter 8, pp. 295–311.
- Olivo-Marin, J. (2002), 'Extraction of spots in biological images using multi-scale products', *Pattern Recognition* **35**, 1989–1996.
- Olshausen, B. & Field, D. (1997), 'Sparse coding with an overcomplete basis set : A strategy employed by V1 ?', *Vision Research* **37**(23), 3311–3325.
- Opdam, F., Echard, A., Croes, H., van den Hurk, J., van de Vorstenbosch, R., Ginsel, L., Goud, B. & Fransen, J. (2000), 'The small GTPase Rab6B, a novel Rab6 subfamily member, is cell-type specifically expressed and localised to the Golgi apparatus', *Journal of Cell Science* **113**, 2725–2735.
- Palade, G. (1975), 'Intracellular aspects of the process of protein secretion', *Science* **189**(4200), 347–358.
- Pankajashkan, P., Zhang, B., Blanc-Féraud, L., Kam, Z., Olivo-Marin, J.-C. & Zerubia, J. (2009), 'Blind deconvolution for thin layered confocal imaging', *Applied Optics* **22**(48), 4437–4448.
- Pérez, P. (2003), *Document d'habilitation, Modèles et algorithmes pour l'analyse probabiliste des images*, Université de Rennes 1.
- Pérez, P., Vermaak, J. & Blake, A. (2004), Data fusion for visual tracking with particles, in 'Issue on State Estimation', Vol. 92, pp. 495–513.
- Pinho, R., Tavares, J. & Correia, M. (2007), 'Efficient approximation of the Mahalanobis distance for tracking with the Kalman filter', *International Journal of Simulation Modelling* **6**(2), 84–92.
- Prasher, D., Eckenrode, V., Ward, W., Prendergast, F. & Cormier, M. (1992), 'Primary structure of the *Aequorea victoria* Green-Fluorescent Protein', *Gene* **111**(2), 229–233.
- Racine, V. (2006), Quantification des Dynamiques Cellulaires par Analyse de Données de Vidéo-Microscopie 3D+T, PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris 6.
- Racine, V., Hertzog, A., Jouaneau, J., Salamero, J., Kervrann, C. & Sibarita, J. (2006), Multiple target tracking of 3d fluorescent objects based on simulated annealing, in 'International Symposium on Biomedical Imaging', pp. 1020–1023.
- Racine, V., Saschse, M., Salamero, J., Fraissier, V., Trubuil, A. & Sibarita, J. (2007), 'Visualization and quantification of vesicle trafficking on a 3D cytoskeleton network in living cells', *Journal of Microscopy* pp. 214–228.
- Reid, D. (1979), 'An algorithm for tracking multiple targets', *IEEE Transactions on Automatic Control* **24**(6), 843–854.

- Reyes, M., Zhao, X., Neuhoff, D. & Pappas, T. (2007), Lossy compression of bilevel images based on markov random fields, in 'Internation Conference on Image Processing', Vol. 2, San Antonio, pp. 373–376.
- Roth, S. & Black, M. J. (2005), Fields of experts : A framework for learning image priors., in 'Computer Vision and Pattern Recognition', Vol. 2, San Diego, USA, pp. 860–867.
- Rother, C., Kolmogorov, V. & Blake, A. (2004), 'Grabcut : interactive foreground extraction using iterated graph cuts', *ACM Trans. Graphics* **23**(3), 309–314.
- Rust, J., Bates, M. & Zhuang, X. (2006), 'Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)', *Nature Methods* **3**, 793–795.
- Sage, D., Neumann, F., Hediger, H., Gasser, S. & Unser, M. (2005), 'Automatic tracking of individual fluorescence particles : Application to the study of chromosome dynamics', *IEEE Transactions on Image Processing* **14**(9), 1372–1383.
- Sahoo, P., Slaaf, D. & Albert, T. (1997), 'Threshold selection using a minimal histogram entropy difference', *Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers* **36**.
- Salamero, J. (2008), 'La "révolution verte" est en marche', *Médecine/Sciences* **24**, 987–988.
- Sbalzarini, I. & Koumoutsakos, P. (2005), 'Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology', *Journal of Structural Biology* **151**, 182–195.
- Schrijver, A. (2003), *Combinatorial Optimization : Polyhedra and Efficiency*, Vol. A, Springer.
- Seabra, M., Mules, E. & Hume, A. (2002), 'Rab GTPase, intracellular traffic and disease', *Trends Mol. Med.* **8**(1), 23–30.
- Serra, J. (1967), 'Buts et réalisation de l'analyseur de textures', *R.I.M.* **49**, 1–14.
- Shen, H., Nelson, G., Kennedy, S., Nelson, D., Johnson, J., Spiller, D., White, M. & Kell, D. (2006), 'Automatic tracking of biological cells and compartments using particle filters and active contours', *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **82**(1-2), 276–282.
- Shi, J. & Tomasi, C. (1994), Good features to track, in 'Proceedings of IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition'.
- Shimomura, O., Johnson, F. & Saiga, Y. (1962), 'Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequora*', *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **59**(3), 223–239.
- Sibarita, J.-B., Magnin, H. & De Mey, J. (2002), Ultra-fast 4D microscopy and high throughput distributed deconvolution, in 'International Symposium on Biomedical Imaging', Washington, pp. 769–772.
- Smal, I., Draegestein, K., Galjart, N., Niessen, W. & Meijering, E. (2008), 'Particle filtering for multiple object tracking in dynamic fluorescence microscopy images : Application to microtubule growth analysis', *IEEE Transactions on Medical Imaging* **27**(6), 789–804.
- Smal, I., Loog, M., Niessen, W. & Meijering, E. (2009), 'Quantitative comparison of spot detection methods in fluorescence microscopy', *IEEE Transactions on Medical Imaging* **99**, in press.
- Smal, I., Meijering, E., Draegestein, K., Galjart, N., Grigoriev, I., Akhmanova, A., van Royen, M., Houtsmuller, A. & Niessen, W. (2008), 'Multiple object tracking in molecular bioimaging by Rao-Blackwellized marginal particle filtering', *Medical Image Analysis* **12**(6), 764–777.
- Smith, M. (1979), 'The existence, uniqueness and stability of traffic equilibria', *Transportation Research* **13**, 295–304.

- Smith, P. & Buechler (1975), 'A branching algorithm for discriminating and tracking multiple objects', *IEEE Transactions on Automatic Control* **20**, 101–104.
- Snickars, F. & Weibull, J. (1977), 'A minimum information principle, theory and practice', *Regional Science and Urban Economics* **7**, 137–168.
- Soule, A., Nucci, A., Cruz, R., Leonardi, E. & Taft, N. (2004), 'How to identify and estimate the largest traffic matrix elements in a dynamic environment', *ACM Sigmetrics* **32**(1), 73–84.
- Spiess, H. (1987), 'A maximum likelihood model for estimating origin-destination matrices', *Transportation research* **21**(5), 395–412.
- Starck, J., Fadili, J. & Murtagh, F. (2007), 'The undecimated wavelet decomposition and its reconstruction', *Image Processing* **16**(2), 297–309.
- Steger, C. (1996), An unbiased detector of curvilinear structures, Technical report, Forschungsgruppe Bildverstehen, Informatik IX.
- Sternberg, S. (1983), 'Biomedical image processing', *IEEE Computer* **16**(1), 22–34.
- Tebaldi, C. & West, M. (1998), 'Bayesian inference on network traffic using link count data', *Journal of the American Statistical Association* **93**(442).
- They, M., Racine, V., Pepin, A., Dimitrov, A., Chen, Y., Sibarita, J.-B. & Bornens, M. (2006), Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity, in 'Proceeding of National Academy of Science USA', Vol. 103, pp. 19771–19776.
- They, M., Racine, V., Pepin, A., Piel, M., Chen, Y., Sibarita, J.-B. & Bornens, M. (2005), 'The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis', *Nature Cell Biology* **7**, 947–953.
- Thomann, D., Dorn, J., Sorger, P. & Danuser, G. (2003), 'Automatic fluorescent tag localization II : improvement in super-resolution by relative tracking', *Journal of Microscopy* **211**(3), 230–248.
- Thomann, D., Rines, D., Sorger, P. & Danuser, G. (2002), 'Automatic fluorescent tag detection in 3D with super-resolution : application to the analysis of chromosome movement', *Journal of Microscopy* **208**.
- Tsai, A., Wells, W., Warfield, S. & Willsky, A. (2005), 'An EM algorithm for shape classification based on level sets', *Medical Image Analysis* **9**(5), 491–502.
- Tsien, R. (1998), 'The Green Fluorescent Protein', *Annual Review of Biochemistry* **67**(4), 509–544.
- Van Zuylen, H. & Willumsen, L. (1980), 'The most likely trip matrix estimated from traffic counts', *Transportation research* **14**, 281–293.
- Vardi, Y. (1994), Network tomography I : Estimating source-destination traffic intensities from link datas - fixed routing, Technical report, AT&T Bell Laboratories.
- Vardi, Y. (1996), 'Network tomography : Estimation source-destination traffic intensities from link data', *Journal of the American Statistical Association* **91**(433), 365–377.
- Vaton, S., Bedo, J. & Gravey, A. (2005), *Performance Evaluation and Planning Methods for the Next Generation Internet*, Springer, chapter Advanced Methods for the Estimation of the Origin Destination traffic matrix, livres du 25ème anniversaire du GERAD.
- Vincent, L. (1993), 'Morphological grayscale reconstruction in image analysis : Applications and efficient algorithms', *IEEE Transactions on Image Processing* **2**(2), 176–201.
- Viola, P. & Jones, M. (2001), Rapid object detection using a boosted cascade of simple features, in 'Proceeding of the Conference on Computer Vision and Pattern Recognition', Vol. 1, pp. 511–518.
- Wang, Y. & Zhu, S. (2002), A generative method for textured motion : Analysis and synthesis, in 'Proceeding of European Conference on Computer Vision'.

- Wang, Y. & Zhu, S. (2003), Modeling textured motion : Particle, wave and sketch, in 'International Conference on Computer Vision'.
- Wardrop, J. (1952), Some theoretical aspects of road traffic research, in 'Proceedings Institute of Civil Engineers', Vol. 1, pp. 325–378.
- Wen, Q., Gao, J., Kosaka, A., Iwaki, H., Luby-Phelps, K. & Mundy, D. (2005), A particle filter framework using optimal importance function for protein molecules tracking, in 'Proceedings of the IEEE International Conference on Image Processing', Vol. 1, pp. 1161–1164.
- White, J., Johannes, L., Mallar, F., Girod, A., Stephan, G., Reinsh, S., Keller, P., Tzschaschel, B., Echard, A., Goud, B. & Stelzer, E. (1999), 'Rab6 coordinates a novel golgi to ER retrograde transport pathway in live cells', *The Journal of Cell Biology* **147**(4), 743–760.
- White, J. & Stelzer, E. (1999), 'Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells', *Trends in Cell Biology* **9**(2), 61–65.
- Wilks, S. (1962), *Mathematical Statistics*, John Wiley.
- Wilson, S. (1976), 'Statistical notes on the evaluation of calibrated gravity models', *Transportation Research* **10**, 343–345.
- Wolf, J., Burgard, W. & Burkhardt, H. (2005), 'Robust vision-based localization by combining an image-retrieval system with Monte Carlo localization', *IEEE Transactions on Robotics* **21**(2), 208–216.
- Work, S. S. & Warshaw, D. M. (1992), 'Computer-assisted tracking of actin filament motility', *Analytical Biochemistry* **202**(2), 275–285.
- Wright, W. (1989), 'A Markov random field approach to data fusion and colour segmentation', *Image and Vision Computing* **7**(2), 144–150.
- Wu, Y., Lin, J. & Huang, T. (2005), 'Analysing and capturing articulated hand motion in image sequences', *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* **27**(12), 1910–1922.
- Yang, H., Sasaki, T., Iida, Y. & Asakura, Y. (1992), 'Estimation of origin-destination matrices from link traffic counts on congested networks', *Transportation Research* **26**(6), 417–434.
- Yao, J. & Odobez, J.-M. (2008), Fast human detection from videos using covariance features, in 'European Conference on Computer Vision Visual Surveillance workshop', Marseille.
- Yen, J. (1971), 'Finding the k shortest loopless paths in a network', *Management Science* **17**, 712–716.
- Younes, L. (2000), Calibrating parameters of cost functionals, in 'European Conference on Computer Vision', Vol. 1843, Dublin, pp. 212–223.
- Zerial, M. & McBride, H. (2001), 'Rab proteins as membrane organizers', *Nature Rev. Molecular Cell Biology* **2**(2), 107–117.
- Zhang, Y., Roughan, M., Lund, C. & Donoho, D. (2003), An information-theoretic approach to traffic matrix estimation, in 'ACM SIGCOMM'03', pp. 301–312.
- Zhu, S., Wu, Y. & Mumford, D. (1998), 'Frame : Filters, Random fields, and Minimax Entropy – towards a unified theory for texture modeling', *International Journal of Computer Vision* **27**(2), 1–20.



## Résumé

Cette thèse traite de l'analyse et de la simulation du trafic vésiculaire sur des séquences d'images de microscopie de fluorescence. À contre-courant des approches habituelles exploitant un suivi individuel des vésicules, nous avons développé une approche globale (tomographie de réseaux) inspirée de travaux antérieurs sur l'analyse du trafic routier et l'analyse du trafic sur des réseaux de télécommunications. Cette approche repose sur l'utilisation de comptages locaux de vésicules couplés à une procédure de routage qui permettent d'estimer les trajectoires globales des vésicules sur l'ensemble d'une séquence d'images. Contrairement aux précédentes applications de la tomographie de réseaux, les comptages et le routage sont également des inconnues du problème. Afin de mesurer les comptages locaux de vésicules, nous avons développé une méthode de séparation des composantes "objet" et "fond" dans des séquences de microscopie de fluorescence. Cette méthode exploite un terme de détection non local reposant sur la similarité entre motifs de l'image et utilise la composante "fond" estimée comme "référence" pour améliorer la détection des vésicules. Par ailleurs, la procédure de routage dépend des données observées. Dans le cas de l'estimation du trafic, le routage est établi à partir du comptage des vésicules ; dans le cas de simulations, le routage est contrôlé par l'utilisateur. La génération de séquences synthétiques a permis d'évaluer quantitativement la méthode d'estimation du trafic vésiculaire. Cette méthode a également été évaluée sur des séquences d'images réelles de microscopie dans le cadre d'une étude précise sur le transport membranaire et le trafic vésiculaire régulé par des isoformes de la protéine Rab6.

**Mots-clés :** tomographie de réseaux, analyse globale du trafic, suivi, modélisation du trafic, routage, vidéo-microscopie de fluorescence, modélisation markovienne, séparation de composantes, détection de spots.

## Summary

This thesis presents a new method for analyzing and simulating vesicular trafficking in fluorescence video-microscopy. Instead of tracking each individual vesicle, we have developed a global approach (network tomography) that is inspired from previous works on road traffic analysis and network telecommunication traffic analysis. This approach makes use of local countings of vesicles and a routing procedure to recover the global trajectories of vesicles on a whole image sequence. Contrary to the previous applications of network tomography, the local countings and the routing are also unknown in our case. In order to measure local countings of vesicles, we have developed a method for object and background estimation in fluorescence video-microscopy. This method exploits a non local detection term based on the similarity between image patches and considers the estimated background component as a reference to improve the detection. The routing procedure depends on vesicle countings for the traffic analysis, and is controlled by the user for the simulations. The generated synthetic image sequences enabled to evaluate quantitatively the vesicular trafficking estimation method. This method was also tested on real image sequences in the context of a study on the membranar transport and vesicular trafficking regulated by Rab6 isoforms.

**Keywords :** network tomography, traffic global analysis, tracking, traffic modelisation, routing, fluorescence video-microscopy, Markovian modelisation, object and background separation, blob detection.